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

RAY SILVA DE ALMEIDA

INVESTIGAÇÃO MULTIDIMENSIONAL DE COMPOSTOS TIAZÓLICOS LIVRES E NANOESTRUTURADOS COMO ESTRATÉGIA PARA SUPERAÇÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA: INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO, MODULAÇÃO DA PERMEABILIDADE DE MEMBRANA E PREDIÇÃO FARMACOCINÉTICA POR ADME-DOCKING

Crato – CE
2026

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

RAY SILVA DE ALMEIDA

INVESTIGAÇÃO MULTIDIMENSIONAL DE COMPOSTOS TIAZÓLICOS LIVRES E NANOESTRUTURADOS COMO ESTRATÉGIA PARA SUPERAÇÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA: INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO, MODULAÇÃO DA PERMEABILIDADE DE MEMBRANA E PREDIÇÃO FARMACOCINÉTICA POR ADME-DOCKING

Tese apresentado ao programa de pós-graduação em química biológica, da universidade regional do cariri, como requisito para obtenção do título de doutor em química biológica.

Orientador: Prof. Dr.Saulo Relison Tintino

Coorientador: Profa. Dra. Cicera Datiane Moraes de Oliveira Tintino

Crato – CE
2026

Ficha Catalográfica elaborada pelo autor através do sistema
de geração automático da Biblioteca Central da Universidade Regional do Cariri - URCA

De Almeida, Ray SILVA

A447i INVESTIGAÇÃO MULTIDIMENSIONAL DE COMPOSTOS TIAZÓLICOS LIVRES E NANOESTRUTURADOS COMO ESTRATÉGIA PARA SUPERAÇÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA: INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO, MODULAÇÃO DA PERMEABILIDADE DE MEMBRANA E PREDIÇÃO FARMACOCINÉTICA POR ADME-DOCKING / Ray SILVA De Almeida. Crato - CE, 2026.

149p. il.

Tese. Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade Regional do Cariri - URCA.

Orientador(a): Prof. Dr. Saulo Relison Tintino

Coorientador(a): Prof.ª Dr.ª Cicera Datiane Moraes de Oliveira Tintino

1.Lipossomas, 2.Tiazólicos, 3.MepA, 4.Expressão gênica, 5.Resistência bacteriana; I.Título.

CDD: 571.7

ATA DE DEFESA DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA

Aos vinte e seis dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte e seis (2026), às14:00 horas, de forma remota, na cidade de Crato-CE, realizou-se a defesa pública da tese de doutorado do aluno **Ray Silva Almeida** , intituladaz **"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE COMPOSTOS TIAZÓLICOS, LIVRES E INCORPORADOS EM NANOFORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS, COMO INIBIDORES DE BOMBAS DE EFLUXO BACTERIANAS"**, sob a orientação do Prof. Dr. Saulo Relison Tintino da Universidade Regional do Cariri – URCA. A Banca Examinadora foi composta pelo, Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior (Membro Titular Interno - UFS), Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Júnior (Membro Titular Externo - UFAL). Profa. Dra. Janaína Esmeraldo Rocha (Membro Avaliadora Interna - URCA). Profa. Dra. Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa (Membro Titular Externa - URCA). A sessão foi aberta pelo presidente da Banca Prof. Dr. Saulo Relison Tintino. O candidato teve cinquenta minutos para expor oralmente o seu trabalho, sendo em seguida arguido durante quarenta minutos por cada membro da Banca. Encerrada a arguição, a Comissão Examinadora emitiu o parecer final sobre a DEFESA, sendo o aluno APROVADO. De acordo com o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, o aluno deverá efetuar as modificações sugeridas, que serão conferidas por seu orientador e entregar a versão final da tese, à Coordenação do PPQB num prazo máximo de 60 (sessenta) dias após a defesa. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Banca deu por encerrada a sessão pública de defesa, da qual, para constar, eu, Iúna Lobo de Almeida Nunes, Secretária do Programa, lavrei e assinei a presente Ata juntamente com os demais Membros da Banca Examinadora, em Crato-CE, 26 de fevereiro de 2026.

gov.br Documento assinado digitalmente
SAULO RELISON TINTINO
Data: 27/02/2026 07:39:26 -0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Saulo Relison Tintino (Orientador -URCA)

gov.br Documento assinado digitalmente
LUCINDO JOSE QUINTANS JUNIOR
Data: 01/03/2026 10:26:27 -0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior(Avaliador Interno - UFS)

Prof. Dr . Edeildo Ferreira da Silva Júnior (Avaliador Externo - UFAL)

Profa. Dra. Janaina Esmeraldo Rocha (Avaliadora Interna - URCA)

Profa. Dra. Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa (Avaliadora Externa - URCA)

Iúna Lobo de Almeida Nunes - Secretária do PPQB

RAY SILVA DE ALMEIDA

INVESTIGAÇÃO MULTIDIMENSIONAL DE COMPOSTOS TIAZÓLICOS LIVRES E NANOESTRUTURADOS COMO ESTRATÉGIA PARA SUPERAÇÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA: INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO, MODULAÇÃO DA PERMEABILIDADE DE MEMBRANA E PREDIÇÃO FARMACOCINÉTICA POR ADME-DOCKING

Tese apresentado ao programa de pós-graduação em química biológica, da universidade regional do cariri, como requisito para obtenção do título de doutor em química biológica.

Defesa de tese aprovada em: 26/02/2026

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Saulo Relison Tintino
Universidade Regional do Cariri – URCA.
Orientador

Prof. Dr. Lucindo Jose Quintans Junior
Universidade Federal da Paraiba - UFPB
Membro Titular Interno

Profa. Dra. Janaína Esmeraldo Rocha
Universidade Regional do Cariri - URCA

Membro Titula Interno

_____

Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Junior
Universidade Federal de Alagoas - UFAL
Membro Titular Externo

_____

Profa. Dra. Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa
Universidade Regional do Cariri - URCA
Membro Titula Externo

_____

Prof. Dr. Jaime Ribeiro Filho
Fundação Osvaldo Cruz - Fiocruz
Membro Suplente Interno

_____

Profa. Dra. Jacqueline Cosmo Andrade Pinheiro
Universidade Federal do Cariri - UFCA
Membro Suplente Externo

À minha esposa, pelo amor, apoio e compreensão em todos os momentos.
Aos meus pais, pelo incentivo, cuidado e por nunca deixarem de acreditar em mim.
À minha irmã, pelo carinho e companheirismo ao longo desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me conceder saúde, força e perseverança para concluir esta etapa tão importante da minha formação.

Aos meus orientadores, Professor Doutor Henrique Douglas e Professor Doutor Saulo Relison, pela confiança, orientação, disponibilidade e pelas contribuições científicas fundamentais para o desenvolvimento desta tese. Seus conhecimentos e dedicação foram essenciais ao longo de todo o percurso.

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram e estiveram comigo durante todo o processo, em especial Ana Carolina e Priscilla Ramos.

Aos professores, colegas e colaboradores do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - LMBM que, de alguma forma, contribuíram com discussões, sugestões e apoio técnico ou científico, enriquecendo este trabalho.

À instituição, ao programa de pós-graduação e CAPES, pela estrutura, recursos, pelas oportunidades e pelo ambiente acadêmico que possibilitaram a realização desta pesquisa.

À minha esposa, Ewellyn Sarah, pelo amor, paciência e apoio incondicional em todos os momentos, especialmente nos mais desafiadores. Sua compreensão foi essencial para que este sonho se tornasse realidade.

Aos meus pais, José Carmo e Maria Almeida, pelo incentivo constante, pelos valores transmitidos e por acreditarem em mim desde o início. À minha irmã, Raiane Almeida, pelo carinho, apoio e presença ao longo desta caminhada.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta trajetória e contribuíram para a conclusão desta tese e sonho.

“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria, e o conhecimento do Santo é entendimento.”

Provérbios 9:10

Esquema 1: Estrutura geral da tese.....25

Figura 1: Visualização de *Staphylococcus aureus* em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....30

Figura 2: Visualização da bactéria Pseudomonas aeruginosa por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....31

Figura 3: Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos.....34

Figura 4: Estrutura dos representantes de cada superfamília de bombas de efluxo.....37

Figura 5: Estrutura da proteína MepA.....39

Figura 6: Representação em fitas da estrutura de NorA.....41

Figura 7: Representação esquemática dos vários tipos de lipossomas, mostrando a base da sua classificação em termos de tamanho e números de lamelas em: vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelarespequenas (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV), vesículas unilamelares gigantes (GUV), lipossomas multivesiculares (MVL), vesículas oligolamelares pequenas (SOV),vesículas oligolamelares grande (LOV), vesículas oligolamelares gigante (GOV). Cada linha representa uma bicamada lipídica(lamela).....47

Figura 8: Estrutura do lipossoma convencional.....48

Figura 9: Estrutura lipossoma furtivo.....48

Figura 10: Estrutura lipossoma .tiônico.....49

Figura 11: Estrutura lipossoma sítio-específico.....50

Capitulo 1

Tabela 1: Características físico-químicas de nanopartículas lipossomais contendo derivados tiazólicos baseados no eugenol LF 12, 13, 16 e 26.....61

Tabela 2: Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) dos derivados tiazólicos baseados no eugenol encapsulados por lipossomas.....62

Figura 1: Avaliação da atividade potencializadora antibiótica de norfloxacina e gentamicina associado com os derivados LF 12, 13, 16 e 26, frente a cepa de *Staphylococcus aureus* 10.....62

Figura 2: Avaliação da atividade potencializadora antibiótica de norfloxacina e gentamicina associado com derivados LF 12, 13, 16 e 26, frente a cepa de Pseudomonas aeruginosa 24.....63

Figura 3: Avaliação da inibição de bombas de efluxos norA e mepA do CCCP, CPZ e dos derivados LF 12, 13, 16 e 26, associados com brometo de etídio frente as cepas de *Staphylococcus aureus* 1199B e K2068. 64

Figura 4: Avaliação da inibição de bombas de efluxos norA e mepA pelo CCCP, CPZ e dos derivados LF 12, 13, 16 e 26, associados com norfloxacina e ciprofloxacina, frente as cepas de *Staphylococcus aureus* 1199B e K2068. 65

Capítulo 2

Tabela 1: Primers para a expressão dos genes *mepA* e 23s.....85

Tabela 2: Resultado da avaliação da concentração inibitória mínima dos derivados tiazólicos baseados no eugenol e da substância CCCP.....86

Tabela 3: Interações (e distâncias) entre LF13 e CCCP e o modelo de MepA.....92

Figura 1: Avaliação da inibição da bomba de efluxo MepA pelos derivados tiazólicos baseados em eugenol e CCCP associados com brometo de etídio frente a cepa de *Staphylococcus aureus* K2068.....87

Figura 2: Avaliação da inibição da bomba de efluxo MepA pelos derivados tiazólicos baseados em eugenol e CCCP associados com ciprofloxacina, frente a cepa de *Staphylococcus aureus* K2068.....88

Figure 3: Avaliação da inibição da bomba de efluxo MepA por meio da medição da emissão de fluorescência em cepas de *S. aureus* K2068 (B) tratadas com os derivados LF12 a LF22. EtBr = brometo de etídio.....89

Figura 4: Avaliação da expressão do gene mepA na presença de compostos derivados tiazólicos baseados em eugenol(R1=LF13 e R2=LF21) em combinação com o antibiótico em comparação com o controle com antibiótico.....90

Figura 5: Conformações de todos ligantes (LF12: marrom, LF13: roxo. LF15: amarelo, LF16: laranja, LF20: azul, LF21: rosa, LF22: cinza, CCCP: verde) no sítio de ligação a MepA (A) e destaque para LF13 e CCCP (B).....91

Figura 6: Conformação (A) e interações (B) de LF13 no sítio de ligação a MepA.....92

Figura 7: Conformação (A) e interações (B) do CCCP no sítio de ligação a MepA.....92

Apêndice

Tabela 1: Resultado da avaliação da concentração inibitória mínima dos derivados tiazólicos baseados no eugenol e da substância CCCP.....157

Figura 1X: Avaliação da inibição da bomba de efluxo NorA pelos derivados tiazólicos baseados em eugenol e CCCP associados com brometo de etídio frente a cepa de *Staphylococcus aureus* 1199B. N = 3. ****p < 0,0001 indica diferenças significativas entre os grupos. A significância estatística foi determinada por ANOVA unidirecional e teste de post-hoc de Bonferroni.....160

Figura 2X: Avaliação da inibição da bomba de efluxo NorA pelos derivados tiazólicos baseados em eugenol e CCCP associados com norfloxacino frente a cepa de *Staphylococcus aureus* 1199B. N = 3. ****p < 0,0001 indica diferenças significativas entre os grupos. A significância estatística foi determinada por ANOVA unidirecional e teste de post-hoc de Bonferroni.....161

Figure 3X. Evaluation of NorA efflux pump inhibition by measuring fluorescence emission in *S. aureus* 1199B strains treated with derivatives C12 to C21. EtBr = ethidium bromide; **** = p < 0.0001 *vs* EtBr.....162

Figura 4X. Posição dos compostos na cavidade central de NorA (A) e conformações de C21 e CCCP (B). As moléculas estão representadas nas seguintes cores: C12 – verde, C13 – rosa, C15 – azul, C16 – vermelho, C20 – cinza, C21 – laranja, C22 – roxo, CCCP – amarelo.....163

Figura 5X. Melhor conformação de C21 no sítio de ligação (A) e interações com o transportador NorA (B).....164

Figura 6X. Melhor conformação do CCCP no sítio de ligação (A) e interações com o transportador

NorA
(B).....165

Figura 7X: Avaliação da alteração da permeabilidade de membrana pelos derivados tiazólicos frente à cepa de *Staphylococcus aureus* 1199B. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida do teste pós-hoc de Bonferroni. Diferença estatisticamente significativas são indicadas por ****p < 0,0001.....166

Figura 8X: Avaliação da alteração da permeabilidade de membrana pelos derivados tiazólicos frente à cepa de *Staphylococcus aureus* K2068. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida do teste pós-hoc de Bonferroni. Diferença estatisticamente significativas são indicadas por ****p < 0,0001.....167

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Simbolo, Sigla ou Abreviatura	Significado
MDR	Resistência a múltiplas drogas
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
S. aureus ou S.A	*Staphylococcus aureus*
P. aeruginosa ou P.A	*Pseudomonas aeruginosa*
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CCCP	Carbonil Cianida m-Clorofenilhidrazona
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
LF	Laís folquitto
EtBr	Brometo de etídio
LPS	Lipopolissacarídeos
OMS	Organização Mundial da Saúde
MGEs	Elementos genéticos móveis
ATP	Adenosina trifosfato
MATE	Família de múltiplas drogas e extrusão de compostos tóxicos
MFS	Superfamília de facilitadores principais
SMR	Famílias de pequenas proteínas de resistência a múltiplas drogas
RND	Família de resistência-nodulação-divisão celular
MPF	*Proton-motive force*
ABC	Família de cassetesde ligação ao ATP
TMS	Segmentostransmembranares
H	Hidrogênio
Na	*Sódio*
EPIs	Inibidores de bomba de efluxo
KDa	*Kilodalton*
ESBLs	B-lactamases de espectro ampliado
KPC	Klebsiella pneumoniae Carbapenemase
MRSA	*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina
PBP2A	Proteína de ligação à penicilina 2a
UV	Ultravioleta
SUV	Vesículas unilamelares pequenas
LUV	Vesículas unilamelares grandes
MLV	Vesículas multilamelares
pH	Potência hidrogeniônico
MPS	Sistemas mononucleares fagocitários
PEG	Polietilenoglicol
PE	Fosfatidiletanolamina
DOTAP	1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano
RNA	Ácido ribonucleico
BHI	Brain heart infusion
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
CHOL	Colesterol
DSCP	Diastearol fosfatidilcolina
μL	Microlitros

RPM	Rotações por minuto
PBS	Solução Tampão de Fosfato Salino
CPZ	Clorpromazina
DMSO	Dimetilsufóxido
mg	Miligrama
mL	Mililitro
PDI	Índice de polidispersidade
EP	Bombas de efluxo
Fig	Figura
LMBM	Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular
URCA	Universidade Regional do Cariri
F	*Forward*
R	*Reverse*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL 19

1.1 OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS 19

1.2 ESTRATÉGIAS DE PESQUISA 21

1.3 ESTRUTURA DA TESE 23

2 OBJETIVOS 26

2.1.OBJETIVO GERAL 26

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS 26

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 27

3.1 PATÓGENOS BACTERIANOS 27

3.1.1 Staphylococcus aureus 27

3.1.2 Pseudomonas aeruginosa 29

3.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA 30

3.2.1 Bombas de efluxo 34

3.2.1.1 Bomba de efluxo MepA 38

3.2.1.2 Bomba de efluxo NorA 39

3.2.2 Permeabilidade da membrana bacteriana e implicações na resistência antimicrobiana 41

3.3 NANOFORMULAÇÃO 43

3.3.1 Lipossomas 44

3.4 DERIVADOS TIAZÓLICOS 49

4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA 51

CAPÍTULO I: FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL COM COMPOSTOS TIAZÓLICOS CONTRA BOMBAS DE EFLUXO BACTERIANAS 51

CAPÍTULO II – DERIVADOS DE TIAZOL À BASE DE EUGENOL INIBEM A BOMBA DE EFLUXO MEPA EM Staphylococcus aureus 77

2.8 ANÁLISE DE MPO E DESCRITORES DE ADME 86

2.9 PREDIÇÃO DE SÍTIOS DE METABOLISMO 88

2.10 PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA DO GENE mepA 88

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA 89

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 114

5.1 CONCLUSÕES GERAIS 117

5.2 PESPECTIVAS FUTURAS 119

6 REFERÊNCIAS 122

APÊNDICES E ANEXOS 140

APÊNDICE - RESULTADOS VINCULADOS A TESE 140

RESUMO

INVESTIGAÇÃO MULTIDIMENSIONAL DE COMPOSTOS TIAZÓLICOS LIVRES E NANOESTRUTURADOS COMO ESTRATÉGIA PARA SUPERAÇÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA: INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO, MODULAÇÃO DA PERMEABILIDADE DE MEMBRANA E PREDIÇÃO FARMACOCINÉTICA POR ADME-DOCKING

Introdução: A resistência bacteriana mediada por bombas de efluxo representa um dos principais desafios no tratamento de infecções causadas por patógenos multirresistentes. **Objetivo:** Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar o potencial modulador de resistência de derivados tiazólicos à base de eugenol, livres e encapsulados em lipossomas, frente a cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, com foco na inibição das bombas de efluxo NorA e MepA, e alteração da permeabilidade de membrana. **Materiais e métodos:** Metodologicamente, os compostos sintetizados foram avaliados quanto à atividade antibacteriana direta por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Em seguida, foram conduzidos ensaios de modulação da resistência bacteriana, associando os derivados tiazólicos a antibióticos de diferentes classes (gentamicina, norfloxacina e ciprofloxacina) e ao brometo de etídio (EtBr), um substrato clássico de bombas de efluxo. Ensaios de fluorescência foram realizados para avaliar o acúmulo intracelular de EtBr, enquanto análises de expressão gênica por qPCR permitiram investigar o impacto dos compostos sobre a transcrição do gene *mepA*. Complementarmente, estudos de docking molecular flexível foram empregados para elucidar possíveis interações entre os compostos e o sítio ativo da proteína MepA. Por fim, análises in silico de ADME foram realizadas para avaliar propriedades farmacocinéticas e relacioná-las à atividade biológica observada. **Resultados:** Os resultados demonstraram que os derivados tiazólicos evidenciaram expressivo potencial modulador de resistência, especialmente pela redução da CIM de antibióticos e do EtBr. Derivados como LF12, LF13, LF14, LF16, LF20, LF21 e LF22 apresentaram maior eficácia na modulação do EtBr, sugerindo inibição da bomba de efluxo MepA. Ensaios de fluorescência confirmaram aumento do acúmulo intracelular de EtBr, enquanto os compostos LF13 e LF21 reduziram significativamente a expressão do gene *mepA*, indicando um mecanismo duplo de ação, envolvendo inibição funcional da bomba e regulação negativa transcricional. Os estudos de docking revelaram que o composto LF13 apresentou as interações mais favoráveis com resíduos-chave da MepA, corroborando os dados experimentais. Além disso, os compostos encapsulados em lipossomas potencializaram a ação da gentamicina contra cepas multirresistentes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, enquanto apenas o LF16 potencializou a norfloxacina contra *S. aureus*. Observou-se ainda que a modulação da atividade da ciprofloxacina e da norfloxacina por alguns derivados pode estar relacionada a outros mecanismos de resistência, como interferência na DNA-girase e na topoisomerase. **Conclusão:** Conclui-se que os derivados tiazólicos baseados em eugenol apresentam elevado potencial como moduladores de resistência bacteriana, atuando principalmente por meio da inibição de bombas de efluxo e da supressão da expressão gênica associada a esses sistemas. Apesar da ausência de atividade antibacteriana direta, os resultados sustentam a relevância desses compostos como adjuvantes terapêuticos no combate à resistência antimicrobiana. Contudo, a ausência de estudos in vivo e a variabilidade experimental reforçam a necessidade de investigações adicionais para a elucidação completa dos alvos moleculares envolvidos e para o desenvolvimento de estratégias nanotecnológicas que aprimorem sua eficácia e segurança farmacológica.

Palavras-chave: Lipossomas; Tiazólicos; MepA; Expressão gênica; Fluorimetria; Resistência bacteriana; Potencialização de antibióticos.

ABSTRACT

MULTIDIMENSIONAL INVESTIGATION OF FREE AND NANOSTRUCTURED THIAZOLIC COMPOUNDS AS A STRATEGY TO OVERCOME BACTERIAL RESISTANCE: EFFLUX PUMP INHIBITION, MEMBRANE PERMEABILITY MODULATION, AND PHARMACOKINETIC PREDICTION BY ADME AND MOLECULAR DOCKING

Introduction: Bacterial resistance mediated by efflux pumps represents one of the major challenges in the treatment of infections caused by multidrug-resistant pathogens. **Objective:** In this context, the present study aimed to investigate the resistance-modulating potential of eugenol-based thiazolic derivatives, both free and encapsulated in liposomes, against multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, focusing on the inhibition of NorA and MepA efflux pumps and alterations in membrane permeability. **Materials and Methods:** Methodologically, the synthesized compounds were initially evaluated for direct antibacterial activity by determining the minimum inhibitory concentration (MIC). Subsequently, resistance modulation assays were performed by combining the thiazolic derivatives with antibiotics from different classes (gentamicin, norfloxacin, and ciprofloxacin) and with ethidium bromide (EtBr), a classical efflux pump substrate. Fluorescence assays were conducted to assess intracellular EtBr accumulation, while gene expression analyses using qPCR allowed investigation of the compounds' impact on *mepA* gene transcription. Additionally, flexible molecular docking studies were employed to elucidate potential interactions between the compounds and the active site of the MepA protein. Finally, in silico ADME analyses were performed to evaluate pharmacokinetic properties and correlate them with the observed biological activity. **Results:** The results demonstrated that the thiazolic derivatives exhibited significant resistance-modulating potential, particularly through the reduction of MIC values for antibiotics and EtBr. Derivatives such as LF12, LF13, LF14, LF16, LF20, LF21, and LF22 showed greater efficacy in EtBr modulation, suggesting inhibition of the MepA efflux pump. Fluorescence assays confirmed increased intracellular accumulation of EtBr, while compounds LF13 and LF21 significantly reduced *mepA* gene expression, indicating a dual mechanism of action involving both functional inhibition of the pump and transcriptional downregulation. Docking studies revealed that compound LF13 exhibited the most favorable interactions with key residues of MepA, corroborating the experimental findings. Furthermore, liposome-encapsulated compounds enhanced the activity of gentamicin against multidrug-resistant strains of *S. aureus* and *P. aeruginosa*, whereas only LF16 potentiated norfloxacin against *S. aureus*. It was also observed that modulation of ciprofloxacin and norfloxacin activity by some derivatives may be associated with other resistance mechanisms, such as interference with DNA gyrase and topoisomerase. **Conclusion:** It is concluded that eugenol-based thiazolic derivatives present high potential as modulators of bacterial resistance, acting mainly through efflux pump inhibition and suppression of gene expression associated with these systems. Despite the absence of direct antibacterial activity, the findings support the relevance of these compounds as therapeutic adjuvants in combating antimicrobial resistance. However, the lack of in vivo studies and experimental variability highlight the need for further investigations to fully elucidate the molecular targets involved and to develop nanotechnological strategies aimed at improving their efficacy and pharmacological safety.

Keywords: Liposomes; Thiazoles; MepA; Gene expression; Fluorimetry; Bacterial resistance; Antibiotic potentiation.

IMPORTÂNCIA/RELEVÂNCIA PARA A SOCIEDADE

A resistência antimicrobiana (RAM) é uma das maiores ameaças à saúde pública mundial, sendo responsável direta por cerca de 1,27 milhão de mortes todos os anos. Nesse cenário, o *Staphylococcus aureus* se destaca pela capacidade de desenvolver mecanismos de defesa, como as bombas de efluxo, que impedem o funcionamento de diversos antibióticos tradicionais.

Este trabalho demonstra que, embora os derivados tiazólicos testados não matem as bactérias diretamente, eles funcionam como moduladores de resistência. Ao inibir as bombas de efluxo — o que foi comprovado pela redução da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e pela melhora da ação dos antibióticos — esses compostos permitem a ressensibilização das bactérias. Essa estratégia é vital para a sociedade, pois busca recuperar a eficácia de remédios que já existem, evitando os altos custos e a demora no desenvolvimento de novos fármacos.

Na prática clínica, controlar a resistência pode reduzir falhas em tratamentos e melhorar o atendimento em hospitais, especialmente onde os recursos são escassos. Embora os resultados atuais venham de testes em laboratório (*in vitro e in sílico*), esta tese estabelece os fundamentos necessários para futuros estudos em organismos vivos (*in vivo*). Assim, o trabalho contribui para novas formas de enfrentar a resistência bacteriana de maneira estratégica e viável.

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS

As infecções bacterianas exercem um impacto considerável na saúde pública, especialmente no que diz respeito a doenças causadas por bactérias multirresistentes, que se tornaram um grave problema global. Essa situação resulta no aumento da mortalidade e na elevação dos custos com serviços de saúde. A transmissão de agentes bacterianos aos seres humanos pode ocorrer através do ar e da água, incluindo alimentos ou de vetores, como insetos. Os principais modos de contágio envolvem contato direto com indivíduos, transmissão aérea por meio de gotículas e veículos contaminados (XUAN et al., 2023; SINGH et al., 2022).

Três fatores fundamentais contribuem para o desenvolvimento das infecções bacterianas: infectividade, patogenicidade e virulência. A infectividade refere-se à capacidade do microrganismo de invadir e se multiplicar no hospedeiro; a patogenicidade está relacionada à capacidade de causar doença; enquanto a virulência determina o grau de severidade das manifestações clínicas, incluindo a ocorrência de quadros graves ou fatais. Nesse cenário, as bactérias apresentam diversos mecanismos adaptativos que lhes permitem persistir em diferentes ambientes, como água, solo e alimentos (ANDRAS et al., 2020; SHETTIGAR & MURALI, 2020).

Os patógenos bacterianos adotam estratégias comuns para estabelecer infecções no hospedeiro, as quais estão bem descritas na literatura. Essas estratégias incluem adesão, invasão e evasão das respostas imunológicas do organismo. Uma vez estabelecidas, as infecções bacterianas podem persistir no hospedeiro por longos períodos, caracterizando as chamadas infecções persistentes. Diversos fatores contribuem para o estabelecimento e a manutenção dessas infecções, favorecendo o desenvolvimento de resistência aos antibióticos (RICCIARDI et al., 2018; AGHABABA; LOH; PROFT, 2023; SCHWERMANN & WINSTEL, 2023).

A resistência bacteriana é caracterizada pela incapacidade de um antibiótico de atingir seu alvo em concentrações suficientes para inibir a atividade celular da bactéria. Essa fenômeno pode ocorrer por diferentes mecanismos, como modificação dos sítios de ligação do antibiótico, a redução da permeabilidade da membrana celular, a produção de enzimas de inativar os fármacos e a presença de bombas de efluxo dependentes de energia. Esses mecanismos não só dificultam o tratamento, mas também potencializam a sobrevivência das bactérias em ambientes hostis (FREIRE & JUNIOR., 2022; VARELA et al., 2021).

Somado a isso, fatores do hospedeiro desempenham um papel crucial no desenvolvimento

da doença após a infecção. Fatores como idade, predisposição genética, estado nutricional, bem como a duração da exposição ao patógeno, são determinantes nesse contexto. Indivíduos imunossuprimidos, seja devido ao uso de quimioterápicos, à presença de doenças como AIDS ou em decorrência de transplantes, tendem a apresentar maior suscetibilidade. Essa suscetibilidade agrava o problema da resistência, tornando o tratamento de infecções bacterianas ainda mais desafiador (CASADEVALL; PIROFSKI, 2018; RELMAN; LIPSITCH, 2018).

Entre os patógenos bacteriano que desempenham uma maior significância clínica destaca-se *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. *S. aureus*, uma bactéria Gram-positiva, é frequentemente encontrada como um comensal humano, especialmente nas fossas nasais, onde indivíduos saudáveis podem ser colonizadas de forma assintomática. No entanto, essa bactéria pode atuar como um patógeno oportunista, especialmente quando alcança a corrente sanguínea, causando infecções graves (ZAGHEN et al., 2023; PITOUT et al., 2022; THI et al., 2020; LOURUSSO et al., 2022; HOWDEN et al., 2023).

Uma das características mais preocupantes de *S. aureus* é sua capacidade de colonizar superfícies médicas, como próteses e cateteres, facilitando a disseminação para outros sistemas do organismo. Estima-se que a incidência de infecções na corrente sanguínea causadas por essa bactéria varia entre 80 e 190 casos por 100.000 habitantes ao ano em países desenvolvidos. Essa capacidade de colonização, aliada a sua patogenicidade, tornam *S. aureus* um dos principais desafios contemporâneos para a saúde pública (MAIA et al., 2020; VIEIRA et al., 2020; LOPES et al 2024).

Os mecanismos de resistência em *S. aureus* são diversos e complexos. Dentre eles, destaca-se a redução das concentrações intracelulares de antibióticos, decorrente tanto pela baixa penetração dos fármacos quanto do efluxo mediado por proteínas transmembrana. Adicionamente, mutações genéticas que promovem a modificação do alvo do antibiótico e a inativação enzimática por hidrólise representam estratégias eficazes de resistência. As bombas de efluxo, em particular, exercem um papel central nesse processo, permitindo a extrusão de antibióticos e contribuindo para a resistência a múltiplas drogas (MDR) (DOS SANTOS-BARBOSA et al., 2021; GUO et al., 2022; OLIVEIRA-TINTINO, 2021).

A resistência bacteriana pode ser intrínseca ou adquirida, frequentemente mediada pela transferência horizontal de genes por meio de plasmídeos ou transposons. Além da resistência observada em *S. aureus*, a preocupação com essa bactéria é intensificada devido à sua resistência a diversas classes de antibióticos, incluindo aminoglicosídeos, macrolídeos, fluoroquinolonas,

cloranfenicol e tetraciclinas. Essa situação limita significativamente as opções terapêuticas disponíveis, evidenciando a necessidade urgente de novas abordagens de tratamento (BOECHAT et al., 2023; DO NASCIMENTO et al., 2022; ROCHA et al., 2024).

Diante da necessidade de novos compostos com atividades antimicrobianas e farmacológicas, os derivados tiazólicos à base de eugenol se apresentam como opções promissoras. O eugenol é um fenilpropanóide encontrado em óleos essenciais de diversas plantas, sendo extraído em maior quantidade do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*). Os tiazóis, por sua vez, são compostos heterocíclicos aromáticos nitrogenados de cinco membros, amplamente explorados nos setores farmacêuticos e agroquímicos. Esses compostos e seus derivados apresentam uma ampla diversidade de atividade biológica, com relatos de propriedades fungicidas, bactericidas, antioxidantes, leishmanicidas, anticancerígenas, anti-inflamatórias e analgésicas (XAVIER et al., 2019; GAZOLLA et al., 2018; MELO et al., 2006; KAUFMAN, 2015; ALMEIDA et al., 2024).

Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade antibacteriana de derivados tiazólicos à base de eugenol frente a bactérias multirresistentes, bem como investigar, por meio de diferentes abordagens, o potencial desses compostos na inibição de bombas de efluxo em cepas de *S. aureus*. Espera-se que esta pesquisa contribua para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e para a mitigação do impacto das infecções bacterianas resistentes.

1.2 ESTRATÉGIAS DE PESQUISA

A utilização de produtos sintéticos com propriedades farmacológicas tem crescido significativamente, especialmente no contexto dos tiazóis, que são compostos conhecidos por suas atividades terapêuticas documentadas na literatura. Esses fatores incentivam o uso de tais substâncias e seus derivados em investigações que evidenciem suas atividades, destacando-se a atividade antibacteriana frente a cepas portadoras de bombas de efluxo ainda não descritas (MISHRA et al., 2006; GUERRA et al., 2017; NASCIMENTO, 2022).

Nesse cenário, o encapsulamento desses compostos em sistemas de liberação nanoestruturados, como os lipossomas, surge como uma estratégia promissora para otimizar sua eficácia biológica. O uso de nanocarreadores lipossomais permite não apenas a proteção dos derivados tiazólicos contra a degradação, mas também facilita a entrega direcionada e a internalização celular, auxiliando na superação de barreiras de permeabilidade e na inibição de mecanismos de efluxo bacteriano (GHOSH *et al*., 2023).

Para determinar a menor concentração dos compostos sintetizados capaz de inibir o

crescimento bacteriano, denominada como Concentração Inibitória Mínima (CIM), utilizou-se o teste de microdiluição em caldo, adaptado do método descrito pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Este método in vitro permite a avaliação da eficácia dos produtos testados, com base em valores clinicamente relevantes (KOWALSKA-KROCHMAL; DUDEK-WICHER, 2021). Adicionalmente, foram conduzidos testes para avaliar a atividade potencializadora da ação de antibióticos em cepas multirresistentes (*S. aureus* 10 e *P. aeruginosa* 24), conforme a metodologia proposta por Coutinho *et al*. (2008), que utiliza a microdiluição em caldo para comparar os resultados de CIM do antibiótico isolado com a da associação do antibiótico com os compostos testados.

Para a avaliação da inibição das bombas de efluxo MepA e NorA, aplicou-se a metodologia descrita por Tintino *et al*. (2016), utilizando microplacas estéreis. Este teste avalia a ação inibidora através do brometo de etídio, uma substância intercalante de DNA; a redução na CIM deste agente indica a eficácia dos compostos em inibir o mecanismo de efluxo. A metodologia também compara a associação dos compostos com o brometo de etídio e o antibiótico, incluindo um inibidor específico do mecanismo, a Carbonil Cianida m-Clorofenilhidrazona (CCCP) como controle positivo (TINTINO et al., 2018; SANCHEZ-CARBONEL et al., 2021).

Como método adicional para confirmar a inibição das bombas de efluxo MepA e NorA, utilizou-se o procedimento proposto por Oliveira-Tintino *et al*. (2023b), que avalia a fluorescência do brometo de etídio no interior da célula bacteriana. Um aumento na concentração desse agente indica a falha do mecanismo de efluxo (Blair & Piddock, 2016).

Para um entendimento mais aprofundado da inibição das bombas de efluxo, foi analisada a modulação da expressão do gene *mepA* presente em cepas de *S. aureus* K2068, o qual codifica a bomba de efluxo MepA. O procedimento experimental foi conduzido de forma adaptada, conforme as diretrizes descritas por Tintino *et al*. (2020). Considerando que as bombas de efluxo são proteínas codificadas por genes específicos, torna-se fundamental investigar a inibição da expressão do gene correspondente como um dos possíveis mecanismos de ação dos compostos avaliados.

A análise da expressão gênica permite verificar, por meio de técnicas de biologia molecular, a capacidade de concentrações subinibitórias das associações entre antibióticos e os compostos estudados em modular a expressão gênica, em comparação com bactérias cultivadas em meio isento de fármacos. Entre as técnicas disponíveis, a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo

real (qPCR) destaca-se como uma das metodologias mais específicas e sensíveis para a avaliação da atividade regulatória da expressão gênica (MARTIN et al., 2023; OLIVEIRA-TINTINO et al., 2023a).

A alteração da permeabilidade da membrana bacteriana foi avaliada por meio do ensaio de incorporação do agente fluorescente Sytox Green, que penetra seletivamente em células com membranas comprometidas e se liga aos ácidos nucleicos. As cepas bacterianas foram tratadas exclusivamente com os compostos em estudo, em concentrações previamente estabelecidas, enquanto a polimixina foi utilizada como controle positivo, devido à sua reconhecida capacidade de desestabilizar a membrana celular. Após o período de incubação, a fluorescência emitida foi mensurada utilizando o equipamento Cytation (BioTek Instruments), sendo o aumento do sinal fluorescente interpretado como indicativo de comprometimento da integridade da membrana bacteriana. Os resultados foram comparados ao controle negativo, permitindo inferir a capacidade dos compostos testados em promover alterações na permeabilidade da membrana celular.

Adicionalmente, foram realizadas análises de *docking* molecular, as quais possibilitam a avaliação das interações intermoleculares entre os compostos estudados e seus respectivos alvos biológicos. De forma complementar, foram conduzidas análises *in silico* das propriedades farmacocinéticas (ADME), com o objetivo de prever parâmetros relacionados à absorção, distribuição, metabolismo e excreção, permitindo uma avaliação integrada do potencial biológico e farmacológico dos compostos.

1.3 ESTRUTURA DA TESE

Este trabalho de tese estrutura-se a partir de uma introdução que estabelece o panorama da resistência bacteriana, pormenorizando a complexidade dessa problemática e os mecanismos subjacentes a esse processo. Em seguida, apresenta-se a justificativa que fundamenta a relevância do estudo, culminando na exposição dos objetivos que o norteiam. O referencial teórico é desenvolvido em seções dedicadas às infecções bacterianas, à resistência antimicrobiana e seus diversos mecanismos. Adicionalmente, discute-se a necessidade imperativa de novas abordagens terapêuticas, com especial atenção aos compostos sintéticos e à promissora aplicação de nanoformulações para otimizar sua eficácia.

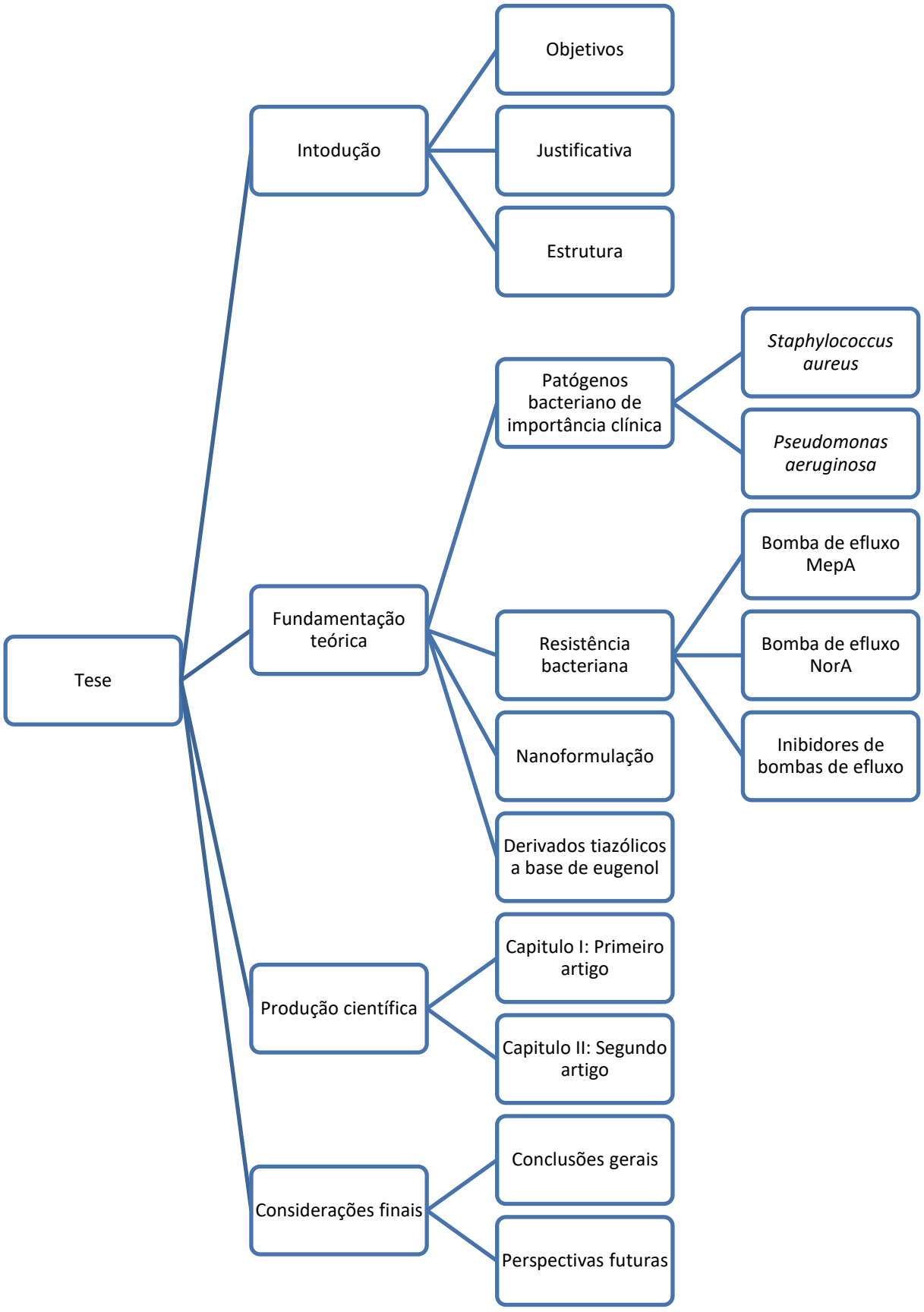
A presente tese integra, como um de seus pilares, o estudo publicado no periódico *Biomedicine & Pharmacotherapy*, intitulado "*Liposomal formulation with thiazolic compounds against bacterial efflux pumps*". Este trabalho pioneiro investigou o encapsulamento de

substâncias tiazólicas à base de eugenol (LF12, LF13, LF16 e LF26), com o objetivo de avaliar a potencialização da atividade antibiótica e a inibição de bombas de efluxo em microrganismos multirresistentes, contribuindo de forma significativa para a compreensão e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Somado à estrutura da tese, incorpora-se um segundo artigo publicado na *ChemistrySelect*, intitulado "*Eugenol-based thiazole derivatives inhibit the MepA efflux pump in Staphylococcus aureus*". Nesse estudo, investigou-se a capacidade de derivados tiazólicos à base de eugenol em inibir a bomba de efluxo MepA em *Staphylococcus aureus* K2068. Para tal, foi empregado uma abordagem metodológica multifacetada, que incluiu testes de inibição por microdiluição, ensaios de emissão de fluorescência com brometo de etídio (EtBr), avaliação da expressão gênica e estudos de *docking* molecular. Adicionalmente, foram realizadas análises *in silico* de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) dos compostos sintetizados, visando uma compreensão aprofundada de seu perfil farmacológico.

Por fim, a tese é concluída com as considerações finais, nas quais são discutidos os principais achados dos estudos realizados, destacando-se suas contribuições científicas e implicações para o avanço da área. Os elementos centrais da estrutura geral da tese encontram-se apresentados de forma esquemática no Esquema 1, proporcionando uma visão clara e organizada do desenvolvimento do trabalho.

Esquema 1. Estrutura geral da tese.



Fonte: Próprio autor.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar derivados tiazólicos baseados em eugenol (livres e encapsulados) como agentes moduladores da resistência bacteriana, caracterizando sua capacidade de inibir bombas de efluxo e potencializar antibióticos em patógenos de relevância clínica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade antibacteriana dos derivados tiazólicos à base de eugenol, livres e encapsulados em lipossomas, por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

- Avaliar o efeito potencializador da ação de antibióticos quando associados aos derivados tiazólicos, investigando possíveis interações que potencialize o efeito frente a cepas multirresistentes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

- Investigar a capacidade dos compostos em inibir funcionalmente bombas de efluxo bacterianas, especialmente MepA e NorA, utilizando ensaios baseados na redução da CIM do brometo de etídio.

- Confirmar a inibição das bombas de efluxo por meio da análise da acumulação intracelular de brometo de etídio, avaliada por ensaios de fluorescência.

- Analisar a modulação da expressão gênica do gene *mepA* em cepas de *Staphylococcus aureus*, utilizando a técnica de PCR em tempo real (qPCR), após tratamento com concentrações subinibitórias dos compostos isolados e em associação com antibióticos.

- Investigar as interações intermoleculares entre os derivados tiazólicos e alvos biológicos associados à resistência bacteriana, por meio de análises de docking molecular.

- Predizer as propriedades farmacocinéticas e o perfil de drug-likeness dos compostos estudados, utilizando análises in silico de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME).

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 PATÓGENOS BACTERIANOS

As bactérias são microrganismos unicelulares com diferentes formas estruturais, sendo as formas mais comuns as esféricas (cocos), em formato de bastonetes (bacilos) e em espirais (espirilos e espiroquetas). Esses organismos possuem uma estrutura simples, caracterizada pela ausência de núcleo celular, com o material genético disperso no citoplasma (FLORES; VARGAS, 2015; DA SILVA et al., 2021).

Esses microrganismos colonizam diversos ambientes, incluindo o organismo humano, no qual muitos atuam de forma benéfica para o equilíbrio fisiológico do hospedeiro, sendo conhecidas como bactérias comensais, integrantes da microbiota normal. No entanto, também existem bactérias patogênicas, capazes de causar diferentes doenças no hospedeiro. Além disso, algumas bactérias presentes na microbiota normal podem ser classificadas como oportunistas, pois podem provocar infecções quando há comprometimento da imunidade do hospedeiro ou em situações específicas, como a colonização de feridas e lesões teciduais (TEIXEIRA, 2020; DE LUCENA et al., 2023).

As bactérias patogênicas podem causar doenças por meio da produção de toxinas ou por outros mecanismos de virulência que favorecem sua sobrevivência e proliferação no hospedeiro, sendo classificadas conforme seu grau de patogenicidade e virulência. Entre os patógenos bacterianos mais frequentemente associados a infecções destacam-se *Staphylococcus aureus*, bactérias dos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus*, além de Gram-negativas, como aquelas pertencentes à família Enterobacteriaceae e *Pseudomonas aeruginosa* (KOCHINSKI et al., 2020; MURRAY et al., 2020).

3.1.1 Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva de morfologia cocóide, amplamente reconhecida como um microrganismo comensal, colonizando principalmente a pele, as narinas e outras mucosas do organismo humano. Essa bactéria é catalase positivas, expressando a enzima catalase como mecanismo de defesa contra espécies reativas de oxigênio, promovendo a degradação do peróxido de hidrogênio. Além disso, é classificadas como coagulase positivas, diferenciando-se de outras espécies do gênero *Staphylococcus*, por apresentar esse importante fator de virulência, bem como produzirem toxinas, como hemolisinas e toxinas esfoliativas (FOSTER, 2002; HAAG et al., 2019; BAI et al., 2022).

Por outro lado, *S. aureus* é classificada como patógeno oportunista, sendo

responsável por um grande número de infecções bacterianas, muitas delas associadas a elevada morbimortalidade. Trata-se da espécie mais patogênica de seu gênero. Essa bactéria desenvolveu variados mecanismos de virulência e defesa, incluindo a liberação de toxinas e a expressão de proteínas de superfície que facilitam sua adesão aos tecidos. Esses fatores podem resultar desde infecções simples até condições mais graves, como bacteremia, meningite, endocardite, pneumonia e osteomielite (ONDUSKO; NOLT, 2018; AHMAD-MANSOUR et al., 2021; CHEUNG et al., 2021; LÁZÁR et al., 2022).

Adicionalmente aos mecanismos de virulência, *S. aureus* apresenta alta capacidade de desenvolver resistência a diferentes antibióticos. Na década de 1950, observou-se o surgimento de resistência à penicilina, devido à produção de β-lactamases. Em resposta a isso, foi desenvolvida a penicilina semissintética meticilina, resistente à ação dessa enzima. No entanto, em poucos anos após o início do seu uso, surgiram cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (ALGAMMAL et al., 2020; MIKLASIŃSKA-MAJDANIK, 2021; NANDHINI et al., 2022).

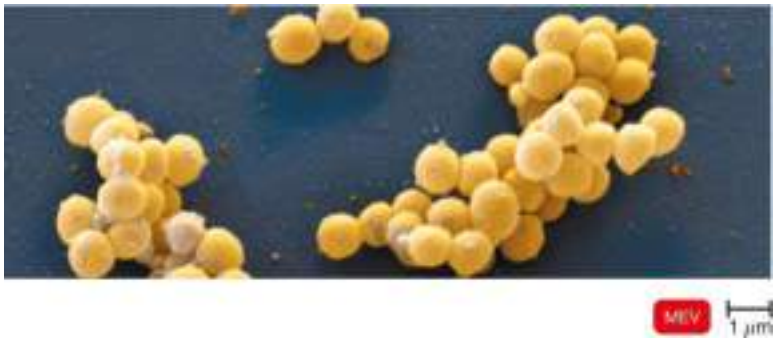
As cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) rapidamente se tornaram um problema global, sendo frequentemente associadas a infecções hospitalares. Essas cepas possuem o gene *mecA*, responsável pela codificação da proteína de ligação à penicilina 2a (PBP2A), responsável por conferir resistência a esse grupo de antibióticos. A propagação desse gene ocorre principalmente por mecanismo de transferência horizontal (LEE et al., 2018; FRI et al., 2020; GUO et al., 2020).

Somado a resistência à meticilina, as cepas de MRSA são classificadas como multirresistentes (MDR), uma vez que apresentam resistência a diversos grupos de outros antibióticos, incluindo os β-lactâmicos (como amoxicilina com ácido clavulânico e oxacilina), macrolídeos, quinolonas e cefalosporinas. Diante desse perfil de resistência, é comum a realização de testes de sensibilidade antimicrobiana para orientar o tratamento a escolha terapêutica mais eficaz no tratamento de infecções causadas por MRSA (WU et al., 2019; ALGAMMAL et al., 2020; NANDHINI et al., 2022).

Diante da resistência à meticilina, a vancomicina tornou-se uma das principais alternativa terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por MRSA. Esse antibiótico atua na síntese da parede celular bacteriana e é eficaz contra bactérias Gram-positivas, sendo especialmente indicado para pacientes com alergias a penicilinas ou cefalosporinas. Entretanto, nos últimos anos, surgiram cepas de MRSA resistentes à vancomicina, devido à presença do gene de resistência *vanA*, detectado por técnicas moleculares. Esse fenômeno representa um grave problema de saúde pública (CONG et al., 2020; SHARIATI et al., 2020;

WU et al., 2021).

Figura 1: Visualização de *Staphylococcus aureus* em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).



Fonte: TORTORA (2025).

3.1.2 Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa, de morfologia bacilar, não fermentadora, móvel e com capacidade de crescer em temperaturas entre 25 °C e 37 °C. Trata-se de um microrganismo amplamente distribuído em diversos ambientes, classificado como um patógeno humano oportunista devido à sua capacidade de causar infecções graves, especialmente em pacientes imunocomprometidos e em indivíduos com fibrose cística, onde apresenta alta prevalência (NEVES et al., 2011; WU et al., 2015; THI et al., 2020; GAMBAZZA et al., 2023).

De forma complementar, essa bactéria é considerada uma das principais causas de infecções hospitalares. Além disso, *P. aeruginosa* apresenta notável capacidade de adaptação a mudanças ambientais, um fator crucial determinante para o desenvolvimento da resistência antimicrobiana e para sua sobrevivência em condições adversas. Essa bactéria também produz diversos fatores de virulência que contribuem para sua patogenicidade (JURADO-MARTÍN et al., 2021; QIN et al., 2022).

Entre os fatores de virulência, destaca-se o papel dos lipopolissacarídeos (LPS) presentes em sua membrana externa. Essas moléculas podem desencadear uma intensa resposta inflamatória no hospedeiro, agravando o quadro infeccioso e associando-se a maior mortalidade. Outros fatores incluem a produção de exotoxinas, como a exotoxina A, a secreção de proteases e a capacidade de formar biofilmes, os quais intensificam a resistência a antibióticos e dificultam o tratamento das infecções causadas por essa bactéria (ROCHA et al., 2019; LIAO et al., 2022).

A resistência bacteriana apresentada por *P. aeruginosa* constitui um grande desafio para a saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou esta espécie como um patógeno crítico, ressaltando a necessidade urgente de desenvolver novos antibióticos

eficazes contra suas cepas. A resistência já foi identificada para diversos fármacos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos e carbapenêmicos, comprometendo significativamente as opções terapêuticas (WHO, 2017; GLEN; LAMONT, 2021; COYNE et al., 2022).

Em *P. Aeruginosa*, resistência aos carbapenêmicos está amplamente associado a perda ou redução da expressão da porina OprD, decorrente da mutação do gene *oprD*. Essas alterações resultam na diminuição da permeabilidade da membrana externa, conferindo resistência a antibióticos como imipenem e meropenem (LANGENDONK et al., 2021; VÁZQUEZ et al., 2021).

Além disso, *P. aeruginosa* utiliza outros mecanismos de resistência, como atuação de bombas de efluxo, a produção de β-lactamases, a modificação de alvos de ligação de antibióticos e formação de biofilmes. Conjuntamente, essas estratégias tornam a bactéria um microrganismo multirresistente (MDR), dificultando ainda mais o controle e o tratamento das infecções associadas (LIAO et al., 2022; LORUSSO et al., 2022).

Figura 2: Visualização da bactéria Pseudomonas aeruginosa por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).



Fonte: TORTORA (2025).

3.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência aos antibióticos pode ser definida, em termos bioquímicos, como a incapacidade de um antibiótico de atingir seu alvo bacteriano, em uma concentração que anteriormente seria adequada para inibir a atividade desse alvo. O surgimento da resistência aos antibióticos é promovido pela liberação de antibióticos no meio ambiente; seu uso excessivo e inadequado por automedicação, uso em infecções não bacterianas, como resfriados e outras infecções virais; aplicação de antibióticos em animais, o que favorece a propagação de bactérias resistentes através de múltiplas rotas de transferência, como a água,

alimentos e aplicação de adubo no solo (MARSHALL; LEVY, 2011; WRIGHT, 2010a).

Esses fatores fornecem condições ideais para cepas bacterianas menos suscetíveis sobreviverem, serem selecionadas, adaptarem-se, desenvolverem resistência e serem propagadas através da cadeia alimentar (ALCOCK et al., 2020; AMINOV; MACKIE, 2007; SILBERGELD; GRAHAM; PRICE, 2008).

A descoberta dos antibióticos constitui um dos marcos mais significativos da história da humanidade, revolucionando a prática médica ao reduzir de forma drástica as taxas de mortalidade associadas a infecções bacterianas. A introdução da penicilina, identificada por Alexander Fleming em 1928, foi fruto de observações pioneiras em culturas bacterianas contaminadas por fungos. Tal descoberta não apenas transformou o manejo de doenças infecciosas, mas também impulsionou o desenvolvimento de uma ampla gama de antimicrobianos subsequentes (ABUSHAHEEN et al., 2020; TERRENI et al., 2021; YE; CHEN, 2022).

Todavia, o uso disseminado de antibióticos revelou, já em 1946, o fenômeno da resistência bacteriana, que emergiu como um desafio crescente à eficácia terapêutica. A resistência bacteriana, caracterizada pela habilidade dos microrganismos em neutralizar a ação dos agentes antimicrobianos, rapidamente se tornou uma questão central de saúde pública global (GARCIA; COMARELLA, 2021; SOUZA et al., 2021).

Os mecanismos de resistência bacteriana podem ser classificados em intrínsecos, inerentes a certas espécies bacterianas, e adquiridos, que decorrem de alterações genéticas, como mutações espontâneas ou transferência horizontal de genes. Este último processo é facilitado por elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons, cuja disseminação é particularmente preocupante em ambientes hospitalares, onde infecções por bactérias multirresistentes (MDR) são prevalentes (SERWECIŃSKA, 2020; JUBAIR et al., 2021; MANCUSO et al., 2021).

A resistência dos micro-organismos a diferentes agentes pode ser de duas naturezas distintas: resistência intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca deve-se às características funcionais ou estruturais que já são inerentes à própria bactéria. Mecanismos intrínsecos são codificados por cromossomos e incluem as enzimas inativadoras de antibióticos, bombas de efluxo e barreira de permeabilidade, envolvendo a composição da membrana de Gram-positivas e Gram-negativas. Os mecanismos intrínsecos conferem uma resistência mais baixa, todavia em hospedeiros imunocomprometidos, as bactérias podem facilmente tornar-se patógenos oportunistas (COX; WRIGHT, 2013; FAJARDO et al., 2008; PONTES et al., 2018; WRIGHT, 2007).

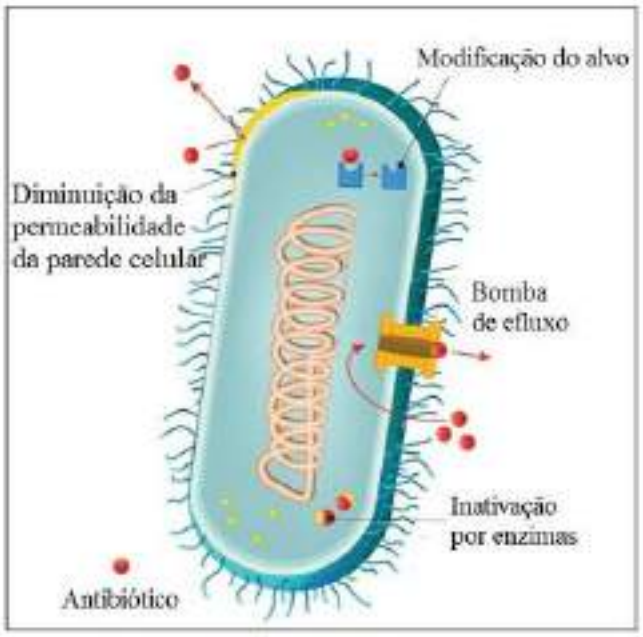
Por outro lado, os mecanismos de resistência adquiridos são obtidos por transferência

horizontal de genes, em elementos genéticos móveis como plasmídeos. Incluem outra categoria de bombas de efluxo com substratos mais específicos, codificadas por plasmídeo. Neste grupo, também estão inclusos os mecanismos de inativação por enzimas, que modificam o antibiótico ou seu alvo (VAN HOEK et al., 2011). Como os elementos de transferência de genes podem ser facilmente disseminados entre os micro-organismos, estes mecanismos representam um grande risco no avanço rápido e descontrolado da resistência bacteriana (DANTAS; SOMMER, 2012; MARTÍNEZ, 2018).

Estima-se que na Europa cerca de 25.000 mortes anuais estejam associadas a infecções por bactérias resistentes, gerando custos aproximados de 1,5 bilhão de euros. Nos Estados Unidos, mais de 2 milhões de pessoas são infectadas anualmente por microrganismos resistentes, resultando em 23.000 mortes diretas. No Brasil, embora os dados epidemiológicos sejam limitados, acredita-se que milhares de mortes anuais sejam atribuídas a essa problemática. Além disso, observa-se uma preocupante escassez de novos antibióticos em desenvolvimento, o que agrava ainda mais a crise global da resistência antimicrobiana (WHO, 2014; HAMPTON et al., 2013; WALKER; FOWLER, 2011).

Entre os principais mecanismos moleculares de resistência, destacam-se: a produção de enzimas inativadoras, como as ß-lactamases, que degradam antibióticos; a modificação de alvos moleculares, que reduz a afinidade do fármaco; a diminuição da permeabilidade da membrana bacteriana, dificultando a entrada do antibiótico; e o aumento da expressão de bombas de efluxo, que expulsam ativamente os fármacos do interior celular. Essas estratégias conferem aos microrganismos uma notável capacidade de adaptação e sobrevivência, mesmo sob pressão seletiva intensa (WANG et al., 2020; CHAWLA et al., 2022; PULINGAM et al., 2022).

Figura 3: Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos.



Fonte: adaptado de Nicolsen e Stang (2019).

A resistência intrínseca, definida pela ausência ou baixa afinidade de um alvo suscetível ao antibiótico, também desempenha um papel crucial. Estudos recentes têm identificado genes relacionados a esse tipo de resistência em classes como β-lactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Técnicas avançadas, como high-throughput screening (Triagem em alta escala), têm sido aplicadas em patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli e Pseudomonas aeruginosa*, expandindo a compreensão sobre os determinantes genéticos da resistência bacteriana (BLAKE; O'NEILL, 2013; LIU et al., 2010).

Projeções alarmantes reforçam a gravidade do problema. Em 2014, as infecções causadas por microrganismos resistentes foram associadas a 700 mil mortes anuais, com estimativas de aumento exponencial para 2050. Ademais, a pandemia de COVID-19 exacerbou essa crise, evidenciada pela alta incidência de infecções bacterianas resistentes, particularmente em pacientes hospitalizados tratados com antibióticos de amplo espectro (CHANG et al., 2022; MUTUA et al., 2022; LANGFORD et al., 2023).

A redução da permeabilidade da membrana plasmática, particularmente em bactérias Gram-negativas, representa outro mecanismo relevante. A presença de lipopolissacarídeos (LPS) e a diminuição na expressão de porinas dificultam a entrada de antibióticos hidrofílicos. Exemplos incluem *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, patógenos notórios por apresentarem elevada resistência, tanto intrínseca quanto adquirida (EICHENBERGER; THADEN, 2019; AYOUB MOUBARECK, 2020; VARELA et al., 2021).

Adicionalmente, as bombas de efluxo desempenham um papel central na resistência

bacteriana, expelindo ativamente os fármacos para o exterior da célula. Este mecanismo não apenas compromete a eficácia de antimicrobianos específicos, mas também contribui para a multirresistência, tornando as opções terapêuticas limitadas (THAKUR et al., 2021; GAURAV et al., 2023).

Podem-se distinguir duas estratégias centrais de resistência: a redução da afinidade do alvo pelo antibiótico, por mutações nos genes que codificam o alvo ou por modificações pós-traducionais. Por essa razão, os mecanismos de resistência podem se agrupar nas seguintes categorias gerais: mecanismos de modificação, desvio e proteção do alvo; modificação ou degradação de antibióticos; e prevenção de acesso ao alvo, por efluxo do antibiótico ou por diminuição da permeabilidade da parede celular (BLAIR et al., 2015; PETERSON; KAUR, 2018; WRIGHT, 2011).

Frente a esse panorama, iniciativas como o Plano de Ação Global sobre Resistência Antimicrobiana, liderado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), evidênciam a urgência de estratégias integradas. Medidas como o fortalecimento do controle de infecções, monitoramento do uso de antimicrobianos e o investimento em pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos são fundamentais para mitigar a crise.

Compreender a base genética e bioquímica da resistência bacteriana é essencial para orientar o desenvolvimento de novas combinações terapêuticas. Estudos têm demonstrado efeitos sinérgicos *in vitro* entre associações não convencionais de antibióticos, ampliando o arsenal terapêutico contra patógenos de difícil tratamento, como *Acinetobacter baumannii* e *Neisseria gonorrhoeae* (BARBEE et al., 2014; PRINCIPE et al., 2013). A integração dessas evidências com triagens genéticas sistemáticas pode potencializar a reutilização de medicamentos existentes, restaurando sua eficácia frente a espécies previamente resistentes (BLAIR et al., 2015).

3.2.1 Bombas de efluxo

O mecanismo de resistência mediado por bombas de efluxo foi descrito pela primeira vez no estudo de Mcmurry *et al.* (1980), em que os pesquisadores relataram sobre a resistência mediada por proteínas de efluxo encontradas em cepas de *Escherichia coli* ao antibiótico tetraciclina. No entanto, essas proteínas existentes na membrana bacteriana fisiologicamente são responsáveis por gerar defesa à célula, em que sua atuação não é necessariamente ligada ao processo de resistência, além disso, são responsáveis pela extrusão de substâncias tóxicas para a bactéria (POOLE, 2007; JUBAIR et al.,2021).

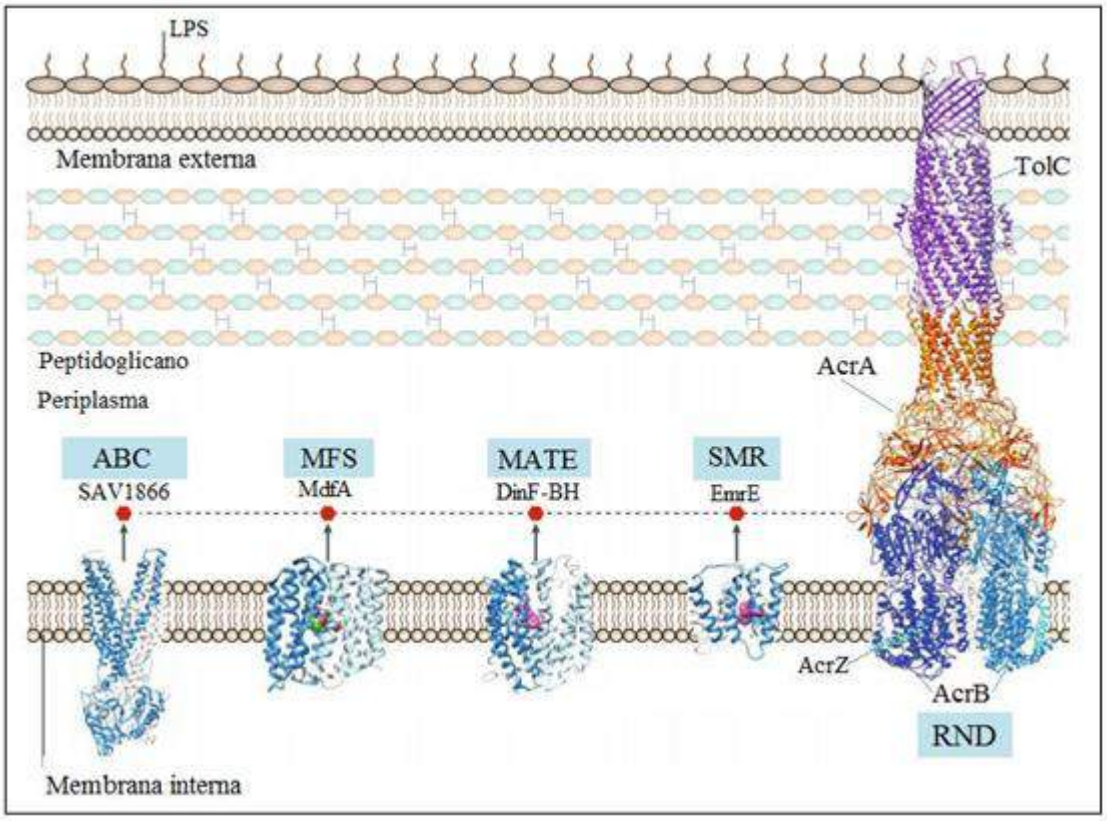
A partir de então, sabendo que sua presença está também associada ao processo de resistência aos antibióticos, é reconhecido que estas proteínas são codificadas por genes específicos e são encontradas em bactérias Gram-positivas, sendo uma das principais

espécies estudadas a cepa de *S.aureus*. A expressão dos genes de bomba de efluxo é o método responsável pela produção das proteínas e tais genes são encontrados predominantemente em regiões denominadas de elementos genéticos móveis (MGEs). Por meio do reconhecimento desses genes os estudos apontam que até o momento foram encontradas, aproximadamente, 20 regiões responsáveis pela codificação destas proteínas (YILMAZ; ÖZCENGIZ, 2017; ALTINÖZ; ALTUNER, 2019).

De acordo com a semelhança na sequência e fatores como fontes de energia e número de componentes, as bombas de efluxo são classificadas nas seguintes superfamílias: família de transportadores ABC dependentes de ATP (ABC) -, família de múltiplas drogas e extrusão de compostos tóxicos (MATE), superfamília dos principais facilitadores (MFS), famílias de pequenas proteínas de resistência a múltiplas drogas (SMR) e família de resistência-nodulação-divisão celular (RND) (OLIVEIRA-TINTINO, 2021; GAURAV et al., 2023).

É importante ressaltar as superfamílias MATE, MFS, SMR e RND dependem da energia fornecida pela força próton-motriz, do inglês *Proton-Motive Force* (PMF), e são, portanto, classificadas como bombas de efluxo secundárias, uma vez que realizam a extração de energia a partir de gradientes químicos de prótons. Em contraste, a superfamilia ABC constitui uma exceção, pois utiliza a energia proveniente da hidrólise de ATP, sendo classificada como bombas de efluxo primárias (GHOSH et al., 2016; SHARMA et al., 2019; ALMATAR et al., 2021).

Figura 4: Estrutura dos representantes de cada superfamília de bombas de efluxo.



As superfamílias ABC, MATE, MFS e SMR estão representadas em Gram-positivas e RND geralmente se apresenta em Gram-negativas unindo-se em um sistema tripartido como na figura esquemática. SAV1866 está como representante da família ABC, MdfA de MFS, DinF-BH representa a família MATE, EmrE representa SMR e AcrAB-TolC representa a família RND. LPS: lipopolissacarídeo.

Fonte: adaptado de Du et al. (2018).

Em relação à superfamília ABC, esta é uma das maiores famílias de bombas de efluxo e é encontrada em muitas espécies bacterianas, como evidenciado pela sua presença em *Staphylococcus aureus, Lactobacillus lactis* e *Bacillus subtilis*, ainda que a importância clínica em cepas Gram-negativas não seja totalmente elucidada. As proteínas de efluxo presentes nessa superfamília são responsáveis pela extrusão de muitos substratos, tais como açúcares, aminoácidos e proteínas, incluindo uma variedade de drogas, o que relaciona sua atuação a casos de resistência bacteriana (GREENE et al., 2018; KORNELSEN; KUMAR, 2021).

A superfamília MATE apresenta, em média, 400 a 500 aminoácidos com 12 segmentos transmembranares (TMS) hidrofóbicos, que podem ocasionar a extrusão de diferentes substratos, entre os quais se destaca a extrusão de drogas, tais como as fluoroquinolonas, sendo, assim, responsáveis por ocasionar resistência a estes fármacos. A remoção de compostos por membros dessa superfamília ocorre através da utilização de

energia de gradientes eletroquímicos transmembranares de H^+ e Na^+ ou de ambos, porém, ainda não é totalmente elucidada a seletividade iônica e o acoplamento do substrato nesse mecanismo (GARCIA et al., 2022; LORUSSO et al., 2022; SIASAT; BLAIR, 2023).

Com relação à superfamília MFS, as proteínas de efluxo são expressas predominantemente por genes cromossômicos, podendo também ser mediada por plasmídeos, como ocorre pela expressão do gene *qacA/B*. Essas bombas de efluxos são encontradas tanto em bactérias Gram-positivas quanto em bactérias Gram-negativas, contribuindo para a extrusão de substratos, sendo que nas bactérias Gram-negativas, estas podem apresentar uma conformação estrutural denominada de complexo tripartido. Além disso, análises realizadas por meio da utilização da bioinformática contribuíram para a classificação dessas bombas de efluxos, em que podem ser divididas em dois tipos, contento 12 ou 14 TMS (KUMAR et al., 2013; NEUBERGER et al., 2018; PASQUA et al., 2019).

Já em relação à superfamília RND, a relevância clínica dessas bombas de efluxo ocorre em cepas Gram-negativas, conferindo resistência a uma variedade de antibióticos a esses microrganismos, como também proporciona a extrusão de substâncias tóxicas, como biocidas e metais pesados. Um dos principais e mais estudados tipos de proteínas de efluxo dessa superfamília é MexAB-OprM presente em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e AcrAB-TolC em *Escherichia coli* (AUDA et al., 2020; SIASAT; BLAIR, 2023).

Além disso, com exceção da superfamília RND, presente apenas em bactérias Gram-negativas, as demais famílias estão presentes tanto em bactérias Gram-positivas, como, em Gram-negativas. Em relação as bactérias Gram-positivas as bombas de efluxo ocorrem por meio da presença de um transportador único localizado na membrana plasmática. Já nas bactérias Gram-negativas, pode ocorrer como um transportador único, na membrana interna, ou até mesmo por sistemas tripartidos de modo que consigam atingir a membrana interna e externa bacteriana (COMPAGNE et al., 2023; DE GAETANO et al., 2023).

No sistema de efluxo, são descritas substâncias denominadas de inibidores de bomba de efluxo (EPIs), que são produtos capazes de impedir a resistência clínica de cepas bacterianas, de forma seja possível tornar sensíveis as bactérias a um antibiótico específico ou a uma classe de antibióticos. Por outro lado, nenhum dos inibidores identificados atualmente é utilizado em práticas clínicas, considerando a elevada toxicidade destes compostos *in vivo* (EBBENSGAARD et al., 2020; GREEN et al., 2020).

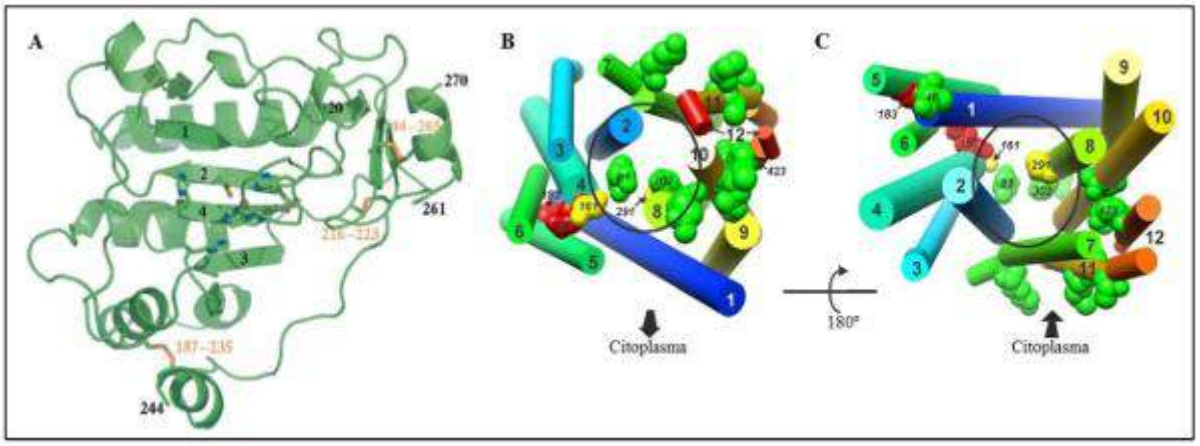
Para o desenvolvimento de inibidores dos sistemas de efluxo, alguns mecanismos podem ser explorados para uma redução ou o bloqueio dessas proteínas. Um desses mecanismos envolve o aumento da permeabilidade de membrana, a fim de favorecer a

entrada de maior concentração de antibiótico para o interior da bactéria, consequentemnte, dificultando a atividade da bomba de efluxo. Além desse, a modificação do antibiótico, com a finalidade de diminuir a interação com o mecanismo de extrusão, ou até mesmo a inibição dos genes responsáveis pela codificação das proteínas de efluxo (ALMATAR et al., 2021; LI et al., 2021; HUANG etal., 2022).

3.2.1.1 Bomba de efluxo MepA

A bomba de efluxo MepA é um transportador multidrogas pertencente à família MATE, encontrado em *Staphylococcus aureus*. Codificada pelo gene cromossômico *mepA*, esta bomba desempenha um papel importante na resistência bacteriana, embora esteja associada a um menor grau de resistência em comparação com outras bombas de efluxo descritas em *S. aureus*. A MepA tem a capacidade de expulsar fluoroquinolonas (como ciprofloxacina e norfloxacina) e compostos de amônio quaternário (como cloreto de benzalcônio e tetrafenilfosfônio), aumentando a CIM desses antimicrobianos (KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005; MCALEESE et al., 2005; HUANG et al., 2022).

Figura 5: Representação da estrutura da proteína MepA.



(A) Representação das fitas na estrutura da MepA. Os números de hélice e resíduos específicos são indicados. O resíduo 20 encontra-se na extremidade N-terminal e o resíduo 270 está marcado no C terminal. As quatro folhas-β centrais estão rotuladas. Os resíduos do sítio ativo central são representados em esferas e bastões e as seis cisteínas destacadas em rosa-claro. (B) Vista superior e cilíndrica da MepA. Visão da face voltada para o citoplasma da célula. (C) Visão da face proteica voltada para o exterior da célula, estando a face citoplasmática da proteína, longe do leitor, conforme indicado pelas setas. Os segmentos transmembranares e alguns resíduos específicos são indicados, assim como a cavidade central oval demarcada.

Fonte: adaptado de Marcyjaniak et al. (2004) e Schindler et al. (2013).

A proteína MepA é composta por 451 aminoácidos e 12 segmentos transmembranares, características comuns às bombas da família MATE. Sua fonte de energia para o transporte de substratos é o gradiente de íons sódio (Na^+), diferindo de outras bombas MATE que

utilizam o gradiente de prótons (H^+) (HE et al., 2004; KURODA; TSUCHIYA, 2009; MORITA et al., 2000). O gene *mepA* está integrado ao *operon mepRAB* e sua regulação depende da proteína repressora MepR. Quando ocorrem mutações em *mepR* podem levar a inativação de MepR, resultando em uma superexpressão de mepA e, consequentemente, no aumento da resistência bacteriana (SCHINDLER et al., 2013a; SCHINDLER et al., 2013b; MARTIN et al., 2023).

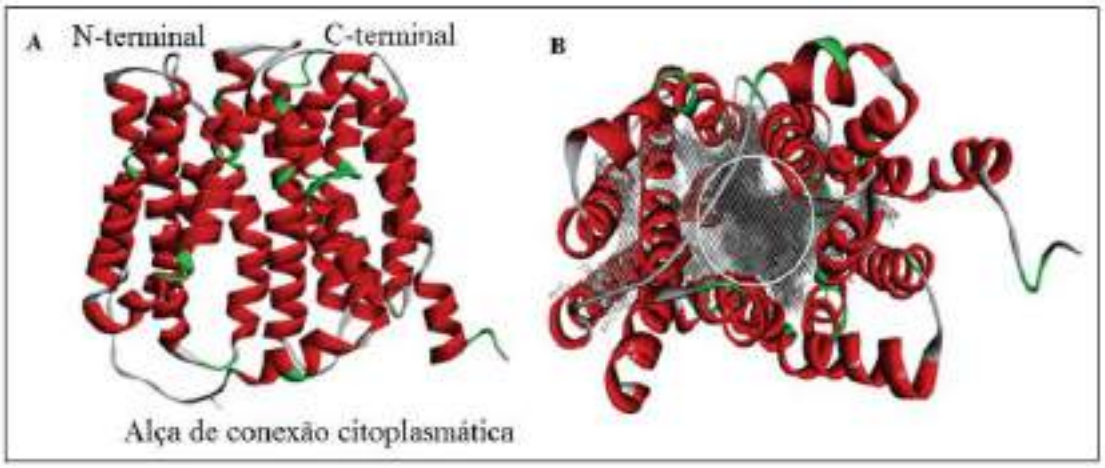
A expressão de MepA em cepas de *S. aureus* é associada ao aumento da CIM de diversos antibióticos, dificultando o tratamento de infecções causadas por essa bactéria. Por isso, estratégias para inibir a atividade da MepA têm sido amplamente investigadas, uma vez que a inibição funcional dessa bomba de efluxo é crucial para reduzir a resistência bacteriana e restaurar a eficácia dos antimicrobianos existentes (FREITAS et al., 2021).

3.2.1.2 Bomba de efluxo NorA

A bomba de efluxo NorA, amplamente estudada em *Staphylococcus aureus*, é sintetizada pela expressão do gene *norA*, localizado no fragmento *Smal D* do cromossomo bacteriano (NG; TRUCKSIS; HOOPER, 1994). Essa proteína pertence à superfamília dos principais facilitadores (MFS) e desempenha um papel fundamental na resistência às fluoroquinolonas e outros compostos antimicrobianos, reduzindo sua concentração intracelular no patógeno-alvo, contribuindo para a redução da eficácia terapêutica e aumento do risco de surgimento de resistência de alto nível (PIDDOCK et al., 2006; POOLE, 2007).

NorA é uma proteína de 388 aminoácidos com massa molecular de 42,38 kDa, constituída por 12 segmentos transmembranares, localizada na membrana citoplasmática (NEYFAKH; BORSCH; KAATZ, 1993; NG; TRUCKSIS; HOOPER, 1994). Essa bomba de efluxo é homóloga à Bmr de *Bacillus subtilis* (AHMED et al., 1994; NEYFAKH et al., 1992; ZHELEZNOVA et al., 1999) e protege *S. aureus* contra compostos lipofílicos e monocatiônicos, como brometo de etídio, cetrimida, cloreto de benzalcônio, brometo tetrafenilfosfônio e acriflavina, além de conferir resistência a quinolonas hidrofílicas como norfloxacina e ciprofloxacina (HSIEH et al., 1998; KAATZ & SEO, 1995).

Figura 6: Representação em fitas da estrutura de NorA.



(A) domínios N- e C-terminais conectados pela alça de conexão citoplasmática. (B) Visão superior das 12 α-hélices transmembranares com uma cavidade grande de ligação ao substrato em cinza, marcada com um círculo, composta pelas hélices I, II, IV e V da parte N-terminal e as hélices VII, VIII, X e XI da região C-terminal.

Fonte: adaptado de Bhaskar et al. (2016).

A regulação gênica da NorA ainda não é totalmente compreendida. Sabe-se que mutações no promotor do gene *norA* podem resultar em superexpressão dessa proteína (NG; TRUCKSIS; HOOPER, 1994), e que o sistema regulatório *ArlSR* também influencia sua expressão. A deleção do sistema *ArlSR*, resultou na expressão constitutiva de NorA (FOURNIER; ARAS; HOOPER, 2000). Além disso, outras bombas de efluxo homólogas, como norB e norC, também estão presentes em *S. aureus* e são negativamente reguladas pela *mgrA*, enquanto *norG* atua regulando positivamente norB (TRUONG-BOLDUC; HOOPER, 2007).

Duas cepas principais de *S. aureus* utilizadas como modelos de estudos de NorA são: a SA-1199, considerada do tipo selvagem, que apresenta expressão basal de NorA, e a SA-1199B, que superexpressa constitutivamente a proteína devido a mutações no promotor do gene *norA* (KAATZ; SEO, 1995; KAATZ; SEO; RUBLE, 1993). Em estudos, foi analisado a adição do inibidor reserpina que reduziu a CIM de brometo de etídio e norfloxacina em cepas SA-1199, sugerindo que a NorA, embora presente em níveis baixos, desempenha um papel relevante na resistência antimicrobiana (KAATZ; SEO; RUBLE, 1993). Já em SA-1199B, foi demonstrado que a superexpressão de NorA é funcionalmente constitutiva, conferindo resistência mais eficiente e expressiva em relação à cepa selvagem (COUTO et al., 2008; KAATZ; SEO, 1995).

O mecanismo de ação de NorA está relacionado ao transporte ativo de compostos para o meio extracelular, utilizando a força próton-motriz como fonte de energia. Essa energia é gerada pelo gradiente de prótons através da membrana, permitindo o antiporte droga/H+ (NG; TRUCKSIS; HOOPER, 1994; PALAZZOTTI et al., 2019). Inibidores como o protonóforo CCCP dissipam esse gradiente, inibindo o efluxo mediado por NorA e restaura a eficácia de compostos como brometo de etídio e norfloxacina (KAATZ; SEO; RUBLE, 1993; NG; TRUCKSIS; HOOPER, 1994).

NorA apresenta alta diversidade genética, com três alelos descritos até o momento, que diferem entre si em até 10% na sequência nucleotídica. Essa diversidade genética, combinada com sua regulação complexa e papel na resistência antimicrobiana, torna NorA um alvo importante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, como inibidores específicos de bombas de efluxo, que podem ser empregados para superar a resistência às fluoroquinolonas e outros antibióticos (HOOPER, 1999; NOGUCHI et al., 2004; SCHMITZ et al., 1998a; SIERRA et al., 2000).

3.2.2 Permeabilidade da membrana bacteriana e implicações na resistência antimicrobiana

A permeabilidade da membrana bacteriana constitui um fator determinante tanto para a absorção de antibióticos quanto para a adaptação microbiana a diferentes estresses ambientais. Em bactérias Gram-negativas, a presença de uma membrana externa assimétrica rica em lipopolissacarídeos representa a principal barreira à entrada de compostos hidrofílicos, enquanto em bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, as alterações de permeabilidade estão majoritariamente associadas à membrana citoplasmática e à sua composição lipídica. Essas diferenças estruturais explicam, em grande medida, a variabilidade observada na suscetibilidade antimicrobiana entre esses grupos bacterianos (EPAND et al., 2011; ZGURSKAYA; RYBENKOV, 2020).

Observa-se que a permeabilidade da membrana depende diretamente de propriedades físico-químicas da bicamada lipídica, como fluidez, espessura e estado de organização molecular, além da presença de vias proteicas específicas, incluindo porinas e canais. Membranas mais ordenadas e espessas tendem a restringir a difusão passiva de solutos, enquanto membranas mais fluidas favorecem maior permeabilidade. Em bactérias Gram-negativas, a modulação da expressão e da seletividade das porinas destaca-se como um mecanismo adaptativo essencial para limitar o influxo de antibióticos e contribuir para a resistência antimicrobiana (LUNDBAEK et al., 2010; NIKAIDO, 2003).

A membrana bacteriana não constitui uma estrutura estática, sendo rapidamente modulada em resposta a condições ambientais adversas. Em *Salmonella*, por exemplo, a exposição a espécies reativas de oxigênio (EROs) induz uma redução significativa da permeabilidade da membrana externa, mediada por modificações redox-dependentes em porinas como OmpA e OmpC Esses dados reforçam o papel da membrana externa como principal barreira limitante à entrada de agentes oxidantes e como elemento central na sobrevivência bacteriana (VAN DER HEIJDEN et al., 2016; PAGÈS et al., 2008).

No contexto de *Pseudomonas aeruginosa*, a permeabilidade a antibióticos beta-lactâmicos está fortemente associada à expressão de porinas específicas, como OprD. A perda ou redução dessa via de entrada resulta em diminuição expressiva da permeabilidade e consequente aumento da resistência, mesmo quando as variações na concentração inibitória mínima são relativamente discretas, evidenciando que pequenas alterações estruturais podem ter impacto clínico relevante (CHEVALIER et al., 2017).

Além da arquitetura da bicamada lipídica, a permeabilidade da membrana também se relaciona à carga superficial bacteriana e ao potencial zeta. Em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, a interação com agentes catiônicos promove deslocamento do potencial zeta para valores menos negativos, aumentando a permeabilidade e a captação de moléculas hidrofóbicas. Quando esse efeito ultrapassa um limiar crítico, ocorre comprometimento da integridade da membrana e morte celular, o que valida o potencial zeta como um marcador indireto de dano de membrana (ALVES et al., 2010; HALDER et al., 2015).

Em *Staphylococcus aureus*, diversos agentes antimicrobianos exercem sua ação por meio da permeabilização direta da membrana citoplasmática. Peptídeos endógenos associados a sistemas toxina–antitoxina, como SprA1 e SprA2, promovem despolarização da membrana, formação de poros e liberação de metabólitos intracelulares, culminando na inibição do crescimento bacteriano. Observa-se que a parede celular atua como um fator modulador, atenuando parcialmente os efeitos líticos diretos desses peptídeos (FERMON et al., 2025).

Compostos naturais também apresentam atividade antimicrobiana mediada por disrupção da membrana. O cinamaldeído e diferentes óleos essenciais demonstram causar danos extensos à integridade da membrana e da parede celular, promovendo vazamento de macromoléculas e alterações morfológicas severas em *E. coli* e *Salmonella typhimurium*. Inclusive em linhagens resistentes, além de interferirem na síntese proteica e na formação de biofilmes (HELANDER et al., 1998; NAZZARO et al., 2013).

O NH125 destaca-se por sua capacidade de se inserir na membrana bacteriana, aumentar

a fluidez da bicamada e induzir rápida permeabilização da membrana de *S. aureus*, mostrando-se particularmente eficaz contra células persistentes A correlação observada entre aumento da fluidez da membrana e atividade bactericida reforça a relevância dos parâmetros biofísicos como alvos terapêuticos promissores (KIM et al., 2016).

Entretanto, nem todas as estratégias antimicrobianas envolvem aumento direto da permeabilidade. Compostos como o ácido láurico atuam predominantemente como moduladores de bombas de efluxo, potencializando a ação de antibióticos sem causar dano significativo à membrana. De forma semelhante, a diosgenina interfere no metabolismo energético e na formação de células persistentes, modulando a fluidez da membrana sem alterações expressivas na permeabilidade, indicando que esses parâmetros podem ser regulados de maneira independente (SEO; KIM; KIM, 2025; SILVEIRA et al., 2025).

3.3 NANOFORMULAÇÃO

A nanotecnologia constitui uma área multidisciplinar em pleno desenvolvimento, focada na manipulação e produção de estruturas na escala nanométrica, o que possibilita aplicações inovadoras em diversos setores, especialmente na medicina e na indústria. O termo "nano", de origem grega, significa "anão" e refere-se à escala extremamente reduzida dessas estruturas, tipicamente entre 1 e 100 nanômetros. Nessa escala, sistemas de nanoformulações são capazes de superar as limitações de solubilidade, biodisponibilidade e estabilidade de fármacos, ampliando sua aplicabilidade clínica. Dessa forma, a nanotecnologia tem sido aplicada em diversos contextos terapêuticos, com resultados promissores em tratamentos oncológicos, terapias gênicas e desenvolvimento de vacinas (SEKHON, 2010; ANDRONESCU; GRUMEZESCU, 2017).

O conceito de nanotecnologia foi porposto por Norio Taniguchi em 1974, referindo-se à capacidade de projetar materiais e manipular materiais com precisão na escala nanométrica. Inicialmente restrita à manipulação de materiais, a nanotecnologia evoluiu para incluir o desenvolvimento de dispositivos e sistemas com controle em nível molecular e atômico. A aplicação desses materiais na indústria tem proporcionado avanços significativos no desempenho de produtos, bem como a incorporação de propriedades físico-químicas específicas que otimizam sua fabricação e funcionalidade (SANFELICE et al., 2022; JORGENSEN et al., 2009; RAMSDEN, 2005).

Na medicina, a nanotecnologia tem viabilizado avanços importantes, sobretudo no desenvolvimento de sistemas de administração de fármacos com entrega controlada e direcionamento específico ao sítio de ação. Essa estratégia contribuiu para redução de efeitos

adversos, melhora na eficácia terapêutica e promovendo a liberação prolongada dos medicamentos, aumentando assim, a penetração intracelular dos nanomateriais em células-alvo. Além disso, nanopartículas vêm sendo empregadas em dispositivos médicos como agentes de contraste para diagnósticos por imagem, sistemas adjuvantes à radioterapia e terapias anticancerígenas (SCHUSTER et al., 2025; GALPER et al., 2012; LIU et al., 2010; CORMODE et al., 2014; PERLMAN et al., 2015; DE SOUSA et al., 2024).

No setor industrial, os nanomateriais têm revolucionado a eletrônica e a fabricação de dispositivos, possibilitando o desenvolvimento de componentes mais leves, resistentes e energeticamente eficientes. Transistores baseados em nanotubos de carbono, por exemplo, têm apresentado o potencial de substituir o silício na computação, resultando em processadores mais rápidos e com menor consumo de energia. Ademais, revestimentos nanotecnológicos autolimpantes, tecidos com propriedades antibacterianas e tintas resistentes a radiação ultravioleta (UV) exemplificam algumas das aplicações inovadoras que contribuem para uma melhor qualidade dos produtos e da segurança dos usuários (FERNANDES; OLIVEIRA, 2019; FIALKOSKI; MALFATTI, 2019; ANTUNES-FILHO; BACKX, 2020).

A nanotecnologia também apresenta elevado potencial para soluções ambientais sustentáveis, incluindo catalisadores para redução de poluentes, materiais biodegradáveis e sistemas mais eficientes de purificação de água. No entanto, seus impactos ambientais e biológicos ainda permanecem como alvos de estudo, uma vez que as nanopartículas podem apresentar riscos ao meio ambiente e a saúde humana. Nesse contexto, pesquisas voltadas a biossegurança e regulamentação estão em desenvolvimentos, para assegurar o uso ético e seguro da nanotecnologia (NOLASCO, 2017; MARCONE, 2015).

3.3.1 Lipossomas

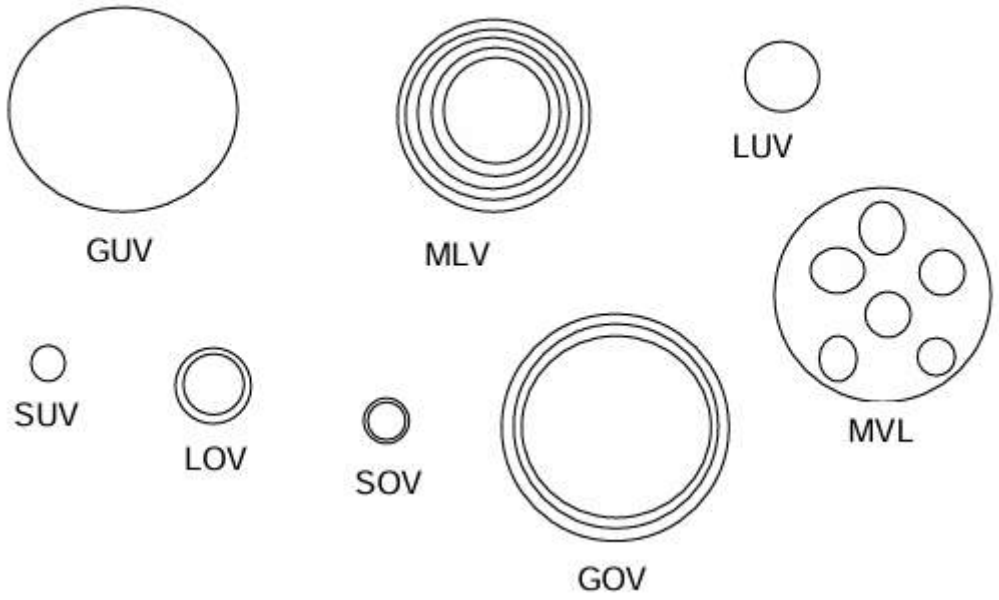
Os lipossomas, vesículas esféricas formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas, emergiram como sistemas pioneiros na nanotecnologia farmacêutica, revolucionando a entrega de fármacos (BUDAI; SZÓGYI, 2001). Descobertos por Bangham em 1965 (BANGHAM et al., 1965; CHANG; YEH, 2012), esses nanocarreadores são constituídos por lipídios naturais ou sintéticos de natureza anfifílica, caracterizados por um grupo de cabeças polares covalentemente ligado a uma ou duas cadeias hidrofóbicas de hidrocarbonetos (FRÉZARD, 1999). Sua arquitetura molecular única permite a encapsulação de fármacos hidrofílicos no meio aquoso interno e de substâncias hidrofóbicas na bicamada lipídica, conferindo-lhes uma versatilidade notável (KYLE; SAHA, 2014; LI et al., 2017).

A biocompatibilidade e biodegradabilidade dos lipossomas, aliadas à sua semelhança estrutural com as membranas biológicas (MASSERINI, 2013; LAMICHHANE et al., 2018), tornam-nos sistemas ideais para a entrega de fármacos. Três décadas após sua descoberta, o primeiro medicamento lipossomal, Ambisome®, foi introduzido no mercado (DAVIDSON et al., 1994), marcando o início de uma era de crescimento exponencial no desenvolvimento de fármacos lipossomais (ALLEN; CULLIS, 2013).

A encapsulação de fármacos em lipossomas oferece proteção contra degradação enzimática, inativação química e rápida depuração plasmática, resultando em um aumento significativo na meia-vida e na eficácia terapêutica (BOZZUTO; MOLINARI, 2015). Além disso, a redução da exposição de tecidos saudáveis a medicamentos tóxicos minimiza efeitos adversos, permitindo a administração de doses terapêuticas mais baixas (PIMENTEL et al., 2007). A liberação controlada e progressiva dos fármacos encapsulados é particularmente vantajosa em aplicações clínicas, como no tratamento de doenças oncológicas, onde os lipossomas são utilizados para a entrega direcionada de quimioterápicos, reduzindo a toxicidade em tecidos não-alvo (HARASHIMA et al., 1994; WOODLE, 1995).

Os lipossomas podem ser classificados com base em suas características estruturais e metodologias de preparação. Quanto ao tamanho e número de lamelas, destacam-se três tipos principais: vesículas unilamelares pequenas (SUV, *small unilamellar vesicles*), com diâmetro de até 100 nm e uma única bicamada; vesículas unilamelares grandes (LUV, *large unilamellar vesicles*), com diâmetro superior a 100 nm e uma bicamada; e vesículas multilamelares (MLV, *multilamellar vesicles*), que podem atingir vários micrômetros e são compostas por múltiplas bicamadas concêntricas (MASSERINI, 2013; FERNANDES et al., 2018).

Figura 7: Representação esquemática dos vários tipos de lipossomas, mostrando a base da sua classificação em termos de tamanho e números de lamelas em: vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelarespequenas (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV), vesículas unilamelares gigantes (GUV), lipossomas multivesiculares (MVL), vesículas oligolamelares pequenas (SOV),vesículas oligolamelares grande (LOV), vesículas oligolamelares gigante (GOV). Cada linha representa uma bicamada lipídica(lamela).

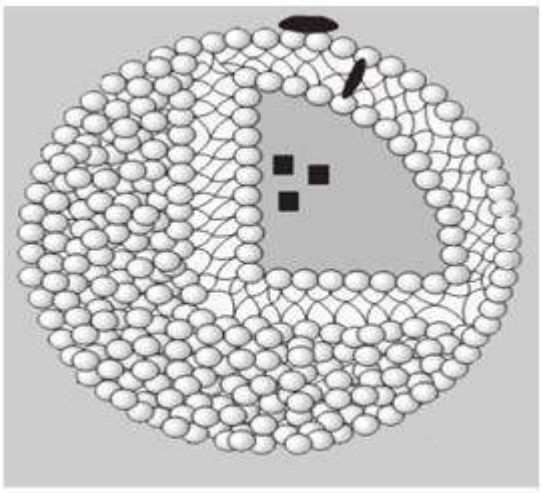


Fonte: Santos e Castanho, 2002.

A metodologia de preparação também influencia a classificação dos lipossomas. Técnicas como evaporação de fase reversa, extrusão por pressão francesa e injeção de éter são amplamente utilizadas para a produção desses sistemas (VEMURI; RHODES, 1995). Com o avanço da nanotecnologia, os lipossomas passaram por otimizações estruturais, permitindo sua atuação em sítios específicos e aumentando sua eficácia terapêutica (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007). Atualmente, os lipossomas são categorizados em quatro tipos principais: convencionais, de longa circulação, catiônicos e sensíveis ao pH (DARAEE et al., 2016).

Os lipossomas convencionais são os mais simples, geralmente compostos por fosfolipídios sintéticos e colesterol. Apesar de sua composição simplificada, eles superam desafios terapêuticos como a biodistribuição inadequada e a falta de direcionamento para receptores específicos, sendo eficazes em diversas aplicações. Formulações lipossomais convencionais já estão disponíveis comercialmente, destacando-se no tratamento de infecções fúngicas em pacientes imunossuprimidos e em terapias oncológicas (IMMORDINO et al., 2006).

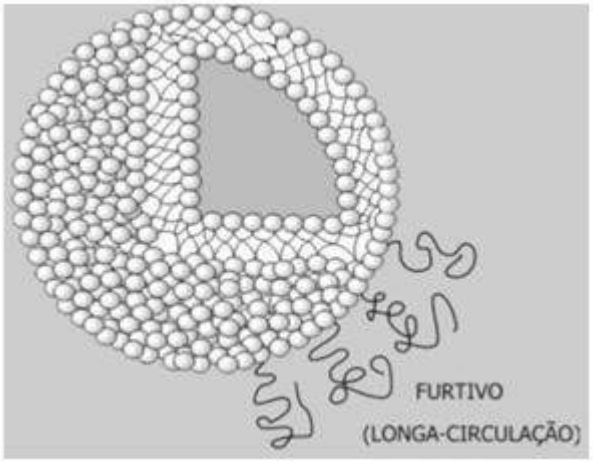
Figura 8: Estrutura do lipossoma convencional.



Fonte: Batista, Carvalho e Magalhães, 2007

A fagocitose pelos sistemas mononucleares fagocitários (MPS) é um desafio para a distribuição de fármacos encapsulados em lipossomas. Para contornar esse problema, lipossomas de longa circulação foram desenvolvidos, incorporando polietilenoglicol (PEG) em sua superfície. O PEG forma uma camada hidratada que reduz a agregação de vesículas e impede a ligação de opsoninas, minimizando a captação pelo MPS e prolongando o tempo de circulação no organismo (MILLA et al., 2012).

Figura 9: Estrutura lipossoma furtivo.

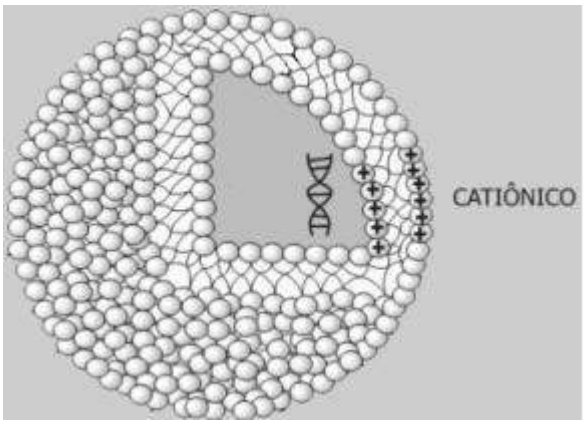


Fonte: Batista, Carvalho e Magalhães, 2007

Os lipossomas sensíveis ao pH foram projetados para explorar as alterações de pH em tecidos patológicos, como tumores e áreas inflamadas, onde o pH é significativamente mais baixo do que em tecidos saudáveis. Esses lipossomas são compostos por misturas de fosfatidiletanolamina (PE) e compostos anfifílicos com grupos ácidos protonáveis, que permitem a liberação controlada do fármaco em ambientes ácidos (DE ARAÚJO LOPES et al., 2013; BATISTA et al., 2007).

Os lipossomas catiônicos são formulados com lipídios carregados positivamente, como o 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP), que facilita a encapsulação de moléculas carregadas negativamente, como DNA e RNA. Esses lipossomas são amplamente utilizados em terapias gênicas e vacinais, devido à sua capacidade de interagir com membranas celulares e promover a entrega eficiente de ácidos nucleicos (KHALIL et al., 2018; DE ARAÚJO LOPES et al., 2013).

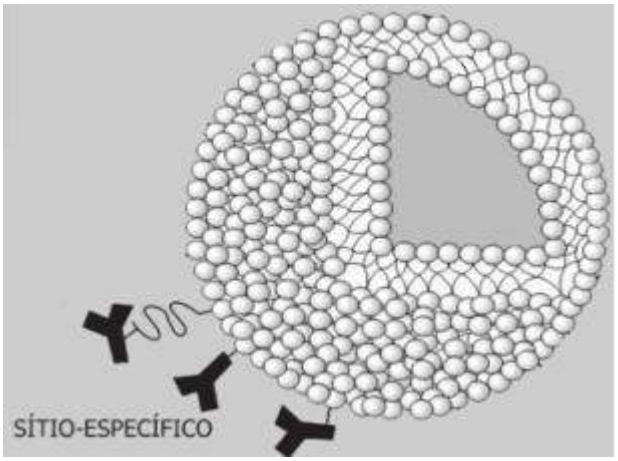
Figura 10: Estrutura lipossoma catiônico. Lipossomas polimórficos se tornam reativos devido à mudança na sua estrutura desencadeada por uma alteração de pH, temperatura ou carga eletrostática.



Fonte: Batista,Carvalho e Magalhães, 2007.

Os lipossomas direcionados são modificados em sua superfície com ligantes específicos, como anticorpos, proteínas ou moléculas que interagem com receptores celulares, permitindo a entrega precisa de fármacos a tecidos ou células-alvo. Essa abordagem aumenta a especificidade e reduz os efeitos colaterais, sendo particularmente útil em terapias oncológicas e no tratamento de doenças infecciosas (BATISTA et al., 2007; WANG et al., 2018).

Figura 11: Estrutura lipossoma sítio-específico.



Fonte: Batista, Carvalho e Magalhães, 2007

Os lipossomas têm sido amplamente explorados em diversas áreas terapêuticas, incluindo oncologia, doenças infecciosas e terapia gênica. Sua capacidade de encapsular gases terapêuticos e biomoléculas, como RNA e DNA, amplia ainda mais seu potencial em aplicações médicas (FIX et al., 2015; PENG et al., 2013). No entanto, desafios persistem, como a escalabilidade da produção, a estabilidade a longo prazo e as interações imunes (BOZZUTO; MOLINARI, 2015). A toxicidade potencial e a resposta imunológica a lipossomas também são preocupações que precisam ser abordadas para garantir a segurança desses sistemas (FRÉZARD et al., 2005).

3.4 DERIVADOS TIAZÓLICOS

Os compostos heterocíclicos constituem uma classe amplamente investigada na química medicinal, em razão de sua estrutural e funcional. Caracteriza-se pela presença de pelo menos um heteroátomo distinto do carbono, como oxigênio, nitrogênio ou enxofre, incorporado à estrutura cíclica, o que lhes confere propriedades químicas e biológicas importantes. Esses compostos estão amplamente distribuídos em moléculas bioativas naturais, incluindo alcaloides, flavonoides e antibióticos, além de integrarem a base estrutural de inúmeros fármacos utilizados no tratamento de diversas doenças (FERREIRA et al., 2022; SINGH et al., 2022; SOUZA et al., 2005).

A estrutura de muitos fármacos, inclui anéis aromáticos, sendo comum a presença de múltiplos sistemas heterocíclicos. Nesse contexto, o tiazol, um heterociclo aromático de cinco membros contendo enxofre e nitrogênio, assumindo papel de destaca por sua ampla recorrência em produtos naturais e compostos bioativos sintéticos. Esse núcleo apresenta elevada relevância na síntese orgânica, sendo empregado em processos de condensação,

oxidação e transformação de grupos funcionais, além de facilitar a formação de ligações carbono-carbono. Sua versatilidade estrutural favorece a interação com diferentes alvos biológicos, tornando o tiazol como uma unidade estrutural estratégica para a química medicinal (FERREIRA et al., 2022; BARREIRO; FRAGA, 2015).

A incorporação do anel tiazólico em moléculas bioativas está associado a uma diversidade de propriedades farmacológicas. Estudos indicam que compostos derivados desse núcleo apresentam atividades anticancerígena, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral e anticonvulsivante. Além disso, o tiazol pode exibir bioisosterismo com outros heterociclos, como oxazol e imidazol, possibilitando modificações estruturais de fármacos para otimizar sua eficácia e reduzir efeitos adversos. Entre os fármacos que contêm esse núcleo destaca-se o tiabendazol, ritonavir, meloxicam e nitazoxanida, amplamente utilizados na prática clínica para o tratamento de diferentes condições médicas (EVREN et al., 2022; THOMAS; DAVID, 2012; BARREIRO; FRAGA, 2015).

A síntese de compostos tiazólicos pode ser realizada por diferentes abordagens, destacando-se a reação de Hantzsch como um método clássico amplamente utilizado. Essa estratégia permite a obtenção de derivados estruturalmente diversificados, ampliando seu potencial terapêutico. No desenvolvimento de novos fármacos, a pesquisa em química computacional e modelagem molecular tem desempenhado um papel essencial, possibilitando a otimização de interações biomoleculares e a identificação de novos alvos terapêuticos. Adicionalmente, a incorporação de conceitos da nanotecnologia e a engenharia molecular ao design de compostos heterocíclicos tem promovido o desenvolvimento de sistemas mais seletivos e seguros. Dessa forma, a contínua evolução das metodologias sintéticas e a aplicação de tecnologias emergentes, reforçam a importância dos compostos heterocíclicos na medicina moderna (KALASHNIKOV et al., 2024; CHUGH et al., 2022).

4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

CAPÍTULO I: FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL COM COMPOSTOS TIAZÓLICOS CONTRA BOMBAS DE EFLUXO BACTERIANAS

Ray Silva de Almeida[a], Priscilla Ramos Freitas[a], Ana Carolina Justino de Araujo[a], Saulo Relison Tintino[a], Gustavo Marinho Miranda[b], Gustavo Miguel Sigueira[a], Sheila Alves Gonçalves[a], Diogo Teixeira Carvalho[c], Thiago Belarmino de Souza[d], Laís Regina dos Santos Folquitto[c], Danielle Ferreira Dias[c], Henrique Douglas Melo Coutinho[a]

a Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri (URCA), Crato 63105-010, CE, Brazil
b Instituto Gonçalo Moniz (IGM), Fiocruz, Bahia, Brazil
c Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNIFAL, Minas Gerais, Brazil
d Escola de Farmácia – UFOP, Minas Gerais, Brazil

Revista: Biomedicine & Pharmacotherapy: Biomedicine & Pharmacotherapy | Journal | ScienceDirect.com by Elsevier **/ Qualis: A1 / Fator de impacto 6,9 / Situação: Publicado –**

DOI: https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117600

Resumo: Apesar do impacto positivo inicial do advento dos antibióticos, a disseminação de bactérias resistentes constitui um desafio crítico para a saúde mundial. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antibacteriana direta, potencialização de antibióticos em bactérias multirresistentes *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, e analisar o potencial de inibição de bombas de efluxo nas cepas de *S. aureus* 1199B e K2068, mediada por derivados tiazólicos baseados no eugenol encapsulados por lipossomas. A preparação das nanopartículas lipossomais contendo derivados tiazólicos foram realizadas por microfluidica. A CIM, o efeito potencializador e avaliação da inibição de bombas de efluxo por brometo de etídio foram realizadas em placas de 96 poços. Todas as experiências foram realizadas em triplicado para todas as cepas bacterianas. Na avaliação da atividade direta, não foi possível observar nenhum resultado clinicamente relevante para nenhuma das cepas testadas, sendo que todas apresentaram CIM ≥1024 µg/mL. Quanto na análise da potencialização de antibióticos associado aos derivados frente a cepas multirresistente de *S. aureus*, o composto LF 16 associado a norfloxacina, reduziu a CIM do antibiótico de 128 µg/mL para 64 µg/mL. Já associados a gentamicina, foi possível observar que houve uma redução significativa com todos os compostos (LF 12, 13, 16 e 26). Na avaliação da potencialização de antibióticos norfloxacina frente a cepa multirresistente de *P. aeruginosa*, não houve nenhuma redução significativa. Porém, quando associados ao antibiótico gentamicina, foi possível visualizar uma redução significativa para todos os compostos. Dentre os compostos testados com a cepa *S. aureus* 1199B, apenas o LF 26 reduziu a CIM do brometo.

Com a cepa *S. aureus* K2068, o comportamento dos derivados se apresentou semelhante, onde somente o composto LF 26 demonstrou reduzir a CIM. Na avaliação da inibição das bombas pelos compostos associados aos antibióticos percebemos que na cepa *S. aureus* 1199B, todos os compostos mostraram resultados de redução da CIM do antibiótico de forma relevante. A mesma coisa percebemos com a bomba mepA, onde 3 dos 4 compostos apresentaram resultados relevantes quanto a redução da CIM do antibiótico. Conclui-se que os derivados tiazólicos baseados no eugenol encapsulados por lipossomas não apresentaram atividade direta, porém, quando avaliamos a potencialização dos antibióticos percebemos que eles potencializaram a ação dos fármacos contra as cepas multirresistentes testadas. Por conseguinte, os resultados da atividade de inibição das bombas de efluxo NorA e MepA, nos mostraram que apenas o composto LF 26 pode atuar como inibidor, pois apresentou atividade de redução tanto associado ao brometo de etídio, quanto, aos antibióticos.

Palavras-chave: Lipossomas**;** Tiazólicos; NorA; MepA.

Biomedicine & Pharmacotherapy 180 (2024) 117600

Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biopha

Liposomal formulation with thiazolic compounds against bacterial efflux pumps

Ray Silva de Almeida [a], Priscilla Ramos Freitas [a], Ana Carolina Justino de Araujo [a], Saulo Relison Tintino [a], Jaime Ribeiro-Filho [b], Gustavo Marinho Miranda [c], Gustavo Miguel Sigueira [a], Sheila Alves Gonçalves [a], Diogo Teixeira Carvalho [d], Thiago Belarmino de Souza [e], Laís Regina dos Santos Folquitto [d], Danielle Ferreira Dias [d], António Raposo [f,*], Ariana Saraiva [g], Heesup Han [h], Henrique Douglas Melo Coutinho [a,*]

[a] Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri (URCA), Crato, CE 63105-010, Brazil
[b] Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Fiocruz Ceará, Eusébio, CE 60180-900, Brazil
[c] Gonçalo Moniz Institute (IGM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Salvador, BA, Brazil
[d] Faculty of Pharmaceutical Sciences – UNIFAL, Minas Gerais, Brazil
[e] School of Pharmacy – UFOP, Minas Gerais, Brazil
[f] CBIOS (Research Center for Biosciences and Health Technologies), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal
[g] Research in Veterinary Medicine (I-MVET), Faculty of Veterinary Medicine, Lisbon University Centre, Lusófona University, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal
[h] College of Hospitality and Tourism Management, Sejong University, 209 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul 05006, South Korea

ARTICLE INFO

Keywords:
Antibiotic resistance
Efflux pump
Liposomes
MepA
NorA
Thiazoles

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of liposome-encapsulated eugenol-based thiazolic derivatives against efflux pump-carrying bacteria. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined to evaluate the antibacterial activity and antibiotic potentiation against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, as well as to analyze the inhibition of efflux pumps in *S. aureus* strains 1199B and K2068 in the ethidium bromide assay. The direct antibacterial activity analysis showed no clinically relevant results since the compounds presented MICs ≥1024 μg/mL. Regarding the analysis of antibiotic potentiation against multidrug-resistant (MDR) strains of *S. aureus*, compound LF16 reduced norfloxacin MIC from 128 μg/mL to 64 μg/mL. All associated with gentamicin caused a significant antibiotic MIC reduction. None of the compounds could potentiate the activity of norfloxacin against *P. aeruginosa*. However, all of them potentiated the activity of gentamicin against the same strain. Only the LF 26 caused a significant MIC reduction in the ethidium bromide assay, suggesting efflux inhibition in the *S. aureus* 1199B strain. Similar results were observed with the K2068 strain. Observing antibiotic MIC reduction *S. aureus* strains carrying the NorA and MepA proteins brought additional evidence of efflux pump inhibition. Our results indicate that while eugenol-based thiazoles didn't exhibit direct activity, they can potentiate the antibiotics activity against MDR strains of *P. aeruginosa* and *S. aureus*. Among them, compound LF 26 potentiated the inhibitory effects of ethidium bromide and antibiotics against *S. aureus* strains carrying the NorA and MepA proteins, indicating a potential role of this class of compounds as efflux pump inhibitors.

* Corresponding authors.
E-mail addresses: antonio.raposo@ulusofona.pt (A. Raposo), hdmcoutinho@gmail.com, hdmcoutinho@urca.br (H.D.M. Coutinho).

https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117600
Received 9 August 2024; Received in revised form 12 October 2024; Accepted 21 October 2024
Available online 30 October 2024
0753-3322/© 2024 The Author(s). Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. INTRODUÇÃO

Apesar do impacto positivo inicial do advento dos antibióticos, a disseminação de bactérias resistentes constitui um desafio crítico para a saúde mundial (Huemer et al., 2020) [1]. Conforme dados da Organização Mundial da Saúde, a resistência bacteriana é responsável por aproximadamente 700.000 mortes anuais, representando uma séria ameaça à saúde global, com estimativas de 10 milhões de mortes até 2050 decorrentes de bactérias multirresistentes (MDR) (Reygart, 2018; Willyard, 2017) [2,3].

Entre as MDR gram-negativas, destaca-se *Pseudomonas aeruginosa*, um patógeno oportunista associado a infecções em indivíduos imunocomprometidos, sepse e pneumonia (Aloush et al., 2006; Kunz Coyne et al., 2022; Qin et al., 2022) [4-6]. No contexto das MDR gram-positivas, a notável é *Staphylococcus aureus*, que pode desencadear diversas infecções, principalmente em ambientes hospitalares (Lowy, 2003; Onanuga & Temedie, 2011) [7,8]. Múltiplos mecanismos contribuem para a resistência bacteriana, incluindo a inativação do fármaco, modificação do alvo e redução da concentração intracelular do antibiótico, sendo este último mediado por proteínas denominadas bombas de efluxo (Blair, 2015; Giedraitienė, 2011; Soto, 2013) [9-11].

A espécie *Staphylococcus aureus* é capaz de apresentar diversos tipos de bombas de efluxo. Dentre elas, a bomba *norA* é a mais estudada, responsável pelo efluxo de fluoroquinolonas, como norfloxacina e ciprofloxacino, biocidas e brometo de etídio (Brawley et al. 2022; Zimmermann et al., 2019) [12,13]. Ainda, destaca-se a bomba *mepA*, também responsável pelo efluxo de fluoroquinolonas e de outras substâncias, como clorexidinas (Costa et al., 2013) [14].

Diante desta problemática, há uma necessidade de pesquisas com novos compostos e substâncias capazes de contornar os mecanismos de resistência. Nesse cenário, destaca-se o eugenol, um composto natural derivado de plantas das famílias *Lamiaceae*, *Myrtaceae* e *Lauraceae*, conhecido por suas diversas atividades biológicas (Mohammadi Nejad; Özgüneş; Başaran, 2007; Ulanowska; Olas, 2021) [15,16]. A estratégia de hibridização molecular do eugenol, e seus derivados, com os grupos tiazol, imino-tiazol, amino-tiazol ou hidrazona-tiazol, emerge como estratégia promissora, uma vez que essas moléculas possuem efeitos biológicos já descritos (Stana et al., 2016; Cordeiro; Kachro., 2020; Makam; Kankanala; Prakash., 2013) [17-19], e a complexação pode potencializar estes efeitos. Além dessa abordagem, a estratégia de encapsulamento em lipossomas pode ser utilizada a fim de aprimorar a entrega, solubilidade, proteção e eficácia dos compostos (Gonzalez-Gomes; Hosseinidoust, 2020; Liu; Chen; Zhang, 2022) [20,21].

Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antibacteriana direta,

potencialização de antibióticos em bactérias multirresistentes *P. aeruginosa* e *S. aureus*, e analisar o potencial de inibição de bombas de efluxo nas cepas de *S. aureus* 1199B e K2068, mediada por derivados tiazólicos baseados no eugenol encapsulados por lipossomas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMOS

Para a realização dos testes foram utilizadas cepas bacterianas multirresistentes Pseudomonas aeruginosa 24, Staphylococcus aureus 10, e as cepas portadoras de bomba de efluxo Staphylococcus aureus 1199B, portadora da bomba norA e Staphylococcus aureus K2068, portadora da bomba MepA. As bactérias foram doadas pelo Professor Gibbons da Universidade de Londres, Inglaterra. Para a realização dos testes as cepas foram cultivadas em meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI), 24 horas antes do teste e incubadas a uma temperatura de 37 ºC.

2.2 SÍNTESE DOS LIPOSSOMAS

A preparação das nanopartículas lipossomais contendo derivados tiazólicos baseados no eugenol foram realizadas por microfluidica. Inicialmente foi preparada uma solução superconcentrada de 50 mg/mL dos compostos LF 12, 13, 16 e 26 que seriam encapsulados. Para a preparação da fase orgânica que constituiu as nanopartículas lipossomais, foi preparada uma solução lipídica composta por 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), colesterol (CHOL) e diastearol fosfatidilcolina (DSCP), em uma proporção DPPC:CHOL:DSPC de 52:45:3 (mol/mol), considerando-se uma concentração final de lipídios de 35 mM. Após pesados, os lipídios foram solubilizados em álcool etílico absoluto.

Para a fabricação das nanopartículas empregou-se a técnica de microfluidica através do equipamento NanoAssemblr Benchtop (Precision NanosystemsTM), pertencente à Plataforma de Nanotecnologia da Fiocruz Ceará – FioNanoCE. A fim de otimizar a eficiência de encapsulamento, os fatores empregados para a técnica foram: flow rate ratio de 2:1 e total flow ratio de 12 mL/min, considerando as seringas da esquerda e da direita, respectivamente. Na seringa da esquerda, com a fase aquosa, contendo a solução de derivados de eugenol e hidrazinotiazóis diluído, empregou-se um volume total de 3 mL, volume de trabalho de 3 mL e taxa de vazão de 8 mL/min. Já na seringa da direita, contendo a solução lipídica, empregou-se um volume total de trabalho de 1 mL, a uma taxa de vazão de 4 mL/min. A fim de minimizar as perdas no processo, ajustou-se os volumes tanto do expurgo inicial, quanto do expurgo final para 100 µL.

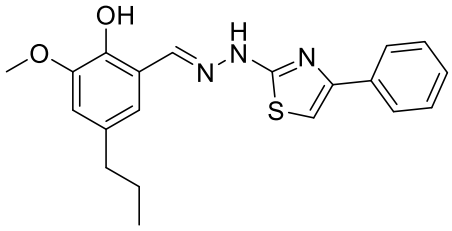
Na preparação das formulações controle (lipossome control) na seringa da esquerda, onde

está a solução aquosa, utilizou-se apenas solução tampão PBS. No caso, a mesma que foi empregada para solubilizar os derivados de eugenol e hidrazinotiazóis. Após a preparação das nanopartículas, a formulação obtida foi inserida em Amicon® Ultra-15 3.000 MWCO e centrifugada a 3.000 rpm, 20ºC por 30 minutos, para a remoção do solvente residual empregado na solubilização dos lipídios. Para tal foi realizada uma diluição/lavagem em Tampão PBS pH 7.2. Essa lavagem foi de 10x o volume inicial da solução. O volume que não passou pela membrana foi recuperado e completado para o volume esperado empregando-se Tampão PBS (Barros et al., 2013) [22].

2.3 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÕES E ANTIBIÓTICOS

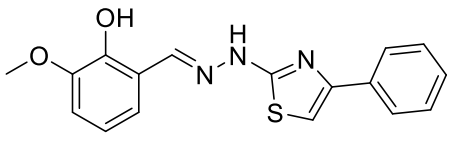
Os derivados tiazólicos baseados no eugenol foram cedidos pela professora Dra. Danielle Ferreira do Instituto de Química – UNIFAL-MG. Os antibióticos, norfloxacina, ciprofloxacina e gentamicina, e as substâncias Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl-hydrazone - CCCP, clorpromazina - CPZ e brometo de etídio foram obtidos através do fabricante Sigma Aldrich. Em relação ao preparo destas substâncias, cada uma foi pesada 10 mg e diluída em 500 µL de solvente dimetilsufóxido (DMSO), com exceção do brometo de etídio que foi diluído totalmente em água destilada estéril. Após essa diluição prévia em DMSO, cada composto, antibiótico e substância foi adicionado 9,265 mL de água destilada estéril, resultando em uma concentração inicial de 1.024µg / mL para cada composto, antibiótico e substância.

LF 12



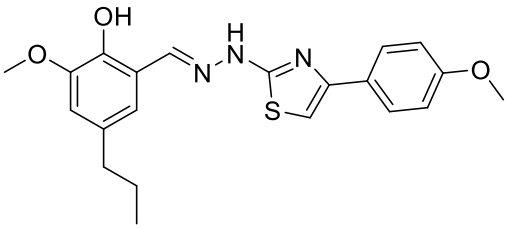
(*E*)-2-methoxy-6-((2-(4-phenylthiazol-2-yl)hydrazineylidene)methyl)-4-propylphenol
Chemical Formula: $C_{20}H_{21}N_3O_2S$

LF 13



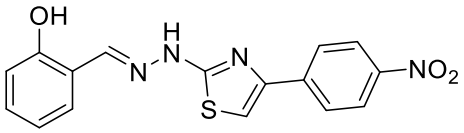
(*E*)-2-methoxy-6-((2-(4-phenylthiazol-2-yl)hydrazineylidene)methyl)phenol
Chemical Formula: $C_{17}H_{15}N_3O_2S$

LF 16



(*E*)-2-methoxy-6-((2-(4-(4-methoxyphenyl)thiazol-2-yl)hydrazineylidene)methyl)-4-propylphenol
Chemical Formula: $C_{21}H_{23}N_3O_3S$

LF 26



(*E*)-2-((2-(4-(4-nitrophenyl)thiazol-2-yl)hydrazineylidene)methyl)phenol
Chemical Formula: $C_{16}H_{12}N_4O_3S$

2.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Nesta etapa, avaliamos a Concentração Inibitória Mínima dos derivados tiazólicos baseados no eugenol (LF12, 13, 16 e 26), como também do CCCP e CPZ. Cada inóculo foi preparado com 10% de Brain Heart Infusion (BHI) na proporção de 1:9. Em seguida, 100 μL do inóculo foram colocados em eppendorfs contendo 900 μL meio BHI a 10%, homogeneizado e transferido 100 μL para placa de 96 poços. Após isso, foi adicionado 100 μL da substância ou composto e microdiluido, obtendo assim concentrações variando de 1024 a 8 μg/mL, seguido de incubação a 37 °C por 24 h. Controles positivos (meio + inóculo) foram incluídos nos últimos poços da placa (NCCLS, 2003)[23]. Após a incubação, 20 μL de resazurina sódica foram adicionados a cada poço, seguido por um período adicional de incubação de 1 h à temperatura ambiente. Uma mudança na cor da solução, devido à redução da resazurina, foi utilizada como indicador de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano. Todas as experiências foram realizadas em triplicado para todas as cepas bacterianas (Mann et al., 1998; Palomino et al., 2002; Coutinho et al., 2008) [24-26].

2.5 ANÁLISE DA POTENCIALIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS EM CEPAS MULTIRRESISTENTES

Para avaliar a capacidade dos compostos (LF 12, 13, 16 e 26) em potencializar o efeito dos antibióticos, as CIMs de norfloxacina e gentamicina foram testadas contra cepas resistentes de P. aeruginosa, e S. aureus. Os compostos foram testados associados ou não aos antibióticos, em concentrações equivalentes ao seu MIC ÷ 8. As leituras foram realizadas conforme a CIM (Coutinho et al., 2008)[26].

2.6 ANÁLISE DE INIBIÇÃO DA BOMBA DE EFLUXO POR REDUÇÃO DA CIM DE BROMETO DE ETÍDIO

Neste teste, a CIM do brometo de etídio foi determinada na presença ou ausência de concentrações subinibitórias dos compostos LF12, 13, 16 e 26, e também, CCCP e CPZ. Resumidamente, os inóculos bacterianos foram preparados em meio BHI 10% e os tratamentos foram adicionados em concentrações equivalentes à sua CIM ÷ 8. Os poços de uma placa de 96 poços foram preenchidos com 100 μL das soluções de cada tratamento e em seguida foi adicionado brometo de etídio aos poços em concentrações variando de 1024 a 0,5 μg/mL. Uma redução na CIM do brometo de etídio foi interpretada como inibição da bomba de efluxo (Tintino et al., 2017)[27]. Os controles experimentais e os valores de MIC para os compostos foram determinados conforme descrito acima. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

2.7 ANÁLISE DA POTENCIALIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA PELA INIBIÇÃO DA BOMBA DE EFLUXO

Considerando que as cepas de S. aureus 1199B e K2068 carregam genes que codificam proteínas de efluxo associadas à resistência de antibióticos norfloxacina e ciprofloxacina, respectivamente, este protocolo foi utilizado para avaliar a capacidade dos compostos LF 12, 13, 16 e 26, em modular a resistência bacteriana em associação com esses antibióticos contra a bomba correspondente. Os inóculos bacterianos foram preparados em meio BHI 10% e os tratamentos foram adicionados em concentrações equivalentes à sua CIM ÷ 8. Os poços de uma placa de 96 poços foram preenchidos com 100 μL das soluções de cada tratamento e, em seguida, cada antibiótico foi adicionado aos poços em concentrações variando de 1.024 a 0,5 μg/mL. Uma redução na CIM do antibiótico foi interpretada como inibição da bomba de efluxo (Tintino et al., 2017)[27]. Os controles experimentais e os valores de MIC para os compostos foram determinados conforme descrito acima. Todos os testes foram realizados em triplicado.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são expressos como média aritmética ± erro padrão da média e foram analisados

por análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste de Bonferroni utilizando o software GraphPad Prism versão 7.00 (disponível em http://www.graphpad.com/scientific-software /prisma/). Foi considerada significância estatística quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. PERFIL FÍSICO-QUÍMICO DOS LIPOSSOMAS

A caracterização físico-química dos lipossomas consistiu na determinação do tamanho, intensidade, potencial Zeta, PDI e eficiência de encapsulamento, pH e concentração. Essas características são mostradas na Tabela1.

Tabela 1.Características físico-químicas de nanopartículas lipossomais contendo derivados tiazólicos baseados no eugenol LF 12, 13, 16 e 26.

	Controle	Lipossoma/LF 12	Lipossoma/LF 13	Lipossoma/LF 16	Lipossoma/LF 26
Tamanho	218,9±45,1	164±28,9	218,5±40,5	201,2±55,6	243,4±86,6
Intensidade	2,5 au	2,5 au	2,5 au	3 au	5 au
Potencial Zeta	-18,8	-29,6	-14,4	4,4	-25
Índice de polidispersidade (PDI)	0,50	0,46	0,45	0,63	0,9
Eficiência de encapsulamento	N/A	97%	69%	65%	34%
Ph	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4
Concentração	6,99 x 10^8 particles/Ml	7,19 × 10^8 particles/mL	10,2 × 10^8 particles/mL	9 × 10^8 particles/mL	10,2 × 10^8 particles/mL

3.2 ATIVIDADE DIRETA

Na avaliação da atividade direta pela metodologia empregada, não foi possível observar nenhum resultado clinicamente relevante para nenhum derivado frente as cepas testadas, sendo que todos apresentaram CIM ≥1024 μg/mL, conforme a tabela 2.

Tabela 2: Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) dos derivados tiazólicos baseados no eugenol encapsulados por lipossomas.

Substâncias	*S. aureus*	*P. aeruginosa*	*S. aureus* - 1199B	*S. aureus* - K2069
LF 12	≥1024 µg/mL	≥1024 µg/mL	≥1024 µg/mL	≥1024 µg/mL
LF 13	≥1024 µg/mL	≥1024 µg/mL	≥1024 µg/mL	≥1024 µg/mL
LF 16	≥1024 µg/mL	≥1024 µg/mL	≥1024 µg/mL	≥1024 µg/mL
LF 26	≥1024 µg/mL	≥1024 µg/mL	≥1024 µg/mL	≥1024 µg/mL
CCCP	-	-	32 µg/mL	32 µg/mL
CPZ	-	-	128 µg/mL	128 µg/mL

3.3 POTENCIALIZAÇÃO ANTIBIÓTICA

Quanto na análise da potencialização de antibióticos associado aos derivados tiazólicos baseados no eugenol encapsulados por lipossomas frente a cepa multirresistente de *S. aureus*, foi observado que o composto LF 16 associado a norfloxacina, reduziu a CIM do antibiótico de 128 µg/mL para 64 µg/mL, conforme verificado na figura **1**.

Na análise, os derivados associados a gentamicina frente a cepa de *S. aureus*, foi possível observar que houve uma redução significativa com todos os derivados (LF 12, 13, 16 e 26), como mostra a figura 1. Apesar de todos terem apresentado efeito significativo, o LF 12 e LF 26 obtiveram uma maior redução da CIM do antibiótico, saindo de 25 µg/mL para 2 µg/mL e 2,59 µg/mL, respectivamente.

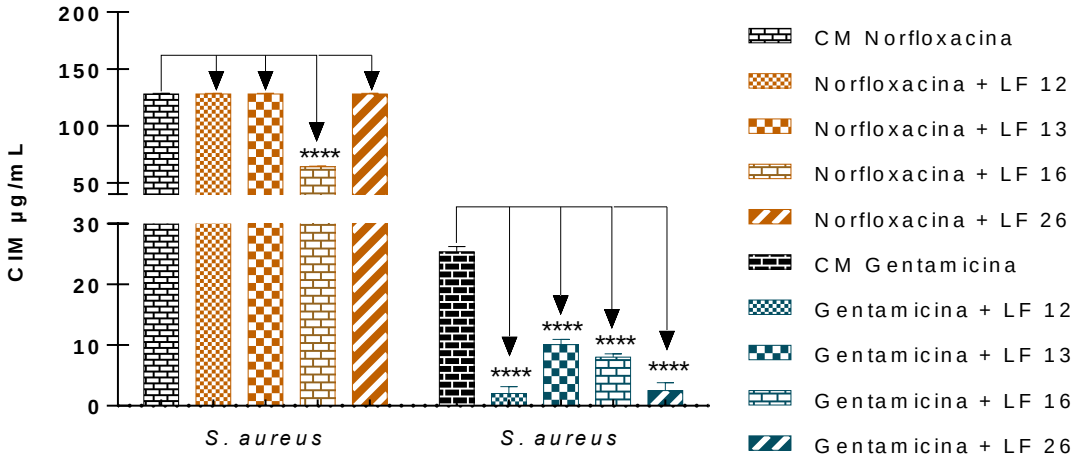


Figura 1: Avaliação da atividade potencializadora antibiótica de norfloxacina e gentamicina associado com os derivados LF 12, 13, 16 e 26, frente a cepa de *Staphylococcus aureus* 10. N = 3. ****p < 0,0001 indica diferenças significativas entre os grupos. A significância estatística foi determinada por ANOVA unidirecional e teste de post-hoc de Bonferroni.

Já na avaliação da potencialização de antibióticos associado aos derivados frente a cepa multirresistente de *P. aeruginosa*, verificou-se que apesar de terem reduzido a CIM do antibiótico

norfloxacina, não foi uma redução significativa. Porém, quando associados ao antibiótico gentamicina, foi possível visualizar uma redução significativa da CIM do antibiótico para todos os derivados tiazólicos. O LF 13 por exemplo, reduziu a CIM do antibiótico gentamicina de 16 µg/mL para 10 µg/mL (p< 0,0011). Os derivados LF 12, 16 e 26 reduziram a CIM de 16 µg/mL para 2 µg/mL, 8 µg/mL e 2,5 µg/mL, respectivamente, como mostra a figura 2.

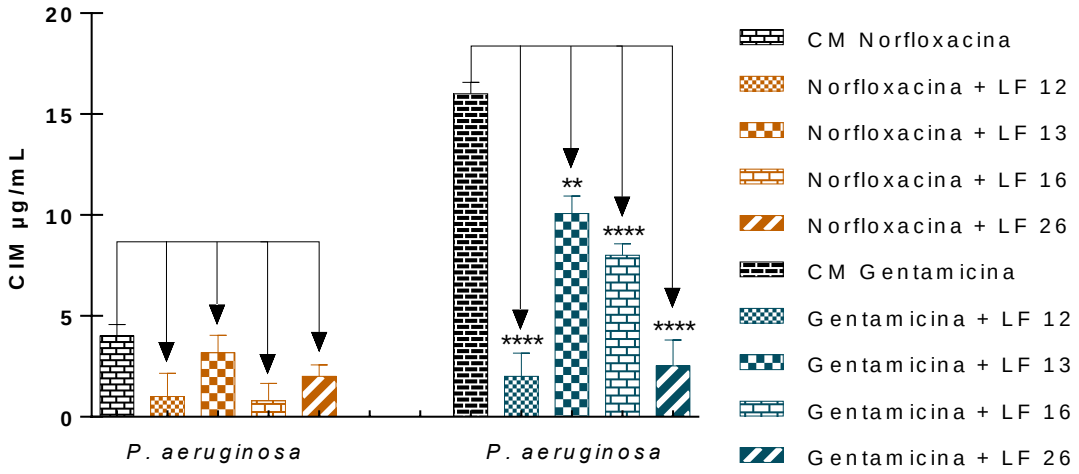


Figura 2: Avaliação da atividade potencializadora antibiótica de norfloxacina e gentamicina associado com derivados LF 12, 13, 16 e 26, frente a cepa de Pseudomonas aeruginosa 24. N = 3. ****p < 0,0001 indica diferenças significativas entre os grupos. A significância estatística foi determinada por ANOVA unidirecional e teste de post-hoc de Bonferroni.

3.4 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO ASSOCIADO AO BROMETO DE ETÍDIO

Na figura 3, é demonstrado à avaliação da inibição das bombas de efluxo norA e mepA, das cepas de *S. aureus* 1199B e K2068, respectivamente. Nessa avaliação foram utilizados CCCP como grupo controle positivo, o antibiótico clorpromazina, e os derivados tiazólicos para avaliação da inibição associado ao Brometo de etídio. Dentre os derivados testados com a cepa *S. aureus* 1199B, apenas o LF 26 reduziu a CIM do brometo de 64 µg/mL para 40 µg/mL (p< 0,1092), porém, mesmo com essa redução nenhum composto se mostrou clinicamente relevante. Quando avaliamos a cepa *S. aureus* K2068, observamos que o comportamento dos derivados tiazólicos associadas ao Brometo de Etídio, se apresentaram semelhante, onde somente o composto LF 26 demonstrou reduzir a CIM do brometo de 64 µg/mL para 32 µg/mL (p< 0,0083).

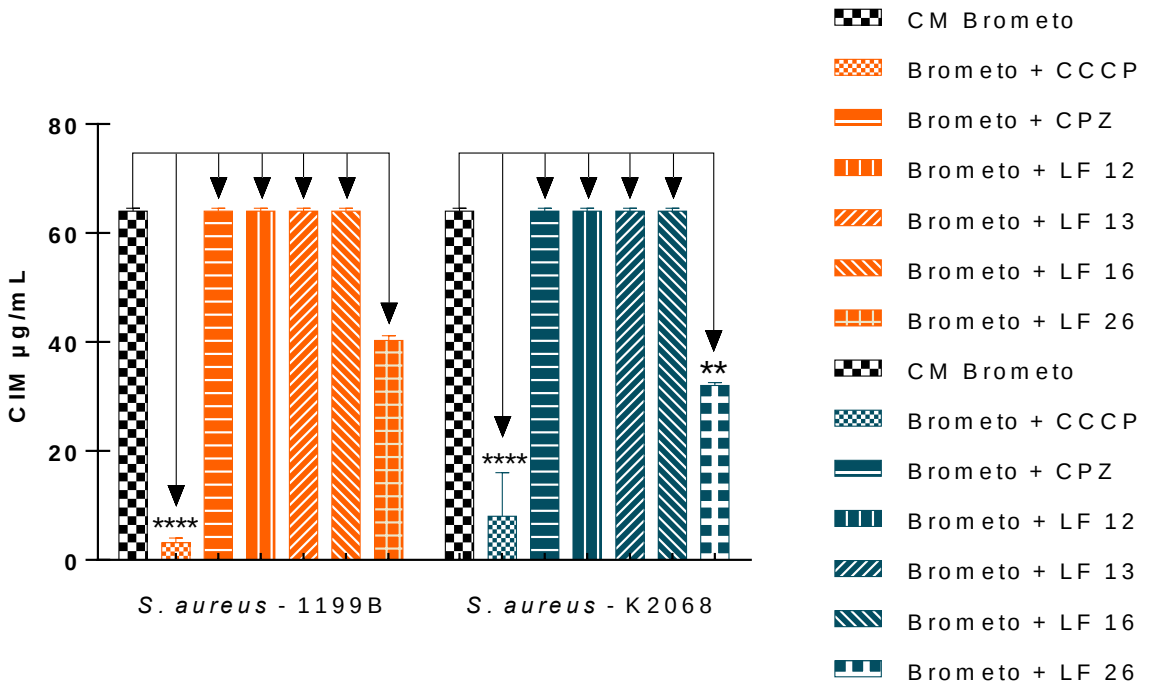


Figura 3: Avaliação da inibição de bombas de efluxos norA e mepA do CCCP, CPZ e dos derivados LF 12, 13, 16 e 26, associados com brometo de etídio frente as cepas de *Staphylococcus aureus* 1199B e K2068. N = 3. ****p < 0,0001 indica diferenças significativas entre os grupos. A significância estatística foi determinada por ANOVA unidirecional e teste de post-hoc de Bonferroni.

3.5 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO ASSOCIADO A ANTIBIÓTICOS

Na avaliação da inibição das bombas de efluxos pelos derivados tiazólicos associados aos antibióticos, foi possível perceber que na bomba norA, presente na cepa *S. aureus* 1199B, todos os derivados mostraram resultados de redução da CIM do antibiótico de forma relevante. O LF 12 reduziu a CIM do antibiótico norfloxacina de 128 µg/mL para 50 µg/mL, e os demais compostos LF 13, 16 e 26, reduziram a CIM de 128 µg/mL para 64 µg/mL. A mesma coisa percebemos com a bomba mepA, presente na cepa *S. aureus* K2068, onde 3 dos 4 compostos apresentaram resultados relevantes quanto a redução da CIM do antibiótico ciprofloxacina. Dentre os derivados avaliados o que demonstrou uma maior redução da CIM do antibiótico foi o LF 16, reduzindo a CIM de 64 µg/mL para 16 µg/mL. Já os compostos LF 12 e 26, reduziram a CIM de 64 µg/mL para 25 µg/mL, e o LF 13 não apresentou nenhuma redução para bomba mepA, como mostra a figura 4.

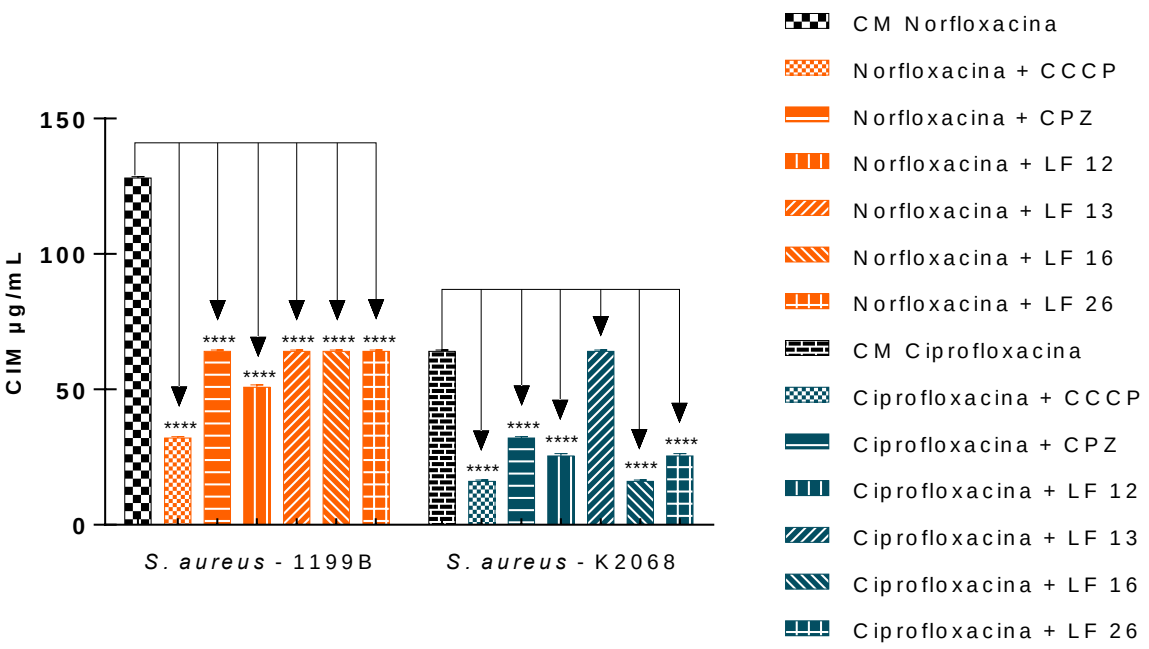


Figura 4: Avaliação da inibição de bombas de efluxos norA e mepA pelo CCCP, CPZ e dos derivados LF 12, 13, 16 e 26, associados com norfloxacina e ciprofloxacina, frente as cepas de *Staphylococcus aureus* 1199B e K2068. N = 3. ****p < 0,0001 indica diferenças significativas entre os grupos. A significância estatística foi determinada por ANOVA unidirecional e teste de post-hoc de Bonferroni.

4. DISCUSSÃO

Há quatro décadas, Alec Bangham, por meio de sua observação pioneira, revelou que fosfolipídeos em soluções aquosas têm a capacidade de formar estruturas fechadas em bicamadas. Esse marco permitiu que a pesquisa sobre os lipossomas avançasse consideravelmente, transformando-os de meros objetos de estudo biofísico em veículos terapêuticos com ampla aplicabilidade clínica (Torchilin, 2005) [28]. A técnica avançada de nanotecnologia conhecida como encapsulamento lipossomal tem transformado radicalmente a administração de medicamentos, resultando em melhorias notáveis na eficácia, biodisponibilidade e na redução de efeitos adversos(Birk; Boisen; Nielsen., 2021; Tan et al., 2018) [29,30]. Em contrapartida, várias são as características que influenciam em sua atividade, tais como: tamanho, intensidade, potencial Zeta, entre outras características observadas na tabela 1.

O tamanho médio das nanopartículas desempenha um papel crucial na determinação da atividade biológica desses sistemas de liberação de fármacos impactando diretamente a biodistribuição, absorção e eficácia terapêutica [31,32]. A intensidade do sinal na análise de rastreamento de nanopartículas fornece informações cruciais sobre o número de partículas presentes na amostra, relacionando-se à eficiência de encapsulamento dos agentes carregados dentro das nanopartículas [33]. No contexto deste estudo, as nanopartículas apresentaram valores satisfatórios de intensidade de sinal. O potencial Zeta, indicador da carga elétrica das nanopartículas e sua estabilidade coloidal, revelou-se uma medida essencial. Os lipossomas obtidos no presente estudo exibiram características satisfatórias para LF 12, 13 e 26, com potenciais Zeta de -29,6 mV para a nanoformulação de LF 12, -14,4 mV para a nanoformulação de LF 13 e -25 mV para LF 26 [34,35].

Por outro lado, a concentração das nanopartículas também desempenha um papel crucial em aplicações terapêuticas, influenciando a dose e a eficácia do tratamento. Estudos anteriores mostraram que uma maior concentração de nanopartículas pode resultar em uma inibição mais significativa no tratamento, indicando uma relação direta entre a concentração e o efeito terapêutico [36]. Além disso, a concentração está relacionada à biodistribuição e toxicidade das nanopartículas. Finalmente, a eficiência de encapsulamento, que mensura a quantidade de composto ativo encapsulado nas nanopartículas lipídicas, revelou-se tecnicamente significativa neste estudo, principalmente para os compostos LF 12, 13 e 16. Os lipossomas contendo os derivados tiazólicos baseados no eugenol, apresentaram eficiência de encapsulação de 34% a 97%. Esses resultados indicam uma alta eficiência na incorporação desses compostos ativos nas nanopartículas, contribuindo para sua aplicabilidade.

Tem sido realizado várias pesquisas explorando o estudo de diversos produtos naturais e sintéticos para potencialização de antibióticos, inibição de bombas de efluxos, β-lactamases e outros mecanismos presente em bactérias multirresistentes portadoras de um ou mais mecanismos citados (Freitas et al., 2024; Oliveira-Tintino et al., 2024; Araujo et al., 2024; Pereira et al., 2023; Almeida et al., 2020; Santos et al., 2021) [37-42].

Nesta pesquisa, é apresentado um estudo de derivados tiazólicos baseados no eugenol encapsulados por lipossomas, e é possível observar que dentre os derivados testados na atividade direta, nenhum composto se mostrou clinicamente relevante. Um estudo realizado por Guilherme e colaboradores[43], e outro por De Souza e colaboradores[44], trabalhando com acilhidrazona, 6-triazolo-6-deoxy eugenol glucosides e derivados, respectivamente, frente às cepas bacterianas ATCC, e em concentrações variando de 500 a 0.98 µg/mL e 100 a 0,19 µg/mL, respectivamente, também não obtiveram uma atividade direta significativa. Já Cukurovali e colaboradores[45], trabalhando com grupos hidrazona-tiazol, obteve resultados mais clinicamente eficientes quando comparado ao desse estudo e ao estudo realizado por Guilherme e colaboradores. No entanto, quando comparamos moléculas e atividades é evidente e importante ressaltar que a metodologia abordada, os radicais de cada molécula modificada e a estrutura principal irá sem dúvida influenciar diretamente na sua atividade, no qual conhecemos como relação de estrutura-atividade.

El-Naggar e colaboradores[46], ao trabalharem com a síntese de derivados de hidrazinil-tiazole frente a espécies bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, demonstraram em sua pesquisa que os derivados 4b (0,5 mg/mL para *P. aeruginosa* e 1 mg/mL para *S. aureus*), 5h (4 mg/mL para *P. aeruginosa* e 4 mg/mL para *S. aureus*), 5j (1 mg/mL para *P. aeruginosa* e 4 mg/mL para *S. aureus*) e 5m (2 mg/mL para *P. aeruginosa* e 8 mg/mL para *S. aureus*) exerceram atividade contra todos os patógenos testados, tanto em disco quanto em microdiluição. Por outro lado, Harron e colaboradores[47], ao estudarem as atividades antimicrobianas dos compostos de 2-(2-(arilideno)hidrazinil)tiazol-4-carboxilatos de etila, tanto em disco quanto em placas de 96 poços, não obtiveram resultados de inibição do crescimento com as bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Novos análogos de 2-arilidenohidrazinil-4-ariltiazol, especialmente os compostos 2c e 2j contendo substituinte bromo ou metoxi na posição do anel fenil arilideno, exibiram atividade contra várias espécies de bactérias, incluindo cepas de *S. aureus*. No entanto, nenhum análogo apresentou atividade contra a cepa de *P. aeruginosa* (ALAM et al., 2011) [48].

Na avaliação da potencialização do antibiótico norfloxacina contra as cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, apenas o derivado LF 16 apresentou redução da CIM, de acordo com a figura 1 e 2, e sendo redução significativa somente com *S. aureus*. Entretanto, quando analisados os

derivados associados a gentamicina frente as cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, verificou-se que todos potencializaram de forma significativa a ação do antibiótico contra as cepas. A modulação da resistência aos antibióticos ou potencialização da atividade antibiótica por um determinado composto é altamente influenciada pela sua estrutura química, bem como pelo arranjo tridimensional dos átomos na molécula, pois influenciam diretamente nas ligações feitas entre compostos e o alvo de ação.

Evidências crescentes indicam a superexpressão de bombas de efluxo em cepas bacterianas multirresistentes, como o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020) [49]. As bombas de efluxo são proteínas de membrana responsáveis pelo transporte ativo de uma ampla variedade de moléculas, eliminando substâncias potencialmente tóxicas do meio intracelular. Contudo, no contexto da antibioticoterapia, a atividade de transporte ativo dessas proteínas pode resultar na redução das concentrações intracelulares de fármacos, levando a uma falha no efeito terapêutico [50]. Diante do papel significativo das bombas de efluxo na resistência antibacteriana do *S. aureus*, decidiu-se pesquisar o potencial envolvimento da inibição da bomba de efluxo utilizando derivados tiazólicos baseados no eugenol contra as cepas de *S. aureus* 1199B e K2068, que expressam as bombas de efluxo NorA e MepA, respectivamente.

Neste estudo, observou-se que a associação com concentrações subinibitórias de derivados tiazólicos baseados no eugenol resultou na redução da CIM do brometo de etídio, sendo que apenas o composto LF 26 apresentou tal efeito de redução em ambas as cepas. No entanto, destaca-se que a cepa *S. aureus* K2068 demonstrou uma redução com significância estatística de $p < 0,0083$ (**), conforme observado na análise da figura 3. Segundo Tintino et al. [51], quando compostos naturais ou sintéticos são avaliados em conjunto com brometo de etídio contra cepas portadoras de bombas de efluxo (EP), uma diminuição na CIM desse último pode indicar que o composto testado atua também como um inibidor de EP.

Considerando os efeitos demonstrados pelos derivados tiazólicos baseados no eugenol no ensaio de inibição da bomba de efluxo por brometo de etídio, foi avaliado também se esses derivados poderiam potencializar a ação da atividade antibiótica de norfloxacina e ciprofloxacina, pela inibição das mesmas bombas nas cepas de *S. aureus*. O resultado foi que todos os compostos atuaram potencializando o efeito dos antibióticos, exceto o LF 13 que não apresentou atividade para *S. aureus* K2068. Já o composto LF 26, assim como diminuiu a MIC na avaliação com brometo de etídio, também diminuiu a MIC quando associado aos antibióticos norfloxacina e ciprofloxacina, atuando provavelmente como inibidor da bomba de efluxo presente nas cepas.

Por fim, é possível notar que ao analisarmos as figuras 3 e 4, o perfil de atividade do brometo de etídio associado aos derivados (Fig. 3) e antibióticos associados aos derivados (Fig. 4) foram diferentes. Essa atividade visualizada associada aos antibióticos pode estar relacionada a outro mecanismo de resistência apresentado pelas cepas que não seja as bombas de efluxo avaliadas (Fig. 4), como também pode ter acontecido uma interação entre brometo e derivados diminuindo assim a ação dos derivados tiazólicos baseados no eugenol(Fig. 3). Já que o mecanismo de ação da norfloxacina e ciprofloxacina é na DNA girasse e topoissomerase, respectivamente, podendo por tanto, os derivados LF 12, 13, 16 e 26 terem modulado possivelmente esse mecanismo de resistência. Sendo que a resistência a estes antibióticos em *S. aureus* passa por alterações no local de ligação a estas enzimas (subunidade GyrA da girase e subunidade GrlA na topoisomerase) bem como pela expressão de bombas de efluxo pelo gene NorA e MepA que expulsam o antibiótico para o meio extracelular (Gnanamani et al., 2017; Ezelarab et al., 2018; Gutierrez; Stokes; Matic, 2018; Marians; Hiasa, 1997) [52-55].

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que os derivados tiazólicos baseados no eugenol encapsulados por lipossomas não apresentaram atividade direta, porém, quando avaliamos a potencialização dos antibióticos pelos compostos, percebemos que eles potencializaram a ação do fármaco gentamicina contra as cepas multirresistentes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Por outro lado, ao associarmos os compostos com a norfloxacina, apenas o LF 16 potencializou seu efeito contra *S. aureus*.

Por conseguinte, os resultados da atividade de inibição das bombas de efluxo NorA e MepA, nos mostraram que apenas o composto LF 26 pode atuar como inibidor, pois apresentou atividade de redução tanto associado ao brometo de etídio, quanto, aos antibióticos. Concluímos também, que ao avaliarmos a inibição dos compostos associados com os antibióticos norfloxacina e ciprofloxacina, verificamos que todos os compostos, exceto o LF 13 para K2068, melhoraram o seu efeito nos indicando que possivelmente esta atividade provém de outro mecanismo de resistência, como os de ação dos fármacos, a DNA-girase e topoissomerase. Portanto, novos estudos são necessários para descrever os alvos moleculares envolvidos na ação destes compostos, bem como para desenvolver novas estratégias nanotecnológicas que melhore suas propriedades antibacterianas.

REFERENCIAS

1. Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2020). Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. EMBO Reports, 21(12). https://doi.org/10.15252/embr.202051034

2. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. AIMS Microbiol. 2018 Jun 26;4(3):482-501. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482. PMID: 31294229; PMCID: PMC6604941.

3. Willyard, C. (2017). The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature*, *543*(7643), 15–15. https://doi.org/10.1038/nature.2017.21550

4. Aloush, V., Navon-Venezia, S., Seigman-Igra, Y., Cabili, S., & Carmeli, Y. (2006). Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* : Risk Factors and Clinical Impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(1), 43–48. https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.43-48.2006

5. Kunz Coyne, A. J., El Ghali, A., Holger, D., Rebold, N., & Rybak, M. J. (2022). Therapeutic Strategies for Emerging Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa. Infectious Diseases and Therapy, 11(2), 661–682. https://doi.org/10.1007/s40121-022-00591-2

6. Qin, S., Xiao, W., Zhou, C. et al. Pseudomonas aeruginosa: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. Sig Transduct Target Ther 7, 199 (2022). https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1

7. Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. Journal of Clinical Investigation, 111(9), 1265–1273. https://doi.org/10.1172/JCI18535

8. Onanuga, A., & Temedie, T. C. (2011). Multidrug-resistant Intestinal <i>Staphylococcus aureus</i> among Self-medicated Healthy Adults in Amassoma, South-South, Nigeria. *Journal of Health, Population and Nutrition*, *29*(5). https://doi.org/10.3329/jhpn.v29i5.8898

9. Blair, J., Webber, M., Baylay, A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol 13, 42–51 (2015). https://doi.org/10.1038/nrmicro3380

10. Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilonis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. Medicina (Kaunas). 2011;47(3):137-46. English, Lithuanian. PMID: 21822035.

11. Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. Virulence. 2013 Apr 1;4(3):223-9. doi: 10.4161/viru.23724.

12. Brawley, D.N., Sauer, D.B., Li, J. et al. Structural basis for inhibition of the drug efflux pump NorA from Staphylococcus aureus. Nat Chem Biol 18, 706–712 (2022). https://doi.org/10.1038/s41589-022-00994-9

13. Zimmermann S, Klinger-Strobel M, Bohnert JA, Wendler S, Rödel J, Pletz MW, Löffler B and Tuchscherr L (2019) Clinically Approved Drugs Inhibit the Staphylococcus aureus Multidrug NorA Efflux Pump and Reduce Biofilm Formation. Front. Microbiol. 10:2762. doi: 10.3389/fmicb.2019.02762

14. Costa SS, Viveiros M, Amaral L, Couto I. Multidrug Efflux Pumps in Staphylococcus aureus: an Update. Open Microbiol J. 2013;7:59-71. doi: 10.2174/1874285801307010059. Epub 2013 Mar 22. PMID: 23569469; PMCID: PMC3617543.

15. Mohammadi Nejad S, Özgüneş H, Başaran N. Pharmacological and Toxicological Properties of Eugenol. Turk J Pharm Sci. 2017 Aug;14(2):201-206. doi: 10.4274/tjps.62207. Epub 2017 Aug 15. PMID: 32454614; PMCID: PMC7227856.

16. Ulanowska M, Olas B. Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol-A Review. Int J Mol Sci. 2021 Apr 1;22(7):3671. doi: 10.3390/ijms22073671. PMID: 33916044; PMCID: PMC8036490.

17. Stana, A., et al., New Thiazolyl-triazole Schiff Bases: Synthesis and Evaluation of the Anti-Candida Potential. Molecules, v. 21, 1595, 2016. doi:10.3390/molecules21111595.

18. Rachel, C., Monica, K., Synthesis and biological evaluation of anti-tubercular activity of Schiff bases of 2-Amino thiazoles, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2020), doi: https://doi.org/ 10.1016/j.bmcl.2020.127655.

19. P. Makam, R. Kankanala, A. Prakash, T. Kannan, 2-(2-Hydrazinyl)thiazole derivatives: Design, synthesis and in vitro antimycobacterial studies, European Journal of Medicinal Chemistry (2013), doi: 10.1016/j.ejmech.2013.08.054.

20. Gonzalez Gomez A, Hosseinidoust Z. Liposomes for Antibiotic Encapsulation and Delivery. ACS Infect Dis. 2020 May 8;6(5):896-908. doi: 10.1021/acsinfecdis.9b00357. Epub 2020 Apr 7. PMID: 32208673.

21. Liu P, Chen G, Zhang J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. Molecules. 2022 Feb 17;27(4):1372. doi: 10.3390/molecules27041372. PMID: 35209162; PMCID: PMC8879473.

22. Barros, N.B.; Migliaccio, V.; Facundo, V.A.; Ciancaglini, P.; Stábeli, R.G.; Nicolete, R.; Silva-Jardim, I. Liposomal-Lupane System as Alternative Chemotherapy against Cutaneous Leishmaniasis: Macrophage as Target Cell. Exp. Parasitol. 2013, 135, 337–343, doi:10.1016/j.exppara.2013.07.022.

23. NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically. 6ed.

Pennsylvania, PA, USA; 2003. https://clsi.org/media/1632/m07a10_sample.pdf (accessed 10 January 2020)

24. Mann, C.M.; Markham, J.L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. J. Appl. Microb. 1998, 84, 538–544. doi:10.1046/j.1365-2672.1998.00379.x

25. Palomino, J.C.; Martin, A.; Camacho, H.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F. Resazurin microtiter assay plate: 15imple and unexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother. 2002, 46, 2720–2722. doi: 10.1128 / AAC.46.8.2720-2722.2002

26. Coutinho, H.D.M.; Costa, J.G.; Lima, E.O.; Falcão-Silva, V.S.; Siqueira-Júnior, J.P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant Escherichia coli by Mentha arvensis L. and chlorpromazine. Chemotherapy 2008, 54, 328–330. doi: 10.1159 / 000151267

27. Tintino, S.R.; Oliveira-Tintino, C.D.; Campina, F.F.; Costa, M.S.; Cruz, R.P.; Pereira, R.L.; Andrade, J.C.; Sousa, E.O.; Siqueira-Junior, J.P.; Coutinho, H.D.M.; et al. Cholesterol and ergosterol affect the activity of Staphylococcus aureus antibiotic efflux pumps. Microbial. Pathogenesis 2017a, 104, 133–136. doi: 10.1016 / j.micpath.2017.01.019

28. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. Nat Rev Drug Discov. 2005 Feb;4(2):145-60. doi: 10.1038/nrd1632.

29. Birk SE, Boisen A, Nielsen LH. Polymeric nano- and microparticulate drug delivery systems for treatment of biofilms. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. 2021;174:30–52. Available from: https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.04.005

30. Tan Y, Ma S, Leonhard M, Moser D, Haselmann GM, Wang J, et al. Enhancing antibiofilm activity with functional chitosan nanoparticles targeting biofilm cells and biofilm matrix. Carbohydr Polym. 2018;200(July):35–42

31. Caster, J.M.; Yu, S.K.; Patel, A.N.; Newman, N.J.; Lee, Z.J.; Warner, S.B.; Wagner, K.T.; Roche, K.C.; Tian, X.; Min, Y.; et al. Effect of Particle Size on the Biodistribution, Toxicity, and Efficacy of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles in Chemoradiotherapy. Nanomedicine 2017, 13, 1673. [CrossRef] Pharmaceutics 2023, 15, 2400 14 of 15

32. Moazeni, M.; Kelidari, H.R.; Saeedi, M.; Morteza-Semnani, K.; Nabili, M.; Gohar, A.A.; Akbari, J.; Lotfali, E.; Nokhodchi, A. Time to Overcome Fluconazole Resistant Candida Isolates: Solid Lipid Nanoparticles as a Novel Antifungal Drug Delivery System. Colloids Surf. B Biointerfaces 2016, 142, 400–407. [CrossRef]

33. Li, C.; Li, X.; Li, S.; Weng, Y.; Wang, K.; Zhang, T.; Chen, S.; Lu, X.; Jiang, Y.; Xu, J.; et al. Development and Validation of a Method for Determination of Encapsulation Efficiency of

CPT-11/DSPE-MPEG2000 Nanoparticles. Med. Chem. Open Access J. 2016, 6, 345–348. [CrossRef]

34. Honary, S.; Zahir, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems—A Review (Part 2). Trop. J. Pharm. Res. 2013, 12, 265–273. [CrossRef]

35. Smith, M.C.; Crist, R.M.; Clogston, J.D.; McNeil, S.E. Zeta Potential: A Case Study of Cationic, Anionic, and Neutral Liposomes. Anal. Bioanal. Chem. 2017, 409, 5779–5787. [CrossRef]

36. Wilhelm, S.; Tavares, A.J.; Dai, Q.; Ohta, S.; Audet, J.; Dvorak, H.F.; Chan, W.C.W. Analysis of Nanoparticle Delivery to Tumours. Nat. Rev. Mater. 2016, 1, 16014. [CrossRef]

37. Priscilla R. Freitas , Ana C. J. de Araújo , Isaac M. Araújo , Gustavo M. Siqueira , Daniel S. Alves , João A. O. Borges , Gustavo M. Miranda , Igor J. S. Nascimento , João X. Araújo-Júnior , Edeildo F. Silva-Júnior , Thiago M. de Aquino , Francisco J. B. M. Junior , Emanuel Silva Marinho , Helcio Silva dos Santos , Saulo R. Tintin , Clara Mariana Gon-çalves Lima , Talha Bin Emran , Sheikh F. Ahmad , Sabry M. Attia , Henrique D. M. Coutinho. ADMET Analysis, Antibacterial and Modified Antibiotic Activities of Thiadiazine Derivatives. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 2024, 38(1): 123-135 https://doi.org/10.23812/j.biol.regul.homeost.agents.20243801.9

38. Oliveira-Tintino, C.D.d.M.; Tintino, S.R.; Justino de Araújo, A.C.; dos Santos Barbosa, C.R.; Ramos Freitas, P.; Araújo Neto, J.B.d.; Begnini, I.M.; Rebelo, R.A.; Silva, L.E.d.; Mireski, S.L.; et al. Efflux Pump (QacA, QacB, and QacC) and β-Lactamase Inhibitors? An Evaluation of 1,8-Naphthyridines against *Staphylococcus aureus* Strains. Molecules 2023, 28, 1819. https://doi.org/10.3390/molecules28041819

39. Ana Carolina Justino de Araújo, Priscilla Ramos Freitas, Isaac Moura Araújo, Gustavo Miguel Siqueira, João Arthur de Oliveira Borges, Daniel Sampaio Alves, Gustavo Marinho Miranda, Igor José dos Santos Nascimento, João Xavier de Araújo-Júnior, Edeildo Ferreira da Silva-Júnior, Thiago Mendonça de Aquino, Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior, Emmanuel Silva Marinho, Helcio Silva dos Santos, Saulo Relison Tintino, Henrique Douglas Melo Coutinho. Potentiating-antibiotic activity and absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity properties (ADMET) analysis of synthetic thiadiazines against multi-drug resistant (MDR) strains, 2024 Pages 84-98

40. Raimundo L.S. Pereira, Ana C.J. de Araújo, Priscilla R. Freitas, Isaac M. Araújo, Sheila A. Gonçalves, Suziete B.S. Gusmão, Ramón R. Peña-Garcia, Yuset G. Dávila, Bartolomeu C. Viana, João H. da Silva, Irwin R.A. de Menezes, Henrique D.M. Coutinho, Alexandre M.R. Teixeira, Effect of gallium and strontium salts on the characteristics and biological applications of

Sr and Ga-modified titanate nanotubes, Results in Chemistry,Volume 6,2023,101162,doi.org/10.1016/j.rechem.2023.101162.

41. Almeida, R.S.; Freitas, P.R.; Araújo, A.C.J.; Alencar Menezes, I.R.; Santos, E.L.; Tintino, S.R.; Moura, T.F.; Filho, J.R.; Ferreira, V.A.; Silva, A.C.A.; et al. GC-MS Profile and Enhancement of Antibiotic Activity by the Essential Oil of *Ocotea odorífera* and Safrole: Inhibition of *Staphylococcus aureus* Efflux Pumps. Antibiotics 2020, 9, 247. https://doi.org/10.3390/antibiotics9050247

42. Eduardo L. Santos, Priscilla R. Freitas, Ana Carolina J. Araújo, Ray S. Almeida, Saulo R. Tintino, Cicera Laura R. Paulo, Ana Cristina A. Silva, Luiz E. Silva, Wanderlei do Amaral, Cícero Deschamps, José Pinto Siqueira Junior, José Maria Barbosa Filho, Gabriela Ribeiro de Sousa, Jaime Ribeiro-Filho, Henrique D.M. Coutinho, Enhanced antibacterial effect of antibiotics by the essential oil of Aloysia gratissima (Gillies & Hook.) Tronc. and its major constituent beta-caryophyllene, Phytomedicine Plus,Volume 1, Issue 4,2021,100100,https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100100.

43. F.D. Guilherme, Julia.É. Simonetti, L.R.S. Folquitto, A.C. Cardoso Reis, Josidel.Conceiçã. Oliver, Amanda.Laté.Tranches. Dias, D.F. Dias, D.T. Carvalho, Geraldo.Cé. Brandão, T.B.d. Souza, Synthesis, chemical characterization and antimicrobial activity of new acylhydrazones derived from carbohydrates, Journal of Molecular Structure (2019), doi: https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.02.045.

44. de Souza TB, Raimundo POB, Andrade SF, Hipólito TMM, Silva NC, Dias ALT, Ikegaki M, Rocha RP, Coelho LFL, Veloso MP, Carvalho DT, Dias DF, Synthesis and antimicrobial activity of 6-triazolo-6-deoxy eugenol glucosides, Carbohydrate Research (2015), doi: 10.1016/j.carres.2015.04.002

45. Alaaddin Cukurovali; İbrahim Yilmaz; Seher Gur; Cavit Kazaz (2006). *Synthesis, antibacterial and antifungal activity of some new thiazolylhydrazone derivatives containing 3-substituted cyclobutane ring. , 41(2), 201–207.* doi:10.1016/j.ejmech.2005.01.013

46. Abeer M. El-Naggar, Alaa Zidan, Eslam B. Elkaeed, Mohammed S. Taghour, Waleed A. Badawi. Design, synthesis and docking studies of new hydrazinyl-thiazole derivatives as anticancer and antimicrobial agents, Journal of Saudi Chemical Society,V. 26, n. 4,2022,101488.https://doi.org/10.1016/j.jscs.2022.101488.

47. Haroon, M., Akhtar, T., Khalid, M., Ali, S., Zahra, S., ul haq, I., Alhujaily, M., C. H. de B. Dias, M., Cristina Lima Leite, A. & Muhammad, S. Synthesis, antioxidant, antimicrobial and antiviral docking studies of ethyl 2-(2-(arylidene)hydrazinyl)thiazole-4-carboxylates. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. *76*, p. 467-480, 2021. https://doi.org/10.1515/znc-2021-0042

48. Mohammad Sayed ALAM, Lijun LIU, Yong-Eok LEE, Dong-Ung LEE. Synthesis, Antibacterial Activity and Quantum-Chemical Studies of Novel 2-Arylidenehydrazinyl-4-arylthiazole Analogues. Chem. Pharm. Bull, v. 59, n. 5, p. 568—573, 2011.

49. CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. Journal of Molecular Evolution, v.88, n.1, p. 26 40, 2020.

50. Tortora, G.J.; CASE, C.L.; Funke, B.R. *Microbiologia*, 12th ed.; Artmed Editora: Porto Alegre, Brazil, 2017.

51. Tintino, S.R.; Oliveira-Tintino, C.D.; Campina, F.F.; Silva, R.L.; Costa, M.do.S.; Menezes, I.R.; Calixto-Júnior, J.T.; Siqueira-Junior, J.P.; Coutinho, H.D.M.; Leal-Balbino, T.C.; et al. Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *Microb. Pathog.* 2016, *97*, 9–13.

52. Gnanamani, A., Hariharan, P., e Paul-Satyaseela, M. (2017) Staphylococcus aureus : Overview of Bacteriology , Clinical Diseases , Epidemiology , Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach. Frontiers in Staphylococcus aureus (p. 11–12).

53. EZELARAB, H. A. A. et al. Recent updates of fluoroquinolones as antibacterial agents. Archiv der Pharmazie, v. 351, n. 9, p. 1800141, 2018.

54. GUTIERREZ, A.; STOKES, J. M.; MATIC, I. Our evolving understanding of the mechanism of quinolones. Antibiotics, v. 7, n. 2, p. 32, 2018.

55. MARIANS, K. J.; HIASA, H. Mechanism of quinolone action. A drug-induced structural perturbation of the DNA precedes strand cleavage by topoisomerase IV. Journal of Biological Chemistry, v. 272, n. 14, p. 9401-9409, 1997.

CAPÍTULO II – DERIVADOS DE TIAZOL À BASE DE EUGENOL INIBEM A BOMBA DE EFLUXO MEPA EM *Staphylococcus aureus*

Ray Silva de Almeida[1], Laís Regina dos Santos Folquitto[2], Priscilla Ramos Freitas[1], Ana Carolina Justino de Araujo[1], Saulo Relison Tintino[1], Jaime Ribeiro-Filho[3], Cicera Datiane de Morais Oliveira Tintino[1], Gustavo Marinho Miranda[4], Ivaldo Francisco da Silva Junior[1], Diogo Teixeira Carvalho[2], Thiago Belarmino de Souza[5], Danielle Ferreira Dias[2], Carolina Bandeira Domiciano[6], Henrique Douglas Melo Coutinho[1*]

[1] Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri (URCA), Crato, Ceará, Brazil

[2] Faculty of Pharmaceutical Sciences – UNIFAL, Minas Gerais, Brazil

[3] Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Ceará, Brazil

[4] Gonçalo Moniz Institute (IGM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Salvador, Bahia, Brazil

[5] School of Pharmacy – UFOP, Minas Gerais, Brazil

[6] Center of Medical Sciences, Federal University of Paraíba–UFPB, João Pessoa, Brazil

Revista: Chemistry Select **Fator de impacto**: 2.1 /
Situação: Publicado –
DOI: **https://doi.org/10.1002/slct.202505764**

Resumo: Bactérias multirresistentes (MDR) são consideradas patógenos de prioridade crítica pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Considerando a relevância do desenvolvimento de medicamentos antibacterianos nesse cenário, o presente estudo de pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana de derivados de tiazol à base de eugenol e analisar seu potencial para inibir a bomba de efluxo de MepA na cepa *K2068 de Staphylococcus aureus*. A concentração inibitória mínima (CMI) foi determinada pelo método de microdiluição, enquanto a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real. Todos os experimentos foram realizados em triplicado. Nenhum dos derivados de tiazol apresentou atividade antibacteriana direta, pois todos apresentaram CIM ≥ 1024 μg/mL. No entanto, LF12, LF13, LF14, LF16, LF20, LF21 e LF22 aumentaram significativamente a atividade do EtBr, um substrato de bomba de efluxo. Além disso, alguns derivados aumentaram o EtBr na fluorescência de *S. aureus* em comparação com o controle negativo, sugerindo possível inibição da bomba de efluxo de MepA. Notavelmente, os compostos LF14, LF16, LF20, LF21 e LF22 foram encontrados como potenciadores na atividade dos antibióticos. Os compostos LF13 e LF22 também reduziram significativamente (em 10 vezes) a expressão gênica *mepA*, e LF13, LF20 e LF22 mostraram interações promissoras in silico com essa proteína. O acoplamento flexível indicou que o LF13 era o mais eficaz, seguido pelo LF20 e LF22, com conformações distintas na cavidade MepA. Essas interações foram mediadas por ligações convencionais de hidrogênio, hidrofóbicas e interações de van der Waals envolvendo resíduos específicos. Em conjunto, esses achados sugerem que derivados à base de eugenol podem inibir o efluxo de fármacos, diminuindo tanto a expressão quanto a atividade de MepA em *S. aureus*. Em conclusão, derivados à base de eugenol são potenciais inibidores da bomba de efluxo e, portanto, podem ser usados no desenvolvimento de medicamentos que visem resistência a antibióticos mediada por bombas de efluxo em *S. aureus*.

Palavras-chave: Derivados à base de eugenol | expressão gênica | bomba de efluxo MepA

ChemistrySelect

ChemistrySelect Chemistry Europe

RESEARCH ARTICLE OPEN ACCESS

Eugenol-Based Thiazole Derivatives Inhibit the MepA Efflux Pump in *Staphylcoccus aureus*

Ray Silva de Almeida[1] | Laís Regina dos Santos Folquitto[1] | Priscilla Ramos Freitas[1] | Ana Carolina Justino de Araujo[1] | Saulo Relison Tintino[2] | Jaime Ribeiro-Filho[3] | Cicera Datiane de Morais Oliveira-Tintino[2] | Gustavo Martinho Miranda[4] | Ivaldo Francisco da Silva Junior[5] | Diogo Teixeira Carvalho[2] | Thiago Belarmino de Souza[2] | Danielle Ferreira Dias[2] | Carolina Bandeira Domiciano[6] | Henrique Douglas Melo Coutinho[1]

[1]Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri (URCA), Crato, Ceará, Brazil | [2]Faculty of Pharmaceutical Sciences–UNIVAL, Minas Gerais, Brazil | [3]Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Ceará, Brazil | [4]Gonçalo Moniz Institute (IGM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Salvador, Bahia, Brazil | [5]School of Pharmacy – UFOP, Minas Gerais, Brazil | [6]Center of Medical Sciences, Federal University of Paraíba–UFPB, João Pessoa, Brazil

Correspondence: Ray Silva de Almeida (ray.almeida@urca.br) | Henrique Douglas Melo Coutinho (hdmcoutinho@gmail.com)

Received: 19 September 2025 | **Revised:** 7 January 2026 | **Accepted:** 11 January 2026

Keywords: eugenol-based derivatives | gene expression | MepA efflux pump

ABSTRACT

Multidrug resistant (MDR) bacteria are considered critical priority pathogens by the World Health Organization (WHO). Considering the relevance of antibacterial drug development in this scenario, the present research study aimed to evaluate the antibacterial activity of eugenol-based thiazole derivatives and analyze their potential to inhibit the MepA efflux pump in *Staphylococcus aureus* strain K2068. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined through the microdilution method, whereas gene expression was assessed through real time PCR. All experiments were carried out in triplicate. None of the thiazole derivatives showed direct antibacterial activity since they all presented MIC ≥ 1024 μg/mL. However, LF12, LF13, LF14, LF16, LF20, LF21, and LF22 significantly enhanced the activity of EtBr, an efflux pump substrate. In addition, some derivatives increased EtBr in *S. aureus* fluorescence compared to the negative control, suggesting potential inhibition of the MepA efflux pump. Notably, compounds LF14, LF16, LF20, LF21, and LF22 were found to potentiate the activity of antibiotics. Compounds LF13 and LF22 also significantly reduced (by 10x) the gene expression MepA, and LF13, LF20, and LF22 showed promising in silico interaction with this protein. Flexible docking indicated that LF13 was the most effective, followed by LF20 and LF22, with distinct conformations in the MepA cavity. These interactions were mediated by conventional hydrogen bonds, hydrophobic and van der Waals interactions involving specific residues. Together, these findings suggest that eugenol-based derivatives can inhibit drug efflux, decreasing both the expression and activity of MepA in *S. aureus*. In conclusion, eugenol-based derivatives are potential efflux pump inhibitors and, thus, can be used in drug development targeting antibiotic resistance mediated by efflux pumps in *S. aureus*.

1. INTRODUÇÃO

A descoberta dos antibióticos no início do século XX reduziu de forma dramática a morbidade e a mortalidade associadas às infecções bacterianas [1]. Entretanto, o uso excessivo e indiscriminado desses fármacos nas décadas subsequentes contribuiu significativamente para o surgimento de mecanismos de resistência em múltiplas espécies bacterianas [2]. As bactérias multirresistentes (MDR) são consideradas patógenos de prioridade crítica pela Organização Mundial da Saúde (OMS) [3,4], uma vez que são responsáveis por taxas elevadas de infecção e por um aumento substancial da mortalidade associada às infecções resistentes [5,6].

Entre os principais mecanismos de resistência antimicrobiana, a extrusão de antibióticos mediada por bombas de efluxo desempenha um papel central tanto em bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas [7]. Ao transportarem ativamente os antibióticos para o meio extracelular, as bombas de efluxo reduzem a concentração intracelular dos fármacos e, consequentemente, diminuem a eficácia terapêutica [8,9].

O *Staphylococcus aureus* destaca-se entre as espécies que utilizam as bombas de efluxo como um importante mecanismo de resistência [10]. Esse patógeno é responsável por um amplo espectro de infecções, incluindo endocardite, infecções de pele e tecidos moles, gastroenterite e sepse [11]. Destaca-se que a proteína de efluxo MepA, pertencente à família *multiple drug and toxin extrusion* (MATE), contribui para a extrusão de fluoroquinolonas [12,13], reforçando o crescente quadro de resistência observado para essa classe de antibióticos.

Diante desse cenário, tem-se observado um crescente interesse científico na identificação de substâncias naturais ou sintéticas capazes de inibir mecanismos de efluxo, seja por meio da modulação da expressão gênica, seja pela interferência direta na atividade das bombas [14–16]. Nesse contexto, os heterociclos constituem uma classe de compostos de excepcional relevância química e biológica [17], apresentando uma ampla variedade de atividades biológicas, incluindo expressivas propriedades antimicrobianas [18–20], com destaque para os derivados tiazólicos [18,21].

O eugenol, um composto fenólico encontrado em famílias vegetais como Lamiaceae, Lauraceae e Myrtaceae, é reconhecido por suas diversas atividades biológicas [22,23]. Avanços na química medicinal têm demonstrado o potencial da conjugação do eugenol com arcabouços sintéticos, como hidrazinas e azóis, permitindo a preservação ou até mesmo a potencialização de suas propriedades biológicas [24–27].

A resistência antimicrobiana em *S. aureus* evidencia a necessidade urgente de novas alternativas terapêuticas capazes de superar os mecanismos de resistência mediados por bombas de efluxo. Embora a inibição dessas bombas já tenha sido explorada, a combinação de derivados tiazólicos com eugenol representa uma abordagem inovadora e ainda pouco investigada. Este estudo investiga a inibição da bomba de efluxo MepA como um alvo molecular específico, propondo uma nova classe de agentes antimicrobianos com potencial para o combate a infecções resistentes.

Ao abordar essa lacuna, a pesquisa oferece perspectivas terapêuticas promissoras e contribui para o avanço de estratégias no enfrentamento da resistência bacteriana. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana de derivados tiazólicos à base de eugenol, bem como analisar seu potencial de inibição da bomba de efluxo MepA e de redução da expressão gênica em cepas de *S. aureus* K2068.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

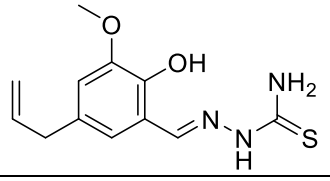
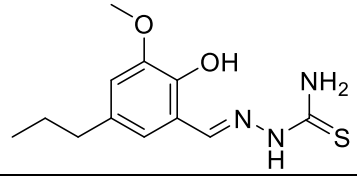
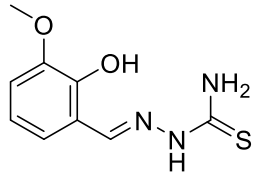
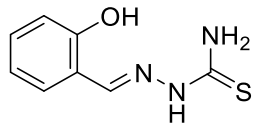
2.1 MICRORGANISMOS

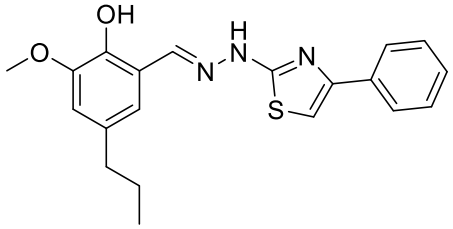
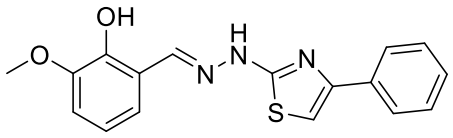
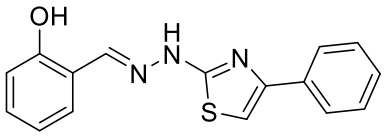
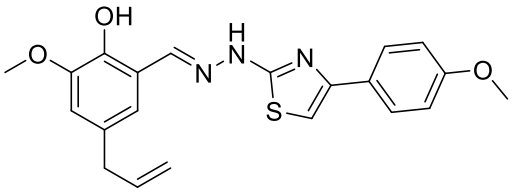
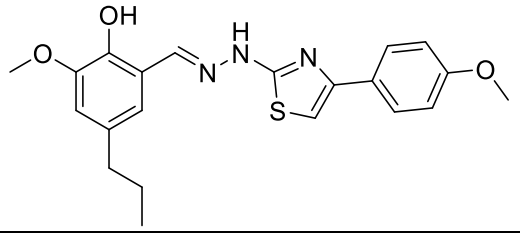
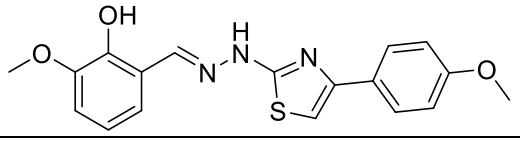
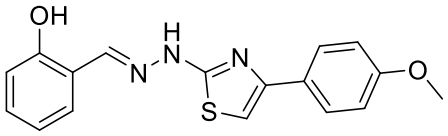
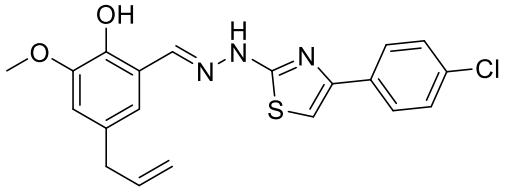
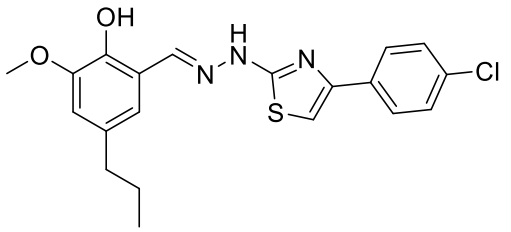
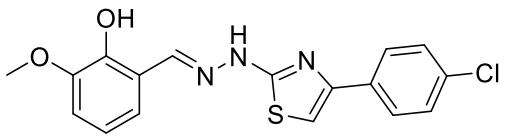
Os experimentos utilizaram a cepa *S. aureus* K2068, a qual possui o gene da bomba de efluxo MepA. Essa cepa foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Antes da realização dos ensaios, as bactérias foram cultivadas em meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas a 37 °C por 24 horas.

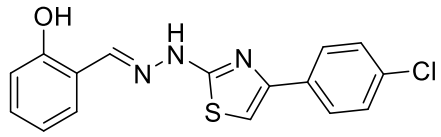
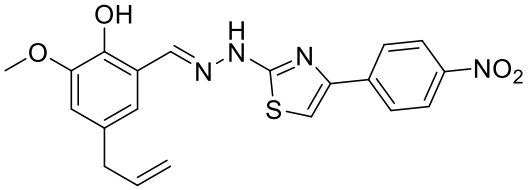
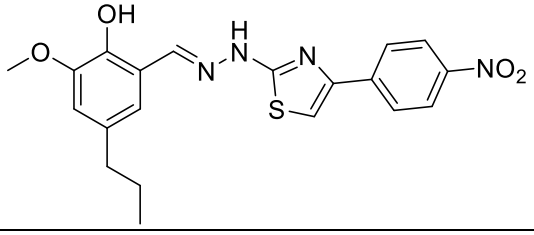
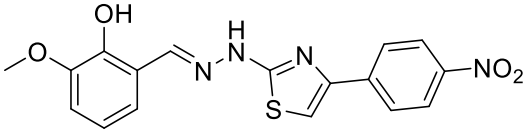
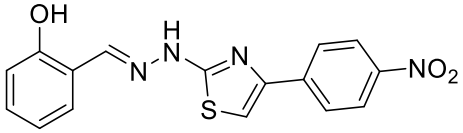
2.2 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÕES E ANTIBIÓTICOS

Os derivados tiazólicos à base de eugenol foram fornecidos pela Professora Danielle Ferreira (Tabela ST-1), do Instituto de Química da UNIFAL-MG [28]. A ciprofloxacina, o carbonil cianeto *m*-clorofenil-hidrazona (CCCP) e o brometo de etídio foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Brasil. Para cada substância, 10 mg foram diluídos em 500 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), com exceção do brometo de etídio, que foi dissolvido em água destilada estéril. Em seguida, foram adicionados 9,265 mL de água destilada estéril, obtendo-se uma concentração inicial de 1.024 µg/mL.

Tabela ST-1: Estruturas químicas dos derivados usadas nos testes.

Estrutura Química	Códigi	Massa Molecular
	LF7	265,3310
	LF8	267,3470
	LF9	225,2660
	LF10	195,2400

	LF12	367,4670
	LF13	325,3860
	LF14	295,3600
	LF15	395,4770
	LF16	397,4930
	LF17	355,4120
	LF18	325,3860
	LF19	399,8930
	LF20	401,9090
	LF21	359,8280

	LF22	329,8020
	LF23	410,4480
	LF24	412,4640
	LF25	370,3830
	LF26	340,3570

2.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos derivados tiazólicos à base de eugenol e do CCCP foi determinada da seguinte forma: cada inóculo foi preparado em meio *brain heart infusion* (BHI) a 10%, na proporção de 1:9. Em seguida, 100 µL do inóculo foram transferidos para tubos tipo Eppendorf contendo 900 µL de meio BHI a 10% e homogeneizados. Posteriormente, 100 µL dessa solução foram transferidos para uma placa de 96 poços.

Na sequência, adicionaram-se 100 µL do composto em teste por meio de diluições seriadas, obtendo-se concentrações variando de 1.024 a 8 µg/mL. A placa foi então incubada a 37 °C por 24 horas. Os últimos poços da placa foram utilizados como controle positivo (meio + inóculo), conforme as diretrizes do NCCLS (2003).

Após o período de incubação, foram adicionados 20 µL de resazurina sódica em cada poço, seguidos de nova incubação por 1 hora à temperatura ambiente. A mudança de coloração da solução, decorrente da redução da resazurina, indicou crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, de acordo com protocolos previamente estabelecidos [29–31].

2.4 ANÁLISE DE INIBIÇÃO DA BOMBA DE EFLUXO POR REDUÇÃO DA CIM DE BROMETO DE ETÍDIO

este experimento, a CIM do brometo de etídio foi avaliada tanto na presença quanto na ausência de concentrações subinibitórias dos compostos testados e do controle CCCP, correspondentes à CIM dividida por 8. De forma resumida, os inóculos bacterianos foram preparados em meio BHI a 10%, e os tratamentos foram adicionados conforme o protocolo experimental.

Os poços de uma placa de 96 poços foram preenchidos com 100 μL das soluções de cada tratamento, seguidos da adição de brometo de etídio em concentrações variando de 1.024 a 0,5 μg/mL. Qualquer redução na CIM do brometo de etídio foi interpretada como indicativa de inibição da bomba de efluxo, conforme descrito por [32]. Os controles experimentais dos compostos e os valores de CIM foram determinados conforme descrito anteriormente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.5 ANÁLISE DA POTENCIALIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA PELA INIBIÇÃO DA BOMBA DE EFLUXO

Considerando que a cepa *S. aureus* K2068 expressa genes que codificam proteínas de efluxo associadas à resistência a antibióticos, como a ciprofloxacina, este protocolo foi empregado para avaliar a capacidade dos derivados à base de eugenol em modular a resistência bacteriana a esse antibiótico. Os inóculos bacterianos foram preparados em meio BHI a 10%, e os tratamentos foram adicionados em concentrações equivalentes à CIM dividida por 8. Os poços de uma placa de 96 poços foram preenchidos com 100 μL das soluções de cada tratamento, seguidos da adição do antibiótico em concentrações variando de 1.024 a 0,5 μg/mL. Qualquer redução na CIM do antibiótico foi interpretada como indicativa de inibição da bomba de efluxo, conforme descrito por [32]. Os controles experimentais dos compostos e os valores de CIM foram determinados conforme descrito anteriormente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.6 AÇÃO INIBIDORA DE BOMBAS DE EFLUXO AVALIADA PELO AUMENTO DA EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DE BROMETO DE ETÍDIO

A cepa *S. aureus* K2068 foi cultivada em meio sólido HIA por 24 horas antes do experimento e mantida em estufa bacteriológica a 37 °C. Os inóculos bacterianos foram preparados em tampão fosfato-salino (PBS) até atingirem a concentração de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC). Os compostos que apresentaram a atividade mais significativa de

potencialização antibiótica foram selecionados para este ensaio.

As soluções de teste, contendo o inóculo bacteriano e cada composto, foram preparadas na concentração de 100 µg/mL. Uma solução contendo CCCP a 50 µg/mL foi utilizada como controle positivo. O tampão PBS foi adicionado para completar o volume final de 1 mL de cada solução. As amostras foram incubadas por 1 hora e 30 minutos. Em seguida, foi adicionado brometo de etídio (EtBr) a 100 µg/mL em todas as soluções, exceto no grupo contendo apenas o inóculo, utilizado como controle de crescimento. As soluções foram novamente incubadas por 1 hora.

Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 2 minutos e lavadas com PBS para remoção do EtBr e dos compostos testados. O pellet final foi ressuspendido em PBS e distribuído em microplacas. As leituras foram realizadas em leitor de microplacas de fluorescência BioTek Cytation 1, utilizando o software Gen5, com excitação a 530 nm e emissão a 590 nm. Foram analisados os seguintes grupos: inóculo isolado (controle de crescimento), inóculo + EtBr (controle negativo), inóculo + EtBr + CCCP a 50 µg/mL (controle positivo) e inóculo + EtBr + derivados a 100 µg/mL. O ensaio foi realizado em triplicata [33].

2.7 ANALYSIS in sílico Docking

O modelo da MepA foi construído no servidor SWISS-MODEL a partir da sequência obtida no UniProt (ID: Q2G140), utilizando como molde o PDBID 3W4T [34]. Os ligantes foram desenhados e otimizados conforme descrito anteriormente [35]. O software AutoDockTools 1.5.7 (https://ccsb.scripps.edu/mgltools/) foi empregado para o preparo do receptor e dos ligantes.

Foram adicionados átomos de hidrogênio (com união dos hidrogênios não polares) e cargas parciais de Gasteiger, mantendo-se a flexibilidade dos ligantes e do receptor (posições 81, 156, 161, 183, 291, 302 e 423). O procedimento de *docking* molecular foi realizado utilizando o software AutoDock Vina 1.2.5, com uma caixa de grade (*grid box*) de dimensões 50 Å × 50 Å × 50 Å, posicionada no centro da cavidade da bomba de efluxo, mantendo-se os demais parâmetros em seus valores padrão [36]. A definição do melhor resultado para cada ligante baseou-se no maior grau de afinidade de ligação, representado pelos valores mais negativos de energia.

2.8 ANÁLISE DE MPO E DESCRITORES DE ADME

As estruturas químicas dos ligantes foram construídas utilizando o software Avogadro® (versão compatível com OpenSSL 3.0.2) e, posteriormente, submetidas à minimização de energia empregando o Campo de Força Molecular de Merck (MMFF94). A otimização geométrica foi realizada por meio do algoritmo de Steepest Descent, fundamentado na mecânica newtoniana

clássica, com o objetivo de obter conformações energeticamente estáveis [S1].

Após a otimização, as superfícies moleculares dos ligantes foram geradas para a avaliação do Potencial de Lipofilicidade Molecular (MLP). O mapeamento e a visualização do MLP foram realizados utilizando o Python Molecular Graphics (PyMOL), permitindo a análise da distribuição espacial das regiões lipofílicas e hidrofílicas na superfície molecular, conforme descrito na Equação 1:

$$MLP = \sum_{i=1}^{N} F_i \,.\, f(d_{ik}) \qquad (1)$$

onde F representa o índice de lipofilicidade do fragmento *i* em uma molécula composta por N fragmentos, e $f(d_{ik})$ corresponde à função da distância espacial (*k*) entre os fragmentos *i* [S2]. Os resultados incluem um mapa da superfície molecular cujo espectro varia do vermelho (fragmentos polares) ao azul (fragmentos não polares), o qual foi comparado com os descritores de lipofilicidade calculados (ClogP).

Para a análise do perfil de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), foi empregado o algoritmo quantitativo de estimativa de *drug-likeness* baseado em otimização multiparamétrica (MPO), conforme apresentado na Equação 2:

$$d = \sum_{i=1}^{N} w_k \, T_k(x_k^0) \qquad (2)$$

aqui, a ordem de desejabilidade (d) é dada pela soma das contribuições estruturais (w), variando de 0 a 1, para cada atributo k com valor calculado x que se encontra dentro ($x_k \leq x_a$) ou fora ($x_\beta < x_k$) do limiar ótimo (T(x)). Os limiares foram definidos da seguinte forma: ClogP ≤ 3, lipofilicidade em tampão (ClogD) ≤ 2, peso molecular (MW) ≤ 360 g/mol, Área de Superfície Polar Topológica (TPSA) entre 40–90 Å², doadores de ligação de hidrogênio ≤ 1 e pKa mais básico ≤ 8 (N = 6 atributos), resultando em uma pontuação final variando de 0 a 6 [S3].

Subsequentemente, foram preditos descritores de ADME baseados em ensaios de permeabilidade, incluindo permeabilidade aparente (Papp) utilizando células Madin–Darby Canine Kidney (MDCK), efluxo passivo mediado pela glicoproteína P (P-gp) e clearance intrínseco em microssomas hepáticos humanos (CLHLM). Esses parâmetros foram estimados utilizando os servidores ADMETlab 2.0 (https://admetmesh.scbdd.com/) e ADMETboost – AI Drug Lab (https://ai-druglab.smu.edu/home).

2.9 PREDIÇÃO DE SÍTIOS DE METABOLISMO

Para a predição dos sítios metabólicos, foi utilizado o servidor online XenoSite (https://xenosite.org/). Esse preditor baseia-se em descritores de especificidade estrutural para estimar a suscetibilidade de fragmentos moleculares à biotransformação no fígado humano pelo sistema de isoenzimas do citocromo P450 (CYP450) durante o metabolismo de fase I, bem como por reações de conjugação associadas ao metabolismo de fase II [S4].

A análise estrutural foi correlacionada com os descritores de CLHLM, com a predição de substratos das isoformas do CYP450 e com as estimativas de lesão hepática induzida por fármacos (DILI) fornecidas pelo servidor online ADMETlab 2.0 (https://admetmesh.scbdd.com/), com o objetivo de relacionar as vias estimadas de biotransformação com a reatividade dos ligantes.

2.10 PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA DO GENE mepA

Para avaliar a inibição da expressão do gene *mepA* após o cultivo bacteriano, três condições experimentais foram preparadas em tubos cônicos, em triplicata:

1. **Controle 1**: contendo o volume necessário para atingir uma concentração correspondente à CIM/8 do antibiótico, uma alíquota da suspensão bacteriana e o volume restante de solução BHI suficiente para completar 5 mL, preparada conforme as instruções do fabricante.

2. **Controle 2**: contendo o volume de solução BHI necessário para completar 5 mL, preparada conforme as instruções do fabricante, e uma alíquota da suspensão bacteriana.

3. **Tratamento**: contendo o volume correspondente à CIM/8 do antibiótico e dos derivados tiazólicos à base de eugenol (LF13 e LF21), uma alíquota da suspensão bacteriana e o volume de solução BHI necessário para completar 5 mL, conforme instruções do fabricante.

Os tubos foram incubados a 37 °C por 24 horas. Em seguida, realizou-se a extração de RNA utilizando o reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific), e a análise quantitativa foi conduzida utilizando o sistema Gen5™. O DNA complementar (cDNA) foi obtido por meio do kit SuperScript VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. A expressão gênica foi avaliada utilizando o SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) no equipamento *Analytik Jena qTower³*, com auxílio do software qPCRsoft. Ambos os *primers* foram utilizados com temperatura de anelamento (*annealing*) de 61 °C, conforme descrito na Tabela 1. A expressão relativa do gene *mepA* foi determinada pelo método

ΔΔCT [37,38].

Tabela 1: Primers para a expressão dos genes *mepA* e 23s.

Gene	Primer F	Primer R	Referência
mepA	GGCAAATAAAGGCCGTATGA	CAGTCGCTTGAAGCATACCA	Ashraf et al., 2022
23S	ACGGAGTTACAAAGGACGAC	AGCTCAGCCTTAACGAGTAC	Machado et al., 2018

F: *Forward*; R*: Reverse*

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, a fim de garantir a confiabilidade e a reprodutibilidade dos dados. Os resultados foram expressos como média aritmética ± erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism, versão 9.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

As diferenças entre os grupos experimentais foram avaliadas por meio de análise de variância de uma via (one-way ANOVA), seguida do teste pós-hoc de comparações múltiplas de Bonferroni para identificação de diferenças estatisticamente significativas. Valores de p inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS

3.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS DERIVADOS TIAZÓLICOS BASEADOS NO EUGENOL

A Tabela 2 apresenta os valores de CIM dos derivados tiazólicos à base de eugenol frente à cepa *S. aureus* K2068. Todas as substâncias apresentaram valores de CIM superiores a 1.024 μg/mL, o que é considerado clinicamente ineficaz. Esses resultados indicam que nenhum dos compostos avaliados possui atividade antibacteriana direta. Por outro lado, o controle CCCP apresentou uma CIM de 64 μg/mL.

Substâncias	*S. aureus* - K2069
LF07	≥1024 μg/mL
LF08	≥1024 μg/mL
LF09	≥1024 μg/mL
LF10	≥1024 μg/mL
LF12	≥1024 μg/mL

LF13	≥1024 µg/mL
LF14	≥1024 µg/mL
LF15	≥1024 µg/mL
LF16	≥1024 µg/mL
LF17	≥1024 µg/mL
LF18	≥1024 µg/mL
LF19	≥1024 µg/mL
LF20	≥1024 µg/mL
LF21	≥1024 µg/mL
LF22	≥1024 µg/mL
LF23	≥1024 µg/mL
LF24	≥1024 µg/mL
LF25	≥1024 µg/mL
LF26	≥1024 µg/mL
CCCP	64 µg/mL

Tabela 2: Resultado da avaliação da concentração inibitória mínima dos derivados tiazólicos baseados no eugenol e da substância CCCP.

3.2 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO POR DERIVADOS TIAZÓLICOS BASEADOS EM EUGENOL ASSOCIADO AO BROMETO DE ETÍDIO (EtBr)

A Figura 1 apresenta a variação da CIM do brometo de etídio (EtBr) associada a diferentes compostos frente à cepa *S. aureus* K2068, que expressa a bomba de efluxo MepA. Nesta avaliação, o CCCP foi utilizado como controle positivo, e os derivados tiazólicos foram analisados quanto à sua capacidade de reduzir a CIM do EtBr, o que indica inibição do sistema de efluxo. Os compostos LF12, LF13, LF14, LF16, LF20, LF21 e LF22 promoveram reduções mais significativas na CIM do EtBr, enquanto os compostos LF10, LF25 e LF26 não apresentaram efeitos inibitórios relevantes nesse modelo experimental.

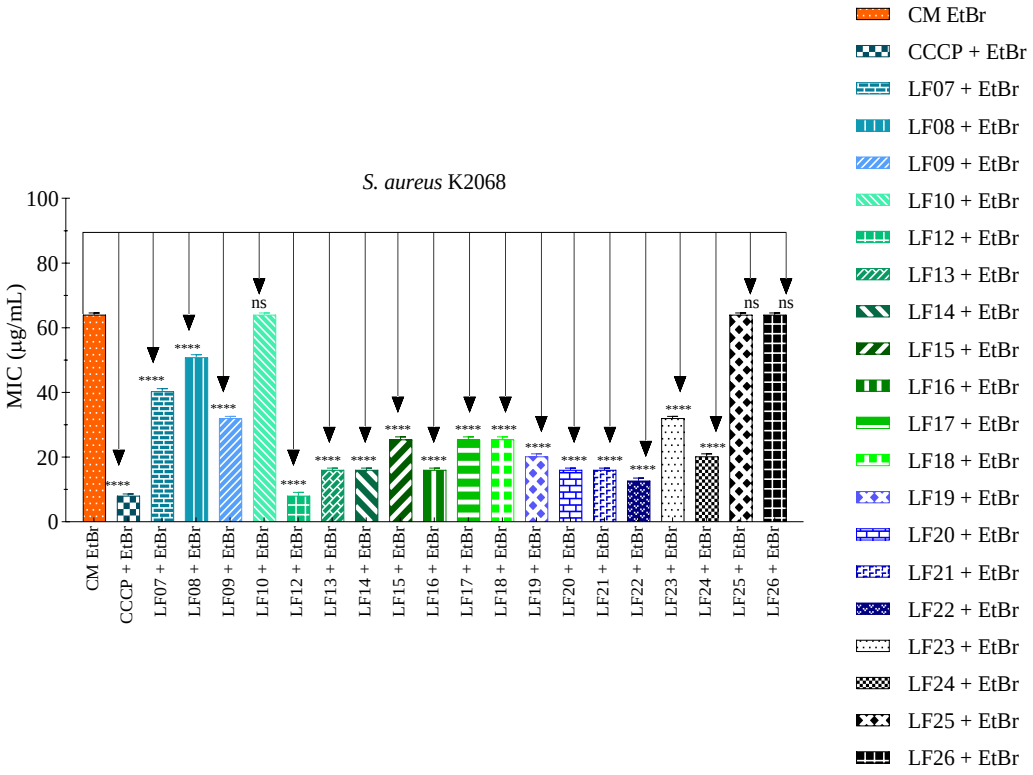


Figura 1: Avaliação da inibição da bomba de efluxo MepA pelos derivados tiazólicos baseados em eugenol e CCCP associados com brometo de etídio frente a cepa de *Staphylococcus aureus* K2068. N = 3. ****p < 0,0001 indica diferenças significativas entre os grupos. A significância estatística foi determinada por ANOVA unidirecional e teste de post-hoc de Bonferroni.

3.3 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO POR DERIVADOS TIAZÓLICOS BASEADOS EUGENOL ASSOCIADO AO ANTIBIÓTICO CIPROFLOXACINA

Considerando a resistência aos antibióticos associada à MepA neste modelo, foi avaliada a capacidade dos derivados à base de eugenol em reduzir a CIM da ciprofloxacina frente à cepa *S. aureus* K2068 (Figura 2). Observou-se que a maioria dos compostos que promoveram a redução da CIM do brometo de etídio também foi capaz de reduzir a CIM do antibiótico frente à cepa que expressa a MepA. Dentre esses compostos, destacam-se LF13, LF14, LF16, LF20, LF21 e LF22. Curiosamente, embora o composto LF12 tenha reduzido a CIM do EtBr, sua associação com a ciprofloxacina resultou em efeito antagonista, sugerindo o envolvimento de outros mecanismos de modulação da resistência aos antibióticos.

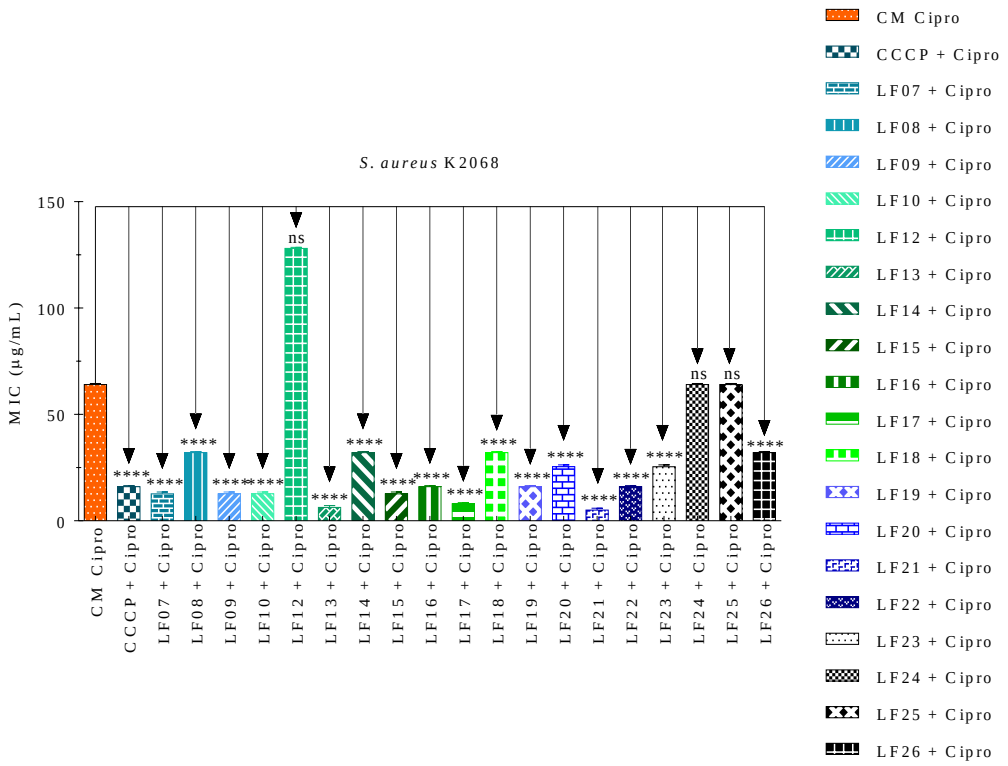


Figura 2: Avaliação da inibição da bomba de efluxo MepA pelos derivados tiazólicos baseados em eugenol e CCCP associados com ciprofloxacina, frente a cepa de *Staphylococcus aureus* K2068. N = 3. ****p < 0,0001 indica diferenças significativas entre os grupos. A significância estatística foi determinada por ANOVA unidirecional e teste de post-hoc de Bonferroni.

3.4 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO POR EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA

Sete derivados que apresentaram os efeitos farmacológicos mais significativos nos ensaios anteriores foram selecionados para avaliação no teste de emissão de fluorescência do EtBr, cujo

resultado está diretamente relacionado à atividade das bombas de efluxo. Na concentração de 100 µg/mL, os derivados LF12, LF13, LF15, LF16, LF20, LF21 e LF22 promoveram aumento da emissão de fluorescência do EtBr nas culturas da cepa K2068, em comparação com o controle negativo (EtBr isolado). Resultados semelhantes foram observados no grupo tratado com CCCP, indicando que os derivados avaliados inibem a extrusão do EtBr mediada pela MepA, resultando no aumento da emissão de fluorescência (Figura 3).

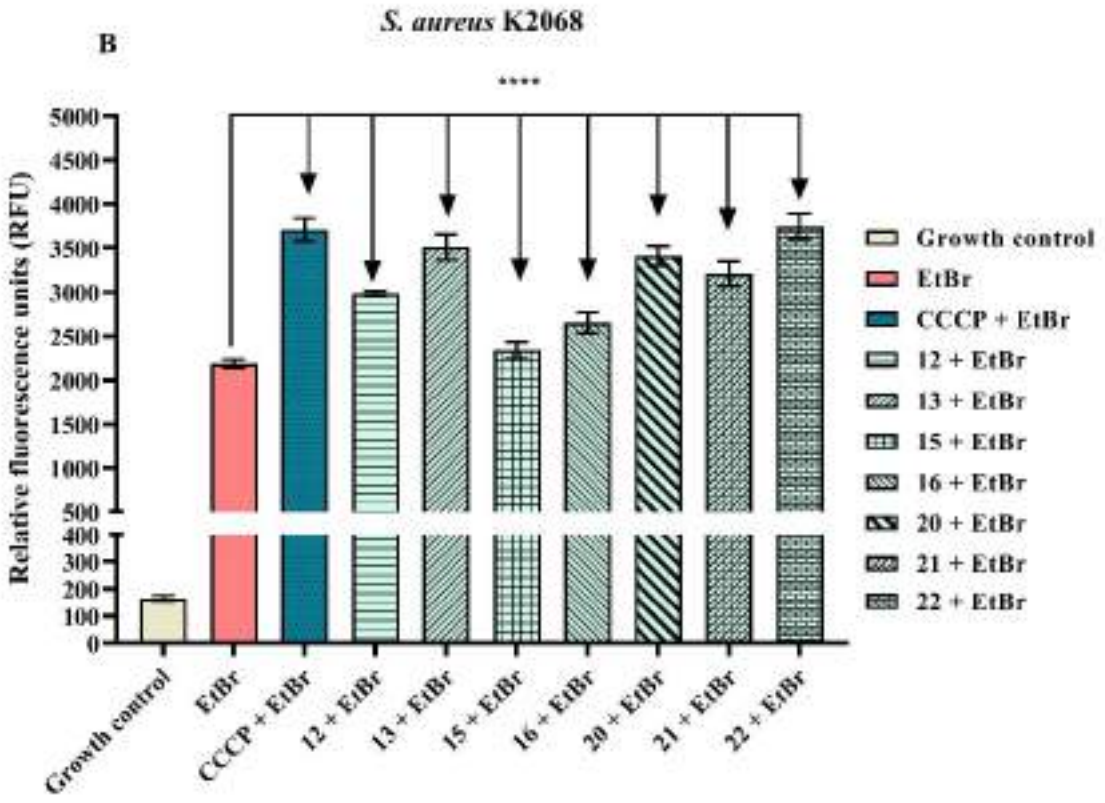


Figure 3. Evaluation of MepA efflux pump inhibition by measuring fluorescence emission in *S. aureus* K2068 **(B)** strains treated with derivatives LF12 to LF22. EtBr = ethidium bromide; **** = $p < 0.0001$ *vs* EtBr.

3.5 AVALIAÇÃO DA DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE BOMBAS DE EFLUXO

Para testar a hipótese de que os derivados tiazólicos à base de eugenol poderiam modular o efluxo de antibióticos por meio da redução da expressão gênica das bombas de efluxo, a expressão do gene *mepA* em *S. aureus* K2068 foi analisada por PCR. Os compostos LF13 e LF21 promoveram uma redução significativa na expressão do gene *mepA*, indicando possíveis mecanismos de modulação da resistência aos antibióticos por parte desses compostos (Figura 4).

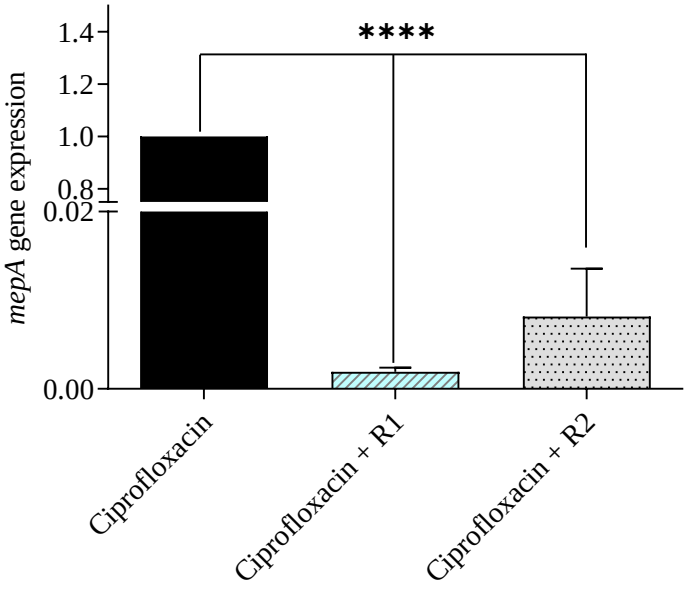


Figura 4. Avaliação da expressão do gene mepA na presença de compostos derivados tiazólicos baseados em eugenol(R1=LF13 e R2=LF21) em combinação com o antibiótico em comparação com o controle com antibiótico. **** = $p < 0.0001$ indica diferenças significativas entre os grupos. A significância estatística foi determinada por one-way ANOVA.

3.6 DOCKING MOLECULAR

As energias obtidas por meio do *docking* flexível, correspondentes às melhores conformações dos compostos na cavidade do modelo da MepA, foram as seguintes: −7,564 para LF12, −7,956 para LF13, −7,371 para LF15, −7,726 para LF16, −7,894 para LF20, −7,758 para LF21, −7,814 para LF22 e −6,826 para o CCCP (todos os valores expressos em kcal/mol).

Considerando que a expressividade dos resultados está associada aos valores mais negativos de energia, a ordem de eficácia dos compostos foi: LF13 > LF20 > LF22 > LF21 > LF16 > LF12 > LF15 > CCCP, destacando-se os derivados com estruturas mais simples. Essa sequência é semelhante aos dados obtidos no ensaio de emissão de fluorescência do brometo de etídio, diferindo principalmente na posição ocupada pelo CCCP.

A Figura 5 demonstra que as conformações selecionadas estão localizadas em um mesmo nível da cavidade da MepA, embora os derivados apresentem orientações distintas, provavelmente em decorrência de suas particularidades estruturais.

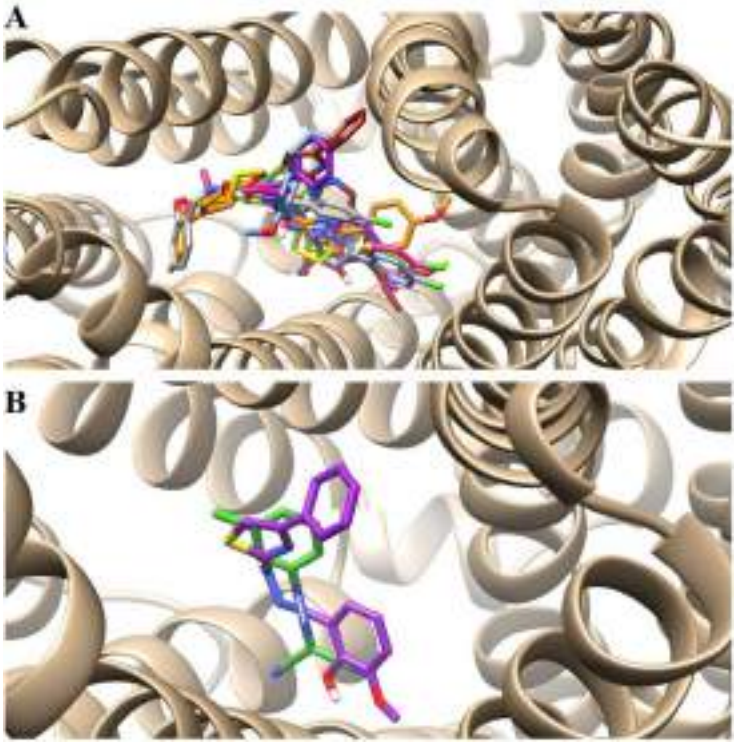


Figura 5. Conformações de todos ligantes (LF12: marrom, LF13: roxo. LF15: amarelo, LF16: laranja, LF20: azul, LF21: rosa, LF22: cinza, CCCP: verde) no sítio de ligação a MepA (A) e destaque para LF13 e CCCP (B).

As figuras 6 e 7 ilustram as interações entre o composto LF13 ou o CCCP e a MepA, especificando a participação dos componentes estruturais dessas moléculas, enquanto a Tabela 3 descreve as respectivas distâncias de interação. Ambos os ligantes apresentaram ligações de hidrogênio convencionais, interações hidrofóbicas (alquil e π-alquil), interações π-enxofre e interações do tipo van der Waals; entretanto, apenas

neste último tipo foram identificados resíduos coincidentes (Arg160, Met25, Ser32 e Thr29).

Os resíduos Asn70, Glu295, Gly73, Met172, Phe152, Phe153 e Val74 aparecem em ambas as análises, porém envolvidos em diferentes tipos de interação.

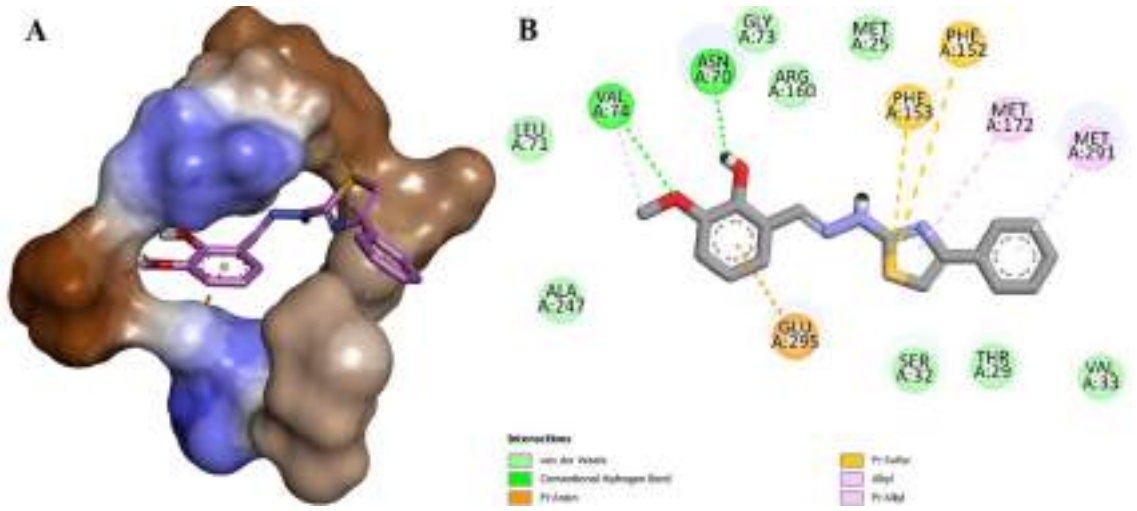


Figura 6. Conformação (A) e interações (B) de LF13 no sítio de ligação a MepA.

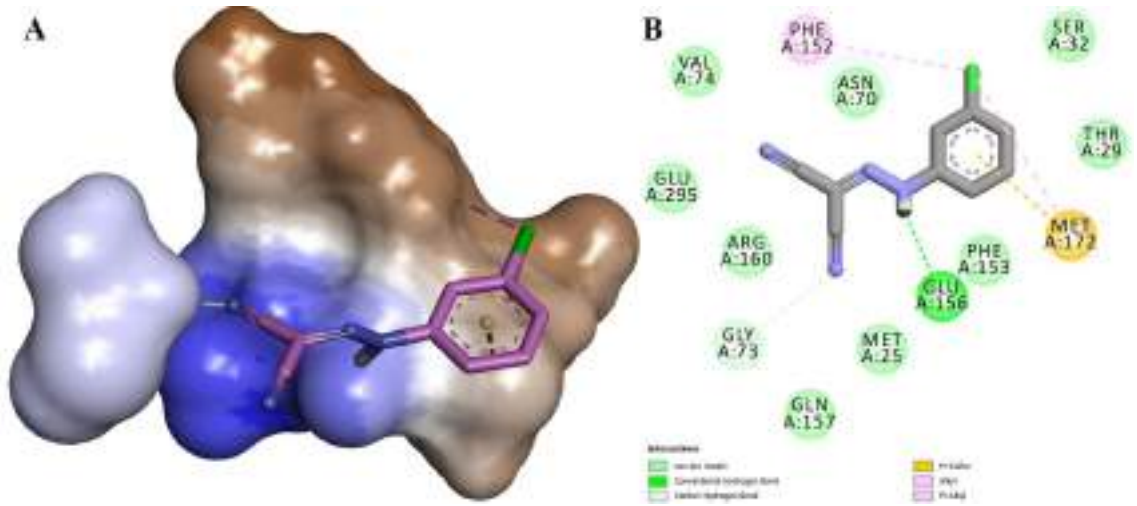


Figura 7. Conformação (A) e interações (B) do CCCP no sítio de ligação a MepA.

Tabela 3. Interações de LF13 e CCCP com os aminoácidos de MepA

Interactions	LF13	CCCP
van der Waals	Ala247, Arg160, Gly73, Leu71, Met25, Ser32, Thr29, Val33	Arg160, Asn70, Gln157, Glu295, Met25, Phe153, Ser32, Thr29, Val74
Ligação de hidrogênio convencional	Asn70 (2.01 Å) Val74 (3.03 Å)	Glu156 (1.75 Å)
Ligação de hidrogênio-carbono	----	Gly73 (3.19 Å)

π-Ânion	Glu295 (3.27 Å)	----
Alquil	Val74 (3.83 Å)	Met172 (4.49 Å)
π-Alquil	Met172 (5.22 Å) Met291 (5.25 Å)	Phe152 (5.39 Å)
π-Enxofre	Phe152 (5.54 Å) Phe153 (4.71 Å)	Met172 (3.53 Å)

3.7 ANÁLISE DE MPO E DESCRITORES DE ADME

Tabela ST-2: Propriedades físico-químicas calculadas e aplicadas ao sistema de classificação biofarmacêutica da Pfizer, Inc., analisadas por meio de otimização multiparamétrica (MPO).

Name	ClogP	ClogD	MW	TPSA	HBD	pKa	MPO
LF12	6.77	6.77	367.47	66.74	2	4.18	3.45
LF13	5.37	5.36	325.39	66.74	2	4.00	3.5
LF15	6.46	6.46	365.45	66.74	2	4.11	3.46
LF16	6.61	6.61	397.49	75.97	2	3.93	3.23
LF20	7.37	7.37	401.91	66.74	2	3.77	3.2
LF21	5.97	5.97	359.83	66.74	2	3.56	3.5

Nota: ClogP, lipofilicidade intrínseca calculada; ClogD, lipofilicidade calculada em tampão (pH 7,4); MW, peso molecular em g/mol; TPSA, área de superfície polar topológica em $Å^2$.

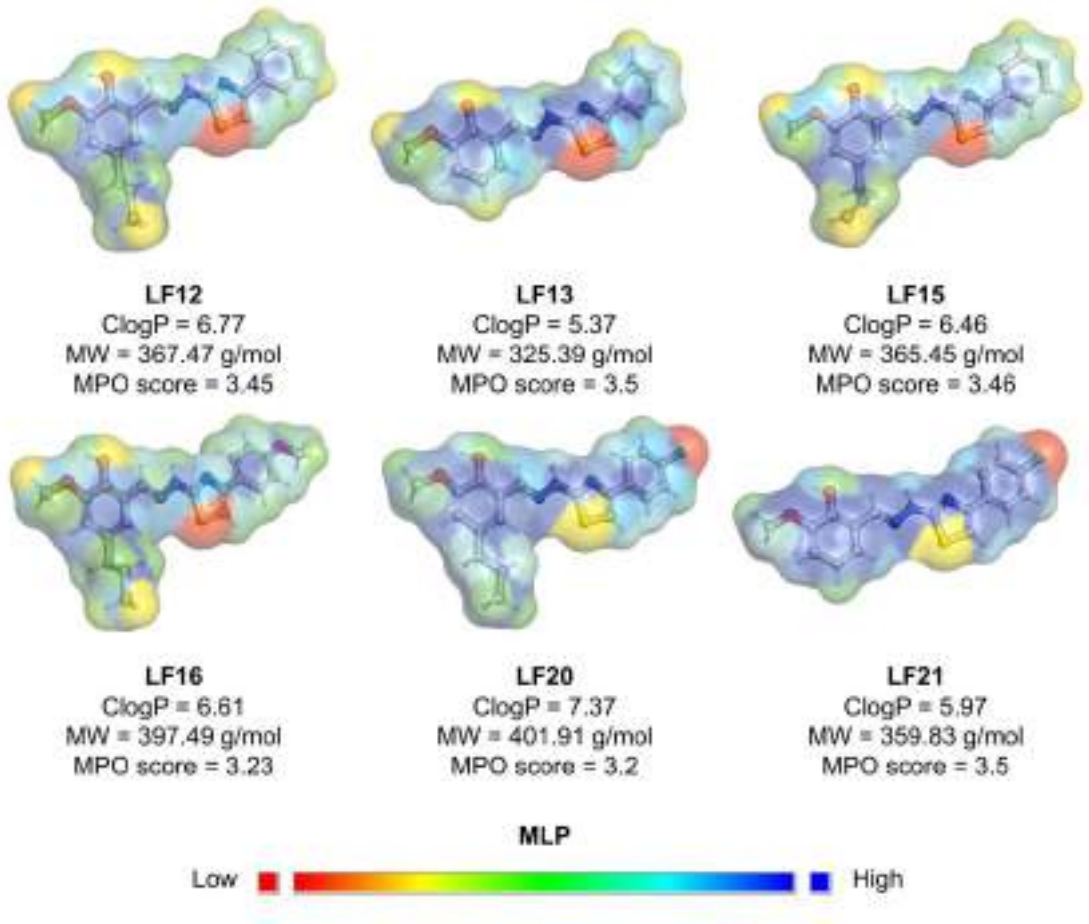


Figura SF-1: Mapa de superfície do potencial de lipofilicidade molecular (MLP) dos derivados LF, no qual o espectro de cores varia do amarelo ao vermelho para fragmentos polares e do verde ao azul para fragmentos hidrofóbicos.

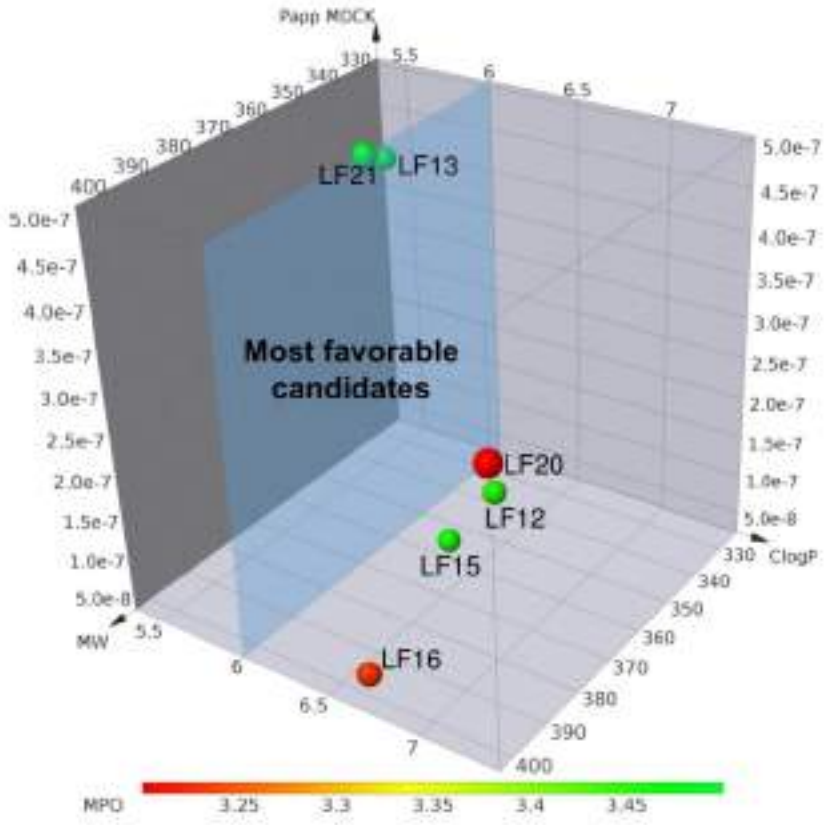


Figura SF-2: Gráfico dos atributos físico-químicos de peso molecular e lipofilicidade calculada (ClogP) em relação aos valores preditos de permeabilidade aparente (Papp) em células MDCK.

Tabela ST-3: Propriedades farmacocinéticas preditas pelo teste de consenso de ADME entre as plataformas ADMETlab 2.0 e ADMETboost.

Name	P_{app} MDCK	P-gp	HIA	VD_{ss}	CYP1A2	CYP2C9	CL_{HLM}	DILI
LF12	1.71×10^{-7}	0.99	72.54	1.79	0.92	0.59	43.54	49.98
LF13	3.89×10^{-7}	0.12	73.03	0.49	0.94	0.64	40.39	49.88
LF15	7.72×10^{-8}	0.99	71.13	0.59	0.91	0.54	38.70	54.69
LF16	3.53×10^{-8}	0.99	72.36	1.64	0.95	0.82	45.80	48.89
LF20	3.61×10^{-7}	0.99	72.36	2.18	0.89	0.59	43.89	50.4
LF21	4.95×10^{-7}	0.23	72.68	0.56	0.91	0.63	40.20	49.26

Nota: Papp MDCK, permeabilidade aparente na linhagem celular MDCK (cm/s); P-gp, efluxo mediado pela glicoproteína P; HIA, absorção intestinal humana (%); VDss, volume de distribuição em estado estacionário (L/kg); CLHLM, clearance intrínseco em microssomas hepáticos humanos (mL/min/kg); DILI, lesão hepática induzida por fármacos.

3.8 PREDIÇÃO DE SÍTIOS DE METABOLISMO

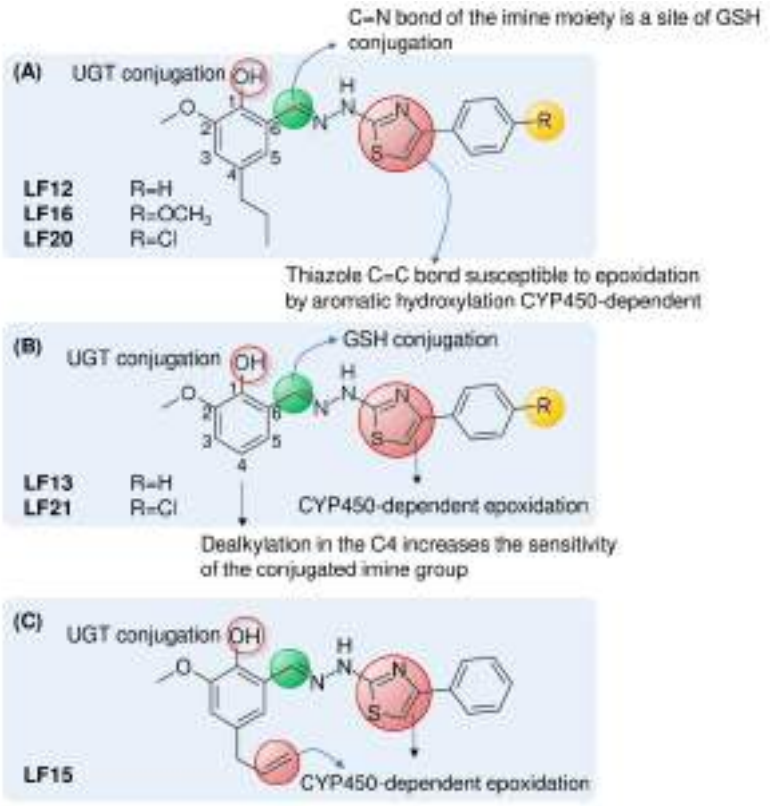


Figura SF-3: Predição dos sítios metabólicos para (A) derivados C4-alquilados da subestrutura hidroxi-metoxibenzílica (LF12, LF16 e LF20), (B) derivados C4-desalquilados (LF13 e LF21) e (C) o ligante LF15, considerando as modificações estruturais e os substituintes R na porção fenil-tiazol.

4. DISCUSSÃO

Staphylococcus aureus é um importante agente etiológico de infecções nosocomiais. Devido à sua elevada capacidade de desenvolver resistência aos antibióticos, *S. aureus* representa uma ameaça crescente à saúde pública, principalmente em razão do surgimento de cepas multirresistentes. Evidências indicam que a bomba de efluxo MepA constitui um mecanismo relevante subjacente à resistência antimicrobiana em *S. aureus*.

As bombas de efluxo são proteínas transmembranares que removem ativamente diversos compostos, incluindo agentes antimicrobianos, do interior da célula bacteriana, reduzindo, assim, sua eficácia terapêutica. Em *S. aureus*, a MepA é uma bomba de efluxo multidroga que confere resistência a diferentes classes de antibióticos, incluindo fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Essa proteína permite que a bactéria sobreviva mesmo na presença de altas concentrações de antibióticos, tornando significativamente mais desafiador o tratamento de infecções causadas por cepas resistentes [12,39–42].

Pesquisas indicam que a expressão da MepA pode ser modulada em resposta a condições de estresse ambiental, como a presença de antibióticos e variações de pH. Isso sugere que a MepA contribui para a sobrevivência bacteriana em ambientes hostis, além de facilitar a adaptação e a persistência da bactéria no hospedeiro. Dessa forma, compreender os mecanismos farmacológicos envolvidos na regulação da MepA é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas capazes de restaurar a eficácia dos antibióticos frente a cepas resistentes de *S. aureus* [13,43,44].

A análise da CIM dos derivados tiazólicos à base de eugenol frente à cepa *S. aureus* K2068, portadora da bomba de efluxo MepA, indicou ausência de atividade antibacteriana direta clinicamente relevante (Tabela 1). Diante disso, levantou-se a hipótese de que esses compostos, embora não apresentem ação antibacteriana intrínseca, possam modular a resistência aos antibióticos por meio da inibição dos mecanismos de efluxo bacteriano.

De acordo com Bhardwaj e Mohanty (2012) [45] e Bambeke et al. (2006) [46], uma das características ideais de um inibidor de bomba de efluxo é a ausência de atividade antibacteriana própria, uma vez que esta poderia favorecer o desenvolvimento de resistência. Para testar essa hipótese, o presente estudo avaliou a capacidade dos derivados em reduzir a CIM do brometo de etídio (EtBr) e do antibiótico ciprofloxacina. A redução da CIM resultante da associação do composto em teste sugere a inibição da bomba de efluxo, associada ao aumento da concentração intracelular do fármaco devido à diminuição da atividade de efluxo [47].

Os derivados tiazólicos LF12, LF13, LF14, LF16, LF20, LF21 e LF22 promoveram uma redução de três vezes na CIM do EtBr, indicando maior retenção intracelular desse marcador em *S. aureus* K2068. Em contrapartida, os compostos LF10, LF25 e LF26 não apresentaram atividade significativa. A associação dos derivados tiazólicos com a ciprofloxacina resultou na redução da CIM para a maioria dos compostos avaliados, incluindo LF13, LF14, LF16, LF20, LF21 e LF22. Entretanto, o composto LF12 apresentou efeito antagonista quando associado ao antibiótico, evidenciando a complexidade das interações entre diferentes compostos [48,49] e ressaltando a necessidade de investigações adicionais para melhor compreensão desse fenômeno.

Um estudo conduzido por Muniz et al. (2020) [50] obteve resultados bastante distintos ao avaliar a eficácia de derivados de eugenol como inibidores da bomba de efluxo NorA em cepas de *S. aureus* 1199B. Esse achado sugere que tais compostos podem apresentar certo grau de seletividade em relação às proteínas de efluxo. Por outro lado, Muniz et al. observaram

redução na CIM do brometo de etídio e de antibióticos após a associação com derivados de eugenol frente à cepa *S. aureus* 1199B portadora da bomba NorA, corroborando os resultados apresentados no presente estudo.

Althagafi et al. (2019) [51] demonstraram que alguns derivados tiazólicos apresentam atividade antibacteriana frente a cepas de *S. aureus*, resultando em halos de inibição superiores aos observados para o antibiótico controle ampicilina. De acordo com Vale e Aguiar (2020) [52], os derivados tiazólicos constituem agentes antimicrobianos promissores. No trabalho intitulado *"Thiazoles: having diverse biological activities"*, Kashyap e colaboradores (2012) [53] evidenciaram o amplo potencial farmacológico desses compostos.

Cabe destacar que a presente pesquisa é um estudo pioneiro ao demonstrar o efeito de derivados tiazólicos à base de eugenol como inibidores do sistema de efluxo de antibióticos, associado à redução da expressão gênica em *S. aureus* K2068. Segundo Tintino et al. (2016) [54], substâncias capazes de reduzir a CIM de antibióticos em cepas resistentes são denominadas "modificadores da atividade antibiótica". Sabe-se que muitos desses agentes podem alterar a suscetibilidade bacteriana aos antimicrobianos por meio da inibição de bombas de efluxo [55].

A avaliação da emissão de fluorescência do brometo de etídio (EtBr) demonstrou que, de forma semelhante ao controle positivo CCCP, os compostos LF12, LF13, LF15, LF16, LF20, LF21 e LF22 aumentaram a retenção de EtBr na cepa *S. aureus* K2068, possivelmente em decorrência da inibição da bomba de efluxo MepA [56,47,49]. O uso do EtBr como substrato para bombas de efluxo é amplamente descrito na literatura, e os efeitos observados para os derivados tiazólicos associados a esse inibidor padrão indicam fortemente mecanismos de inibição semelhantes.

Os mecanismos subjacentes à inibição dos sistemas de efluxo MDR ainda não são completamente elucidados. No entanto, propõe-se que o inibidor possa ligar-se diretamente à bomba, atuando de forma competitiva ou não competitiva. Além disso, os inibidores podem promover depleção energética, seja por inibição da ligação ao ATP, seja pela dissipação do gradiente de prótons, alteração da permeabilidade da membrana ou inibição da expressão gênica [45,57–61].

Considerando os resultados experimentais, os sete compostos avaliados por fluorimetria foram submetidos à análise de *docking* molecular. Os resultados demonstraram que os derivados tiazólicos interagem de forma eficaz com o modelo da MepA, apresentando energias de ligação negativas, indicativas da estabilidade das interações. O composto LF13 apresentou

a energia mais negativa, seguido por LF20 e LF22. Essas interações envolvem ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, consideradas essenciais para a eficácia de inibidores de bombas de efluxo [47].

O estudo de Schindler et al. (2013) [62] avaliou a contribuição de diferentes resíduos da MepA para a atividade proteica e seu impacto na inibição da bomba de efluxo. Entre as posições investigadas, os autores observaram que mutações na posição 156 resultaram em perda de função, evidenciando a relevância do resíduo ácido glutâmico (Glu156). Alterações na posição 291, normalmente ocupada por metionina (Met291), também impactaram a resistência conferida pela MepA, embora em menor grau.

Esses achados estão diretamente relacionados aos resultados obtidos na análise de *docking* molecular, corroborando o potencial dos compostos como inibidores de efluxo e explicando as diferenças observadas entre a eficácia *in vitro* e *in silico* de LF13 e CCCP. Embora ambos interajam com resíduos envolvidos na função da MepA, apenas o CCCP atuou sobre um resíduo crítico para a proteína, o que justifica seus resultados *in vitro* mais expressivos, apesar de não apresentar o melhor perfil de interação *in silico*.

Adicionalmente, outro indicativo da ação inibitória dos compostos é a interação da clorpromazina, um conhecido inibidor de bomba de efluxo, com os resíduos Phe152 e Phe153 [63]. A análise por PCR demonstrou que a expressão gênica da MepA após exposição à ciprofloxacina associada aos compostos LF13 e LF21 foi significativamente reduzida em comparação ao grupo controle, revelando potenciais mecanismos de modulação da resistência aos antibióticos por esses compostos.

Os derivados tiazólicos à base de eugenol apresentam elevado potencial como inibidores de bombas de efluxo, especialmente quando associados a antibióticos como a ciprofloxacina. Sua eficácia na inibição da bomba de efluxo MepA e na redução da resistência bacteriana abre novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias combinadas no combate a infecções resistentes. No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar com precisão os mecanismos de interação e otimizar a estrutura desses compostos para aplicação clínica.

Os derivados tiazólicos à base de eugenol também exibem potencial terapêutico em razão de suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes. A combinação dessas estruturas pode aumentar a estabilidade e a biodisponibilidade dos compostos, tornando-os candidatos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos. Estudos indicam que heterociclos tiazólicos apresentam atividade antifúngica significativa, como frente a *Cryptococcus gattii*, enquanto o eugenol é amplamente reconhecido por suas propriedades

antimicrobianas e antioxidantes. Dessa forma, a conjugação desses compostos pode ampliar seu potencial farmacológico, oferecendo novas alternativas para o combate a microrganismos resistentes e a doenças inflamatórias crônicas [64–66].

A busca por novos agentes antimicobacterianos tornou-se urgente devido ao aumento da resistência aos antibióticos convencionais e à capacidade de micobactérias de crescimento rápido (RGM), como *Mycobacterium abscessus* e *Mycobacterium massiliense*, de formar biofilmes. Nesse contexto, a síntese de novas moléculas, incluindo derivados tiazólicos, surge como uma estratégia promissora. Entretanto, a eficácia de qualquer novo composto depende diretamente de seu perfil de segurança, tornando a avaliação de toxicidade uma etapa crítica.

Dados apresentados por Folquitto et al. (2025) [67] demonstram que os tiazóis sintetizados apresentaram alta seletividade para células micobacterianas em comparação com células mamíferas, conforme evidenciado por ensaios de citotoxicidade realizados com PBMCs e células Vero. Embora os resultados obtidos sejam promissores, é importante considerar algumas limitações do estudo. A variabilidade nas condições experimentais, como concentração dos compostos ou tempo de exposição, pode influenciar os resultados. Além disso, a validação *in vivo* é fundamental para confirmar a eficácia e a segurança dos derivados tiazólicos à base de eugenol, uma vez que as condições fisiológicas podem diferir significativamente dos modelos *in vitro* utilizados.

Em ensaios de permeabilidade baseados em células publicados por Wager et al. (2016) [S5], os autores demonstraram o impacto do alinhamento sistemático de atributos físico-químicos na seleção de novos candidatos a fármacos com propriedades de ADME favoráveis. As observações indicaram que um conjunto de fármacos ativos no sistema nervoso central (SNC), fármacos inativos no SNC e candidatos a fármacos situados em um espaço físico-químico definido por $\log P \leq 3$ e TPSA > 75 Å² apresentou alta permeabilidade em células MDCK (Papp MDCK > 10×10^{-6} cm/s), baixo efluxo passivo em células MDR1 mediado pela P-glicoproteína (P-gp) e baixo clearance intrínseco em microssomas hepáticos humanos (CLHLM ≤ 100 mL/min/kg), desde que também se encontrassem dentro da faixa de peso molecular MW ≤ 360 g/mol, requisito necessário para a difusão passiva através de membranas.

Essas características combinadas sustentam boa biodisponibilidade oral e estabilidade metabólica otimizada [S6,S7].

Em uma análise topológica do Potencial de Lipofilicidade Molecular (MLP) apresentada na Figura SF-1, é possível observar que os compostos substituídos por grupos alquila no anel

hidroxi-metoxibenzílico apresentam MW > 360 g/mol, como é o caso dos derivados LF12, LF15, LF16 e LF20. Esse achado indica que a presença dessa cadeia lateral resulta em uma maior extensão da área de superfície hidrofóbica (espectro verde a azul), levando, consequentemente, a valores calculados de lipofilicidade (ClogP) superiores a 6,00 (Tabela ST-2).

Por outro lado, os derivados LF13 e LF21 apresentaram menor extensão da superfície hidrofóbica devido à ausência da cadeia lateral alquila na porção hidroxi-metoxibenzílica. Neste contexto, é importante destacar que o efeito indutivo retirador de elétrons do substituinte cloro na subestrutura fenil-tiazol (espectro de cor vermelha) torna a superfície do derivado LF21 mais hidrofóbica (espectro azul) quando comparada ao derivado LF13, seu análogo estrutural com ClogP < 6,0 [S8].

No gráfico apresentado na Figura SF-2, é possível observar como o alinhamento entre ClogP e o aumento do peso molecular (MW) se correlaciona com os valores de Papp MDCK dos derivados. Verificou-se que os derivados LF13 e LF21 se situam dentro de um espaço físico-químico definido por compostos de menor massa molecular (MW < 360 g/mol) e menor lipofilicidade (ClogP < 6,0), resultando em escores de MPO em torno de 3,5 (Tabela ST-2).

Essas substâncias apresentaram valores estimados de Papp MDCK de $3{,}89 \times 10^{-7}$ cm/s e $4{,}95 \times 10^{-7}$ cm/s (Tabela ST-3), respectivamente, indicando que possuem o perfil mais favorável de permeabilidade celular passiva entre os análogos avaliados. Quando combinados com a baixa probabilidade de efluxo passivo mediado pela P-gp (Tabela ST-3), esses compostos são esperados apresentar absorção superior em comparação aos demais análogos (HIA > 72,6%).

Em contraste, a substituição p-OCH_3 na porção fenil-tiazol do derivado LF16 resultou em uma área de superfície polar topológica (TPSA) de 75,97 $Å^2$, o que, por sua vez, levou a uma redução de seu Papp em relação aos demais ligantes [S9].

Além disso, observou-se que a afinidade dessas substâncias por ambientes apolares aumenta sua distribuição nos tecidos biológicos. Esse comportamento é evidente para os ligantes LF12, LF16 e LF20, que apresentaram valores preditos de volume de distribuição em estado estacionário (VDss) superiores a 1,0 L/kg (Tabela ST-3), indicando que sua lipofilicidade elevada direciona a distribuição para compartimentos fisiológicos mais hidrofóbicos.

Nesse contexto, os derivados LF13 e LF21 se destacam, uma vez que seus menores valores de ClogP resultam em valores preditos de VDss em torno de 0,6 L/kg (Tabela ST-3), sugerindo uma distribuição mais uniforme entre o plasma sanguíneo e o tecido adiposo [S10].

O metabolismo de fase I no fígado humano pode levar a reações de desintoxicação de

fármacos que promovem a formação de compostos mais polares, facilitando sua excreção renal. No entanto, essas reações também podem resultar na formação de metabólitos secundários reativos. A predição de sítios metabólicos permite estimar os riscos toxicológicos associados ao metabolismo de fase I, com base em vias de biotransformação conhecidas catalisadas por isoenzimas do citocromo P450 (CYP450). Um exemplo clássico envolve a formação de epóxidos, gerados pela hidroxilação de centros insaturados, os quais constituem metabólitos eletrofílicos capazes de se ligar covalentemente a proteínas e ao DNA [S4,S11,S12].

Com base nos descritores preditos de estabilidade metabólica, observou-se que todos os ligantes apresentam probabilidade superior a 0,80 de serem substratos da isoforma CYP1A2 durante o metabolismo de fase I (Tabela ST-3), além de possuírem um sítio –OH suscetível à O-conjugação por UDP-glicuronosiltransferase (UGT) no metabolismo de fase II (Figura SF-3).

Para os derivados substituídos por grupos alquila na posição C4 do anel hidroxi-metoxibenzílico (LF12, LF16 e LF20), foi identificado um sítio de hidroxilação aromática na subestrutura tiazólica, independente do grupo substituinte R. Entretanto, a presença do átomo de cloro intensifica essa biotransformação por meio de seu efeito indutivo retirador de elétrons, favorecendo a formação de intermediários reativos do tipo epóxido. Por outro lado, esses ligantes também apresentam um sítio de conjugação com glutationa (GSH) na porção imina insaturada (Figura SF-3a), o que pode reduzir sua suscetibilidade à ligação covalente com proteínas.

Em contraste, a desalquilação em C4, que leva à formação dos análogos LF13 e LF21, aumentou a sensibilidade do grupo imina para a formação de conjugados com GSH (Figura SF-3b), promovendo a geração de metabólitos secundários por meio de mecanismos celulares de desintoxicação e reduzindo o risco de lesão hepática induzida por fármacos (DILI) decorrente da ligação covalente a proteínas e ao DNA [S13]. Essa observação é consistente com os valores preditos do descritor DILI, que indicam que essas substâncias apresentam baixo potencial hepatotóxico (Tabela ST-3).

É importante destacar que esses processos metabólicos não afetam significativamente o clearance dos compostos, os quais apresentaram valores preditos de CLHLM em torno de 40 mL/min/kg (Tabela ST-3).

Adicionalmente, observou-se que o derivado LF15 contém uma ligação dupla isolada em sua cadeia lateral alquila, resultando em um segundo sítio de epoxidação, o que pode levar a dano hepático por ativação metabólica, com probabilidade estimada de 54,69%. Esse resultado indica que o composto farmacologicamente ativo pode requerer controle cuidadoso

da dose oral diária administrada [S12].

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que, embora os derivados tiazólicos à base de eugenol não apresentem atividade antibacteriana intrínseca, eles são capazes de modular a resistência aos antibióticos ao potencializar a atividade de antibióticos e do brometo de etídio (EtBr) por meio da inibição de bombas de efluxo e da redução da expressão do gene *mepA* em *Staphylococcus aureus* K2068. Entre os compostos avaliados, LF13, LF14, LF16, LF20, LF21 e LF22 aumentaram significativamente a eficácia tanto do EtBr quanto da ciprofloxacina. Notavelmente, embora o LF12 tenha reduzido a MIC do EtBr, ele apresentou comportamento antagonista quando combinado com a ciprofloxacina, evidenciando a complexidade das interações entre compostos e antibióticos. A redução observada na MIC do EtBr é consistente com um mecanismo dependente da inibição da bomba de efluxo, sustentado pelo aumento do acúmulo intracelular de EtBr e por interações moleculares favoráveis com resíduos-chave de aminoácidos no sítio de ligação da MepA.

Além disso, compostos como LF13 e LF21 foram capazes de inibir a expressão do gene *mepA*, indicando que essa classe de compostos pode suprimir o efluxo de fármacos por meio de um mecanismo duplo, envolvendo tanto a inibição funcional quanto a regulação negativa transcricional da bomba de efluxo MepA. A partir das análises de ADME, foi possível correlacionar a lipofilicidade e o peso molecular com a permeabilidade celular e a estabilidade metabólica dos derivados, destacando o LF13 como um ligante particularmente promissor. Seu elevado valor de Papp em células MDCK sugere boa absorção oral, enquanto as modificações estruturais parecem favorecer uma maior estabilidade metabólica, reforçando seu potencial farmacológico.

De modo geral, esses achados ressaltam o potencial dos derivados de tiazol baseados em eugenol como agentes moduladores de resistência e sustentam a necessidade de investigações adicionais para elucidar a contribuição individual de cada composto. Apesar dos resultados promissores, a variabilidade nas condições experimentais e a ausência de dados *in vivo* enfatizam a necessidade de estudos complementares para confirmar a eficácia e a segurança desses compostos em modelos clinicamente relevantes.

REFERÊNCIAS

Althagafi I, El-Metwaly N, Farghaly TA. New Series of Thiazole Derivatives: Synthesis, Structural Elucidation, Antimicrobial Activity, Molecular Modeling and MOE Docking. Molecules. 2019 May 4;24(9):1741. doi: 10.3390/molecules24091741. PMID: 31060260; PMCID: PMC6539608.

Ashraf, S., D. Parrine, M. Bilal, U. Chaudhry, M. Lefsrud and X. Zhao. Proteomic Comparison of Ivermectin Sensitive and Resistant Staphylococcus aureus Clinical Isolates Reveals Key Efflux Pumps as Possible Resistance Determinants. Antibiotics 2022, 11, pp. 759.

Bambeke, F. V.; Pages, J. M.; Lee, V. J. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. Recent patents on anti-infective drug Discovery, 1, 157-75, 2006.

Banbeke, F. V.; Pages, J. M.; Lee, V. J. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. Recent patents on anti-infective drug Discovery, 1,157-175, 2006.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards of antimicrobial disk susceptibility test: Ninth Informational Supplement. NCCLS document M100-S9. NIH, 2008.

Cordeiro, R.; Kachroo, M. Synthesis and biological evaluation of anti-tubercular activity of Schiff bases of 2-Amino thiazoles. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, [s.l], v. 30, n. 24, p. 127655, 2020.

Cussolim, P.A., Junior, A.S., Melo, A.L., et al. MECHANISMS OF RESISTANCE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS TO ANTIBIOTICS. Revista faculdade do saber, v. 6, n. 12, p. 831-843, 2021.

D. E. V. Pires, L. M. Kaminskas, D. B. Ascher, *Prediction and optimization of pharmacokinetic and toxicity properties of the ligand*, in *Computational Drug Discovery and Design*, M. Gore, U. B. Jagtap, Eds., *Methods Mol. Biol.*, Springer, New York 2018, pp. 271–284. DOI: 10.1007/978-1-4939-7756-7_14. **(S10)**

da Costa RHS, Rocha JE, de Freitas TS, Pereira RLS, Junior FNP, de Oliveira MRC, Batista FLA, Coutinho HDM, de Menezes IRA. Evaluation of antibacterial activity and reversal of the NorA and MepA efflux pump of estragole against Staphylococcus aureus bacteria. Arch Microbiol. 2021 Aug;203(6):3551-3555. doi: 10.1007/s00203-021-02347-x. Epub 2021 May 3. PMID: 33942156.

Davies J, Wright GD. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. Trends Microbiol. 1997;5:234- 40

de Morais Oliveira-Tintino CD, Muniz DF, Dos Santos Barbosa CR, Silva Pereira RL, Begnini IM, Rebelo RA, da Silva LE, Mireski SL, Nasato MC, Lacowicz Krautler MI, Barros Oliveira CV, Pereira PS, Rodrigues Teixeira AM, Tintino SR, de Menezes IRA, Melo Coutinho HD, da Silva TG. NorA, Tet(K), MepA, and MsrA Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*, their Inhibitors and 1,8-Naphthyridine Sulfonamides. Curr Pharm Des. 2023;29(5):323-355. doi: 10.2174/1381612829666221212101501. PMID: 36515045.

Dos Santos, T. et al. Synthesis and Biological Evaluation of New Eugenol-Derived 1,2,3 Triazoles as Antimycobacterial Agents. Journal of Brazilian Chemical Society, Alfenas, v. 30, n. 7, p. 1425–1436, 2019.

E. V. Radchenko, A. S. Dyabina, V. A. Palyulin, N. S. Zefirov, *Prediction of human intestinal absorption of drug compounds*, *Russ. Chem. Bull.* 2016, *65*, 576–580. DOI: 10.1007/s11172-016-1340-0. **(S9)**

EBERHARDT, et al. AutoDock Vina 1.2. 0: New docking methods, expanded force field, and python bindings. Journal of chemical information and modeling, v. 61, n. 8, p. 3891-3898, 2021. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203

Eicher, T.; Speicher, A.; Hauptmann, S. The Chemistry of Heterocycles - Structure, Reactions, Syntheses, and Applications. 2a ed. [s.l.] WILEY-VCH, 2003.

Garzón, J.P., Martínez, S.R., Molina, L.M. Staphylococcus aureus: generalities, mechanisms of pathogenicity and cell colonization. Nova vol.17 no.32 Bogotá July/Dec. 2019

Gibbons S, Oluwatuyi M, Kaatz GW. Um novo inibidor de bombas de efluxo multidrogas em Staphylococcus aureus. J Antimicrob Quimioterápica. Janeiro de 2003; 51(1):13-7. DOI: 10.1093/jac/dkg044. PMID: 12493782.

González-González, J.N. et al. Prevalence of Bacterial Resistance from 2016 to 2018 at the General Hospital of Obregon, Sonora. Biotecnia vol.25 no.3 Hermosillo sep./dic. 2023 Epub 27-Mayo-2024. https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i3.2064

Griffin, S. G., Wyllie, S. G., Markham, J. L., & Leach, D. N. (1999). O papel da estrutura e propriedades moleculares de terpenóides na determinação de sua atividade antimicrobiana. *Revista de Aromas e Fragrâncias*, *14*(5), 322-332. doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199909/10)14:5<322::AID-FFJ837>3.0.CO; 2-4

Gürsoy, E. et al. Design and synthesis of novel Imidazo[2,1-b]thiazole derivatives as potent antiviral and antimycobacterial agents. Bioorganic Chemistry, [s.l], v. 95, n. December 2019, p. 103496, 2020.

Huang H, Wan P, Luo X, Lu Y, Li X, Xiong W, Zeng Z. Tigecycline Resistance-Associated Mutations in the MepA Efflux Pump in Staphylococcus aureus. Microbiol Spectr. 2023 Aug 17;11(4):e0063423. doi: 10.1128/spectrum.00634-23. Epub 2023 Jul 11. PMID: 37432114; PMCID: PMC10434020.

K. Yu, X. Geng, M. Chen, J. Zhang, B. Wang, K. Ilic, W. Tong, *High daily dose and being a substrate of cytochrome P450 enzymes are two important predictors of drug-induced liver injury*, *Drug Metab. Dispos.* 2014, *42*, 744–750. DOI: 10.1124/dmd.113.056267. **(S12)**

Kanj, S. S., *et al.* Clinical data from studies involving novel antibiotics to treat multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. Int J Antimicrob Agents, v. 60, n. 3, p. 106633, 2022.

Kashyap, S.J., Garg, V.K., Sharma, P.K. *et al.* Thiazoles: having diverse biological activities. *Med Chem Res* 21, 2123–2132 (2012). https://doi.org/10.1007/s00044-011-9685-2

M. Ahmed, C.M. Borsch, et al., J. Biol. Chem 268 (1993) 11086-11089.

M. Pettersson, X. Hou, M. Kuhn, T. T. Wager, G. W. Kauffman, P. R. Verhoest, *Quantitative assessment of the impact of fluorine substitution on P-glycoprotein (P-gp)-mediated efflux, permeability, lipophilicity, and metabolic stability*, *J. Med. Chem.* 2016, *59*, 5284–5296. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00027. **(S8)**

M. T. Kuentz, Y. Arnold, *Influence of molecular properties on oral bioavailability of lipophilic drugs – mapping of bulkiness and different measures of polarity*, *Pharm. Dev. Technol.* 2009, *14*, 312–320. DOI: 10.1080/10837450802626296. **(S7)**

M. Zheng, X. Luo, Q. Shen, Y. Wang, Y. Du, W. Zhu, H. Jiang, *Site of metabolism prediction for six biotransformations mediated by cytochromes P450*, *Bioinformatics* 2009, *25*, 1251–1258. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp140. (SUPLEMENTAR 4)

Machado, G. P., R. C. Silva, F. F. Guimarães, A. Salina and H. Langoni. Detection of Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae and Escherichia coli in Brazilian Mastitic Milk Goats by Multiplex-PCR. Pesquisa Veterinária Brasileira 2018, 38, pp. 1358-64.

Magalhães, L. S. et al. Glucosyl-1,2,3-triazoles derived from eugenol and analogues: Synthesis, anti-Candida activity, and molecular modeling studies in CYP-51. Chemical Biology and Drug Design, [s.l], v. 98, n. 5, p. 903–913, 2021.

Markham PN., Westhaus E, Klyachko K, Johnson ME, Neyfakh AA.1999.Multiple Novel Inhibitors of the NorA Multidrug Transporter of Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother43:.https://doi.org/10.1128/aac.43.10.2404

Muniz, D.F., dos Santos Barbosa, C.R., de Menezes, I.R.A., de Sousa, E.O., Pereira, R.L.S., Júnior, J.T.C., Pereira, P.S., de Matos, Y.M.L., da Costa, R.H.S., de Morais Oliveira-Tintino, C.D., Coutinho, H.D.M., Filho, J.M.B., Ribeiro de Sousa, G., Filho, J.R., Siqueira-Junior, J.P., Tintino, S.R., In vitro and in silico inhibitory effects of synthetic and natural eugenol derivatives against the NorA efflux pump in Staphylococcus aureus, Food Chemistry (2020), doi: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127776

N. Oberhauser, A. Nurisso, P.-A. Carrupt, *MLP Tools: a PyMOL plugin for using the molecular lipophilicity potential in computer-aided drug design*, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2014, *28*, 587–596. DOI: 10.1007/s10822-014-9744-0 **(S2)**

Oliveira, Raíssa C. et al. In silico and in vitro evaluation of efflux pumps inhibition of α, β-amyrin. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, v. 40, n. 23, p. 12785-12799, 2022. https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1976277

O'Neill, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations, v., n., p., 2016.

Piddock, L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clinical microbiology reviews, 19, 382–402, 2006.

Rodrigues Dos Santos Barbosa C, Macêdo NS, de Sousa Silveira Z, Rocha JE, Freitas TS, Muniz DF, Araújo IM, Datiane de Morais Oliveira-Tintino C, Marinho ES, Nunes da Rocha M, Marinho MM, Bezerra AH, Ribeiro de Sousa G, Barbosa-Filho JM, de Souza-Ferrari J, Melo Coutinho HD, Silva Dos Santos H, Bezerra da Cunha FA. Evaluation of the antibacterial and inhibitory activity of the MepA efflux pump of Staphylococcus aureus by riparins I, II, III, and IV. Arch Biochem Biophys. 2023 Oct 15;748:109782. doi: 10.1016/j.abb.2023.109782. Epub 2023 Oct 13. PMID: 37839789.

S.R. Tintino, C.D. Morais-Tintino, F.F. Campina, M.d.S. Costa, I.R.A. Menezes, Y.M.L.S. de Matos, J.T. Calixto-Júnior, P.S. Pereira, J.P. Siqueira-Junior, T.C. Leal-Balbino, H.D.M. Coutinho, V.Q. Balbino, Tannic acid affects the phenotype ofStaphylococcus aureusresistant to tetracycline and erythromycin by inhibition of efflux pumps, Bioorganic Chemistry (2017), doi:

http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.08.004

Schindler, Bryan D. et al. Mutagenesis and modeling to predict structural and functional characteristics of the *Staphylococcus aureus* MepA multidrug efflux pump. Journal of bacteriology, v. 195, n. 3, p. 523-533, 2013. https://doi.org/10.1128/jb.01679-12

Silva, S.G.M., Melo, B.A., dos Santos, M.T., et al. Resistance of Staphylococcus aureus and Escherichia coli to antibiotics. Research, Society and Development, v. 11, n. 2, e39611225693, 2022. DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25693

T. A. Halgren, *Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94*, *J. Comput. Chem.* 1996, *17*, 490–519. DOI: 10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P **(S1)**

T. B. Hughes, G. P. Miller, S. J. Swamidass, *Modeling epoxidation of drug-like molecules with a deep machine learning network*, *ACS Cent. Sci.* 2015, *1*, 168–180. DOI: 10.1021/acscentsci.5b00131. **(S11)**

T. B. Hughes, G. P. Miller, S. J. Swamidass, *Site of reactivity models predict molecular reactivity of diverse chemicals with glutathione*, *Chem. Res. Toxicol.* 2015, *28*, 797–809. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.5b00017. **(S13)**

T. T. Wager, X. Hou, P. R. Verhoest, A. Villalobos, *Central nervous system multiparameter optimization desirability: application in drug discovery*, *ACS Chem. Neurosci.* 2016, *7*, 767–775. DOI: 10.1021/acschemneuro.6b00029. **(S5)**

T. T. Wager, X. Hou, P. R. Verhoest, A. Villalobos, *Moving beyond rules: the development of a central nervous system multiparameter optimization (CNS MPO) approach to enable alignment of drug-like properties*, *ACS Chem. Neurosci.* 2010, *1*, 435–449. DOI: 10.1021/cn100008c. **(S3)**

T. W. Johnson, K. R. Dress, M. Edwards, *Using the Golden Triangle to optimize clearance and oral absorption*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, *19*, 5560–5564. DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.08.045. **(S6)**

T.E. Renau, R.C. Lemoine, Drug Fut 26 (2001) 1171-1178.

Tintino, S. R., P. Wilairatana, V. C. A. de Souza, J. M. A. da Silva, P. S. Pereira, C. D. de Morais Oliveira-Tintino, Y. M. L. S. de Matos, J. T. C. Júnior, V. de Queiroz Balbino and J. P. Siqueira-Junior. Inhibition of the norA Gene Expression and the NorA Efflux Pump by the Tannic Acid. Scientific reports 2023, 13, pp. 17394.

Vale, L.G.R., de Aguiar, A.P. Synthesis of 2- (n-morpholine-1-thiocarbonotiol) acetyl) -2-amino-4-methil- (thiazol-2-il) -5-ethyl carboxylate as a potential antimicrobial agente. Brazilian Journal of Development, v. 6, n. 2, p. 8346-8351, 2020. DOI:10.34117/bjdv6n2-225

Waterhouse, Andrew et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. Nucleic acids research, v. 46, n. W1, p. W296-W303, 2018. https://doi.org/10.1093/nar/gky427

WHO. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibioticsfor drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. **Geneva**, v., n., p. 87, 2017.

X.Z. Li, H. Nikaido, Drugs 64 (2004) 159-204.

Xavier, M.R. et al. Anti-inflammatory effect, antibiotic potentiating activity against multidrug-resistant strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, and evaluation of antibiotic resistance mechanisms by the ibuprofen derivative methyl 2-(-4-isobutylphenyl) propanoate. Microbial Pathogenesis, v. 170, p. 105697, 2022. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105697

5. ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA

A produção científica desenvolvida nesta tese insere-se no contexto da crescente crise global associada à resistência antimicrobiana, particularmente no que se refere à limitação de novas moléculas com atividade antibacteriana direta e à necessidade de estratégias alternativas capazes de restaurar a eficácia de antibióticos já existentes. Dessa forma, os resultados obtidos evidenciam, de forma consistente, que os derivados tiazólicos à base de eugenol investigados não atuam como agentes bactericidas ou bacteriostáticos clássicos, mas apresentam um perfil funcional distinto, caracterizado predominantemente como moduladores de resistência bacteriana.

De maneira geral, a ausência de atividade antibacteriana intrínseca observada para os compostos, embora possa inicialmente ser interpretada como uma limitação, revela-se, sob uma análise mais aprofundada, como um indicativo de seletividade funcional, direcionando a atuação dessas moléculas para alvos específicos relacionados aos mecanismos de resistência. Esse comportamento reforça uma mudança conceitual relevante na prospecção de novos fármacos, na qual compostos que não apresentam atividade direta podem, ainda assim, exercer papel estratégico ao atuarem como adjuvantes terapêuticos, potencializando antibióticos e revertendo fenótipos de resistência.

Nesse contexto, um dos padrões mais robustos identificados ao longo dos experimentos foi a capacidade dos derivados tiazólicos em modular a atividade de antibióticos, especialmente fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, reduzindo significativamente seus valores de concentração inibitória mínima. Esse efeito foi particularmente evidente em cepas de *Staphylococcus aureus*, sugerindo uma maior susceptibilidade de bactérias Gram-positivas à ação desses compostos. Em contraste, a ausência ou limitação desse efeito em *Pseudomonas aeruginosa* indica a influência de barreiras estruturais adicionais, como a presença de membrana externa rica em lipopolissacarídeos, bem como a atuação de sistemas de efluxo mais complexos, como os da família MSF e MATE, o que evidencia uma limitação importante quanto ao espectro de ação dos compostos avaliados.

A análise estrutural dos compostos avaliados permite ainda identificar uma tendência relevante de relação estrutura-atividade. De modo geral, os derivados que apresentaram maior eficácia na inibição de bombas de efluxo compartilham um mesmo esqueleto molecular central, característico dos derivados tiazólicos à base de eugenol, diferindo entre si principalmente por

pequenas modificações nos substituintes laterais (R1, R2 e R3) dos tipos OCH3 (Metoxi), H, Propil, Alil, Cl e NO3, representada na figura **X**. Essas variações estruturais, embora sutis, parecem influenciar diretamente a interação dos compostos com o alvo biológico, possivelmente modulando propriedades como lipofilicidade, orientação espacial e capacidade de interação com resíduos-chave da proteína.

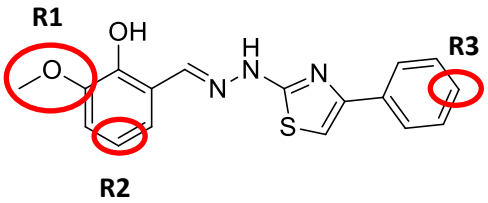


Figura X: Representação do esqueleto central das moléculas que tiveram melhor atividade com os pontos de modificações dos substituintes R1, R2 e R3.

Esse comportamento sugere que a manutenção do núcleo estrutural é essencial para a atividade biológica, enquanto modificações nos grupos substituintes podem atuar como determinantes finos da potência e eficácia dos compostos. No entanto, apesar dessa tendência observada, a ausência de uma análise quantitativa aprofundada limita a definição precisa de um padrão estrutural ideal, indicando a necessidade de estudos futuros mais direcionados à elucidação das relações estrutura-atividade.

A análise integrada dos ensaios funcionais demonstra que a inibição de bombas de efluxo constitui o principal mecanismo associado à atividade biológica observada. A redução da CIM do brometo de etídio, aliada ao aumento do acúmulo intracelular desse marcador fluorescente, fornece evidências consistentes da inibição funcional desses sistemas, especialmente da bomba MepA e NorA. Esse achado é particularmente relevante, considerando que as bombas de efluxo desempenham papel central na resistência a múltiplas drogas, atuando na extrusão ativa de antibióticos e reduzindo sua concentração intracelular.

Adicionalmente, a avaliação da expressão gênica do gene *mepA* revelou que determinados compostos, como LF13 e LF21, não apenas interferem na atividade funcional da bomba de efluxo, mas também promovem a regulação negativa de sua expressão. Esse resultado sugere um mecanismo de ação multifatorial, no qual os compostos atuam simultaneamente em níveis distintos — funcional e transcricional — ampliando seu potencial como moduladores de resistência.

Outro aspecto relevante diz respeito à capacidade dos compostos em promover alterações

na permeabilidade da membrana bacteriana, evidenciada pelos ensaios com Sytox Green. Embora esse efeito tenha sido observado, sua magnitude sugere que a alteração da permeabilidade atua como mecanismo complementar, potencializando a entrada de antibióticos, mas não sendo o principal responsável pela modulação da resistência. Essa observação reforça a hipótese de que a inibição de efluxo representa o mecanismo dominante.

Os dados obtidos por meio de docking molecular corroboram os achados experimentais, demonstrando que compostos como LF13 apresentam interações favoráveis com resíduos-chave da proteína MepA, sugerindo estabilidade no sítio de ligação e potencial capacidade de interferência na função da bomba. Essa convergência entre dados *in vitro* e *in silico* fortalece a plausibilidade biológica dos mecanismos propostos. Contudo, é importante reconhecer que modelos computacionais apresentam limitações inerentes, especialmente no que se refere à dinâmica conformacional da proteína em ambiente celular, o que requer validação adicional por técnicas experimentais mais robustas.

No que se refere à estratégia nanotecnológica empregada, a incorporação dos derivados tiazólicos em sistemas lipossomais demonstrou potencial em ampliar a eficácia biológica dos compostos, particularmente na potencialização da atividade de antibióticos. Esse achado sugere que a nanoencapsulação pode atuar como uma ferramenta importante para superar limitações relacionadas à biodisponibilidade, estabilidade e entrega intracelular dos compostos. Entretanto, a variabilidade nos resultados entre diferentes combinações indica que o efeito da nanoformulação não é universal, dependendo de fatores como composição lipossomal, interação com o fármaco e características da célula bacteriana.

Outro aspecto relevante a ser considerado refere-se à cinética de liberação dos compostos encapsulados em sistemas lipossomais. Diferentemente dos compostos em sua forma livre, cuja disponibilidade biológica é imediata, os sistemas lipossomais apresentam um perfil de liberação gradual, dependente de fatores como composição da bicamada lipídica, estabilidade da vesícula e interação com o meio biológico. Nesse sentido, a avaliação da atividade biológica dos compostos encapsulados utilizando o mesmo tempo de incubação adotado para os compostos livres, especialmente no intervalo de 24 horas, pode não refletir plenamente seu potencial farmacológico o que possivelmente pode ter levado a diminuição da atividade.

Considerando que o processo de distribuição e liberação do fármaco a partir do lipossoma ocorre de forma prolongada, é plausível inferir que períodos maiores de exposição poderiam resultar em uma intensificação dos efeitos observados, particularmente no que se refere à

modulação da resistência bacteriana. Dessa forma, os resultados obtidos para as formulações lipossomais devem ser interpretados com cautela, sendo necessária a realização de estudos cinéticos adicionais que considerem diferentes tempos de incubação, a fim de melhor caracterizar o perfil de liberação e sua correlação com a atividade biológica.

Do ponto de vista farmacocinético, as análises *in silico* de ADME indicaram que os compostos apresentam propriedades compatíveis com candidatos a fármacos, incluindo baixa toxicidade predita e perfil favorável para administração oral. No entanto, tais resultados devem ser interpretados com cautela, uma vez que não substituem estudos experimentais *in vivo*, os quais são fundamentais para a validação do perfil de segurança e eficácia.

Apesar dos avanços apresentados, algumas limitações devem ser consideradas. A ausência de avaliação em modelos *in vivo* restringe a extrapolação dos resultados para aplicações clínicas. Além disso, a variabilidade entre compostos e a ausência de um padrão estrutural claramente definido para atividade máxima indicam a necessidade de estudos adicionais de otimização estrutural. Outro ponto relevante refere-se à possível atuação dos compostos em outros alvos moleculares, como enzimas envolvidas na replicação do DNA, o que sugere a existência de mecanismos adicionais ainda não completamente elucidados.

Em síntese, a produção científica desta tese evidencia que os derivados tiazólicos à base de eugenol representam uma classe promissora de moduladores de resistência bacteriana, atuando predominantemente por meio da inibição de bombas de efluxo e, em menor extensão, pela alteração da permeabilidade da membrana e modulação da expressão gênica. Esses achados reforçam a relevância de abordagens que visam a restauração da eficácia de antibióticos existentes, em detrimento da busca exclusiva por novos agentes antimicrobianos, posicionando os compostos estudados como potenciais adjuvantes terapêuticos no enfrentamento da resistência antimicrobiana.

5.1 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos nesta tese demonstram, de forma consistente, que os derivados tiazólicos à base de eugenol não apresentam atividade antibacteriana direta frente às cepas de *Staphylococcus aureus* avaliadas, o que os posiciona fora da categoria clássica de agentes bactericidas ou bacteriostáticos. No entanto, essa ausência de atividade intrínseca não configura uma limitação funcional, mas sim indica um perfil farmacológico distinto, direcionado à

modulação de mecanismos de resistência bacteriana, especialmente aqueles relacionados aos sistemas de efluxo.

A avaliação da inibição da bomba de efluxo MepA, por meio da associação com brometo de etídio, evidenciou que os derivados LF12, LF13, LF14, LF16, LF20, LF21 e LF22 apresentam maior capacidade de redução da concentração inibitória mínima, indicando potencial atividade inibitória sobre sistemas de efluxo. Em contraste, compostos como LF10, LF25 e LF26 não demonstraram esse efeito, sugerindo ausência de interação relevante com esse mecanismo específico. Ainda nesse contexto, observou-se que determinados compostos, como LF14, LF16, LF20, LF21 e LF22, apresentaram atividade consistente tanto na presença de EtBr quanto em associação com antibióticos, enquanto outros, como LF12 e LF13, embora eficazes na modulação do EtBr, apresentaram comportamento antagonista quando combinados com antibióticos, evidenciando a complexidade das interações entre moduladores e agentes antimicrobianos.

Os ensaios de fluorescência reforçam essa interpretação, demonstrando que alguns derivados promovem aumento significativo do acúmulo intracelular de EtBr na cepa K2068, indicando inibição funcional da bomba de efluxo. Esse efeito é corroborado pelos dados de expressão gênica, nos quais compostos como LF13 e LF21 foram capazes de reduzir a expressão do gene *mepA* em mais de uma ordem de grandeza, sugerindo um mecanismo de ação duplo, envolvendo tanto a inibição funcional da bomba quanto sua regulação negativa em nível transcricional. Esse achado é particularmente relevante, pois indica uma atuação mais profunda e sustentada sobre o sistema de resistência bacteriana.

A análise computacional por docking molecular revelou que o composto LF13 apresenta maior afinidade pelo sítio de ligação da MepA, seguido por LF20 e LF22, sendo observadas interações do tipo ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals com resíduos-chave da proteína. As diferentes orientações conformacionais observadas sugerem que pequenas variações estruturais impactam diretamente a estabilidade do complexo ligante–proteína, reforçando a existência de uma relação estrutura–atividade. De forma geral, os compostos mais ativos compartilham um esqueleto molecular central comum, sendo as diferenças de atividade atribuídas a modificações nos substituintes laterais, o que indica que o núcleo tiazólico é essencial para o reconhecimento do alvo, enquanto os grupos R modulam a intensidade da resposta biológica.

No que se refere à estratégia de nanoencapsulação, os derivados tiazólicos incorporados em sistemas lipossomais também não apresentaram atividade antibacteriana direta. Entretanto, observou-se que esses sistemas foram capazes de potencializar a ação da gentamicina contra cepas multirresistentes de *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Por outro lado, a associação com norfloxacina resultou em efeito mais restrito, sendo observado apenas para o composto LF16 frente a *S. aureus*. Esses resultados indicam que o efeito da nanoformulação é dependente tanto do composto quanto do antibiótico associado, não sendo universal.

Um aspecto crítico a ser considerado refere-se ao tempo de avaliação biológica adotado. Considerando que os sistemas lipossomais apresentam liberação gradual dos compostos, a utilização de um período fixo de 24 horas, semelhante ao empregado para os compostos livres, pode não refletir adequadamente o potencial farmacológico dessas formulações. Assim, é plausível que tempos de exposição mais prolongados resultem em maior eficácia, o que indica uma limitação metodológica relevante e aponta para a necessidade de estudos cinéticos mais detalhados.

Adicionalmente, os resultados indicam que o composto LF26 se destaca por apresentar atividade consistente tanto na inibição de bombas de efluxo NorA e MepA quanto na modulação da atividade antibiótica, sugerindo um perfil de ação mais abrangente. Por outro lado, a observação de que a maioria dos compostos, quando associada a norfloxacina e ciprofloxacina, promove aumento da atividade antibacteriana — mesmo na ausência de forte evidência de inibição de efluxo — sugere a possível atuação sobre outros alvos moleculares, como DNA-girase e topoisomerases, indicando um mecanismo de ação adicional ainda não completamente elucidado.

Dessa forma, os resultados desta tese demonstram que os derivados tiazólicos à base de eugenol atuam predominantemente como moduladores de resistência bacteriana, com destaque para a inibição de bombas de efluxo e potencial interferência em múltiplos alvos celulares. No entanto, a variabilidade observada entre os compostos, a presença de efeitos antagonistas e as limitações metodológicas identificadas indicam que o avanço dessa classe de compostos dependerá de uma abordagem mais integrada, envolvendo otimização estrutural, validação mecanística e expansão para modelos biológicos mais complexos.

5.2 PESPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos nesta tese estabelecem uma base sólida para o avanço do

desenvolvimento de moduladores de resistência bacteriana, porém evidenciam, de forma clara, que a transição desses compostos para aplicações terapêuticas exige uma abordagem mais aprofundada e sistemática.

Um dos principais eixos de avanço consiste na realização de estudos in vivo, indispensáveis para validar a eficácia observada in vitro. A utilização de modelos experimentais de infecção bacteriana permitirá avaliar não apenas a atividade terapêutica dos compostos, mas também seu perfil toxicológico, biodistribuição e comportamento farmacocinético. Nesse contexto, compostos como LF13, LF22 e LF26 devem ser priorizados, considerando seu desempenho nos ensaios realizados.

Paralelamente, torna-se essencial a validação dos mecanismos de ação em nível proteico. A utilização de técnicas como Western blot e ensaios bioquímicos permitirá confirmar a modulação da expressão e atividade das bombas de efluxo MepA e NorA, superando as limitações das análises exclusivamente transcricionais. Além disso, a investigação de alvos adicionais, como DNA-girase e topoisomerases, será fundamental para elucidar se esses compostos atuam de forma multifatorial, o que pode ampliar significativamente seu potencial terapêutico.

Outro ponto crítico envolve o aprofundamento dos estudos de relação estrutura–atividade. A síntese de novos derivados com modificações sistemáticas nos grupos substituintes permitirá identificar padrões estruturais associados à maior eficácia e reduzir a ocorrência de efeitos antagonistas. A integração desses estudos com ferramentas de modelagem molecular avançada e dinâmica molecular pode acelerar o processo de otimização racional desses compostos.

Nesse contexto, destaca-se como eixo estratégico o uso aprofundado de abordagens de bioinformática e modelagem molecular. A realização de simulações de dinâmica molecular permitirá avaliar a estabilidade dos complexos ligante–proteína ao longo do tempo, fornecendo uma visão mais realista do comportamento dos compostos no sítio ativo da MepA e NorA. Adicionalmente, a aplicação de métodos de cálculo de energia livre, como MM-PBSA ou MM-GBSA, possibilitará estimativas mais robustas da afinidade de ligação entre os derivados e seus alvos moleculares. A incorporação de estratégias como triagem virtual (virtual screening), desenho racional de fármacos e predição avançada de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas permitirá a construção de um pipeline integrado de descoberta e otimização de compostos, reduzindo custos experimentais e aumentando a eficiência na identificação de candidatos

promissores.

No campo nanotecnológico, há necessidade de desenvolvimento de sistemas de liberação mais eficientes, que considerem não apenas a encapsulação, mas também o controle da cinética de liberação e o direcionamento específico para sítios de infecção. Estratégias como nanopartículas funcionalizadas e sistemas de liberação responsivos ao microambiente infeccioso podem representar um avanço significativo em relação aos lipossomas convencionais.

Por fim, a exploração de estratégias combinatórias mais complexas, envolvendo múltiplos antibióticos ou associação com diferentes moduladores de resistência, representa uma abordagem promissora para enfrentar a multirresistência bacteriana. Nesse sentido, a compreensão detalhada das interações entre compostos e antibióticos será fundamental para evitar efeitos antagonistas e maximizar sinergismos terapêuticos.

6 REFERÊNCIAS

ABUSHAHEEN, M. A., *et al.* Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, v. 66, n. 6, p. 100971, 2020.

AHMAD-MANSOUR, N., *et al. Staphylococcus aureus* toxins: An update on their pathogenic properties and potential treatments. **Toxins**, v. 13, n. 10, p. 677, 2021.

AHMED, M. et al. A. A protein that activates expression of a multidrug efflux transporter upon binding the transporter substrates. **Journal of Biological Chemistry**, 269, 28506–28513, 1994.

ALCOCK, B. P. *et al*. CARD 2020: Antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. **Nucleic Acids Research,** v. 48, n. D1, p. D517-D525, 2020.

ALGAMMAL, A. M., *et al.* Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): one health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. **Infect Drug Resist**, v., n., p. 3255-3265, 2020.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 36-48, 2013.

ALMATAR, M., *et al.* Efflux pump inhibitors: new updates. **Pharmacol Rep**, v. 73, n., p. 1-16, 2021.

ALTINÖZ, E.; Altuner, E. M. Antibiotic resistance and efflux pumps. **Int J Inf Res Rev**, v. 3, n. 2, p. 1-9, 2019.

ALVES, C. S. *et al*. *Escherichia coli* cell surface perturbation and disruption induced by antimicrobial peptides BP100 and pepR. **Journal of Biological Chemistry**,v. 285, n. 36, p. 27536–27544, set. 2010. DOI: 10.1074/jbc.M110.130955.

AMINOV, R. I.; MACKIE, R. I. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 271, n. 2, p. 147-161, 2007.

ANDRADE, F. A. Atividade de compostos naturais e sintéticos na presença de espécies de Cândida. 61 p. **Tese (Mestrado em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro), Universidade Federal de Goiás**. 2017.

ANDRONESCU, E; GRUMEZESCU, A. M (Ed.). **Nanostructures for drug delivery**. Elsevier, 2017.

ANTUNES-FILHO, S; BACKX, B. P. Nanotecnologia e seus impactos na sociedade. **Revista Tecnologia e Sociedade**, v. 16, n. 40, p. 1-15, 2020.

ARAÚJO, L. L. C; AZEVEDO, F. H. C. Estudo da enzima beta-lactamase e sua relação com a resistência aos antibióticos. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e663974594-e663974594, 2020.

ARAÚJO, N. J. S., *et al.* Evaluation of the antibacterial activity of hecogenin acetate and its inhibitory potential of NorA and MepA efflux pumps from *Staphylococcus aureus*. **Microb Pathog**, v. 174, n.,p. 105925, 2023.

ARSÈNE, M. M. J., *et al.* The public health issue of antibiotic residues in food and feed: Causes, consequences, and potential solutions. **Vet World**, v. 15, n. 3, p. 662, 2022.

ATALLAH, P., *et al.* ADMET: the future revealed. **Macromolecules**, v. 46, n. 12, p. 4735-4741, 2013.

ATMARAM, U. A.; Roopan, S. M. Biological activity of oxadiazole and thiadiazole derivatives. **ApplMicrobiol Biotechnol**, v. 106, n. 9-10, p. 3489-3505, 2022.

AUDA, I. G., *et al.* Efflux pumps of Gram-negative bacteria in brief. **Gene Rep**, v. 20, n., p. 100666,2020.

AURILIO, C., *et al.* Mechanisms of action of carbapenem resistance. **Antibiotics**, v. 11, n. 3, p. 421,2022.

AYOUB, M.C. Polymyxins and bacterial membranes: a review of antibacterial activity and mechanisms of resistance. **Membranes**, v. 10, n. 8, p. 181, 2020.

BAI, A. D., *et al. Staphylococcus aureus* bacteraemia mortality: a systematic review and meta-analysis. **Clin Microbiol Infect**, v. 28, n. 8, p. 1076-1084, 2022.

BANGHAM, A. D. *et al*. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 238-252, 1965.

BARBEE, L. H. *et al*. In vitro synergy testing of novel antimicrobial combination therapies against Neisseria gonorrhoeae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 69, 1572–1578, 2014.

BARBOSA, M. U. *et al*. Resistência bacteriana aos antibióticos e suas implicações no manejo clínico de infecções comunitárias. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 6, n. 10, p. 1256-1263, 2024.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

BATISTA, C. M; CARVALHO, C. M. B; MAGALHAES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Rev. Bras. Cienc. Farm**, v. 43, n. 2, p. 167-179, June 2007.

BHARADWAJ, A., *et al.* Multidrug-Resistant Bacteria: Their mechanism of action and prophylaxis. **BioMed Res Int**, v. 2022, n., p., 2022.

BHASKAR, B. V. *et al*. Homology modeling, molecular dynamics, and virtual screening of NorA efflux pump inhibitors of *Staphylococcus aureus*. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 3237, 2016.

BLAIR, J. M., *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, n. 1, p.42-51, 2015.

BLAIR, J. M.; Piddock, L. J. How to measure export via bacterial multidrug resistance efflux pumps. **MBio**, v. 7, n. 4, p. 10.1128/mbio. 00840-00816, 2016.

BLAKE, K. L; O'NEILL, A. J. Transposon library screening for identification of genetic loci participating in intrinsic susceptibility and acquired resistance to antistaphylococcal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 68, 12–16, 2013.

BONGIOVANNI, M., *et al.* Impact of the COVID-19 pandemic on multidrug-resistant hospital-acquiredbacterial infections. **J Hosp Infect**, v. 123, n., p. 191, 2022.

BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 975-999, 2015.

BUDAI, M.; SZOGYI, M. Liposomes as drug carrier systems. Preparation, classification and therapeutic advantages of liposomes. **Acta Pharmaceutica Hungarica**, v. 71, n. 1, p. 114 118, 2001.

BUSH, K; BRADFORD, P. A. Interplay between β-lactamases and new β-lactamase inhibitors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 5, p. 295-306, 2019.

CHANG, H-I.; YEH, M-K. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy**. International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 49, 2012.

CHANG, R. Y. K., *et al.* Novel antimicrobial agents for combating antibiotic-resistant bacteria. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 187, n., p. 114378, 2022.

CHAWLA, M., *et al.* Antibiotic potentiators against multidrug-resistant bacteria: Discovery, development, and clinical relevance. **Front Microbiol**, v. 13, n., p. 887251, 2022.

CHEUNG, G. Y., *et al.* Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547-569, 2021.

CHEVALIER, S. *et al*. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 5, p. 698–722, set. 2017. DOI: 10.1093/femsre/fux020.

CHRISTAKI, E., *et al.* Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. **J Mol Evol**, v. 88, n., p. 26-40, 2020.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 32, n., p. M100, 2015.

COMPAGNE, N., *et al.* Update on the discovery of efflux pump inhibitors against critical priority gram-negative bacteria. **Antibiotics**, v. 12, n. 1, p. 180, 2023.

CONG, Y., *et al.* Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. **J Adv Res**, v. 21, n., p. 169-176, 2020.

CORMODE, D. P.; NAHA, P. C.; FAYAD, Z. A. Nanoparticle contrast agents for computed

tomography: a focus on micelles. **Contrast Media & Molecular Imaging**, v. 9, n. 1, p. 37-52, 2014.

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

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

COX, G.; WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6-7, p. 287-292, 2013.

COYNE, A. J. K., *et al.* Therapeutic strategies for emerging multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect Dis Ther**, v. 11, n. 2, p. 661-682, 2022.

COZZARELLI, N. R. DNA Gyrase and the supercoiling of DNA. **Science**, v. 207, n. 4434, p. 953-960, 1980.

DA SILVA, D. P., *et al.* A importância da higienização correta das mãos, no intuito de evitar infecçõespor bactérias. **Anais da mostra de iniciação científica do cesuca-ISSN 2317-5915**, v., n. 15, p., 2021.

DANTAS, G.; SOMMER, M. O. A. Context matters - the complex interplay between resistome genotypes and resistance phenotypes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 577-582, 2012.

DARAEE, H. *et al*. Application of liposomes in medicine and drug delivery. **Artificial Cells**, *Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 44, n. 1, p. 381-391, 2016.

DAVIDSON, R. N. *et al*. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 87, n. 2, p. 75-81, 1994.

DE ARAÚJO LOPES, Sávia Caldeira et al. Liposomes as carriers of anticancer drugs. **Cancer treatment conventional and innovative approaches**, 2013.

DE ARAÚJO, A. C. J., *et al.* Potentiating-antibiotic activity and absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity properties (ADMET) analysis of synthetic thiadiazines against multi-drug resistant (MDR) strains. **Fundam Clin Pharmacol**, v., n., p., 2023.

DE GAETANO, G. V., *et al.* Antimicrobial Resistance: Two-Component Regulatory Systems and Multidrug Efflux Pumps. **Antibiotics**, v. 12, n. 6, p. 965, 2023.

DE LUCENA, B. J. D., *et al.* Resistência bacteriana associada as feridas crônicas em pacientes adultos. **Res, Soc Dev**, v. 12, n. 5, p. e22012541688-e22012541688, 2023.

DE SOUSA SILVEIRA, Z. *et al*. Effect of lauric acid on efflux pump inhibition in *Staphylococcus aureus* K2068: regulation of the *mepA* gene and membrane permeability alterations. *Microbial*

Pathogenesis, v. 209, p. 108057, dez. 2025. DOI: 10.1016/j.micpath.2025.108057.

DE SOUSA, T.A.G. *et al*. Nanotecnologia na medicina: potenciais avanços no diagnóstico e tratamento do câncer. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 7, n. 10, p. e75309-e75309, 2024.

DIGGLE, S. P.; Whiteley, M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. **Microbiology**, v. 166, n. 1, p. 30, 2020.

DOS SANTOS VAZ, Suzana *et al*. Enterobactérias produtoras de β-lactamases de espectro estendido (ESBL) associadas à colonização de neonatos. **Revista Contemporânea**, v. 4, n. 12, p. e7135-e7135, 2024.

DU, D. *et al*. Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. **Nature**, v. 509, n. 7501, p. 512-515, 2014.

EBBENSGAARD, A. E., *et al.* The role of efflux pumps in the transition from low-level to clinical antibiotic resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 12, p. 855, 2020.

EICHENBERGER, E. M.; Thaden, J. T. Epidemiology and mechanisms of resistance of extensively drugresistant Gram-negative bacteria. **Antibiotics**, v. 8, n. 2, p. 37, 2019.

EL BIALY, S. A., *et al.* 2, 3-Bis (5-alkyl-2-thiono-1, 3, 5-thiadiazin-3-yl) propionic Acid: one-pot domino synthesis and antimicrobial activity. **Arch Pharm**, v. 338, n. 1, p. 38-43, 2005.

EPAND, R. M.; EPAND, R. F. Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents. **Journal of Peptide Science**, v. 17, n. 5, p. 298–305, maio 2011. DOI: 10.1002/psc.1319.

EVREN, A. E.; YURTTAŞ, L.; GENÇER, H. K. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, e19248, 2022.

FACCONE, Diego *et al*. Emergence of hyper-epidemic clones of Enterobacterales clinical isolates co-producing KPC and Metallo-Beta-lactamases during the COVID-19 pandemic. **Pathogens**, v. 12, n. 3, p. 479, 2023.

FAJARDO, A. *et al.* The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, p. e1619, 2008.

FARIAS, D.V. *et al.* Investigação da resistência aos betalactâmicos e da produção de betalactamase de espectro estendido (ESBL) em isolados de *Escherichia coli* uropatogênicas ciprofloxacina-resistente. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v. 4, n. 1, p. 13-26, 2022.

FERMON, L. *et al*. Membrane selectivity and pore formation of SprA1 and SprA2 hemolytic peptides from *Staphylococcus aureus* type I toxin-antitoxin systems. ***FEBS Journal***, v. 292, n. 17, p. 4555–4579, set. 2025. DOI: 10.1111/febs.70001.

FERNANDES, L.F. *et al*. Recent advances in the therapeutic and diagnostic use of liposomes and carbon nanomaterials in ischemic stroke. **Frontiers in neuroscience**, v. 12, p. 453, 2018.

FERNANDES, R.G; OLIVEIRA, L.P.S. Entre riscos e desinformação: A utilização da nanotecnologia na indústria de alimentos. **Revista Jurídica da FA7**, v. 16, n. 2, p. 63-81, 2019.

FERREIRA, E. I.; BARREIRO, E. J.; GIAROLLA, J.; PARISE FILHO, R. **Fundamentos de Química Farmacêutica Medicinal**. 1. ed. Santana de Parnaíba: Manole, 2022.

FIALKOSKI, D; MALFATTI, C.R.M. Nanotecnologia: uma prospecção tecnológica no âmbito nacional e internacional. **Cadernos de Prospecção**, v. 12, n. 3, p. 590-590, 2019.

FIX, S.M.; BORDEN, M.A.; DAYTON, P.A. Therapeutic gas delivery via microbubbles and liposomes. **Journal of Controlled Release**, v. 209, p. 139-149, 2015.

FLORES, T. V.; Vargas, A. K. Morfología bacteriana. **Rev Act Clínic**, v. 49, n. 2, p. 2594-2598, 2015.

FOSTER, T. J. *Staphylococcus aureus*. **Mol Med Microbiol**, v., n., p. 839-888, 2002.

FOURNIER, B.; ARAS, R.; HOOPER, D. C. Expression of the multidrug resistance transporter NorA from *Staphylococcus aureus* is modified by a two-component regulatory system. **Journal of Bacteriology**, 182, 664–671, 2000.

FREIRES, M. S.; Junior, O. M. R. Resistência bacteriana pelo uso indiscriminado da azitromicina frente a Covid-19: uma revisão integrativa. **Res, Soc Dev**, v. 11, n. 1, p. e31611125035-e31611125035, 2022.

FREITAS, P. R., *et al.* ADMET Analysis, Antibacterial and Modified Antibiotic Activities of Thiadiazine Derivatives. **Journal of Biological Regulations and Homeostasis Agents**, v. 38, n. 1, p. 13, 2024.

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

FRÉZARD, F. Liposomes: From biophysics to the design of peptide vaccines. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 2, p. 181-189, 1999.

FRÉZARD, F. *et al*. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

FRI, J., *et al.* Antibiotic resistance and virulence gene characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from healthy edible marine fish. **Int J Dent**, v. 2020, n., p.,2020.

GALPER, M.W. *et al*. Effect of computed tomography scanning parameters on gold nanoparticle and iodine contrast. **Investigative Radiology**, v. 47, n. 8, p. 475, 2012.

GAMBAZZA, S., *et al.* Adherence to inhaled antibiotics in people with cystic fibrosis: insights from a virtual patient advisory board. **Expert Rev Respir Med** v., n., p. 1-3, 2023.

GARCIA, Í. R., *et al.* Microbial resistance: The role of efflux pump superfamilies and their

respective substrates. **Life Sci**, v. 295, n., p. 120391, 2022.

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

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

GE, H., *et al.* Research on the drug resistance mechanism of foodborne pathogens. **Microb Pathog**, v. 162, n., p. 105306, 2022.

GHOSH, J. *et al.* Modeling admet. **In Silico Methods for Predicting Drug Toxicity**, v., n., p. 63-83, 2016.

GHOSH, R. *et al*. Liposome-Based Antibacterial Delivery: An Emergent approach to Combat Bacterial infections. **ACS Omega**, 2023;8 (39):354442-35451. doi: 10.1021/acsomega.3c04893.

GLEN, K.A.; LAMONT, I.L. β-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Current status, future prospects. **Pathogens**, v. 10, n. 12, p. 1638, 2021.

GREEN, A. T., *et al.* Discovery of multidrug efflux pump inhibitors with a novel chemical scaffold. **Biochim Biophys Acta Gen Subj**, v. 1864, n. 6, p. 129546, 2020.

GREENE, N. P., *et al.* Antibiotic resistance mediated by the MacB ABC transporter family: a structuraland functional perspective. **Front Microbiol**, v. 9, n., p. 950, 2018.

GUERRA, A., *et al.* Novel Imidazo [4, 5-c][1, 2, 6] thiadiazine 2, 2-dioxides as antiproliferative *Trypanosoma cruzi* drugs: Computational screening from neural network, synthesis and in vivo biological properties. **Eur J Med Chem**, v. 136, n., p. 223-234, 2017.

GUO, Y., *et al.* Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. **Front CellInfect Microbiol**, v. 10, n., p. 107, 2020.

HAAG, A. F., *et al. Staphylococcus aureus* in Animals. **Microbiol Spectr**, v. 7, n. 3, p. 10.1128/microbiolspec. gpp1123-0060-2019, 2019.

HALDER, S. *et al*. Alteration of zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. **SpringerPlus**, v. 4, p. 672, nov. 2015. DOI: 10.1186/s40064-015-1476-7.

HAMPTON, T. Report reveals scope of US antibiotic resistance threat. **JAMA**, 310, 1661 1663, 2013.

HARASHIMA, H. *et al*. Size-dependent liposome degradation in blood: In vivo evidence for vesicle stabilization**.** ***Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes***, v. 1190, n. 1, p. 99-104, 1994.

HASAN, T.H.; Al-HARMOOSH, R.A. Mechanisms of antibiotics resistance in bacteria. **Sys Rev Pharm**,v. 11, n. 6, p. 817-823, 2020.

HE, G.X. *et al*. An H+-Coupled Multidrug Efflux Pump, PmpM, a Member of the MATE Family

of Transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 1, p. 262-265, 2004.

HELANDER, I. M. *et al*. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590–3595, 1998. DOI: 10.1021/jf980154m.

HOOPER, D. C. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 2, n. 1, p. 38-55, 1999.

HSIEH, P. C. *et al.* Bacteria lacking a multidrug pump: a sensitive tool for drug discovery. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 95, 6602–6606, 1998.

HUANG, H., *et al.* Tigecycline Resistance-Associated Mutations in the MepA Efflux Pump in *Staphylococcus aureus*. **Microbiol Spectr**, v. 11, n. 4, p. e00634-00623, 2023.

HUANG, L., *et al.* Bacterial multidrug efflux pumps at the frontline of antimicrobial resistance: An overview. **Antibiotics**, v. 11, n. 4, p. 520, 2022.

IMMORDINO, M. L. *et al*. Stealth liposomes: Review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 3, p. 297-315, 2006.

JAMROZIK, E.; HERIOT, G. S. Ethics and antibiotic resistance. **Br Med Bull**, v. 141, n. 1, p. 4, 2022.

JEON, K., *et al.* Impact of COVID-19 on antimicrobial consumption and spread of multidrug-resistance in bacterial infections. **Antibiotics**, v. 11, n. 4, p. 535, 2022.

JORGENSEN, B. Gas-phase oxidation of aqueous ethanol by nanoparticle vanadia/anatase catalyst**s**. **Topics in Catalysis**, v. 52, n. 3, p. 253-257, 2009.

JUBAIR, N., *et al.* Review on the antibacterial mechanism of plant-derived compounds against multidrug-resistant bacteria (MDR). **J Evid Based Complementary Altern Med**, v. 2021, n., p., 2021.

JURADO-MARTÍN, I., *et al. Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenalof virulence factors. **Int J Mol Sci**, v. 22, n. 6, p. 3128, 2021.

KAATZ, G. W.; MCALEESE, F.; SEO, S. M. Multidrug resistance in Staphylococcus aureus due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1857-1864, 2005.

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

KAATZ, G. W.; SEO, S. M.; RUBLE, C. A. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 1086 1094, 1993.

KALASHNIKOV, S. B.; VINOGRADOV, A. S.; BAGRYANSKAYA, I. Y.; MEZHENKOVA, T. V. **Mendeleev Communications**, v. 34, p. 277, 2024.

KANJ, S. S., *et al.* Clinical data from studies involving novel antibiotics to treat multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **Int J Antimicrob Agents**, v. 60, n. 3, p. 106633, 2022.

KAPOOR, G., *et al.* Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **J Anaesthesiol Clin Pharmacol**, v. 33, n. 3, p. 300, 2017.

KHALIL, I. A. *et al*. Cationic liposomes as non-viral vectors for gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 270, p. 1-10, 2018.

KIM, W. *et al*. NH125 kills methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* persisters by lipid bilayer disruption. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 257–269, 2016. DOI: 10.4155/fmc.15.189.

KOCHINSKI, T., *et al.* Análise microbiológica de bactérias patogênicas em areias de praças públicas nomunicípio de União da Vitória-Paraná. **LUMINÁRIA**, v. 22, n. 01, p., 2020.

KORNELSEN, V.; KUMAR, A. Update on multidrug resistance efflux pumps in *Acinetobacter spp*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 65, n. 7, p. 10.1128/aac. 00514-00521, 2021.

KOWALSKA-KROCHMAL, B.; DUDEK-WICHER, R. The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 165, 2021.

KUMAR, S., *et al.* Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily. **Int J Bacteriol**, v. 2013, n., p., 2013.

KURODA, T.; TSUCHIYA, T. Multidrug efflux transporters in the MATE family, Biochimica et Biophysica Acta - **Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 5, p. 763-768, 2009.

KYLE, S.; SAHA, S. **Nanotechnology for the detection and therapy of stroke**. **Advanced Healthcare Materials**, v. 3, n. 11, p. 1703-1720, 2014.

LAMICHHANE, N. *et al*. Liposomes: clinical applications and potential for image guided drug delivery. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 288, 2018.

LANGENDONK, R. F., *et al.* The building blocks of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*:implications for current resistance-breaking therapies. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 11, n., p. 665759, 2021.

LANGFORD, B. J., *et al.* Antimicrobial resistance in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Microbe**, v., n., p., 2023.

LÁZÁR, V., *et al.* Antibiotic combinations reduce *Staphylococcus aureus* clearance. **Nature**, v. 610, n.7932, p. 540-546, 2022.

LEE, A. S., *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nat Rev Dis Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-23, 2018.

LI, J.-Q., *et al.* Diaryl-substituted thiosemicarbazone: A potent scaffold for the development of NewDelhi metallo-β-lactamase-1 inhibitors. **Bioorg Chem**, v. 107, n., p. 104576, 2021.

LI, X. *et al*. Nano carriers for drug transport across the blood–brain barrier. **Journal of drug targeting**, v. 25, n. 1, p. 17-28, 2017.

LIAO, C., *et al.* Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and antivirulence strategies to combatits drug resistance. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 12, n., p. 926758, 2022.

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

LIU, A. *et al*. Antibiotic sensitivity profiles determined with an Escherichia coli gene knockout collection: generating an antibiotic bar code. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 54, 1393–1403, 2010.

LIU, C-J. *et al*. Enhancement of cell radiation sensitivity by pegylated gold nanoparticles. **Physics in Medicine & Biology**, v. 55, n. 4, p. 931, 2010.

LORUSSO, A. B., *et al.* Role of efflux pumps on antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 24, p. 15779, 2022.

LUNDBAEK, J. A. *et al*. Lipid bilayer regulation of membrane protein function: gramicidin channels as molecular force probes. **Journal of the Royal Society Interface**, London, v. 7, n. 44, p. 373–395, mar. 2010. DOI: 10.1098/rsif.2009.0443.

MANCUSO, G., *et al.* Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens. **Pathogens**, v. 10, n.10, p. 1310, 2021.

MARCONE, G.P.S. Nanotecnologia e nanociência: aspectos gerais, aplicações e perspectivas no contexto do brasil. **Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia-ISSN: 1984-5693**, v. 7, n. 2, p. 1-1, 2015.

MARCYJANIAK, M. *et al*. Peptidoglycan amidase MepA is a LAS metallopeptidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 42, p. 43982-43989, 2004.

MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 718-733, 2011.

MARTIN, A. L. A., *et al.* In vitro and in silico evidences about the inhibition of MepA efflux pump bycoumarin derivatives. **Microb Pathog**, v. 182, n., p. 106246, 2023.

MARTÍNEZ, J. L. Ecology and Evolution of Chromosomal Gene Transfer between Environmental Microorganisms and Pathogens. **Microbiology Spectrum**, p. 139-160, 2018.

MASSERINI, M. **Nanoparticles for brain drug delivery**. *ISRN Biochemistry*, v. 2013, p. 1-18, 2013.

MCALEESE, F. *et al*. A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility

of laboratory-derived Staphylococcus aureus mutants to tigecycline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1865-1871, 2005.

McMURRY, L., *et al.* Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci** v. 77, n. 7, p. 3974-3977, 1980.

MELLO, E. O., *et al.* Antifungal activity of Pv D1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells. **Current microbiology**, v. 62, n., p. 1209-1217, 2011.

MIKLASIŃSKA-MAJDANIK, M. Mechanisms of resistance to macrolide antibiotics among *Staphylococcusaureus*. **Antibiotics**, v. 10, n. 11, p. 1406, 2021.

MILLA, P; DOSIO, F; CATTEL, L. PEGylation of proteins and liposomes: a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery. **Current drug metabolism**, v. 13, n. 1, p. 105-119, 2012.

MISHRA, A., *et al.* Synthesis, characterization, antibacterial and cytotoxic study of platinum (IV) complexes. **Bioorganic Med Chem**, v. 14, n. 18, p. 6333-6340, 2006.

MORITA, Y. *et al*. NorM of Vibrio parahaemolyticus is an Na+-driven multidrug efflux pump. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 23, p. 6694-6697, 2000.

MURRAY, P. R., *et al.* **Medical Microbiology: Medical Microbiology E-Book**. 9ª ed.: Elsevier HealthSciences, 2020. 872 p.

MUTUA, J. M., *et al.* Multidrug resistant bacterial infections in severely ill COVID-19 patients admittedin a national referral and teaching hospital, Kenya. **BMC Infect Dis**, v. 22, n. 1, p. 1-12, 2022.

NANDHINI, P., *et al.* Recent developments in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) treatment: A review. **Antibiotics**, v. 11, n. 5, p. 606, 2022.

NASCIMENTO, I. d. S. Síntese, avaliação biológica e estudos in silico de novos compostos Tiazólicose Tiadiazínico com potencial frente ao *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*. 2022. 182 p. **Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia), Universidade Federal de Alagoas**. 2022.

NAZZARO, F. *et al*. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 6, n. 12, p. 1451–1474, nov. 2013. DOI: 10.3390/ph6121451.

NEUBERGER, A., *et al.* Structure and mechanism of bacterial tripartite efflux pumps. **Res Microbiol**, v.169, n. 7-8, p. 401-413, 2018.

NEVES, P. R., *et al. Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **J Bras Patol Med Lab**, v. 47, n., p. 409-420, 2011.

NEYFAKH, A. A. The multidrug efflux transporter of Bacillus subtilis is a structural and functional homolog of the Staphylococcus NorA protein. **Antimicrobial agents and**

chemotherapy, 36,484–485, 1992.

NEYFAKH, A. A.; BORSCH, C. M.; KAATZ, G. W. Fluoroquinolone resistance protein NorA of Staphylococcus aureus is a multidrug efflux transporter. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 1, p. 128-129, 1993.

NG, E. Y. W.; TRUCKSIS, M.; HOOPER, D. C. Quinolone resistance mediated by norA: Physiologic characterization and relationship to flqB, a quinolone resistance locus on the Staphylococcus aureus chromosome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 6, p. 1345-1355, 1994.

NICOLSEN, N. C.; STANG, A. New Antimicrobials: Where They Fit Within the Armamentarium**. Infectious Disease Special Edition**, 2019.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 593–656, dez. 2003. DOI: 10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003.

NIKOLIC, P.; MUDGIL, P. The Cell Wall, Cell Membrane and Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* and Their Role in Antibiotic Resistance. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, p. 259, 2023.

NOGUCHI, N. *et al*. Comparison of the nucleotide sequence and expression of norA genes and microbial susceptibility in 21 strains of Staphylococcus aureus. **Microbial Drug Resistance**, v. 10, n. 3, p. 197-203, 2004.

NOLASCO, L.G. Impactos da nanotecnologia na saúde humana e no meio ambiente. **Revista Jurídica Direito, Sociedade e Justiça**, v. 4, n. 4, 2017.

NUNES, P. M. A. Combate à resistência aos antibióticos: novas moléculas/estratégias em fase clínica de desenvolvimento. 2023. **Tese (Doutorado).**

OGAWARA, H. Comparison of antibiotic resistance mechanisms in antibiotic-producing and pathogenicbacteria. **Molecules**, v. 24, n. 19, p. 3430, 2019.

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. d. M. Avaliação da atividade antibacteriana e inibidora de bombas de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus* por 1, 8-Naftiridinas sulfonamídicas: abordagem em Vitro e in Silico. 2021. p. **Tese (Doutorado em em Biotecnologia), Universidade Federal de Pernambuco**. 2021.

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. d. M., *et al.* NorA, Tet (K), MepA, and MsrA Efflux Pumps in *Staphylococcusaureus*, Their Inhibitors and 1, 8-Naphthyridine Sulfonamides. **Curr Pharm Des**, v. 29, n. 5, p. 323-355, 2023a.

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. d. M., *et al.* Valencene, Nootkatone and Their Liposomal Nanoformulations as Potential Inhibitors of NorA, Tet (K), MsrA, and MepA Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus* Strains. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 10, p. 2400, 2023b.

ONDUSKO, D. S.; Nolt, D. *Staphylococcus aureus*. **Pediatr Rev**, v. 39, n. 6, p. 287-298, 2018.

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

ORTIZ, M., *et al.* Serological Cross-Reaction between Six Thiadiazine by Indirect ELISA Test and Their Antimicrobial Activity. **Methods Protoc**, v. 6, n. 2, p. 37, 2023.

PACHORI, P., *et al.* Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit;a critical review. **Genes & diseases**, v. 6, n. 2, p. 109-119, 2019.

PAGÈS, J. M.; JAMES, C. E.; WINTERHALTER, M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. ***Nature Reviews Microbiology***, London, v. 6, n. 12, p. 893–903, dez. 2008. DOI: 10.1038/nrmicro1994.

PALAZZOTTI, D. *et al*. Deciphering the molecular recognition mechanism of multidrug resistance Staphylococcus aureus nora efflux pump using a supervised molecular dynamics approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, p. 4041, 2019.

PASQUA, M., *et al.* The varied role of efflux pumps of the MFS family in the interplay of bacteria withanimal and plant cells. **Microorganisms**, v. 7, n. 9, p. 285, 2019.

PENG, T. *et al*. Therapeutic time window and dose dependence of xenon delivered via echogenic liposomes for neuroprotection in stroke. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 19, n. 10, p. 773-784, 2013.

PERLMAN, O; WEITZ, I.S.; AZHARI, H. Copper oxide nanoparticles as contrast agents for MRI and ultrasound dual-modality imaging. **Physics in Medicine & Biology**, v. 60, n. 15, p. 5767, 2015.

PETERSON, E.; KAUR, P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2928, 2018.

PIDDOCK, L. J. V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 382-402, 2006a.

PIMENTEL, A. S. *et al*. **Liposomes as drug delivery systems: A review**. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43, n. 4, p. 515-530, 2007.

POLLY, M., *et al.* Impact of the COVID-19 pandemic on the incidence of multidrug-resistant bacterialinfections in an acute care hospital in Brazil. **Am J Infect Control**, v. 50, n. 1, p. 32-38, 2022.

PONTES, D. S. *et al*. Genetic Mechanisms of Antibiotic Resistance and the Role of Antibiotic Adjuvants**. Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 42-74, 2018.

POOLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. **Ann Med**, v. 39, n. 3, p. 162-176, 2007.

PRINCIPE, L. *et al*. In vitro activity of doripenem in combination with various antimicrobials

against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii: possible options for the treatment of complicated infection. **Microbial Drug Resistance**, 19, 407–414, 2013.

PULINGAM, T., *et al.* Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistanceand strategies to overcome. **Eur J Pharm Sci**, v. 170, n., p. 106103, 2022.

QIN, S., *et al. Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. **Signal Transduct Target Ther** v. 7, n. 1, p. 199, 2022.

RAMSDEN, J. J. **The music of the nanospheres**. *Nanotechnology Perceptions*, v. 1, p. 53-64, 2005.

ROCHA, A. J., *et al. Pseudomonas aeruginosa:* virulence factors and antibiotic resistance genes. **BrazArch Biol Technol**, v. 62, n., p., 2019.

ROCHA, I. V. *et al*. *Estudo de variantes de betalactamases ADC de isolados clínicos de Acinetobacter baumannii na resistência aos beta-lactâmicos.* 2021. Tese (Doutorado).

RODRIGUES, T. S., *et al.* Resistência bacteriana a antibióticos na Unidade de Terapia Intensiva: revisãointegrativa. **Rev Prev Infecç Saúde** v. 4, n., p., 2018.

SANCHEZ-CARBONEL, A., *et al.* The effect of the efflux pump inhibitor Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone (CCCP) on the susceptibility to imipenem and cefepime in clinical strains of*Acinetobacter baumannii*. **PLoS One**, v. 16, n. 12, p. e0259915, 2021.

SANFELICE, R.C; PAVINATTO, A; CORRÊA, D.S. "Introdução à Nanotecnologia", p. 27-48. **Nanotecnologia aplicada a polímeros**. São Paulo: Blucher, 2022.

SANGI, D. P. **Quim. Nova**, v. 39, p. 995, 2016.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: A bala mágica acertou? **Química Nova**, v. 25 , n.6, São Paulo. Dezembro 2002.

SCHINDLER, B. D. *et al*. Mutagenesis and modeling to predict structural and functional characteristics of the Staphylococcus aureus MepA multidrug efflux pump. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 3, p. 523-533, 2013.

SCHINDLER, B. D., *et al.* Functional consequences of substitution mutations in MepR, a repressor of the*Staphylococcus aureus* mepA multidrug efflux pump gene. **J Bacteriol**, v. 195, n. 16, p. 3651-3662,2013b.

SCHINDLER, B. D., *et al.* Mutagenesis and modeling to predict structural and functional characteristicsof the *Staphylococcus aureus* MepA multidrug efflux pump. **J Bacteriol**, v. 195, n. 3, p. 523-533, 2013a.

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

SCHMITZ, F. J. *et al*. Relationship between mutations in the coding and promoter regions of the norA genes in 42 unrelated clinical isolates of Staphylococcus aureus and the MICs of norfloxacin for these strains. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, n. 4, p. 561 563, 1998a.

SCHUSTER, G.R. *et al*. Nanotecnologia na medicina: avanços, aplicações e desafios na administração direcionada de medicamentos. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 25, p. e18998-e18998, 2025.

SEKHON, B. S. **Food nanotechnology–an overview**. *Nanotechnology, Science and Applications*, v. 3, p. 1, 2010.

SEN, P., *et al.* 4-Allyl-2-methoxyphenol modulates the expression of genes involved in efflux pump,biofilm formation and sterol biosynthesis in azole resistant *Aspergillus fumigatus*. **Front Cell InfectMicrobiol**, v. 13, n., p. 1103957, 2023.

SEO, Y.; KIM, M.; KIM, T.-J. Inhibition of (p)ppGpp synthesis and membrane fluidity modulation by diosgenin: a strategy to suppress *Staphylococcus aureus* persister cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, p. 6335, 2025. DOI: 10.3390/ijms26136335.

SERWECIŃSKA, L. Antimicrobials and antibiotic-resistant bacteria: a risk to the environment and to public health. **Water**, v. 12, n. 12, p. 3313, 2020.

SHARIATI, A., *et al.* Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates:a systematic review and meta-analysis. **Sci Rep**, v. 10, n. 1, p. 12689, 2020.

SHARMA, A., *et al.* Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. **Indian J Med Res**, v. 149, n. 2, p. 129, 2019.

SHUBAKAR, K., *et al.* Synthesis and antimicrobial evaluation of novel derivatives of 1, 3, 4-thiadiazineincorporated with pyrazole-4-carboxylic acid moiety. **Bulg Chem Commun**, v. 45, n. 3, p. 274-279,2013.

SIASAT, P. A.; BLAIR, J. M. Microbial Primer: Multidrug efflux pumps. **Microbiology**, v. 169, n. 10, p.001370, 2023.

SIERRA, J. M. *et al*. Prevalence of two different genes encoding NorA in 23 clinical strains of Staphylococcus aureus. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 145-146, 2000.

SILBERGELD, E. K.; GRAHAM, J.; PRICE, L. B. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. **Annual Review of Public Health**. v. 29, p. 151 169, 2008.

SILVA, M. G. d. L., *et al.* Enhancing the Antifungal Efficacy of Fluconazole with a Diterpene: Abietic Acid as a Promising Adjuvant to Combat Antifungal Resistance in *Candida spp*. **Antibiotics**, v. 12, n. 11, p. 1565, 2023a.

SILVA, V., *et al. Staphylococcus aureus* and MRSA in livestock: antimicrobial resistance and geneticlineages. **Microorganisms**, v. 11, n. 1, p. 124, 2023b.

SINGH, A. *et al*. Thiazole derivatives in medicinal chemistry: recent advancements in synthetic strategies, structure–activity relationship and pharmacological outcomes. **Journal of Molecular Structure**, v. 1266, p. 133479, 2022.

SOUZA, M. V. N. *et al*. Methodologies for the preparation and synthetic application of thiazoles, an important class of heterocyclic compounds. **Quim. Nova**, v. 28, p. 77, 2005.

SOUZA, R. d. P., *et al.* A atenção farmacêutica no uso racional de antibióticos: uma revisão narrativa. **Revista Artigos Com**, v. 26, n., p. e6112-e6112, 2021.

TEIXEIRA, D. d. A. **Microbiologia básica**. Teófilo Otoni - MG, 2020. 64 p.

TERRENI, M., *et al.* New antibiotics for multidrug-resistant bacterial strains: latest research developments and future perspectives. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2671, 2021.

THAKUR, V., *et al.* A comprehensive review on pharmacology of efflux pumps and their inhibitors in antibiotic resistance. **Eur J Pharmacol**, v. 903, n., p. 174151, 2021.

THI, M. T. T., *et al. Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 22, p. 8671, 2020.

THOMAS, L. L.; DAVID, A. W. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

TINTINO, S. R., *et al.* Effect of vitamin K3 inhibiting the function of NorA efflux pump and its geneexpression on *Staphylococcus aureus*. **Membranes**, v. 10, n. 6, p. 130, 2020.

TINTINO, S. R., *et al.* Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **Microb Pathog**, v. 97, n., p. 9-13, 2016.

TINTINO, S. R., *et al.* Vitamin K enhances the effect of antibiotics inhibiting the efflux pumps of *Staphylococcus aureus* strains. **Med Chem Res**, v. 27, n., p. 261-267, 2018.

TOOKE, Catherine L. et al. β-Lactamases and β-Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 18, p. 3472-3500, 2019.

TRUONG-BOLDUC, Q. C.; HOOPER, D. C. The transcriptional regulators NorG and MgrA modulate resistance to both quinolones and β-lactams in Staphylococcus aureus. **Journal of Bacteriology**, 189, 8, 2996–3005, 2007.

UDDIN, T. M., *et al.* Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategiesand future prospects. **J Infect Public Health**, v. 14, n. 12, p. 1750-1766, 2021.

VAN DER HEIJDEN, J. *et al*. *Salmonella* rapidly regulates membrane permeability to survive oxidative stress. ***mBio***, v. 7, n. 4, e01238-16, ago. 2016. DOI:10.1128/mBio.01238-16.

VAN HOEK, A. H. A. M. *et al*. Acquired antibiotic resistance genes: An overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 203, 2011.

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

VÁZQUEZ, M. C. G., *et al*. Location of OprD porin in Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. **Apmis**, v. 129, n. 4, p. 213-224, 2021.

VEMURI, S; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 70, n. 2, p. 95 111, 1995.

WALKER, D.; FOWLER, T. **Annual Report of the Chief Medical Officer**: Volume 2, 2011: Infections and the Rise of Antimicrobial Resistance (Department of Health, 2011).

WANG, C.H., *et al.* Defeating antibiotic-resistant bacteria: exploring alternative therapies for a post-antibiotic era. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 3, p. 1061, 2020.

WANG, D. *et al*. Clinical translation of immunoliposomes for cancer therapy: **Recent perspectives. Expert opinion on drug delivery**, v. 15, n. 9, p. 893-903, 2018.

WHO. **World Health Organization.** Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. **Geneva**, v., n., p. 87, 2017.

WHO. **World Health Organization**. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance 2014 http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/ 2014.

WOODLE, M. C. Sterically stabilized liposome therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n. 2-3, p. 249-265, 1995.

WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance in the environment: A link to the clinic? **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 589-594, 2010a.

WRIGHT, G. D. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Chemical Communications**, v. 47, n. 14, p. 4055-4061, 2011.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: The nexus of chemical and genetic diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 175-186, 2007.

WU, Q., *et al.* Systematic review and meta-analysis of the epidemiology of vancomycin-resistance *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrob Resist Infect**, v. 10, n., p. 1-13, 2021.

WU, S.-C., *et al.* Natural products that target virulence factors in antibiotic-resistant *Staphylococcusaureus*. **J Agric Food Chem**, v. 67, n. 48, p. 13195-13211, 2019.

WU, W., *et al.* (2015). *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular medical microbiology**, 753-767.

YE, J.; Chen, X. Current Promising Strategies against Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. **Antibiotics**, v. 12, n. 1, p. 67, 2022.

YILMAZ, Ç.; ÖZCENGIZ, G. Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug effluxpumps. **Biochem Pharmacol**, v. 133, n., p. 43-62, 2017.

ZGURSKAYA, H. I.; RYBENKOV, V. V. Permeability barriers of Gram-negative pathogens. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1459, n. 1, p. 5–18, jan. 2020. DOI: 10.1111/nyas.14134.

ZHELEZNOVA, E. E. *et al*. Structural basis of multidrug recognition by BmrR, a transcription activator of a multidrug transporter. **Cell**, 96, 353–362, 1999.

APÊNDICE - RESULTADOS VINCULADOS A TESE NÃO PUBLICADOS

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS DERIVADOS TIAZÓLICOS BASEADOS NO EUGENOL

Ao analisar os resultados da CIM com a bactéria *Staphylococcus aureus* 1199B, observou-se que nenhuma das substâncias testadas apresentaram atividade direta sobre a bactéria nas concentrações variando de 1024 µg/mL a 8 µg/mL. Por outro lado, constatou-se que o CCCP provocou uma redução significativa na CIM, passando de 1024 µg/mL para 64 µg/mL (Tab. 1).

Substâncias	*S. aureus* – 1199B
LF07	≥1024 µg/mL
LF08	≥1024 µg/mL
LF09	≥1024 µg/mL
LF10	≥1024 µg/mL
LF12	≥1024 µg/mL
LF13	≥1024 µg/mL
LF14	≥1024 µg/mL
LF15	≥1024 µg/mL
LF16	≥1024 µg/mL
LF17	≥1024 µg/mL
LF18	≥1024 µg/mL
LF19	≥1024 µg/mL
LF20	≥1024 µg/mL
LF21	≥1024 µg/mL
LF22	≥1024 µg/mL
LF23	≥1024 µg/mL
LF24	≥1024 µg/mL
LF25	≥1024 µg/mL

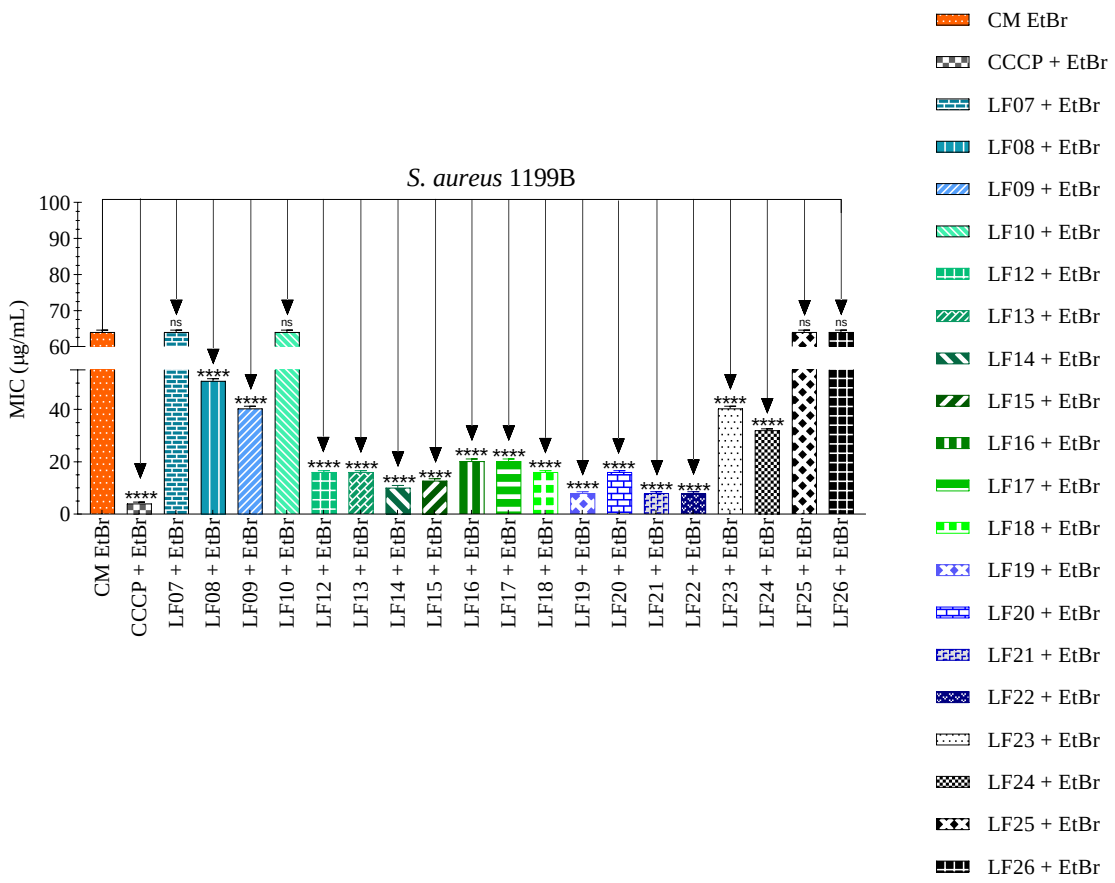
LF26	≥1024 μg/mL
CCCP	64 μg/mL

Tabela 1: Resultado da avaliação da concentração inibitória mínima dos derivados tiazólicos baseados no eugenol e da substância CCCP.

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO POR DERIVADOS TIAZÓLICOS BASEADOS EM EUGENOL ASSOCIADO AO BROMETO DE ETÍDIO (EtBr)

O gráfico 1 mostra a CIM de brometo de etídio (EtBr) em *S. aureus* 1199B na presença de diferentes compostos (LF07 a LF26), além dos controles que incluem: Controle de modulação (CM) e controle positivo para inibição com Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl-hydrazone (CCCP). O controle CM para EtBr apresenta uma CIM de 64 µg/mL, o que indica que, na ausência de moduladores, a bactéria requer uma concentração alta de EtBr para ser inibida. Em contraste, o CCCP, um inibidor conhecido de bombas de efluxo, reduz significativamente a CIM, demonstrando seu efeito de inibição da bomba e potenciador na atividade antimicrobiana do EtBr. Isso sugere que os compostos testados podem atuar modulando o sistema de efluxo bacteriano, aumentando a sensibilidade da bactéria ao EtBr.

Entre os compostos avaliados, LF13 (16 µg/mL), LF14 (~10µg/mL), LF15 (~13 µg/mL), LF19 (8 µg/mL), LF20 (16 µg/mL), LF21 (8 µg/mL) e LF22 (8 µg/mL) se destacaram por apresentarem as menores CIMs, indicando uma potencialização com o EtBr e sugerindo potencial como inibidores de bombas de efluxo. Compostos como LF8 (~51µg/mL), LF9 (~40µg/mL), LF16 (~20µg/mL), LF17 (~20µg/mL), LF23 (~40µg/mL) e LF24 (32µg/mL) também promoveram uma redução significativa na CIM, embora de forma menos acentuada. Em contrapartida, LF07, LF10, LF25 e LF26 exibiram CIMs com mesma características que o CM, indicando baixa eficácia ou ausência de efeito potencializador com o EtBr. A análise estatística confirma a significância dos resultados de vários compostos, conforme indicado pelas marcações (****) no gráfico.



622

623 **Figura 1X:** Avaliação da inibição da bomba de efluxo NorA pelos derivados tiazólicos baseados em eugenol e CCCP
624 associados com brometo de etídio frente a cepa de *Staphylococcus aureus* 1199B. N = 3. ****p < 0,0001 indica
625 diferenças significativas entre os grupos. A significância estatística foi determinada por ANOVA unidirecional e teste
626 de post-hoc de Bonferroni.

627 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO POR DERIVADOS TIAZÓLICOS
628 BASEADOS EUGENOL ASSOCIADO AO ANTIBIÓTICO CIPROFLOXACINA

629 O gráfico ilustra a concentração inibitória mínima (MIC) da norfloxacina (Norf) em
630 *Staphylococcus aureus* 1199B na presença de diferentes compostos moduladores (LF07 a LF26)
631 e controles (CM e CCCP). O controle com norfloxacina (CM Norf), representado pela barra
632 laranja, apresenta uma MIC elevada (~150 µg/mL), indicando resistência significativa à droga. A
633 adição do CCCP, um inibidor de bombas de efluxo, reduz expressivamente a MIC, evidenciando
634 o papel das bombas de efluxo na resistência à norfloxacina. Isso estabelece uma referência para
635 avaliar os compostos testados quanto à sua eficácia como moduladores dessa resistência.

Entre os compostos, LF13, LF15, LF16, LF17, LF19 e LF22 mostraram reduções marcantes na MIC, com destaque para LF13 e LF15, que apresentaram os menores valores, indicando maior eficácia em potencializar a ação da norfloxacina. Compostos como LF10, LF18 e LF20 apresentaram redução na MIC, mas com menor impacto. Por outro lado, LF08, LF09, LF24, LF25 e LF26 não apresentaram alterações significativas, evidenciado pelas marcações "ns" (não significativas) no gráfico, sugerindo baixa ou nenhuma atividade moduladora. Esses resultados demonstram que determinados compostos podem ter potencial para reverter a resistência à norfloxacina, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias combinatórias contra infecções resistentes.

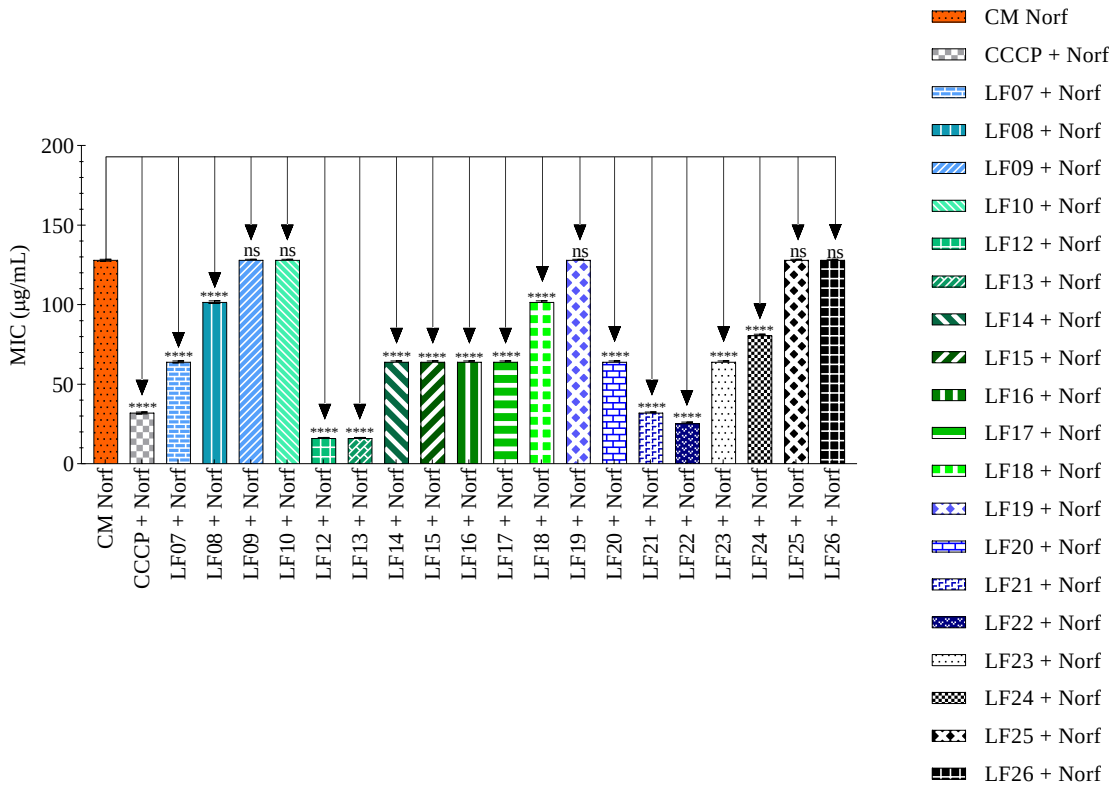


Figura 2X: Avaliação da inibição da bomba de efluxo NorA pelos derivados tiazólicos baseados em eugenol e CCCP associados com norfloxacino frente a cepa de *Staphylococcus aureus* 1199B. N = 3. ****p < 0,0001 indica diferenças significativas entre os grupos. A significância estatística foi determinada por ANOVA unidirecional e teste de post-hoc de Bonferroni.

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO POR EMISSÃO DE

FLUORESCÊNCIA

Dentre os derivados que apresentaram uma melhor atividade com EtBr e o antibiotico, foram selecionados 7 para avaliar a emissão de fluorescência. Observou-se que os derivados LF12, LF13, LF15, LF16, LF20, LF21 e LF22 na concentração de 100 µg/mL aumentaram a emissão de fluorescência em relação ao controle negativo EtBr na cepa 1199B. O mesmo resultado foi observado pelo inibidor padrão de bomba, CCCP, indicando reprodutibilidade do experimento (Figura 3X).

Ação inibidora de bombas de efluxo avaliada pelo aumento da emissão de fluorescência de EtBr

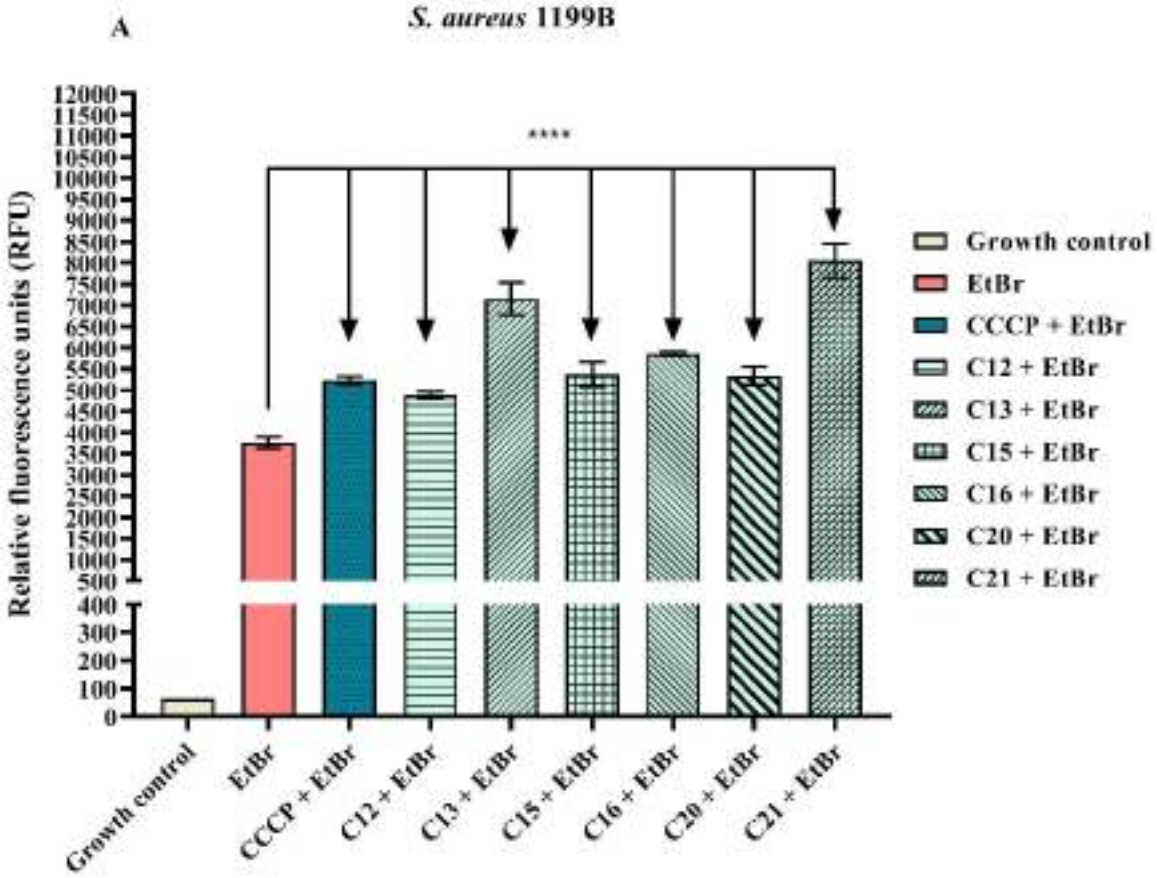


Figure 3X. Evaluation of NorA efflux pump inhibition by measuring fluorescence emission in *S. aureus* 1199B strains treated with derivatives C12 to C21. EtBr = ethidium bromide; **** = $p < 0.0001$ *vs* EtBr.

DOCKING MOLECULAR

Do maior para o menor grau de afinidade entre ligantes e receptor, foram registradas as seguintes energias de ligação (em Kcal/mol): -8.113 (C21), -8.085 (C22), -8.067 (C20), -7.971 (C15), -7.899 (C16), -7.742 (C12), -7.422 (C13) e -6.118 (CCCP). Apesar das diferenças nas energias calculadas, os compostos têm localizações similares no alvo (Figura). Analisando os valores registrados e as estruturas químicas dos derivados testados, fica evidente a relação entre as diferenças estruturais desses compostos e sua efetividade *in silico*, com destaque para aqueles com a presença do átomo de cloro (C20, C21 e C22).

Ao apresentar C21 como o derivado com a maior afinidade com NorA, o docking molecular reforça os resultados das avaliações *in vitro*, pois esse composto foi o melhor no ensaio de emissão de fluorescência e teve resultados favoráveis na associação à norfloxacina e ao brometo de etídio.

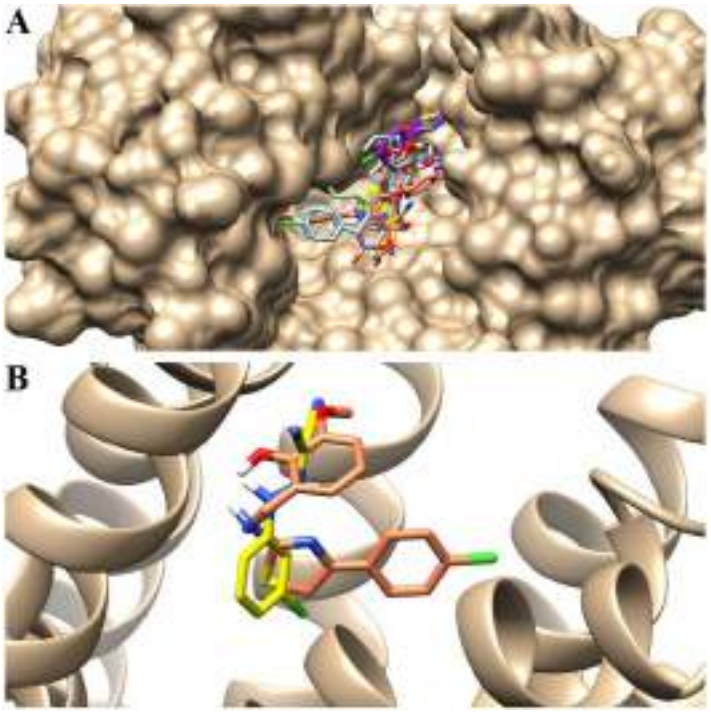


Figura 4X. Posição dos compostos na cavidade central de NorA (A) e conformações de C21 e CCCP (B). As moléculas estão representadas nas seguintes cores: C12 – verde, C13 – rosa, C15 – azul, C16 – vermelho, C20 – cinza, C21 – laranja, C22 – roxo, CCCP – amarelo.

A maioria das interações de C21 com NorA foram classificadas como hidrofóbicas, divididas em: i) alquil: Ile19 (4.02 Å) e Pro344 (3.89 Å), ii) π-alquil: Ile19 (5.03 Å) e Phe47 (5.14 Å), iii) π-π T-shaped: Phe140 (5.00 Å). Uma ligação de hidrogênio clássica ocorreu com Glu222 (1.70 Å) e duas ligações carbono-hidrogênio com Asn340 (2.99 Å) e Ser219 (3.23 Å). O resíduo Glu222 também participou de uma interação eletrostática do tipo ponte salina (1.88 Å) e foram identificadas interações de van der Waals com Leu218, Phe16 e Thr223 (Figura).

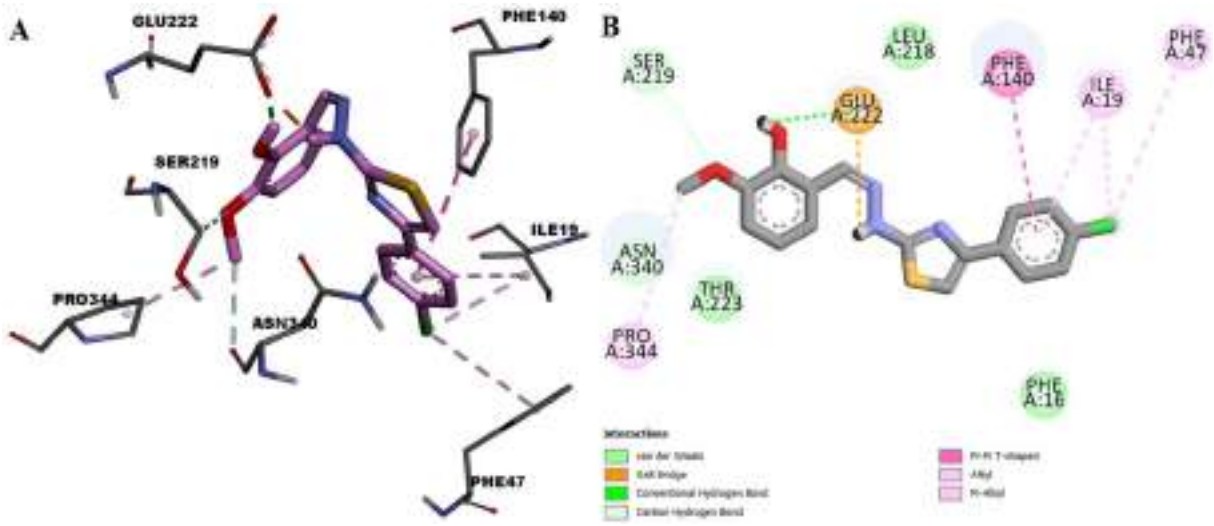


Figura 5X. Melhor conformação de C21 no sítio de ligação (A) e interações com o transportador NorA (B)

Além de interações de van der Waals com Asn340, Ile136, Pro344, Thr223 e Thr336, o CCCP apresentou outros quatro tipos: interação hidrofóbica π-π T-shaped com Phe140 (4.89 Å), ligação de hidrogênio convencional com Glu222 (1.99 Å), ligação carbono-hidrogênio com Ser219 (3.05 Å) e interação eletrostática π-cátion com Arg310 (3.93 Å) (Figura).

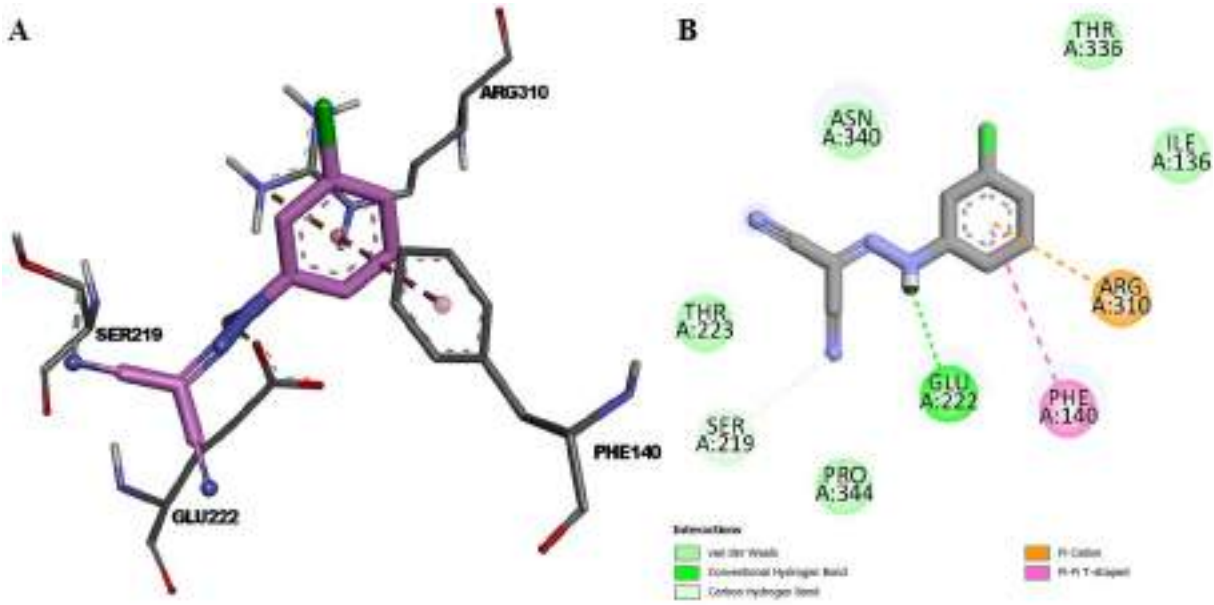
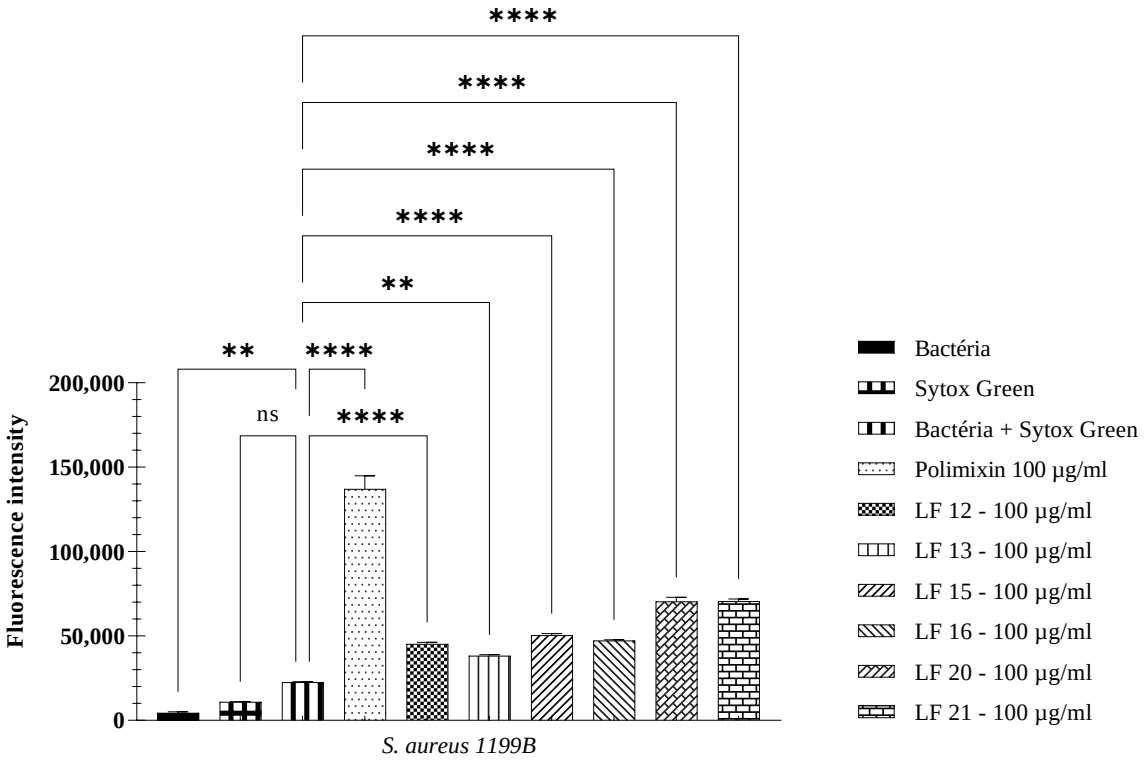


Figura 6X. Melhor conformação do CCCP no sítio de ligação (A) e interações com o transportador NorA (B)

701 ALTERAÇÃO DA PERMEABILIDADE DE MEMBRANA EM *Staphylococcus aureus*



702
703 **Figura 7X:** Avaliação da alteração da permeabilidade de membrana pelos derivados tiazólicos frente à cepa de
704 *Staphylococcus aureus* 1199B. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). A análise estatística
705 foi realizada por ANOVA de uma via, seguida do teste pós-hoc de Bonferroni. Diferença estatisticamente
706 significativas são indicadas por ****p < 0,0001.
707
708

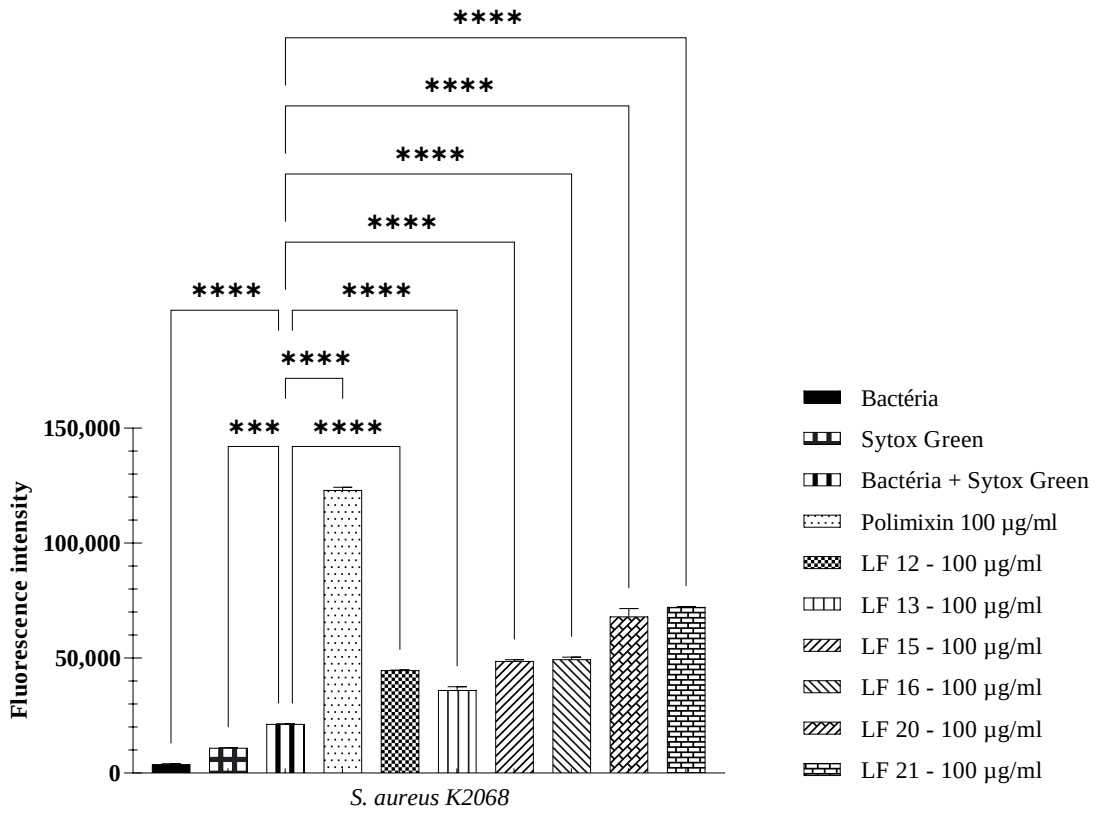


Figura 8X: Avaliação da alteração da permeabilidade de membrana pelos derivados tiazólicos frente à cepa de *Staphylococcus aureus* K2068. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida do teste pós-hoc de Bonferroni. Diferença estatisticamente significativas são indicadas por ****p < 0,0001.