UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB

KARLA SUSANNA TAVARES GRANGEIRO BELÉM

SINTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DIRETA E POTENCIALIZADORA DE ANTIBIÓTICOS DERIVADOS DE HIDRALAZINA FRENTE A BACTÉRIAS PORTADORAS DE BOMBAS DE EFLUXO

Crato-CE

2026

UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA

KARLA SUSANNA TAVARES GRANGEIRO BELÉM

SINTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DIRETA E POTENCIALIZADORA DE ANTIBIÓTICOS DE DERIVADOS DE HIDRALAZINA FRENTE A BACTÉRIAS PORTADORAS DE BOMBAS DE EFLUXO

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

Orientador: Prof. Dr. Hélcio Santos Silva

Coorientador: Profa. Dra. Janaína Esmeraldo Rocha

Crato- CE

2026

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

Tavares Grangeiro Belém, Karla Susanna
Sintese e avaliação da atividade direta e potencializadora de antibióticos de derivados de hidralazina frente a bactérias portadoras de bombas de efluxo
68p

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

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

KARLA SUSANNA TAVARES GRANGEIRO BELÉM

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DIRETA E POTENCIALIZADORA DE ANTIBIÓTICOS DE DERIVADOS DE HIDRALAZINA FRENTE A BACTÉRIAS PORTADORAS DE BOMBAS DE EFLUXO

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

Dissertação deferida e aprovada em 28/01/2026

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Helcio Silva dos Santos - UECE

Orientador - UECE

Janaina Esmeraldo Rocha

Profa. Dra. Janaina Esmeraldo Rocha

Coorientadora – URCA

gov.br Documento assinado digitalmente
MIRA RAYA PAULA DE LIMA
Data: 26/03/2026 18:22:48-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Mira Raya Paula de Lima

Membro Titular Externo - IFCE



Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira

Membro Titular Interno - URCA

Prof. Dr. Francisco Nascimento Pereira Junior

Membro Suplente Externo - UFCA

Dedico este trabalho a todos aquele que acreditam e sempre acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos pela orientação e acolhimento durante este período importante na minha carreira acadêmica.

Aos professores Alexandre Magno Rodrigues Teixeira que me acompanha e acredita no meu potencial desde a graduação, a professora Dra. Mira Raya Paula de Lima pela disposição em compor a banca avaliadora. Também agradeço a professora Dra. Janaína Esmeraldo Rocha pela coorientação e apoio.

Aos meus pais e irmão por sempre estarem do meu lado, acreditarem no meu potencial e me incentivar a ir cada vez mais longe.

Ao meu parceiro por ter me dado apoio e incentivo nos momentos de incerteza e medo.

A todos os colegas que estiveram do meu lado tornado mais divertidos os dias difíceis e me incentivando a seguir em frente.

“Que haja uma luz para você nos lugares escuros, quando todas as outras luzes se apagarem”.

J. R. R. Tolkien

Diagrama 1: Estrutura da dissertação 5
Figura 1: Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos 19
Figura 2: Descrição estrutural da molécula de hidralazina (PUBCHEM, 2025) 22
Figura 3: Estrutura geral das Hidrazonas 24

Símbolo, sigla ou abreviatura	Significado
ATP	Adenosina Trifosfato
CCCP	Carbonyl Cyanide 3-Chlorophenylhydrazone
CIM (MIC)	Concentração Inibitória Mínima
Cip	Ciprofloxacino
CPMZ (CPZ)	Clorpromazina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EPI	Efflux Pump Inhibitors
EtBr	Ethidium Bromide
HDZ	Hidralazina
IBE	Inibidores de Bomba de Efluxo
HDZH2OH	Hidroxibenzaldeído-benzoil-hidrazona

RESUMO 11
IMPORTÂNCIA/RELEVÂNCIA PARA A SOCIEDADE 12
1 INTRODUÇÃO GERAL 13
1.1. OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS 14
1.2. ESTRATÉGIAS DE PESQUISA 14
1.3. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO 15
2 OBJETIVOS 17
2.1 OBJETIVO GERAL 17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 17
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 18
3.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA 18
3.1.1 Mecanismos de Resistência 18
3.2 *Staphylococcus aureus (S. Aureus*) 19
3.4 BOMBAS DE EFLUXO 20
3.4.1 NorA 20
3.4.2 MepA 21
3.5 INIBIDORES DE EFLUXO 21
3.5.1 Hidralazina 22
3.6 MECANISMO DE AÇÃO E APLICAÇÕES CLÍNICAS 23
3.7 APLICAÇÕES NA MICROBIOLOGIA 24
3.8 HIDRAZONAS 24
3.9 DOCAGEM MOLECULAR 24
3.10 PROPRIEDADES DE ADMET E DRUG-LIKENESS 25
4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA 26
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 55

Síntese e Avaliação da atividade direta e potencializadora de antibióticos de derivados de hidralazina frente a bactérias portadoras de bombas de efluxo.

RESUMO

Introdução: A resistência antimicrobiana é atualmente considerada um dos maiores desafios globais para a saúde pública. Devido ao desenvolvimento dessas resistências, os antibióticos antes utilizados no tratamento de infecções bacterianas hoje perderam significativamente seu potencial. Entre os mecanismos de resistência, as bombas de efluxo tem destaque como um dos mais relevantes. Essas proteínas atuam expulsando o medicamento do interior celular, reduzindo sua concentração intracelular e, consequentemente, sua eficácia terapêutica. Diante desse cenário, torna-se necessária a busca por estratégias inovadoras. O estudo de novas substâncias que possam potencializar os fármacos surge como uma alternativa promissora, pois consiste na melhoria de medicamentos já utilizados nos tratamentos. **Objetivo:** Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a atividade antibacteriana direta de derivado da hidralazina, bem como sua capacidade de potencializar a ação dos medicamentos inibindo o mecanismo de bomba de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus*. **Metodologia:** Realizou-se a síntese de novas moléculas de hidrazonas e N-acilidrazonas a partir dos fármacos comerciais Apresolina® (hidralazina) e Isoniazida, respectivamente, para avaliação de sua capacidade de potencializar antibióticos e inibir bombas de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes (NorA e MepA). Foram utilizados inibidores de bomba de efluxo (CCCP, PAβN e clorpromazina), antibióticos específicos (norfloxacina e ciprofloxacina), além de controles e meios de cultura padrão. Os microrganismos foram cultivados, mantidos em estoques refrigerados e padronizados de acordo com a escala McFarland 0,5. Ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e modificação da ação de antibióticos foram realizados por microdiluição em placas de 96 poços, com leitura por resazurina após 24 h. A redução da CIM do brometo de etídeo e de antibióticos foi utilizada como indicativo de inibição de bomba de efluxo. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata, com análise estatística via ANOVA e teste de Bonferroni, considerando $p < 0,05$ como significativo. **Resultados e discussões:** A hidrazona HDZH2OH não tem ação antibacteriana por si só, mas demonstrou potencial como adjuvante ao inibir bombas de efluxo bacterianas. Ela potencializou o efeito do Brometo de Etídio contra a cepa *S. aureus* K2068 (bomba MepA) e da Norfloxacina contra a cepa *S. aureus* 1199B (bomba NorA). No entanto, sua eficácia varia conforme a cepa e o substrato. **Conclusões:** A hidrazona HDZH2OH não demonstrou atividade antibacteriana intrínseca, mas mostrou potencial como coadjuvante ao inibir bombas de efluxo. Sua eficácia é variável e depende da linhagem bacteriana e do substrato em questão. A HDZH2OH intensificou a ação do Brometo de Etídio na cepa *S. aureus* K2068 e da Norfloxacina na cepa *S. aureus 1199B*. Esse perfil de atuação sugere uma ação seletiva, e estudos adicionais são necessários para desvendar seu mecanismo de interação com as bombas e confirmar seu potencial terapêutico.

Palavras-Chave: *Bomba de efluxo; Resistência bacteriana; Hidralazinas.*

Agradecimentos: URCA e PPQB.

STUDY OF CROTAMINE-NEGATIVE FRACTION OF THE SNAKE´S VENOM OF *Crotalus durissus collilineatus*: EVALUATION OF ANALGESIC, ANTI-INFLAMMATORY AND CYTOTOXIC ACTIVITIES

ABSTRACT

Introduction: Antimicrobial resistance is currently considered one of the greatest global challenges to public health. Due to the development of these resistances, antibiotics previously used to treat bacterial infections have significantly lost their effectiveness. Among the resistance mechanisms, efflux pumps stand out as one of the most relevant. These proteins act by expelling the drug from inside the cell, reducing its intracellular concentration and, consequently, its therapeutic efficacy. Given this scenario, the search for innovative strategies becomes necessary. **Objectives:** Thus, the objective of this work is to evaluate the direct antibacterial activity of a hydralazine derivative, as well as its ability to potentiate the action of medications by inhibiting the efflux pump mechanism in Staphylococcus aureus strains. **Methodology:** The synthesis of new hydrazone and N-acylhydrazone molecules from the commercial drugs Apresolina® (hydralazine) and Isoniazid, respectively, was carried out to evaluate their ability to potentiate antibiotics and inhibit efflux pumps in resistant Staphylococcus aureus strains (NorA and MepA). Efflux pump inhibitors (CCCP, PAβN and chlorpromazine), specific antibiotics (norfloxacin and ciprofloxacin), as well as controls and standard culture media were used. The microorganisms were cultured, maintained in refrigerated stocks and standardized according to the McFarland 0.5 scale. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) assays and modification of antibiotic action were performed by microdilution in 96-well plates, with reading by resazurin after 24 h. The reduction in MIC of ethidium bromide and antibiotics was used as an indicator of efflux pump inhibition. All experiments were conducted in triplicate, with statistical analysis via ANOVA and Bonferroni test, considering $p < 0.05$ as significant. **Results and discussion:** The hydrazone HDZH2OH does not have antibacterial action on its own, but it has shown potential as an adjuvant by inhibiting bacterial efflux pumps. It potentiated the effect of ethidium bromide against the S. aureus K2068 strain (MepA pump) and of norfloxacin against the S. aureus 1199B strain (NorA pump). However, its effectiveness varies depending on the strain and substrate. **Conclusions:** The hydrazone HDZH2OH did not demonstrate intrinsic antibacterial activity, but showed potential as an adjuvant by inhibiting efflux pumps. Its efficacy is variable and depends on the bacterial strain and the substrate in question. HDZH2OH intensified the action of ethidium bromide in the S. aureus K2068 strain and of norfloxacin in the S. aureus 1199B strain. This action profile suggests a selective action, and further studies are needed to unravel its mechanism of interaction with the pumps and confirm its therapeutic potential.

Keywords: Efflux pump; Bacterial resistance; Hydralazines.

Acknowledgements: URCA e PPQB.

IMPORTÂNCIA/RELEVÂNCIA PARA A SOCIEDADE

Doenças causadas por bactérias sempre estiveram presentes em nossa sociedade e frequentemente causam problemas graves de saúde e, em alguns casos, até mesmo a morte. Com o avanço da ciência podemos desenvolver medicamentos que ajudaram a retardar os efeitos desses microrganismos nos seres humanos, medicamentos estes conhecidos como antibióticos. Com o passar do tempo, alguns fatores como automedicação e má administração de medicamentos, levaram as bactérias a se tornarem resistentes a diversos antibióticos, o que os levou a perder a eficiência que tinham antes. Estudar esses microrganismos nos permite entender seus mecanismos de defesa e explorar formas de combatê-los. Uma das formas encontradas foi o estudo de novas substância que possam ter capacidade de fortalecer a ação dos medicamentos já existentes. Essas substâncias favorecem o medicamento tornando-o um recurso importante para tratamentos e permitindo que pessoas possam ser curadas mesmo em situações de muito risco.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Através dos anos, doenças infeciosas causadas por micro-organismos são tema de destaque quando se retrata da sobrevivência humana, principalmente em locais com clima tropical e semitropical, onde suas ocorrências tende a ser maiores justamente agravadas pelo clima, gerando considerável número de mortes. (Khan et al., 2016; Sousa et al., 2018). Doenças infeciosas causadas por bactérias tem sido um motivo de preocupação pública, principalmente no campo da saúde. As mesmas têm vetores de contágio bastante abrangentes, como ar, água e alimentos contaminados. O meio que infecções podem se espalhar também abrangem contato direto com outro organismo contaminados, vias aéreas, gotículas ou de fórmula veicular. (Fernstrom; Goldblatt, 2013; Knox; Uhlemann; Lowy, 2015).

Comumente citado, o *Staphylococcus aureus* é um micro-organismo comensal que é um dos principais patogênicos responsáveis por causar infecções hospitalares. Sendo seu hospedeiro natural o ser humano, a bactéria e normalmente encontrada nas fossas nasais e nas peles de recém-nascidos, crianças e adultos, assim posteriormente, conseguindo as demais regiões da pele e das mucosas. (Nery et al., 2023)

Tratando-se do *S. aureus* se tem uma grande preocupação pública, tendo em vista que o mesmo tem a habilidade de adquirir resistência a boa parte dos antibióticos. (Cussolim et al., 2021). A resistência desta bactéria aos antibióticos tem sido desenvolvida por mutações em seus genes ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie (ou até de outras espécies). A resistência bacteriana ocorre por mutação de forma geral, que resulta em uma alteração no sítio de ação do antibiótico (Nascimento et al., 2024).

Por sua ampla capacidade de adquirir resistência a antibióticos por diferentes vias moleculares a *S. aureus* é de grande importância no desenvolvimento clínico. (Ge et al., 2017). Um exemplo a citar foi o surgimento de cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), que demonstra grande preocupação no mundo, com ocorrência na América Latina, variando de 6% na América Central a 80% em alguns países da América do Sul, incluindo Brasil (Arias et al., 2017).

O mecanismo de efluxo vem sendo um forte alvo de estudos no intuito de identificar inibidores de bombas de efluxo ou EPIs (efflux pump inhibitor) (Kapp et al., 2018). Essas moléculas são administradas juntamente com o antibiótico, com o intuito de impedir sua extrusão e elevar sua concentração intracelular (Becker, 2017). Sendo assim, o EPI pode auxiliar a reduzir a ocorrência de persistentes, ajudando no tratamento de infecções crônicas (Monteiro; de Aquino; Mendonça Junior, 2020).

A fim de solucionar a crise que vem sendo causada pelo surgimento acelerado de patogênicos

resistentes, o desenvolvimento de novos medicamentos e agentes que atuem eliminando cepas bacterianas é necessário, utilizando-se de novas abordagens para prever e prevenir a propagação do fenótipo MDR presente em cepas de *Staphylococus aureus* (Baym; Stone; Kishony, 2016; Bell; Maclean, 2018).

Pretende-se neste trabalho sintetizar uma nova hidrazona e avaliar sua possível atividade antibacteriana e inibidora de bombas de efluxo presentes em cepas de 1199B e K4414 de *Staphylococcus aureus.*

1.1. OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS

A busca por novas soluções para o crescente problema da resistência antimicrobiana é a principal motivação para esta pesquisa. Com a diminuição da eficácia dos tratamentos existentes e a falta de novos antibióticos no mercado, estudar novas substâncias que possam potencializar medicamentos já existente se torna uma estratégia promissora.

Este projeto visa investigar a capacidade de certos fármacos em potencializar a ação dos antibióticos e, mais especificamente, em inibir as bombas de efluxo dos microrganismos. As bombas de efluxo são um dos principais mecanismos de resistência, pois expulsam o antibiótico da célula, impedindo que ele cumpra seu papel. Ao desativar essa bomba, espera-se restaurar a eficácia dos medicamentos.

Além de contribuir com as pesquisas científicas, este trabalho possui um potencial significativo para a saúde pública, pois pode fornecer novas abordagens para o combate a infecções bacterianas resistentes.

1.2. ESTRATÉGIAS DE PESQUISA

No presente projeto, foram adotadas estratégias de pesquisa integradas, envolvendo desde a síntese de novas moléculas até análises microbiológicas e estatísticas rigorosas. Inicialmente, novas hidrazonas e N-acilidrazonas foram sintetizadas a partir dos fármacos comerciais Apresolina® (hidralazina) e Isoniazida, visando avaliar seu potencial frente a cepas bacterianas resistentes. A Apresolina® (hidralazina) é utilizada como agente de redução emergencial da pressão arterial em crises hipertensivas (Ehrenpreis; Ehrenpreis, 2001), enquanto a Isoniazida é um pró-fármaco de primeira escolha no tratamento da tuberculose causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Majorov et al., 2020).

Para os ensaios, foram selecionados inibidores de bomba de efluxo consagrados na literatura, como Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl-hydrazone, Phenylalanine Arginyl β-Naphthylamide e Clorpromazina, além de antibióticos específicos — Norfloxacina para a bomba NorA e

Ciprofloxacina para a bomba MepA — de modo a permitir a identificação e caracterização do mecanismo de resistência.

Os microrganismos utilizados compreenderam cepas específicas de *Staphylococcus aureus* resistentes a fluoroquinolonas, mantidas em condições controladas para preservar suas características genéticas, incluindo plasmídeos. Para a realização dos experimentos, os inóculos foram padronizados segundo a escala McFarland 0.5 ($\approx 10^5$ UFC/mL), garantindo reprodutibilidade e consistência nos ensaios.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada por meio do ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM), aplicando a técnica de microdiluição em placas de 96 poços, com detecção baseada na mudança de cor pela adição de resazurina. Os testes foram conduzidos em triplicata para assegurar robustez estatística. Complementarmente, foram realizados ensaios de modificação da ação de antibióticos, nos quais as substâncias foram aplicadas em concentrações sub-inibitórias (CIM/8), e ensaios específicos para avaliar a inibição de bombas de efluxo, analisando a redução da CIM do brometo de etídio ou de antibióticos específicos como indicativo de ação inibitória (Coutinho et al., 2008).

Por fim, os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o software GraphPad Prism (versões 5.0 e 6.01), aplicando-se testes ANOVA (one-way e two-way) com correção de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média geométrica e desvio padrão, sendo considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$ ou $p < 0,01$, conforme o objetivo analítico de cada etapa (Freitas et al., 2021a).

1.3. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A dissertação se encontra dividida em Introdução, Objetivos, Fundamentação Teórica, Produção Científica e Considerações Finais. A estrutura do trabalho segue o esquema abaixo (Diagrama 1).

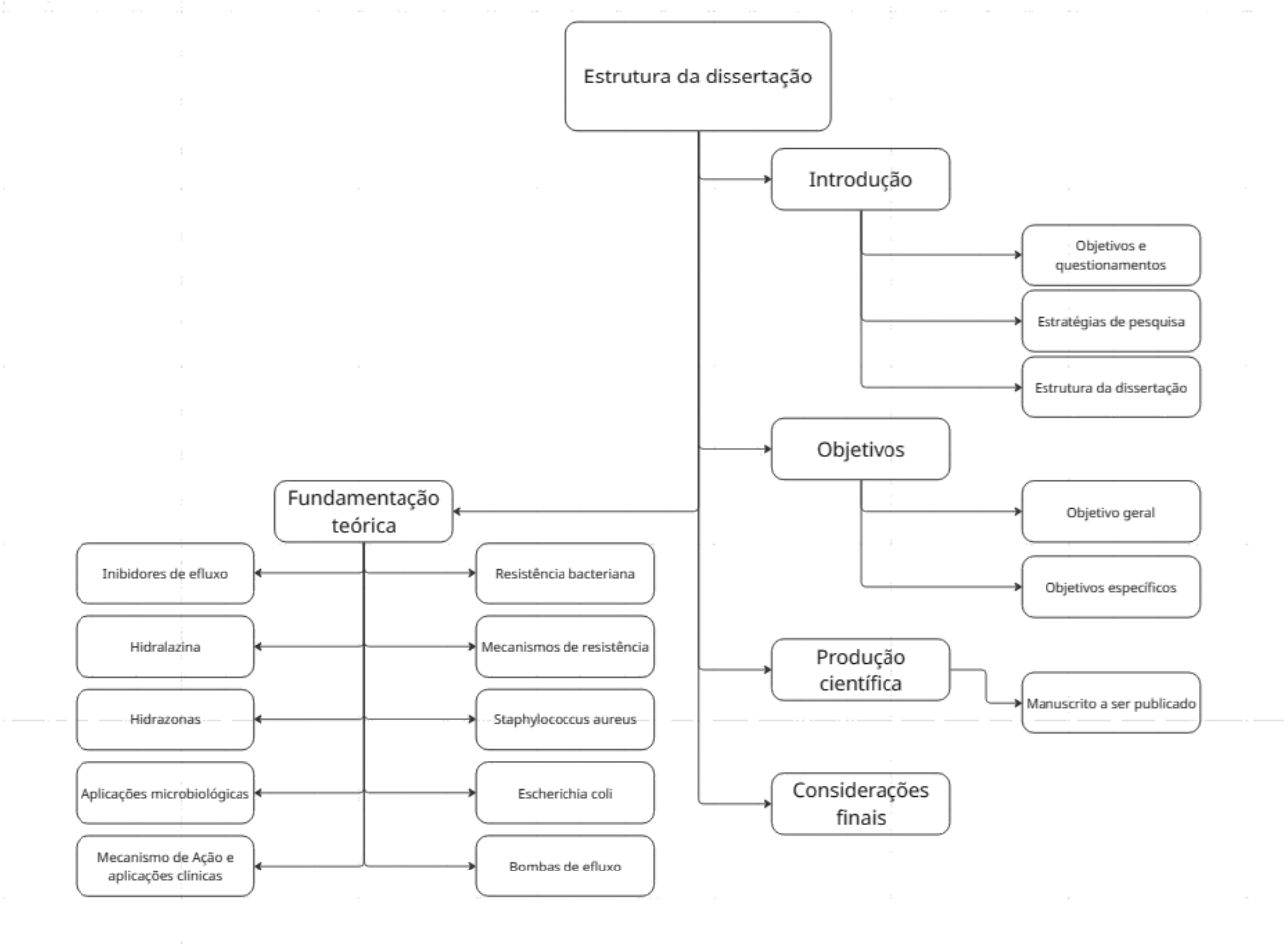


Diagrama 1: Estrutura da dissertação

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ação antibacteriana direta de derivados da hidralazina e verificar seu potencial para reverter a resistência bacteriana por meio da inibição do mecanismo de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese da substância derivada de hidralazina;
- Determinar a estrutura da substância derivada da hidralazina por RMN;
- Avaliar a ação no mecanismo de bomba de efluxo em bactérias de *Staphylococcus aureus* 1199B portadora da bomba NorA e K2068 portadora da bomba MepA;
- Realizar a docagem molecular;
- Verificar a toxicidade através dos testes computacionais de ADMET.

3.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência bacteriana é um desafio crescente para a medicina moderna, uma vez que limita significativamente as opções de tratamento disponíveis para diversas infecções bacterianas. O aumento da resistência bacteriana é impulsionado por vários fatores, incluindo o uso inadequado de antibióticos e a capacidade adaptativa das bactérias, que estão em constante evolução (Rezende-Júnior et al., 2020). A resistência começou a se espalhar mais rapidamente durante o século XX, com o aumento da prescrição inadequada de antibióticos, sua utilização em doses subterapêuticas na agricultura e o uso indiscriminado em hospitais. O uso massivo de antibióticos sem uma supervisão adequada levou à rápida seleção de cepas bacterianas resistentes (Baquero; Martínez; Cantón, 2008).

3.1.1 Mecanismos de Resistência

Os mecanismos pelos quais as bactérias se tornam resistentes aos antibióticos são variados e complexos, estes podem ser divididos em dois principais tipos: intrínseca e adquirida. A resistência intrínseca é um mecanismo natural de resistência que as bactérias possuem devido à sua estrutura biológica. Isso significa que certas espécies de bactérias são naturalmente imunes a determinados antibióticos devido a características específicas da sua membrana celular ou processos metabólicos. Por exemplo, Pseudomonas aeruginosa é naturalmente resistente a muitos antibióticos devido à sua membrana celular altamente impermeável (Nikaido, 2009).

Por outro lado, a resistência adquirida ocorre quando uma bactéria inicialmente sensível a um antibiótico desenvolve resistência a ele. Isso pode ocorrer por mutações genéticas espontâneas ou pela aquisição de genes de resistência provenientes de outras bactérias através de transferência horizontal. Um exemplo clássico de resistência adquirida é a resistência à meticilina em *Staphylococcus aureus* (MRSA), que evoluiu após o uso excessivo de antibióticos como a penicilina (Rezende-Júnior et al., 2020).

Além disso, nos mecanismos de resistência bacteriana se inserem as seguintes categorias gerais: mecanismos de modificação, desvio e proteção do alvo; modificação ou degradação de antibióticos; e prevenção de acesso ao alvo, por efluxo ou por diminuição da permeabilidade da parede celular (Belay et al., 2024) (Figura a).

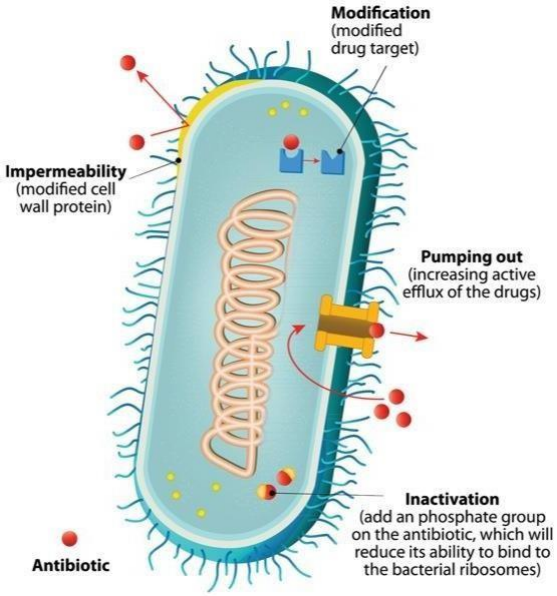


Figura a: Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos.

Fonte: Nicolsen e Stang (2019).

3.2 *Staphylococcus aureus (S. Aureus*)

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva que habitualmente, coloniza a pele e as mucosas, além do intestino, de seres humanos saudáveis, mas pode causar uma variedade de infecções, desde leves, como furúnculos e impetigo, até graves, como pneumonia, endocardite e septicemia (Cheung, 2021; Lowy, 1998). A versatilidade do *S. aureus* decorre da sua capacidade de produzir fatores de virulência e de adquirir resistência a múltiplas classes de antibacterianos (Chambers; Deleo, 2009).

A resistência à meticilina (MRSA) é atribuída ao gene *mecA*, que modifica a proteína PBP2a, reduzindo a eficácia de β-lactâmicos. Adicionalmente, cepas resistentes à vancomicina (VRSA) limitam ainda mais as opções terapêuticas disponíveis, representando um risco significativo em infecções hospitalares e comunitárias (Cong, 2020). Essa capacidade de adaptação permite que o *S. aureus* colonize diferentes ambientes no organismo e escape de mecanismos de defesa do hospedeiro. Entre os principais fatores de virulência estão as toxinas (como as enterotoxinas e a toxina do choque tóxico - TSST-1), a proteína A (que inibe a opsonização ao se ligar à porção Fc de IgG) e enzimas como coagulase, hialuronidase e lipases, que facilitam a disseminação tecidual (Girma, 2024). Além disso, a expressão gênica de muitos desses fatores é regulada por sistemas complexos, como o sistema Agr (accessory gene regulator), que coordena a produção de proteínas extracelulares e promove a virulência em resposta à densidade populacional bacteriana (Patel, 2023).

O aumento da incidência de cepas multirresistentes tem tornado o tratamento das infecções por *S. aureus* cada vez mais desafiador. Cepas MRSA são resistentes não apenas à meticilina, mas

frequentemente a outras classes, como macrolídeos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Já o surgimento do VRSA, associado à aquisição de genes como *vanA* (provenientes de enterococos), representa um marco preocupante, pois compromete a eficácia da vancomicina, considerada por décadas o tratamento de escolha para infecções graves por MRSA (Hou, 2023).

O MRSA está presente em ambientes não hospitalares, como academias, escolas e residências, e isso caracteriza uma transição epidemiológica preocupante. O aumento da incidência de MRSA afeta a populações que não apresentam os fatores de risco clássicos associados à transmissão hospitalar. Estudos observam que grupos como atletas, prisioneiros, crianças e outros têm sido descritos com infecções por MRSA adquiridas na comunidade, evidenciando a disseminação do patógeno em ambientes não hospitalares (Alvarez et al., 2010).

3.4 BOMBAS DE EFLUXO

As **bombas de efluxo** são uma das principais estratégias de resistência bacteriana, funcionando como transportadores ativos que expulsam os antibióticos e outras substâncias tóxicas do interior das células bacterianas, antes que possam exercer seus efeitos. Essas bombas pertencem a cinco famílias estabelecidas até o momento: ATP Binding Cassette (ABC), Multidrug and Toxin Extrusion (MATE), Small Multidrug Resistance (SMR), Major Facilitator Superfamily (MFS) e Resistance Nodulation Cell Division (RND) (Seukep et al., 2022).

Este tipo de mecanismo pode expulsar uma ampla gama de substâncias, incluindo antibióticos de diferentes classes, metais pesados e toxinas (Gaurav et al., 2023). A ação dessas bombas reduz a concentração intracelular dos antibióticos, tornando o tratamento mais difícil. Além disso, elas podem promover a resistência cruzada, ou seja, a resistência a múltiplos antibióticos, mesmo que as bactérias não apresentem mutações no alvo específico do antibiótico (Blanco et al, 2016).

A família RND, por exemplo, inclui bombas como AcrAB-TolC de Escherichia coli, que é capaz de expulsar uma grande variedade de antibióticos, como fluoroquinolonas e betalactâmicos (Anes et al., 2015). A NorA, da família MFS, presente em *Staphylococcus aureus*, é outra bomba de efluxo relevante, especialmente para a resistência a quinolonas (Irianti et al., 2023). Essas bombas são responsáveis por uma significativa parte da resistência bacteriana observada em infecções hospitalares, complicando os tratamentos antimicrobianos.

O papel das bombas de efluxo na resistência bacteriana tem implicações clínicas importantes, pois contribuem para o fracasso terapêutico e para a disseminação de cepas multirresistentes. Além disso, a expressão de genes codificadores dessas bombas podem ser induzida por estresse ambiental, incluindo a exposição subinibitória a antimicrobianos (Nikaido et al. 2012)

3.4.1 NorA

A bomba de efluxo NorA, pertencente à família Major Facilitator Superfamily (MFS), é um dos principais mecanismos de resistência antimicrobiana em *Staphylococcus aureus*. Codificada pelo gene norA, essa proteína transmembranar atua na extrusão de compostos hidrofílicos, como fluoroquinolonas (ex.: norfloxacino e ciprofloxacino), corantes (ex.: brometo de etídio) e biocidas, reduzindo sua concentração intracelular e comprometendo a eficácia terapêutica (Truong-Bolduc et al., 2024).

Estudos recentes indicam que a NorA está presente em 61 de 63 espécies de Staphylococcus, com função conservada no transporte de fármacos, sugerindo seu papel na adaptação ambiental da bactéria além da exposição a antibióticos (Ferreira et al., 2022).

A superexpressão da NorA tem sido associada à resistência em cepas clínicas de *S. aureus*, especialmente em isolados resistentes à meticilina (MRSA). Em um estudo com 126 isolados clínicos, o gene *norA* foi detectado em 75% das amostras, com expressão aumentada em cepas resistentes ao ciprofloxacino (Hamady et al., 2024).

3.4.2 MepA

A bomba de efluxo MepA, pertencente à família MATE (Multidrug and Toxin Extrusion), é o único membro dessa família identificado no genoma de *Staphylococcus aureus*. Codificada pelo gene mepA, essa bomba contribui significativamente para a resistência bacteriana ao extrusar diversos compostos antimicrobianos (Kaatz et al., 2006).

A MepA é uma proteína transmembranar composta por 451 aminoácidos, formando um canal que permite a expulsão de substâncias tóxicas do interior da célula bacteriana. Sua expressão é regulada negativamente por MepR, um repressor transcricional da família MarR, localizado imediatamente a montante do gene mepA (Dashtbani-roozbehani et al., 2021). Mutantes em mepR podem levar à superexpressão de MepA, aumentando a resistência a antibióticos como a tigeciclina (Huang et al., 2023).

A MepA confere resistência de baixo nível a diversos antimicrobianos, incluindo fluoroquinolonas hidrofílicas como norfloxacino e ciprofloxacino, além de biocidas e corantes. Embora esses antibióticos sejam substratos fracos da MepA em comparação com outras bombas como a NorA, sua atividade contribui para a resistência bacteriana (Dashtbani-roozbehani et al., 2021).

3.5 INIBIDORES DE EFLUXO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos representa uma ameaça crescente à saúde pública global. Entre os diversos mecanismos utilizados pelas bactérias para escapar à ação dos antibióticos, destacam-se as bombas de efluxo, proteínas transmembranares que promovem a extrusão ativa de agentes antimicrobianos do interior celular, reduzindo sua concentração intracelular e comprometendo sua eficácia terapêutica (Machado et al., 2024).

Cada classe de bomba de efluxo possui especificidades quanto à estrutura, fonte de energia utilizada e espectro de compostos transportados (Ding et al., 2023). Na *Staphylococcus aureus*, por exemplo, a bomba NorA pertencente a família MFS é particularmente eficiente na expulsão de quinolonas, enquanto a MepA, da família MATE, também contribui para resistência a antimicrobianos hidrofílicos como norfloxacino e ciprofloxacino (Araújo, 2024)

Os inibidores de bombas de efluxo (EPIs – Efflux Pump Inhibitors) surgem como agentes promissores na restauração da eficácia dos antibióticos. Esses compostos não necessariamente possuem atividade antimicrobiana direta, mas atuam bloqueando o funcionamento das bombas de efluxo, permitindo que os antibióticos permaneçam no interior celular em concentrações terapêuticas (SANTOS, 2023).

Apesar dos avanços promissores em ensaios laboratoriais, a aplicação clínica dos EPIs ainda enfrenta barreiras significativas. Os principais desafios envolvem a toxicidade para células humanas, a baixa seletividade pelas bombas bacterianas, além de problemas de biodisponibilidade e estabilidade dos compostos em ambiente fisiológico (Ding et al., 2023).

3.5.1 Hidralazina

A hidralazina é um derivado da ftalazina, classificado como uma hidrazina aromática. Sua fórmula molecular é $C_8H_8N_4$ e a massa molar é de aproximadamente 160,18 g/mol. Sua estrutura consiste em um anel de ftalazina com um grupo hidrazina na posição 1, o que é essencial para sua atividade vasodilatadora (Chemicalbook, 2025; Nist, 2025) (Figura b). A forma farmacêutica mais comum é o cloridrato de hidralazina, que apresenta maior estabilidade e solubilidade (NIH, 2024).

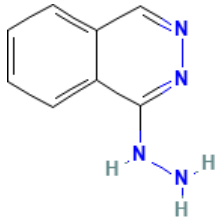


Figura b: Descrição estrutural da molécula de hidralazina (PUBCHEM, 2025).

3.6 MECANISMO DE AÇÃO E APLICAÇÕES CLÍNICAS

A hidralazina promove vasodilatação por meio do relaxamento direto da musculatura lisa arteriolar, resultando em uma significativa redução da resistência vascular periférica (Medicover hospitals, 2024)

Estudos demonstram que esse efeito ocorre por inibição da liberação de cálcio intracelular, especialmente via bloqueio da sinalização mediada por inositol trifosfato (IP3) (Gurney et al., 1995). Além disso, pesquisas recentes apontam para sua capacidade de induzir a expressão de HIF-1α, contribuindo para ações antioxidantes e vasoprotetoras, ampliando seu potencial terapêutico (Chang et al., 2022).

A hidralazina é utilizada no tratamento da hipertensão arterial, sendo particularmente indicada em casos refratários e em gestantes com pré-eclâmpsia. Sua ação vasodilatadora direta sobre as arteríolas contribui para a redução da pressão arterial (SANAR MED, 2023; Magee et al., 2003). A combinação de hidralazina com dinitrato de isossorbida tem mostrado benefícios significativos no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva, especialmente em pacientes afrodescendentes. Ensaios clínicos, como o A-HeFT, evidenciaram a redução da mortalidade e hospitalizações com essa terapia combinada (Fernandes-Silva et al., 2024; Latado et al., 2009).

Além de seus efeitos clássicos como vasodilatador, pesquisas recentes têm demonstrado que a hidralazina possui propriedades que ampliam significativamente seu potencial terapêutico. Estudos indicam que o fármaco é capaz de induzir a expressão do fator induzido por hipóxia 1-alfa (HIF-1α), promovendo efeitos antioxidantes e angiogênicos, o que pode contribuir para a proteção vascular e a regeneração tecidual (Zhou et al., 2006).

Paralelamente, outras investigações revelaram que a hidralazina ativa a via Nrf2-ARE, um importante mecanismo celular de defesa contra o estresse oxidativo. Essa ativação leva ao aumento da expressão de enzimas antioxidantes e da capacidade de resposta a insultos oxidativos (Guo et al., 2019). Em modelos murinos de Alzheimer, o fármaco demonstrou reduzir a neuroinflamação, restaurar a função mitocondrial e melhorar parâmetros cognitivos, via modulação das vias TLR4/NF-κB e Nrf2 (Wang et al., 2023).

Além disso, foi relatado que a hidralazina inibe a modificação de proteínas por produtos da peroxidação lipídica, como o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), o que reforça seu papel neuroprotetor em doenças neurodegenerativas como o Alzheimer (Maheshwari et al., 2010).

Esses dados evidenciam o potencial multifuncional da hidralazina, sugerindo sua utilidade terapêutica em patologias inflamatórias, cardiovasculares e neurodegenerativas.

3.7 APLICAÇÕES NA MICROBIOLOGIA

Pesquisas recentes demonstraram que a hidralazina possui atividade antifúngica, especialmente contra cepas de *Candida spp.* resistentes ao fluconazol. Um estudo realizado por Nascimento (2023) mostrou que a hidralazina, isolada ou combinada com itraconazol, foi eficaz na inibição do crescimento de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata*.

Os mecanismos propostos para essa atividade incluem a indução de espécies reativas de oxigênio (EROS), levando ao estresse oxidativo e à morte celular, além da despolarização do potencial transmembrana mitocondrial, resultando em apoptose (Nascimento, 2018). Também foi evidenciado que a hidralazina causa danos ao DNA, conforme ensaios cometa, sugerindo que o fármaco provoca quebras na fita de DNA das células fúngicas (Nascimento, 2023).

Outro aspecto importante é sua eficácia na redução da viabilidade de biofilmes formados por *Candida albicans*, estruturas altamente resistentes aos tratamentos antifúngicos convencionais (Nascimento, 2023).

3.8 HIDRAZONAS

As hidrazonas constituem uma importante classe de compostos orgânicos derivados da reação de condensação entre uma hidrazina e um composto carbonílico, como aldeídos ou cetonas. A formação de hidrazonas ocorre por um mecanismo de adição nucleofílica, no qual o átomo de nitrogênio terminal da hidrazina ataca o carbono eletrofílico da carbonila, formando inicialmente um intermediário do tipo hemiaminal. Em seguida, há eliminação de água, originando a hidrazona. Essa reação é favorecida em condições levemente ácidas, que ativam a carbonila, mas o produto obtido tende a ser mais estável em meio neutro ou básico (Carey; Sundberg, 2007). Abaixo, na Figura c, pode-se observar a estrutura geral das hidrazonas.

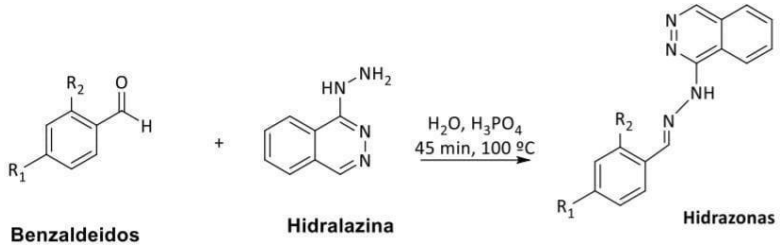


Figura c: Estrutura geral das Hidrazonas.

3.9 DOCAGEM MOLECULAR

A docagem molecular é uma ferramenta computacional essencial na química medicinal moderna, utilizada para prever a orientação preferencial de uma molécula (ligante) quando ligada a uma proteína alvo (receptor), empregando algoritmos de busca e funções de pontuação para avaliar

as conformações e otimizar a velocidade e precisão da análise (Trott; Olson, 2010). Este método permite simular as interações intermoleculares e estimar a afinidade de ligação, expressa em energia livre, ajudando a elucidar o mecanismo de ação de novos compostos bioativos e a selecionar as poses mais estáveis para análises subsequentes.

No contexto da resistência bacteriana, a docagem molecular é aplicada para investigar como potenciais inibidores interagem com os sítios ativos das bombas de efluxo, como a NorA e MepA em *Staphylococcus aureus*. A validação dessas interações é frequentemente realizada comparando-se a posição do ligante teste com substratos clássicos ou inibidores conhecidos, observando-se parâmetros como o desvio quadrático médio (RMSD), onde valores baixos (geralmente ≤ 2,0 Å) indicam uma predição acurada da conformação experimental (Yusuf et al., 2008).

Estudos in silico demonstraram que compostos que estabelecem interações estáveis, caracterizadas por energias de afinidade favoráveis — geralmente consideradas significativas quando inferiores a -6,0 kcal/mol (Shityakov; Förster, 2014) —, podem atuar como moduladores competitivos. A formação de ligações de hidrogênio e contatos hidrofóbicos com resíduos de aminoácidos específicos dentro do canal de efluxo é fundamental para impedir a extrusão de antibióticos e restaurar sua eficácia terapêutica (Coutinho et al., 2023).

3.10 PROPRIEDADES DE ADMET E DRUG-LIKENESS

O desenvolvimento de novos fármacos requer não apenas eficácia biológica, mas também um perfil de segurança e farmacocinética adequado. As propriedades de ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) são avaliadas para prever o comportamento de uma substância no organismo humano e otimizar a seleção de candidatos a fármacos (Pires; Kaminskas; Ascher, 2018).

Para estimar a biodisponibilidade oral de um composto, utilizam-se critérios como a "Regra dos Cinco" de Lipinski, que postula que uma molécula tem maior probabilidade de ser bem absorvida se apresentar peso molecular ≤ 500 Da, LogP ≤ 5, até 5 doadores e 10 aceptores de ligação de hidrogênio (Lipinski, 2004). Complementarmente, a regra de Veber adiciona parâmetros como a área de superfície polar topológica (TPSA) e o número de ligações rotacionáveis para refinar a predição da biodisponibilidade oral (Veber et al., 2002).

Além disso, a predição in silico da toxicidade e de parâmetros farmacocinéticos, como a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BBB), é crucial para identificar precocemente riscos e eficácia. Ferramentas computacionais, como o SwissADME, permitem a identificação de grupos farmacofóricos tóxicos e a estimativa de riscos como hepatotoxicidade e mutagenicidade, orientando a seleção de compostos mais seguros para as etapas pré-clínicas (Daina; Michielin; Zoete, 2017).

Artigo 1 – Avaliação da Atividade Antibacteriana Direta, Efeito Potencializador de Antibióticos e Estudo In Silico de Docking e ADMET de um Derivado da Hidralazina Contra Bactérias que Possuem Bombas de Efluxo

Karla Susanna Tavares Grangeiro Belém[a], Janaina Esmeraldo Rocha[a], Davi Ramalho Furtado[a], Milena Oliveira Andrade Moreira[a], José Weverton Almeida-Bezerra[a], Ana Joyce Morais Bento[a], Jaiza Maria Lima Dias[c], Jessiaca Bezerra Maciel[b], Henrique Douglas Melo Coutinho[a], Francisco das Chagas Lima Pinto[d], Emmanuel Silva Marinho[b], Marcia Machado Marinho[b], Alexandre Magno Rodrigues Teixeira[b], Hélcio S. dos Santos1,2,3*

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

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

Fortaleza, CE, Brasil

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

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

* **Corresponding author:** State University of Vale do Acaraú, Chemistry Course, Sobral, CE, Brazil. E-mail addresses: helcio_santos@uvanet.br

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

Revista: Journal of Infection and Chemotherapy/ Qualis: A4/ Situação: Submetido

ABSTRACT

A resistência bacteriana representa um dos maiores desafios da saúde pública contemporânea, comprometendo a eficácia dos antibióticos convencionais. Nesse contexto, pesquisas focadas na descoberta de novos compostos e moduladores de resistência têm recebido atenção crescente. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e o potencial modulador de antibióticos de um derivado hidrazônico da hidralazina contra cepas de *Staphylococcus aureus* que possuem bombas de efluxo. O composto HDZH2OH foi sintetizado a partir de hidralazina e

isoniazida e avaliado utilizando o ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo, bem como ensaios de modulação de resistência em associação com antibióticos específicos e brometo de etídio.

Os resultados demonstraram que o HDZH2OH apresentou valores de CIM ≥ 1024 μg/mL contra ambas as cepas testadas, indicando ausência de atividade antibacteriana intrínseca. Entretanto, na cepa *S. aureus* 1199B, foi observada uma redução da CIM da norfloxacina de 256 μg/mL para 101,59 μg/mL, sugerindo um efeito potencializador parcial. Na cepa K2068, não foi observada potencialização da ciprofloxacina; contudo, foi detectada uma redução significativa da CIM do brometo de etídio de 8 μg/mL para 2 μg/mL ($p < 0,001$). Esses achados indicam que o composto atua como um modulador seletivo de bombas de efluxo, com maior afinidade pelo sistema MepA, destacando seu potencial como adjuvante terapêutico no combate à resistência bacteriana.

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

INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana tem sido uma das principais ameaças à saúde pública em todo o mundo. O aumento da resistência das bactérias aos antibióticos compromete a eficácia terapêutica, afetando doenças que antes eram tratáveis com agentes antimicrobianos convencionais. Esse fenômeno está principalmente associado ao uso inadequado e ao consumo excessivo de antibióticos (Patini et al., 2020). A resistência bacteriana dificulta o tratamento de infecções ao reduzir a eficácia antimicrobiana, aumentar o risco de transmissão de doenças graves e elevar as taxas de mortalidade (Murugaiyan et al., 2022).

Staphylococcus aureus é um dos microrganismos multirresistentes mais significativos devido à sua alta capacidade de adquirir mecanismos de resistência. Essa bactéria representa um sério risco à saúde, causando rápida deterioração clínica em pacientes infectados e podendo levar à morte (Walvekar et al., 2019). Cepas de *S. aureus* desenvolveram mecanismos de resistência contra numerosos fármacos antimicrobianos comumente utilizados, incluindo agentes empregados no tratamento de infecções por Gram-positivos, como β-lactâmicos, glicopeptídeos e oxazolidinonas (Mlynarczyk-Bonikowska et al., 2022).

A penicilina e a meticilina foram amplamente utilizadas no tratamento de infecções por *S. aureus*, mas gradualmente perderam sua eficácia. Devido à sua plasticidade, a espécie desenvolveu a capacidade de produzir penicilinase, uma enzima capaz de hidrolisar o anel β-lactâmico desses fármacos, levando à resistência (Guo et al., 2020).

Diante dos problemas causados pelo desenvolvimento da resistência aos antibióticos, novas alternativas terapêuticas vêm sendo ativamente buscadas. Compostos como as hidrazonas têm sido

investigados para melhor compreender seu potencial de atividade contra cepas resistentes. As hidrazonas têm sido relatadas como moduladoras da atividade antibiótica e capazes de apresentar propriedades antimicrobianas contra cepas multirresistentes de *S. aureus* (Nery et al., 2023).

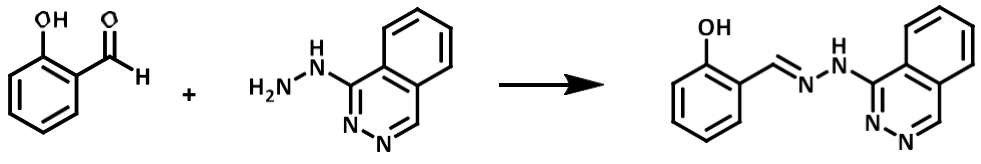
A hidralazina tem sido amplamente utilizada como vasodilatador no tratamento da hipertensão. Segundo Spinasse (2014), seu metabolismo ocorre principalmente no fígado por meio de reações de acetilação, formando hidrazonas que podem influenciar a redução da pressão arterial. Além de seu efeito vasodilatador, a hidralazina demonstrou outros potenciais farmacológicos, como atividade antifúngica contra Candida spp. (Nascimento et al., 2023) e atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (Nascimento et al., 2024).

Portanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar um derivado hidrazônico da hidralazina, com foco em sua atividade antimicrobiana e capacidade de inibição de bombas de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Síntese e caracterização da hidrazona

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



Esquema 1. Síntese da hidrazona

1H NMR (500 MHz, DMSO); δH 12.16 (s, NH-1), 10.33 (s, OH-2'), 8.69 (s, H-7"), 8.31 (d, J = 7.7 Hz, H-8), 8.11 (s, H-4), 7.84 (d, J = 7.5 Hz, H-3'), 7.75 (3H, m, H-5/H-6/H-7), 7.27 (t, J = 7.6 Hz, H-4'), 6.92 (d, J = 7.5 Hz, H-6'), 6.89 (t, J = 7.6 Hz, H-5'). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO); δH 157.0 (C-2'), 154.0 (C-7'), 147.0 (C-1), 137.9 (C-4), 132.2 (C-6), 131.8 (C-7), 131.0 (C-4'), 130.0 (C-1'), 126.9 (C-4a), 126.4 (C-5), 126.1 (C-8a), 123.7 (C-8), 120.2 (C-6'), 119.2 (C-5'), 116.1 (C-3').

Substâncias

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

Microrganismos utilizados nos ensaios de inibição

As cepas de *Staphylococcus aureus* que foram utilizadas: 1199B E K2068 cepa resistente a fluroquinolonas hidrofílicas via proteína de efluxo NorA e MepA respectivamente.

Preparo e padronização dos inóculos

Nos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram preparados inóculos oriundos a partir dos estoques. Desse estoque, foram cultivados novamente em meio sólido Heart Infusion Agar slants e mantido a 37 ºC. A partir desse meio sólido foi feito inóculo utilizando tubos de ensaio contendo solução salina estéril, o qual foi padronizado de acordo com a escala Mcfarland 0.5 que corresponde a 10^8 UFC (Unidades Formadoras de Colônias). Esse método padrão de inoculo é utilizado tanto nos ensaios de CIM das substâncias quanto nos de verificação de inibição de bomba de efluxo.

Ensaios de Concentração Inibitória Mínima

A partir do estoque em meio sólido HIA foi feita uma repicagem em HIA e mantida em estufa bacteriológica a 37 ºC por 24 h. Seguindo os ensaios, foi preparado o meio de distribuição em eppendorfs, utilizando-se 100 µL do inóculo em 900 µL do meio de cultura líquido BHI. Posteriormente, o conteúdo do eppendorf foi transferido para placa de microdiluição de 96 poços, onde foram utilizados 100 µL em cada poço. Após essa etapa, foi realizada a microdiluição das substâncias, sendo adicionados 100 µL nesse meio até a penúltima cavidade (1:1), permanecendo a última cavidade como controle de crescimento. As concentrações variaram de 512 µg/mL a 8 µg/mL, conforme metodologia empregada para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), definida como a menor concentração de um composto capaz de inibir o crescimento bacteriano visível em ensaios de microdiluição em caldo (Kadeřábková et al., 2024).

Após 24 h de incubação, foi realizada a leitura das placas por visualização da mudança de cor do meio, caracterizada pela adição de 20 µL de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido). A leitura desse experimento baseia-se na redução da resazurina por células metabolicamente ativas, promovendo a mudança da coloração azul para rosa/vermelho, o que indica a presença de crescimento bacteriano, enquanto a permanência da coloração azul indica ausência de crescimento microbiano (Herman et al., 2024). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Ensaio de redução do efluxo por redução do CIM

Para verificar o efeito de redução do CIM do brometo de etídeo, foi utilizado inóculos a parti de placas incubadas em estufa bacteriológica por 24h a 37 ºC com o repique do estoque. Após esse período foi utilizado inóculos em solução salina de acordo com Mcfarland 0.5 que corresponde a 10^8 UFC (Unidades Formadoras de Colônias). Como etapa inicial, foi preparado em eppendorfs o meio de distribuição do teste e do controle. No teste foi colocado 150 µL do inóculo, mais substância em concentração sub-inibitória (CIM/8) e completado o volume do eppendorf até o volume de 1,5 mL. Para o controle foi colocado o mesmo volume de inóculo do teste e completado o volume do eppendorf até 1,5 mL. Em seguida foi transferido para placas de microdiluição de 96 poços, com distribuição vertical, caracterizada pela adição de 100 µL do conteúdo do eppendorf em cada poço. Após essa etapa foi realizada a microdiluição do brometo de etídeo, sendo 100 µL nesse meio até penúltima cavidade (1:1). Na última cavidade não foi adicionada por ser o controle de crescimento. As concentrações variaram de 512 µg/mL a 0,5 µg/mL. Após 24 h de incubação, realizou-se a leitura das placas por meio da visualização da mudança de cor do meio, caracterizada pela adição de 20 µL de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido). A redução da CIM do brometo de etídeo ou de antibióticos específicos em cepas portadoras de bombas de efluxo é considerada um indicativo de inibição desses sistemas de resistência bacteriana, conforme metodologia descrita por Tintino *et al.* (2020). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A mesma metodologia foi aplicada aos antibióticos testados.

Análise Estatística

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

Detalhes computacionais

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

Preparação e otimização do ligante

A estrutura da chalcona (HDZH2OH) foi inicialmente construída utilizando a interface gráfica do MarvinSketch (ChemAxon, https://chemaxon.com/products/marvin) e, posteriormente, submetida à otimização conformacional usando o campo de força clássico MMFF94 (Merck Molecular Force Field 94). As etapas de minimização de energia foram realizadas com o programa Avogadro® (Snyder; Kucukkal, 2021), configurado para empregar o formalismo MMFF94 e o algoritmo Steepest Descent, com um total de 500 iterações e critério de convergência estabelecido em 1×10^{-7} (Donchev et al., 2005).

Obtenção e preparação das estruturas proteicas

As sequências de aminoácidos de MepA de *Staphylococcus aureus* K2068 e NorA de *S. aureus* 1199B foram adaptadas de acordo com De Araújo et al. (2025) e Freitas et al. (2024, 2022). A MepA foi obtida do banco de dados Universal Protein Resource (UniProt, http://www.uniprot.org), depositada sob o código NCTC8325 (Pundir et al., 2016; Warraich et al., 2021). Assim, a construção do modelo proteico foi realizada utilizando o servidor SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org/), que identifica modelos estruturais por meio de alinhamento de sequências usando o algoritmo HMM-HMM-based lightning-fast iterative sequence search (HHblits) (Remmert et al., 2012). Com base no alinhamento, a estrutura com maior similaridade foi selecionada para a construção do modelo; dessa forma, o transportador de extrusão de múltiplos fármacos e compostos tóxicos (MATE) de Bacillus halodurans (PDB: 5C6N) foi escolhido para este estudo (Costa et al., 2025; Radchenko et al., 2015). Para NorA, a estrutura foi obtida do RCSB Protein Data Bank (https://www.rcsb.org) sob o código PDB 7LO7 (NorA em complexo com Fab25), com resolução de 3,74 Å, determinada por microscopia eletrônica, e classificada como proteína transportadora de *Staphylococcus aureus*/Homo sapiens, conforme recentemente caracterizado por Brawley et al. (2022).

Procedimentos gerais de docking

As simulações de docking molecular foram realizadas utilizando o AutoDock Vina® (Trott; Olson, 2010), empregando caixas de grade (grid boxes) configuradas para abranger completamente as estruturas-alvo. Para a proteína MepA, a caixa foi centralizada nas coordenadas 9,189 (x), −19,589 (y) e −19,523 (z), com dimensões de 84 (x), 98 (y) e 118 (z) Å. Para NorA, a caixa foi centralizada em 139,133 (x), 138,065 (y) e 155,834 (z) Å, com dimensões de 108 (x), 126 (y) e 126 (z) Å. As estruturas tridimensionais das proteínas e dos ligantes foram previamente preparadas com a adição de cargas parciais de Gasteiger e Kollman, e os hidrogênios apolares foram fundidos aos respectivos átomos pesados, seguindo os protocolos padrão do AutoDock Vina®. Todos os demais parâmetros foram mantidos em seus valores padrão (Wiley et al., 2006). Foram realizadas 50 execuções independentes de docking por ligante, cada uma gerando 20 conformações de ligação (poses), utilizando um parâmetro de exaustividade de 64 para garantir uma amostragem robusta do espaço conformacional. A pose representativa foi selecionada com base na energia livre de ligação mais favorável (menores valores previstos de afinidade) e considerada a conformação mais estável para análises estruturais e energéticas subsequentes do complexo ligante–proteína (Agarwal; Smith, 2023).

Para validar estatística e metodologicamente os protocolos de docking, foram realizadas simulações de redocking, nas quais as conformações dos ligantes co-cristalizados foram reencaixadas em suas respectivas proteínas-alvo. A acurácia do redocking foi avaliada por meio do cálculo do desvio quadrático médio (RMSD) entre a pose predita e a estrutura experimental. Valores de RMSD $\leq$ 2,0 Å foram adotados como critério de validação satisfatória, de acordo com as recomendações da literatura (Yusuf et al., 2008). A estabilidade dos complexos proteína–ligante foi inferida com base na energia livre de ligação estimada pelas simulações. Complexos com valores de afinidade inferiores a −6,0 kcal/mol foram considerados energeticamente favoráveis e potencialmente estáveis (Shityakov; Förster, 2014). Todas as simulações foram realizadas sob condições de parametrização idênticas, garantindo consistência metodológica e permitindo comparações robustas. O desempenho dos ligantes de interesse foi comparado com os antibióticos de referência CCCP (carbonil cianeto m-clorofenil-hidrazona), CPZ (clorpromazina) e EtBr (brometo de etídio), utilizados como controles positivos nos respectivos sistemas.

Propriedades de semelhança a fármacos e ADME

Com base no protocolo descrito por Rocha et al. (2021), as propriedades físico-químicas do composto HDZH2O foram determinadas utilizando o software MarvinSketch (ChemAxon, licença acadêmica). Os parâmetros calculados foram avaliados de acordo com os critérios de semelhança a fármacos, seguindo a regra dos cinco de Lipinski (Lipinski, 2004; Lipinski et al., 2012; Pfizer) e a regra de Veber (Veber, 2002; GSK), que consideram limites críticos para propriedades como logP,

peso molecular, número de doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, área de superfície polar topológica (TPSA) e número de ligações rotacionáveis. Além disso, foi aplicado o algoritmo de otimização multiparamétrica para penetração no sistema nervoso central (CNS MPO) (Pires et al., 2018), implementado no próprio software, para prever o potencial do composto atravessar a barreira hematoencefálica (BBB), critério relevante para fármacos de ação central. Os parâmetros farmacocinéticos relacionados à absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) foram estimados por meio de uma abordagem de consenso, combinando dados preditivos do servidor PreADMET, baseados em modelos in vitro (https://preadmet.bmdrc.kr/adme-prediction/), com os resultados das ferramentas de triagem in silico do servidor SwissADME (http://www.swissadme.ch/), aumentando a robustez das inferências quanto à viabilidade biofarmacêutica do composto.

Farmacóforos tóxicos e efeitos toxicológicos

A identificação dos grupos farmacofóricos foi realizada por meio de triagem virtual de alto desempenho (High-Throughput Screening, HTS) utilizando a plataforma eMolTox (https://xundrug.cn/moltox). Esse procedimento possibilitou a detecção automatizada de subestruturas moleculares associadas à toxicidade, reatividade química ou instabilidade metabólica, com base em algoritmos preditivos validados. As subestruturas identificadas como alertas toxicológicos foram posteriormente analisadas quanto à sua correlação com possíveis efeitos adversos, utilizando o composto HDZH2O como modelo de similaridade estrutural. Essa análise foi complementada com dados das bases preditivas dos servidores PreADMET (https://preadmet.bmdrc.kr/toxicity/) e ProTox-3.0 (https://tox.charite.de/protox3/index.php?site=home), permitindo a associação entre as subestruturas identificadas e os respectivos riscos toxicológicos, como hepatotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade e toxicidade aguda.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do ponto de vista estrutural, o composto HDZH2OH é um derivado hidrazônico da hidralazina, caracterizado pela presença do grupo funcional hidrazona (–C=N–NH–) resultante da condensação entre hidralazina e isoniazida. Essa estrutura apresenta um sistema conjugado capaz de atuar tanto como doador quanto como aceptor de ligações de hidrogênio, além de apresentar lipofilicidade moderada. Essas características estruturais favorecem interações com a membrana bacteriana e com proteínas transmembranares, como as bombas de efluxo, sem necessariamente induzir um efeito bactericida direto. Estudos anteriores indicam que hidrazonas com esse perfil estrutural são mais propensas a modular mecanismos de resistência do que a inibir diretamente o

crescimento bacteriano, o que é consistente com os achados deste estudo (Rollas; Küçükgüzel, 2007; Nery et al., 2023).

O método da Concentração Inibitória Mínima (CIM) é amplamente utilizado para determinar a menor concentração de um composto capaz de inibir o crescimento bacteriano visível e é considerado um ensaio padrão para avaliação da atividade antimicrobiana e de moduladores de resistência (Kadeřábková et al., 2024). No presente estudo, os valores de CIM do composto hidrazônico HDZH2OH contra as cepas de *S. aureus* 1199B (NorA) e K2068 (MepA) foram ≥ 1024 μg/mL, indicando ausência de atividade antibacteriana intrínseca significativa quando o composto foi testado isoladamente.

Esse comportamento é consistente com diversos estudos que demonstram que hidrazonas e derivados da hidralazina frequentemente não apresentam forte atividade antimicrobiana direta, atuando principalmente como moduladores de resistência, interferindo nos mecanismos adaptativos bacterianos, particularmente nas bombas de efluxo (Coutinho et al., 2011; Tintino et al., 2020; Nery et al., 2023).

O efeito potencializador do HDZH2OH é ilustrado nos gráficos a seguir. Quando associado à norfloxacina contra a cepa *S. aureus* 1199B, observou-se uma redução da CIM de 256 μg/mL para 101,59 μg/mL, indicando um possível efeito potencializador, conforme mostrado no Gráfico 1. Entretanto, essa redução foi menos pronunciada do que a observada na presença de CCCP e CPZ, sugerindo atividade parcial ou indireta sobre o mecanismo de resistência.

Resultados semelhantes foram relatados por Nascimento et al. (2024), que demonstraram que a hidralazina e seus derivados podem potencializar antibióticos contra *S. aureus* resistente à meticilina sem apresentar atividade antibacteriana significativa quando testados isoladamente. Esses achados sustentam a hipótese de que compostos hidrazônicos podem atuar como adjuvantes terapêuticos, restaurando parcialmente a eficácia de antibióticos comprometida por mecanismos de efluxo.

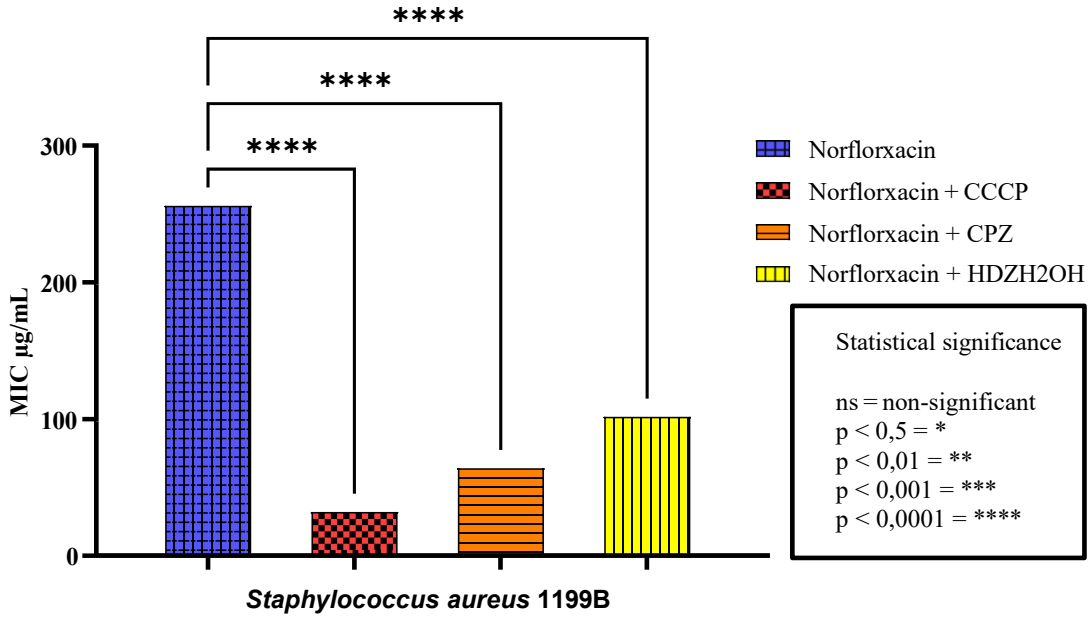


Gráfico 1: CIMs (MICs) do Norfloxacino na presença e ausência de HDZH2OH, assim como de Clorpromazina (CPZ) e carbonil cianeto-3-clorofenilhidrazona (CCCP) frente a cepa 1199B (NorA) de *S. aureus*.

**** p>0,0001

O Gráfico 2 mostra os resultados da associação entre HDZH2OH e brometo de etídio (EtBr). O EtBr isolado apresentou CIM de 12,69 µg/mL, enquanto sua associação com o composto reduziu a CIM para 8 µg/mL. Entretanto, essa redução não foi estatisticamente significativa, indicando que o HDZH2OH não exerce efeito inibitório relevante sobre o sistema de efluxo NorA na cepa 1199B.

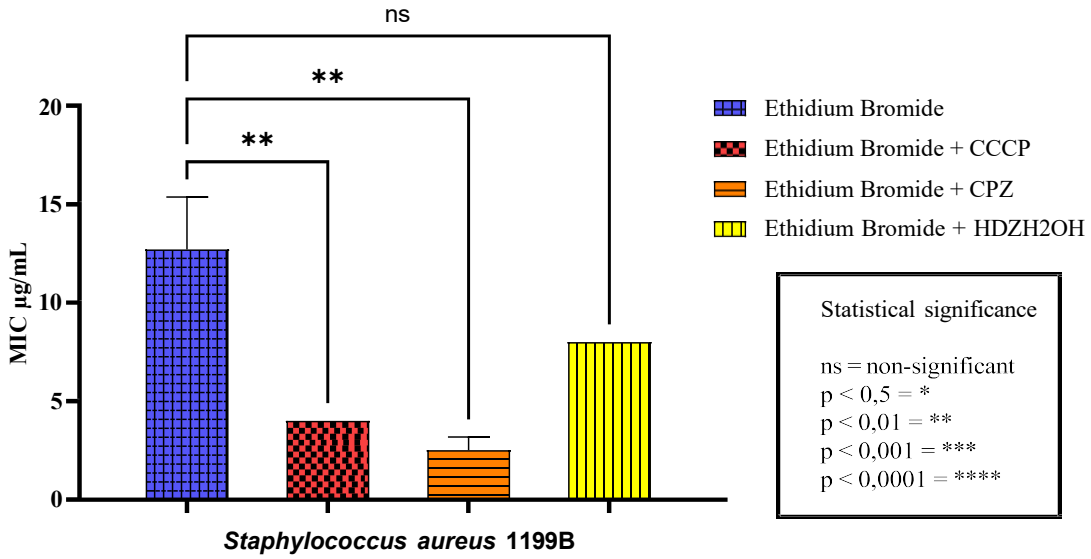


Gráfico 2: CIMs (MICs) do Brometo de Etídio na presença e ausência de HDZH2OH, assim como de Clorpromazina (CPZ) e carbonil cianeto-3-clorofenilhidrazona (CCCP) frente a cepa 1199B (NorA) de *S. aureus*

O Gráfico 3 apresenta os valores de CIM obtidos para a ciprofloxacina, utilizada como antibiótico específico para a bomba MepA na cepa K2068. Na ausência do composto, a CIM observada foi de 16 µg/mL, enquanto na presença de HDZH2OH, aumentou para 25,40 µg/mL. Esse comportamento sugere ausência de efeito potencializador e pode indicar interferência negativa na atividade do antibiótico, possivelmente devido a interações químicas entre o composto e o fármaco.

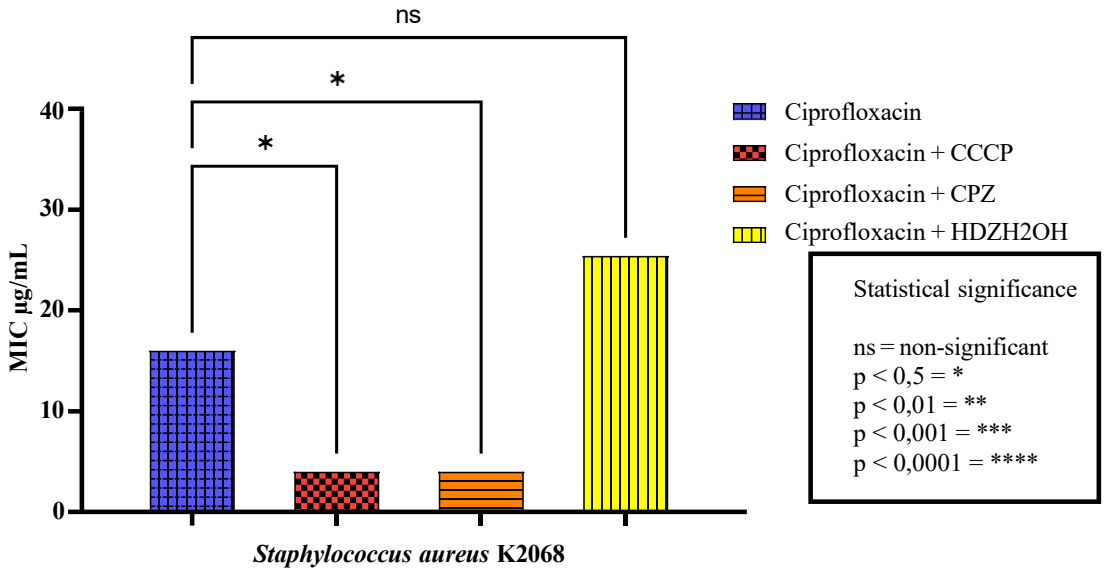


Gráfico 3: CIMs (MICs) do Ciprofloxacino na presença e ausência de HDZH2OH, assim como de Clorpromazina (CPZ) e carbonil cianeto-3-clorofenilhidrazona (CCCP) frente a cepa K2068 (MepA) de *S. aureus*.

O Gráfico 4 demonstra os valores de CIM do brometo de etídio isolado e em associação com HDZH2OH e inibidores padrão (CPZ e CCCP). O EtBr isolado apresentou CIM de 8 µg/mL, que foi reduzida para 2 µg/mL na presença do composto ($p < 0,001$), indicando redução estatisticamente significativa. Esse resultado demonstra que o HDZH2OH apresenta atividade inibitória efetiva contra o sistema de efluxo MepA, caracterizando-o como um potencial modulador de bombas de efluxo nessa cepa.

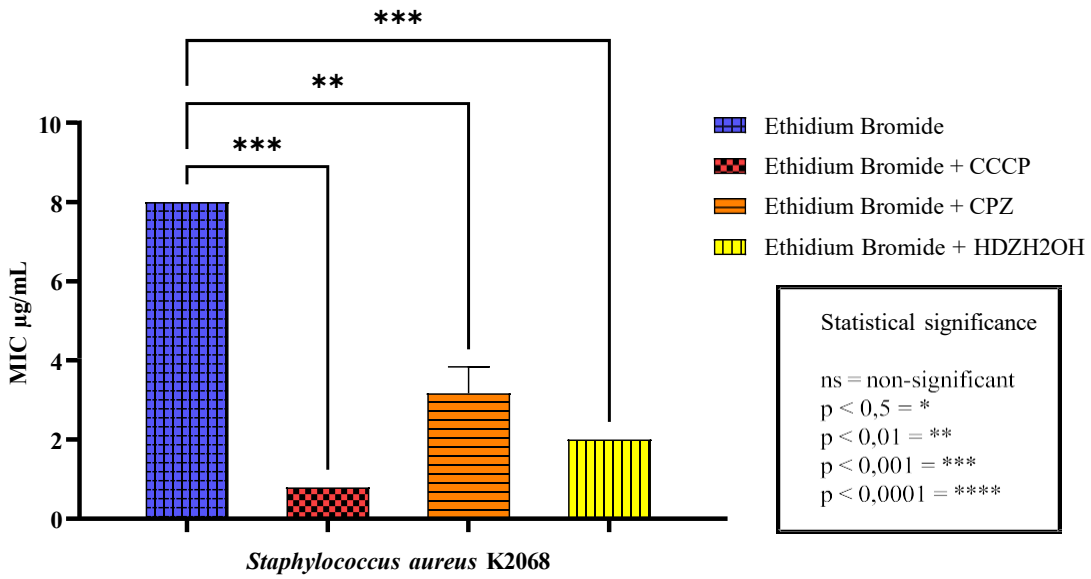


Gráfico 4: CIMs (MICs) do Brometo de Etídio na presença e ausência de HDZH2OH, assim como de Clorpromazina (CPZ) e carbonil cianeto-3-clorofenilhidrazona (CCCP) frente a cepa K2068 (MepA) de *S. aureus*

Esses achados sugerem que o HDZH2OH apresenta atividade seletiva, possivelmente relacionada a diferenças estruturais e funcionais entre as bombas de efluxo NorA e MepA, que, embora ambas pertençam à família MFS, apresentam sítios de ligação ao substrato e mecanismos de extrusão distintos (Schindler et al., 2015; Costa et al., 2022).

A ausência de potencialização da ciprofloxacina na cepa K2068, juntamente com o aumento observado da CIM, pode estar relacionada a interações físico-químicas entre o antibiótico e o composto hidrazônico, resultando em redução da biodisponibilidade do fármaco ou competição por sistemas de transporte. Fenômenos semelhantes foram descritos para associações envolvendo compostos aromáticos contendo nitrogênio e fluoroquinolonas (Tintino et al., 2020; Nascimento et al., 2023).

Do ponto de vista estrutural, a hidrazona HDZH2OH apresenta um núcleo hidrazônico conjugado (–C=N–NH–), capaz de atuar como doador e aceptor de ligações de hidrogênio e exibindo lipofilicidade moderada. Essas características favorecem sua interação com a membrana bacteriana e com proteínas transmembranares, como as bombas de efluxo, sem necessariamente induzir lise celular ou inibição direta do crescimento bacteriano (Rollas; Küçükgüzel, 2007; Nery et al., 2023).

Além disso, a presença de grupos aromáticos e heteroátomos pode contribuir para a afinidade do composto por sítios hidrofóbicos no interior das proteínas transportadoras, explicando a seletividade observada em relação à bomba de efluxo MepA. Estudos de modelagem molecular e docking realizados com hidrazonas estruturalmente relacionadas demonstraram interações estáveis

com regiões internas das bombas de efluxo, reforçando essa hipótese mecanística (Santos et al., 2022; Coutinho et al., 2023).

De modo geral, os resultados corroboram a literatura ao demonstrar que a hidrazona derivada da hidralazina avaliada neste estudo, em concordância com relatos anteriores sobre hidrazonas relacionadas, atua principalmente como modulador de resistência, com efeitos dependentes da cepa bacteriana, do tipo de bomba de efluxo e do substrato utilizado. A atividade diferenciada do HDZH2OH frente às bombas NorA e MepA destaca a importância de avaliações individualizadas e reforça o potencial desses compostos como adjuvantes no tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus* multirresistente.

Com base em um conjunto de simulações independentes de docking molecular, observou-se que o ligante HDZH2O apresenta afinidade de interação com a bomba de efluxo MepA da cepa *Staphylococcus aureus* K2068, ocupando o mesmo domínio de interação que os substratos CCCP e EtBr, bem como o controle clorpromazina (CPZ) (Fig. 5(A)), o que sugere uma sobreposição espacial relevante para a modulação da atividade da proteína. A análise dos complexos derivados do docking revelou ainda que o HDZH2O apresentou afinidade significativa pela MepA, com energia de ligação calculada de −7,2 kcal/mol, e demonstrou alta seletividade espacial para o sítio de interação, sustentada principalmente por contatos hidrofóbicos com regiões alifáticas e por interações de anéis aromáticos envolvendo os resíduos Phe60, Met63, Phe150, Phe154, Thr202 e Gln206 (Fig. 5(E) e Tabela 1), indicando um modo de ligação direcionado e fortemente dependente da complementaridade lipofílica.

Table 1. Dados sobre interações ligante–receptor (L–R) no processo de redocking do agonista CPZ, substratos clássicos CCCP e EtBr, e simulações de docking molecular do HDZH2O, via receptor da bomba de efluxo MepA.

Compd	EA (kcal/mol)	RMSD (Å)	Inter. type	Residues / distances (Å)
CCCP	-5.9	1.425	Hydrophobic	Tyr36 (3.94), Phe150 (4.43), Phe154 (3.45), Pro176 (3.56), Pro176 (4.55), Thr202 (3.86), Gln206 (4.49)
			H-bond	Asn37 (4.07), Tyr139 (3.94)
CPZ	-5.9	1.448	Hydrophobic	Phe60 (4.09), Met63 (4.02), Tyr130 (4.47), Phe154 (3.65), Thr202 (4.61), Gln206 (3.90)

EtBr	-6.8	1.524	Hydrophobic	Met33 (0.72), Tyr36 (3.98), Tyr36 (4.93), Asn37 (3.72), Phe60 (4.61), Phe154 (3.56), Pro176 (4.19), Thr202 (4.73)
			H-bond	Gln206 (3.13)
			π-Stacking	Tyr36 (5.33)
HDZH2OH	-7.2	1.997	Hydrophobic	Met33 (0.99), Tyr36 (4.52), **Phe60** (4.24), **Met63** (4.27), Tyr139 (4.86), **Phe150** (3.57), **Phe154** (3.90), Pro176 (4.15), Pro176 (3.66), **Thr202** (4.76), **Gln206** (4.70)
			H-bond	Asn37 (3.16)

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

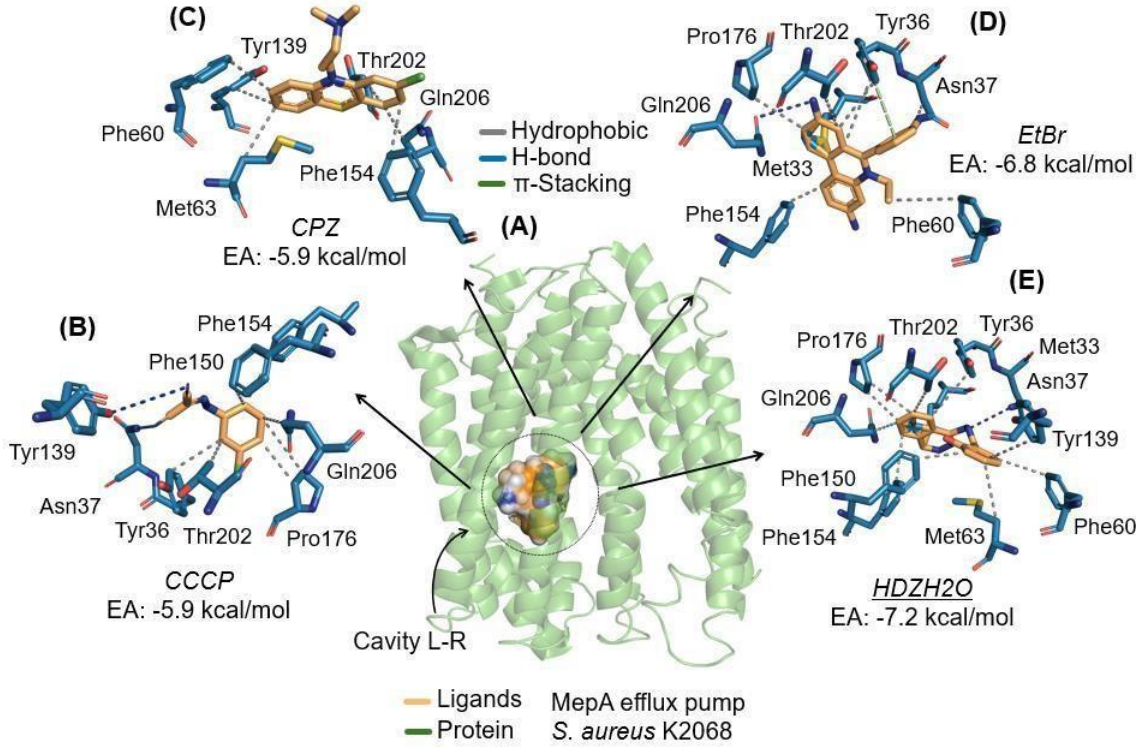


Fig. 5. (A) Visualização tridimensional do docking do ligante na bomba de efluxo MepA, cepa *S. aureus* K2068, e visualização tridimensional das interações ligante–receptor entre resíduos de aminoácidos (cor azul) da bomba de efluxo MepA para os ligantes (cor nude): (B) CCCP, (C) CPZ, (D) EtBr e (E) HDZH2O.

O brometo de etídio (EtBr, −6,8 kcal/mol) e o carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona (CCCP, −5,9 kcal/mol), que são substratos clássicos da bomba de efluxo MepA, apresentaram interações em regiões semelhantes do domínio de ligação (Fig. 5(B) e 5(D)), envolvendo os resíduos Phe154, Thr202, Gln206, Pro176 e Met33, com distâncias de contato variando de 0,72 a 4,7 Å (Tabela 1). O composto controle clorpromazina (CPZ) exibiu energia de afinidade de −5,9 kcal/mol, com

desempenho inferior ao do derivado HDZH2O, que apresentou energia de ligação mais favorável tanto em relação aos substratos clássicos quanto ao controle (Fig. 5(C) e Tabela 1).

As análises de interação revelaram que, embora EtBr e CCCP compartilhem o mesmo domínio de ligação, suas associações são sustentadas principalmente por contatos hidrofóbicos, com contribuição significativa de empilhamento aromático (π–π stacking), o que define a natureza química predominante dessas interações (Fig. 5(B) e 5(D)). Assim, EtBr e CCCP foram estabilizados predominantemente por contatos hidrofóbicos e por empilhamento π–π, refletindo uma associação mais genérica e menos seletiva. Em contraste, o HDZH2O não apenas exibiu maior afinidade, mas também estabeleceu interações adicionais e mais direcionadas, sugerindo um acoplamento mais estável e seletivo ao sítio da MepA. Esse perfil distingue o derivado como um potencial modulador competitivo, capaz de superar as limitações de reconhecimento inespecífico observadas para os substratos clássicos.

A investigação das simulações de docking molecular para a bomba de efluxo NorA de *Staphylococcus aureus* 1199B demonstrou que o HDZH2O se posiciona em uma localização adjacente ao substrato CCCP (−6,0 kcal/mol) e à clorpromazina (CPZ, −5,9 kcal/mol). Essa diferença de posicionamento sugere que, embora não ocupe exatamente o mesmo sítio de interação, o HDZH2O pode interferir na dinâmica do canal de efluxo, competindo parcialmente com esses ligantes e potencialmente modulando a exportação de substratos (Tabela 2 e Fig. 6(A)).

Além disso, a análise das interações ligante–receptor revelou perfis distintos entre os compostos avaliados. O CCCP estabeleceu contatos hidrofóbicos com os resíduos Ile19, Val44, Phe47, Ala48 e Asn340, além de formar quatro ligações de hidrogênio com Gln51, Arg310, Thr336 e Asn340, com distâncias variando entre 2,2 e 4,7 Å, sugerindo um acoplamento relativamente direcionado e potencialmente estabilizador do complexo (Fig. 6(B) e Tabela 2).

Por outro lado, a CPZ interagiu principalmente por meio de interações hidrofóbicas com os resíduos Glu222, Tyr225, Ile240, Ile244 e Phe303, com distâncias entre 3,6 e 4,2 Å (Fig. 6(C) e Tabela 2), sem contribuição de ligações de hidrogênio, refletindo uma associação menos específica e possivelmente mais flexível dentro do canal de efluxo.

Tabela 2. Dados sobre interações ligante–receptor (L–R) no processo de redocking do agonista CPZ, substratos clássicos CCCP e EtBr, e simulações de docking molecular do HDZH2O, via receptor da bomba de efluxo NorA.

Compd	EA (kcal/mol)	RMSD (Å)	Inter. type	Residues / distances (Å)
CCCP	-6.0	1.927	Hydrophobic	Ile19 (3.91), Val44 (4.49), Phe47 (3.78), Ala48 (4.61), Asn340 (4.74)

			H-bond	Gln51 (3.06), Arg310 (3.95), Thr336 (2.21), Asn340 (2.49)
CPZ	-5.9	1.693	Hydrophobic	Glu222 (3.73), Tyr225 (3.74), Ile240 (4.27), Ile240 (3.68), Ile244 (3.90), Ile244 (3.62), Ile244 (3.86), Phe303 (4.35), Phe303 (3.74)
EtBr	-8.0	1.674	Hydrophobic	Phe140 (4.74), Phe140 (3.87), Phe340 (3.83), Glu222 (4.37), Glu222 (4.37), Tyr225 (3.71), Ile240 (4.69), Ile244 (3.48), Phe303 (4.79)
			H-bond	Asp307 (2.83)
HDZH2OH	-7.3	1.442	H-bond	Arg310 (2.97), Arg310 (4.32), Thr336 (3.38), Ser337 (3.80), Asn340 (2.45)

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

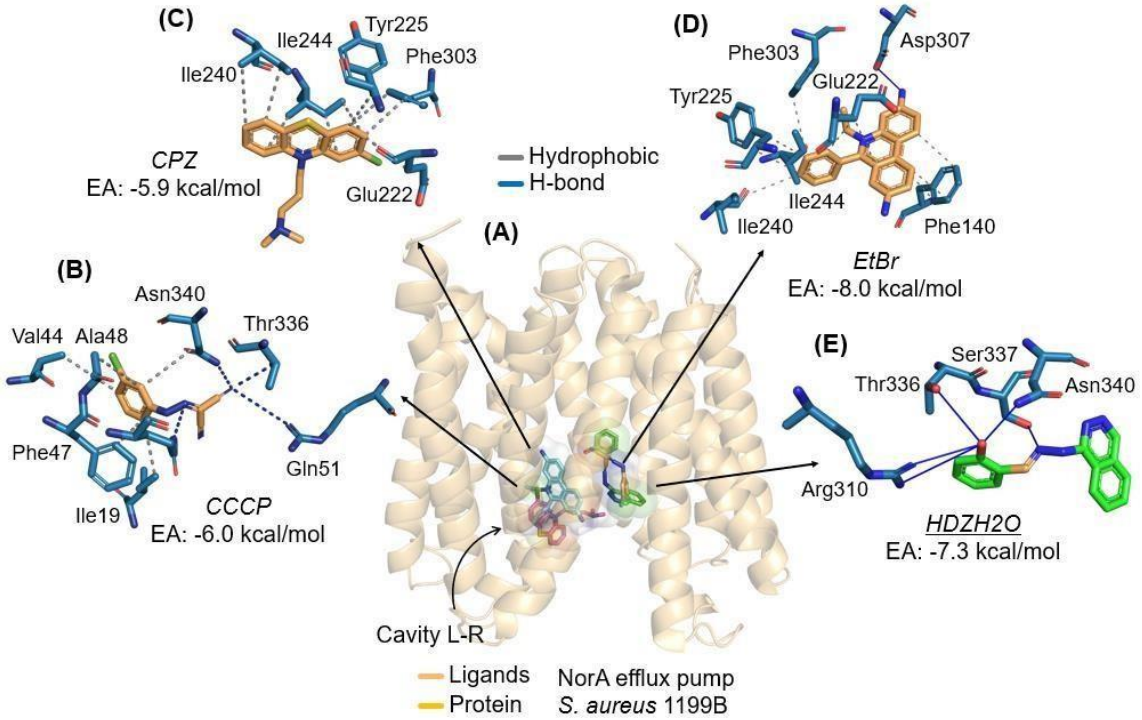


Fig. 6. (A) Visualização tridimensional do docking do ligante na bomba de efluxo NorA, cepa *S. aureus* 1199B, e visualização tridimensional das interações ligante–receptor entre resíduos de aminoácidos (cor azul) da bomba de efluxo NorA para os ligantes (cor nude): (B) CCCP, (C) CPZ, (D) EtBr e (E) HDZH2O.

Apesar disso, o composto HDZH2O se acomoda no mesmo sítio de ligação que o substrato clássico EtBr na bomba de efluxo NorA de *S. aureus* 1199B. Essa sobreposição espacial sugere que o HDZH2O pode competir com substratos naturais da proteína, atuando como um potencial inibidor competitivo. Embora a afinidade do HDZH2O (−7,3 kcal/mol) seja ligeiramente inferior à observada para o EtBr (−8,0 kcal/mol) (Fig. 6(D) e 6(E)), ela permanece superior à do CCCP e da CPZ (−5,9 kcal/mol), indicando uma propensão satisfatória do ligante a ocupar e se manter no sítio ativo.

Assim, a combinação entre afinidade considerável e posicionamento semelhante ao do EtBr sustenta um mecanismo de inibição baseado na competição direta pelo sítio de efluxo, com potencial para reduzir a exportação de antibióticos ou outros substratos e, consequentemente, restaurar a eficácia antimicrobiana frente a cepas resistentes.

A análise detalhada das interações ligante–receptor evidenciou perfis distintos para EtBr e HDZH2O na bomba de efluxo NorA. O EtBr estabelece múltiplas interações hidrofóbicas com resíduos aromáticos e alifáticos do canal, incluindo Phe140, Phe340, Tyr225, Ile240, Ile244 e Phe303, com distâncias variando de 3,48 a 4,79 Å, além de formar uma ligação de hidrogênio com Asp307 (2,83 Å) (Tabela 2).

O HDZH2O, por sua vez, apresenta um padrão complementar: estabelece múltiplas ligações de hidrogênio com Arg310, Thr336, Ser337 e Asn340 (distâncias entre 2,45 e 4,32 Å), formando uma rede de interações polarizadas que favorecem estabilidade e seletividade dentro do sítio. Diferentemente do EtBr, o HDZH2O não depende predominantemente de contatos aromáticos; sua rede de ligações de hidrogênio permite um acoplamento firme e potencialmente competitivo, ocupando regiões adjacentes ao substrato e sugerindo um mecanismo de inibição baseado na competição parcial pelo canal de efluxo.

Os parâmetros físico-químicos e a semelhança a fármacos do HDZH2O estão resumidos na Tabela 3 e ilustrados no radar de biodisponibilidade da Figura 7(B). O peso molecular (MW) de 264,29 g/mol e a área de superfície polar topológica (TPSA) de 70,40 Å² indicam que a molécula é compacta e suficientemente polar para favorecer a permeabilidade celular. Esse perfil é compatível com a lipossolubilidade estimada pelos algoritmos de partição, apresentando logP de 3,53 (ChemAxon) e 2,59 (método de Crippen), valores que atendem aos requisitos da “regra dos cinco” de Lipinski e à regra de Veber para boa biodisponibilidade oral.

A lipofilicidade dependente do pH é detalhada no gráfico da Figura 7(A) e nos dados da Tabela 3. O valor de pKa de 4,05, associado a um grupo amina presente em um dos anéis aromáticos, indica a presença de um centro básico capaz de aumentar a lipofilicidade sob condições fisiológicas. A similaridade entre logD e logP, ambos próximos de 3,53, sugere que a forma predominante da molécula é neutra, apresentando um balanço adequado entre características lipofílicas e hidrofílicas, o que é favorável para permeabilidade e absorção intestinal.

Tabela 3. Propriedades físico-químicas e perfil de semelhança a fármacos da chalcona HDZH2O

Physicochemical property	**Value**	**Source**
Molecular weight	264.29	CheAxon
logP	3.53	CheAxon
WlogP	2.59	Wildman method
H-bond acceptors	4.0	CheAxon
H-bond donors	2.0	CheAxon
Rotatable bonds	3.0	CheAxon
Topological Polar Surface Area	70.40	CheAxon
pKa (most basic center)	4.05	CheAxon
logD at pH 6.4	3.53	CheAxon
logD at pH 7.4	3.53	CheAxon
logS	-4.44	CheAxon
Rule of five	Accepted	Lipinski method
GSK rule	Accepted	Veber method
CNS MPO score (Pfizer)	4.47	CheAxon

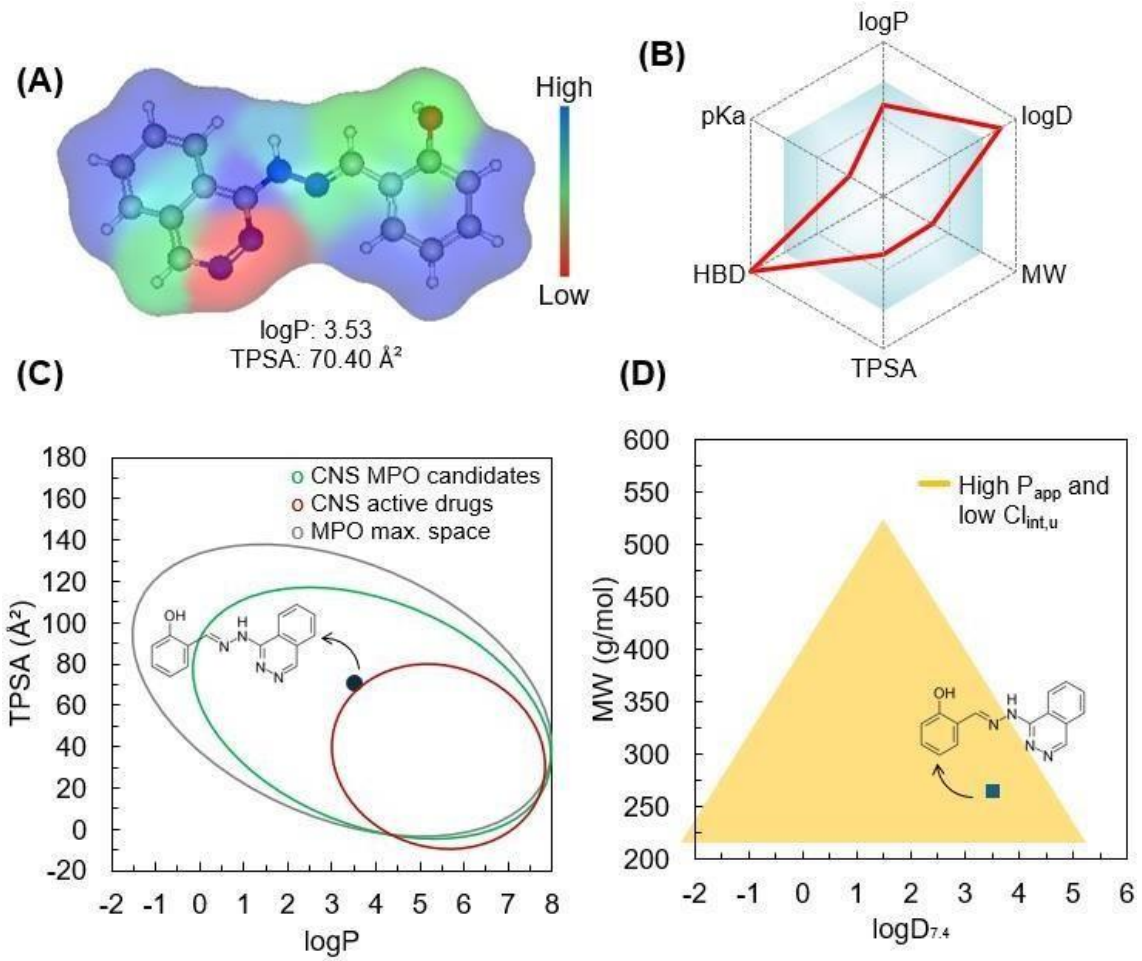


Figura 7. (A) Mapa de superfície do potencial de lipofilicidade molecular (MLP) da base conjugada ao HDZH2O (logD7,4); (B) radar de otimização multiparamétrica (MPO) que expressa o grau de desejabilidade ADME. O espectro MPO foi analisado especificamente alinhando (C) TPSA e logP para estimar o perfil de permeabilidade no SNC e (D) MW e logD em pH 7,4 para estimar o perfil de absorção oral e estabilidade metabólica.

Nesse contexto, o HDZH2O demonstra características compatíveis com compostos ativos no sistema nervoso central, sugerindo potencial para atravessar barreiras fisiológicas e manter perfis farmacocinéticos favoráveis. A aplicação do índice de Otimização Multiparamétrica do SNC (CNS MPO), mostrado na Figura 7(C), revelou uma pontuação de 4,47, indicando que a molécula atende aos critérios de semelhança a fármacos e apresenta atributos desejáveis, como elevada permeabilidade passiva (Papp), baixo efluxo mediado pela glicoproteína P (P-gp) e depuração metabólica reduzida (Yee, 1997). Esses parâmetros posicionam o HDZH2O dentro do quadrante de compostos centrais ativos no conjunto de referência da Pfizer, conforme ilustrado na Figura 7(D), reforçando seu perfil promissor para aplicações no SNC.

As características físico-químicas do HDZH2O estão diretamente relacionadas à sua biodisponibilidade prevista, estimada em 55% de probabilidade de alcançar pelo menos 10% de absorção oral em modelos de ratos, frequentemente utilizados como preditores para humanos. Por se tratar de uma molécula predominantemente neutra em condições fisiológicas e compatível com os limites da “regra dos cinco” de Lipinski (MW ≤ 500, logP ≤ 5, HBA ≤ 10, HBD ≤ 5), ela apresenta

baixa probabilidade de ser transportada pela glicoproteína P (P-gp), favorecendo elevada absorção intestinal (HIA = 93,57%) (Daina; Michielin; Zoete, 2017), conforme mostrado na Tabela 4.

A estimativa de ligação a proteínas plasmáticas (PPB = 92,36%) sugere que a substância se distribui entre o plasma e diferentes tecidos, aumentando a chance de atingir o sistema nervoso central. De forma complementar, o valor calculado de permeabilidade aparente (Papp = 5,53 × 10^{-5} cm/s) no modelo in vitro de células renais caninas MDCK, obtido pelo PreADMET, corrobora a previsão in silico de boa permeabilidade à barreira hematoencefálica (BBB) pelo modelo BOILED-Egg do SwissADME, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Perfil farmacocinético pelos modelos ADME dos servidores SwissADME e PreADMET

ADME profile	PreADMET	SwissADME
F>10% (Bioavailability)	Not reported	0.55
P-gp inhibitor	No	Not reported
P-gp substrate	Not reported	No
HIA (Human intestinal absorption)	93.57%	High
PPB (Plasma protein binding)	92.36%	Not reported
BBB (Blood–Brain Barrier)	5.53 × 10^{-5} cm/s (Papp)*	+++
CYP3A4 substrate	No	Not reported
CYP2D6 substrate	No	Not reported
CYP3A4 inhibitor	No	No
CYP2D6 inhibitor	No	No
CYP2C9 inhibitor	Yes	No
CYP2C19 inhibitor	Yes	No

Notas: A penetração na BBB no servidor PreADMET foi estimada pelo modelo in vitro de permeabilidade passiva (Papp) da linhagem celular Madin-Darby Canine Kidney (MDCK).

A análise do metabolismo do HDZH2O pelas isoformas do citocromo P450 (CYP450) indica que a molécula possui baixa propensão a ser metabolizada pelas CYP3A4 e CYP2D6, sugerindo menor taxa de depuração e possível prolongamento da meia-vida plasmática. Em paralelo, o HDZH2O demonstrou forte potencial de inibição das isoformas CYP2C19 e CYP2C9, o que pode resultar em aumento das concentrações plasmáticas de fármacos coadministrados que dependam dessas enzimas para biotransformação (Tabela 4).

A avaliação da toxicidade do HDZH2O, realizada por meio das plataformas PreADMET, ProTox-II e da triagem de subestruturas do eMolTox, sugere que o fragmento anilina é metabolicamente instável e pode contribuir para hepatotoxicidade induzida por fármacos (DILI). Adicionalmente, os fragmentos do tipo ftalazina apresentam potencial de interação covalente com o DNA, indicando risco mutagênico. Todavia, o grupo orto-substituído no anel benzênico pode aumentar a seletividade para atividade antimicrobiana (Fig. 8(A)). Entretanto, a predição da dose letal (LD_{50} = 350 mg/kg) indica que efeitos adversos significativos podem ocorrer apenas em doses elevadas, evidenciando risco tóxico médio em condições de exposição fisiológica normal (Tabela 5).

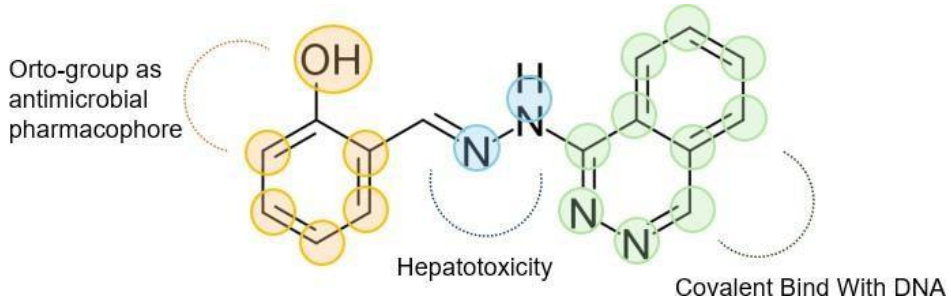


Figura 8. Contribuições estruturais e farmacóforos.

Tabela 5. Desfechos toxicológicos e dose letal oral (LD_{50}) pela predição consensual dos servidores PreADMET e ProTox-II

Toxic property	PreADMET	ProTox-3.0
DILI	Not reported	+ (0.62)
AMES Mutagenic	Mutagenic	+ (0.74)
hERG inhibitor	Low risk	Not reported
LD50	Not reported	350mg/kg (class 4)

CONCLUSÃO

O composto hidrazônico HDZH2OH não apresentou atividade antibacteriana intrínseca contra cepas de *Staphylococcus aureus* que possuem as bombas de efluxo NorA e MepA, conforme indicado pelos altos valores de CIM observados quando o composto foi testado isoladamente. No entanto, os ensaios de modulação da resistência demonstraram que o composto interferiu seletivamente nos mecanismos de efluxo bacteriano, particularmente na bomba MepA da cepa K2068, como evidenciado pela redução significativa da CIM do brometo de etídio. Esses achados indicam que o HDZH2OH atua principalmente como um modulador de resistência, e não como um agente antibacteriano direto. Em relação à bomba NorA, foi observada uma potencialização parcial da norfloxacina contra a cepa 1199B, indicando que a atividade do composto depende tanto do tipo de bomba de efluxo quanto do substrato utilizado. A ausência de um efeito significativo sobre o

brometo de etídio nessa cepa reforça a hipótese de que o HDZH2OH interage seletivamente com os sistemas de efluxo e é influenciado por diferenças estruturais e funcionais entre as proteínas transportadoras. De modo geral, os resultados sugerem que o HDZH2OH possui potencial como adjuvante terapêutico, contribuindo para a restauração parcial da eficácia de antibióticos comprometida pela resistência mediada por bombas de efluxo. Esses achados ressaltam a importância do desenvolvimento de compostos hidrazônicos como moduladores da resistência bacteriana e indicam a necessidade de estudos adicionais, como ensaios de acúmulo intracelular, modelagem molecular e avaliação frente a outros sistemas de efluxo, para elucidar de forma mais precisa seu mecanismo de ação e sua aplicabilidade clínica. As simulações de docking molecular revelaram que o HDZH2O apresenta marcada seletividade para a cepa SA K2068 (que expressa MepA) e potencial para modular sinergicamente a atividade da clorpromazina (CPZ), do carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP) e do brometo de etídio contra cepas de *Staphylococcus aureus* SA1199B (que superexpressam NorA). Em concordância com esses achados, as análises farmacocinéticas demonstraram alto grau de semelhança com um fármaco antimicrobiano de uso oral, com volume de distribuição favorável, potencial atividade no sistema nervoso central (SNC) e risco moderado de toxicidade por ingestão.

AGRADECIMENTO

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal, R., & Smith, J. C. (2023). Speed vs accuracy: effect on ligand pose accuracy of varying box size and exhaustiveness in AutoDock vina. Molecular Informatics, 42(2), 2200188. https://doi.org/10.1002/minf.202200188

Brawley, D. N., Sauer, D. B., Li, J., Zheng, X., Koide, A., Jedhe, G. S., ... & Traaseth, N. J. (2022). Structural basis for inhibition of the drug efflux pump NorA from *Staphylococcus aureus*. Nature Chemical Biology, 18(7), 706-712. https://doi.org/10.1038/s41589-022-00994-9

COSTA, S. S.; VIVEIROS, M.; AMARAL, L.; COUTO, I. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update. The Open Microbiology Journal, v. 16, p. 1–15, 2022. DOI: 10.2174/1874285802216010001.

Costa, W. D., Rocha, J. E., de Oliveira, V. M., de Lima, L. F., de Freitas, T. S., de Souza, M. A., ... & Dos Santos, H. S. (2025). Evaluation of the intrinsic antibacterial and antibiotic potentiating activity against antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and inhibition of the NorA and MepA efflux pumps by a hydrazone derivative of isoniazid. Microbial Pathogenesis, 204, 107588. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2025.107588

COUTINHO, H. D. M. et al. Enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds against multidrug resistant bacteria. Journal of Medicinal Plants Research, v. 5, n. 13, p. 2921–2926, 2011.

COUTINHO, H. D. M. et al. Molecular docking and pharmacological potential of hydrazone derivatives against bacterial resistance mechanisms. Microbial Pathogenesis, v. 176, p. 105999, 2023. DOI: 10.1016/j.micpath.2023.105999.

Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(1), 42717. https://doi.org/10.1038/srep42717

De Araújo, A. C. J., Freitas, P. R., Araújo, I. M., de Oliveira Borges, J. A., Almeida, R. S., de Araújo-Neto, J. B., ... & Braga, M. F. B. M. (2025). Assessment of MepA inhibition potential using thiadiazine derivatives through fluorometry, docking, and qPCR. Gene Reports, 39, 102162. https://doi.org/10.1016/j.genrep.2025.102162

Donchev, A. G., Ozrin, V. D., Subbotin, M. V., Tarasov, O. V., & Tarasov, V. I. (2005). A quantum mechanical polarizable force field for biomolecular interactions. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102(22), 7829-7834. https://doi.org/10.1073/pnas.0502962102

EHRENPREIS, J.; EHRENPREIS, I. Hydralazine in the treatment of hypertension. American Journal of Therapeutics, v. 8, n. 5, p. 337–342, 2001.

El-Hachem, N., Haibe-Kains, B., Khalil, A., Kobeissy, F. H., & Nemer, G. (2017). AutoDock and AutoDockTools for protein-ligand docking: beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) as a case study. In Neuroproteomics: Methods and Protocols (pp. 391-403). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6952-4_20

Freitas, P. R., de Araújo, A. C. J., dos Santos Barbosa, C. R., Muniz, D. F., de Almeida, R. S., de Menezes, I. R. A., ... & Coutinho, H. D. M. (2022). Inhibition of the MepA efflux pump by limonene demonstrated by in vitro and in silico methods. Folia Microbiologica, 67(1), 15-20. https://doi.org/10.1007/s12223-021-00909-6

Freitas, P. R., de Araújo, A. C., Araújo, I. M., de Almeida, R. S., Borges, J. A., Paulo, C. L., ... & Coutinho, H. D. (2024). Thiazine-derived compounds in inhibiting efflux pump in *Staphylococcus aureus* K2068, mepA gene expression, and membrane permeability alteration. Biomedicine & Pharmacotherapy, 179, 117291. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117291

FREITAS, T. S. et al. Statistical analysis applied to microbiological assays in microdilution plates. Brazilian Journal of Biology, v. 81, n. 3, p. 782–789, 2021.

GUO, Y. et al. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 10, p. 107, 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00107.

HERMAN, P. et al. Colorimetric resazurin-based microdilution method for determination of minimum inhibitory concentration and cell viability. Frontiers in Microbiology, v. 15, p. 1–12, 2024. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1352976.

KADEŘÁBKOVÁ, P.; KOUDELKOVÁ, M.; BENDA, V.; DOLEŽALOVÁ, M. Antibiotic susceptibility testing using minimum inhibitory concentration. npj Antimicrobials and Resistance, v. 2, n. 1, p. 1–10, 2024. DOI: 10.1038/s44259-024-00051-6.

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

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2012). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Advanced drug delivery reviews, 64, 4-17. https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019

MAJOROV, K. et al. Isoniazid as a first-line drug for tuberculosis therapy. Tuberculosis, v. 121, p. 101899, 2020.

MEDICOVER HOSPITALS**.** Hydralazine mechanism of action. *Medicover Hospitals*, 13 ago. 2024. Disponível em: https://www.medicoverhospitals.in/articles/hydralazine-mechanism-of-action. Acesso em: 16 jan. 2026.

MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, B. et al. Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. International Journal of Molecular Sciences, v. 23, n. 15, p. 8088, 2022. DOI: 10.3390/ijms23158088.

Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. Journal of Computational Chemistry, 30(16), 2785-2791. https://doi.org/10.1002/jcc.21256

MURUGAIYAN, J. et al. Progress in alternative strategies to combat antimicrobial resistance: focus on antibiotics. Antibiotics, v. 11, n. 2, p. 200, 2022. DOI: 10.3390/antibiotics11020200.

NASCIMENTO, F. B. S. A. et al. Antimicrobial activity of hydralazine against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. Future Microbiology, v. 19, n. 2, p. 91–106, 2024. DOI: 10.2217/fmb-2023-0138.

NASCIMENTO, F. B. S. A. et al. Synergistic effect of hydralazine associated with triazoles on Candida spp. in planktonic cells. Future Microbiology, v. 18, n. 10, p. 661- 672, 2023. DOI: 10.2217/fmb-2022-0224.

NERY, K. L. F. B. et al. Ação antimicrobiana e moduladora da resistência de derivados da hidrazida em cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*: uma revisão integrativa. Peer Review, v. 5, n. 17, p. 499–514, 2023.

PATINI, R. et al. The effect of different antibiotic regimens on bacterial resistance: a systematic review. Antibiotics, v. 9, n. 1, p. 22, 2020. DOI: 10.3390/antibiotics9010022.

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

Pundir, S., Martin, M. J., O'Donovan, C., & UniProt Consortium. (2016). UniProt tools. Current Protocols in Bioinformatics, 53(1), 1-29. https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0129s53

Radchenko, M., Symersky, J., Nie, R., & Lu, M. (2015). Structural basis for the blockade of MATE multidrug efflux pumps. Nature communications, 6(1), 7995. https://doi.org/10.1038/ncomms8995

Remmert, M., Biegert, A., Hauser, A., & Söding, J. (2012). HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. Nature methods, 9(2), 173-175. https://doi.org/10.1038/nmeth.1818

Rocha, M. N. D., Alves, D. R., Marinho, M. M., Morais, S. M. D., & Marinho, E. S. (2021). Virtual screening of citrus flavonoid tangeretin: A promising pharmacological tool for the treatment and prevention of Zika fever and COVID-19. Journal of Computational Biophysics and Chemistry, 20(03), 283-304. https://doi.org/10.1142/S2737416521500137

ROLLAS, S.; KÜÇÜKGÜZEL, Ş. G. Biological activities of hydrazone derivatives. Molecules, v. 12, n. 8, p. 1910–1939, 2007. DOI: 10.3390/12081910.

SANTOS, H. S. et al. In silico evaluation of hydrazone derivatives as efflux pump inhibitors in multidrug-resistant bacteria. Journal of Molecular Modeling, v. 28, n. 9, p. 1–13, 2022. DOI: 10.1007/s00894-022-05164-3.

SCHINDLER, B. D. et al. The *Staphylococcus aureus* MepA efflux pump confers resistance to tigecycline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, n. 7, p. 4099- 4107, 2015. DOI: 10.1128/AAC.05169-14.

Shityakov, S., & Förster, C. (2014). In silico predictive model to determine vector mediated transport properties for the blood–brain barrier choline transporter. Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry, 23-36. https://doi.org/10.2147/AABC.S63749

Snyder, H. D., & Kucukkal, T. G. (2021). Computational chemistry activities with Avogadro and ORCA. Journal of Chemical Education, 98(4), 1335-1341. https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.0c00959

SPINASSE, L. B. et al. Different phenotypes of the NAT2 gene influences hydralazine antihypertensive response in patients with resistant hypertension. Pharmacogenomics, v. 15, n. 2, p. 169–178, 2014. DOI: 10.2217/pgs.13.221.

TINTINO, S. R. et al. Effect of natural products on the inhibition of efflux pumps in multidrug-resistant bacteria. Microbial Pathogenesis, v. 140, p. 103949, 2020. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103949.

TINTINO, S. R. et al. Evaluation of the inhibitory effect of natural products on efflux pumps of *Staphylococcus aureus*. Microbial Pathogenesis, v. 97, p. 191–196, 2016. DOI: 10.1016/j.micpath.2016.06.016.

Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. Journal of Computational Chemistry, 31(2), 455-461. https://doi.org/10.1002/jcc.21334

Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W., & Kopple, K. D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), 2615-2623. https://doi.org/10.1021/jm020017n

WALVEKAR, P. et al. Self-assembled oleylamine grafted hyaluronic acid polymersomes for delivery of vancomycin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 182, p. 110388, 2019. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.110388.

Warraich, A. A., Mohammed, A. U. R., Gibson, H., Hussain, M., & Rahman, A. S. (2021). Acidic amino acids as counterions of ciprofloxacin: Effect on growth and pigment production in *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 and Pseudomonas aeruginosa PAO1. Plos one, 16(4), e0250705. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250705

Wiley, E. A., MacDonald, M., Lambropoulos, A., Harriman, D. J., & Deslongchamps, G. (2006). LGA-dock/EM-dock exploring Lamarckian genetic algorithms and energy-based local search for ligand receptor docking. Canadian Journal of Chemistry, 84(3), 384-391. https://doi.org/10.1139/v06-012

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

Yusuf, D., Davis, A. M., Kleywegt, G. J., & Schmitt, S. (2008). An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. Journal of Chemical Information and Modeling, 48(7), 1411-1422. https://doi.org/10.1021/ci800084x.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo possibilitou uma investigação aprofundada sobre a ação antibacteriana direta de derivados da hidralazina e seu potencial para reverter a resistência bacteriana, por meio da inibição do mecanismo de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus*. Os resultados obtidos demonstraram que esses compostos apresentam atividade significativa contra as bactérias portadoras das bombas de efluxo NorA e MepA, evidenciando a relevância dessas substâncias como candidatos promissores para o combate à resistência bacteriana.

A síntese dos derivados da hidralazina foi realizada com sucesso, permitindo a obtenção de compostos com propriedades físico-químicas adequadas para a interação com as proteínas-alvo. A escolha criteriosa das modificações químicas contribuiu para o aprimoramento da atividade antimicrobiana, reforçando a importância do desenho racional de moléculas para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Os testes de concentração inibitória mínima (MIC) realizados com brometo de etídio e ciprofloxacina, isolados e em combinação com moduladores como CCCP, clorpromazina (CPZ) e hidrazona (HDZH2OH), mostraram resultados expressivos quanto à reversão da resistência bacteriana. Para a cepa *S. aureus* 1199B, por exemplo, a adição de CCCP e CPZ reduziu significativamente a MIC do brometo de etídio e da ciprofloxacina, com CPZ sendo particularmente eficaz na redução da MIC do brometo de etídio para cerca de 2 μg/mL. Já o modulador HDZH2OH apresentou efeito moderado ou ausente, dependendo da combinação, sugerindo uma atuação variável dependendo da cepa e do antimicrobiano utilizado.

Na cepa *S. aureus* K2068, portadora da bomba MepA, observou-se que CCCP e CPZ também promoveram reduções significativas nas MICs da ciprofloxacina e do brometo de etídio, reforçando a hipótese da inibição das bombas de efluxo como mecanismo central para a reversão da resistência. Curiosamente, o derivado HDZH2OH apresentou resultados distintos nesta cepa, aumentando a MIC da ciprofloxacina sem diferença significativa, mas reduzindo a MIC do brometo de etídio de forma significativa, ainda que menos pronunciada que os outros moduladores.

A avaliação funcional dos compostos sobre o mecanismo da bomba de efluxo, por meio desses testes, confirmou a capacidade de inibir a ação dessas bombas, fator crucial para a reversão da resistência bacteriana. A inibição das bombas NorA e MepA propiciou a retenção intracelular dos antibióticos, potencializando sua eficácia contra as cepas testadas.

Adicionalmente, a docagem molecular proporcionou um entendimento detalhado das interações moleculares entre os derivados da hidralazina e os sítios ativos das bombas de efluxo. Essa

abordagem computacional revelou os principais resíduos envolvidos na ligação e sustentou os dados experimentais, destacando a complementaridade entre técnicas experimentais e in sílico na investigação farmacológica.

Os testes computacionais de ADMET indicaram que os compostos avaliados apresentam perfis de toxicidade aceitáveis, sugerindo que, além da atividade antibacteriana, eles detêm características favoráveis para o desenvolvimento como agentes terapêuticos seguros. Estes resultados reforçam a viabilidade dos derivados da hidralazina para avanços em estudos pré-clínicos.

Embora os resultados obtidos sejam promissores, algumas limitações foram identificadas, como a necessidade de validação in vivo para confirmar a eficácia e segurança dos compostos, bem como a investigação de possíveis mecanismos de resistência alternativos que possam comprometer a atividade dos derivados.

Como sugestões para trabalhos futuros, recomenda-se a realização de ensaios in vivo para avaliar a farmacocinética, farmacodinâmica e toxicidade dos compostos em modelos animais. Além disso, estudos que explorem a combinação dos derivados da hidralazina com diferentes classes de antibióticos poderão ampliar o entendimento sobre sinergias terapêuticas. Outra linha promissora inclui a análise detalhada do efeito dos moduladores HDZH2OH em diferentes cepas e sob diferentes condições, para elucidar os mecanismos envolvidos em sua atuação variável.

Por fim, é importante aprofundar a análise estrutural das bombas de efluxo através de técnicas avançadas de cristalografia e simulações de dinâmica molecular para identificar novos sítios de interação e desenvolver derivados ainda mais eficientes. Essa linha de pesquisa pode contribuir significativamente para o combate à crescente ameaça da resistência bacteriana.

ALVAREZ, C. A. et al. Prevention strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 14, supl. 2, p. S107–S118, 2010. DOI: https://doi.org/10.1590/S1413-86702010000700003.

ANES, João et al. The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 587, 2015. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00587.

ARIAS, C. A. et al. A prospective cohort multicenter study of molecular epidemiology and phylogenomics of *Staphylococcus aureus* bacteremia in nine Latin American countries. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 10, e00816-17, 2017. DOI: https://doi.org/10.1128/AAC.00816-17.

BAQUERO, Fernando; MARTÍNEZ, José-Luis; CANTÓN, Rafael. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 19, n. 3, p. 260–265, 2008. DOI: https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006.

BAYM, M.; STONE, L. K.; KISHONY, R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. *Science*, v. 351, n. 6268, p. aad3292, 2016. DOI: https://doi.org/10.1126/science.aad3292.

BECKER, A. P. Investigação da formação de biofilme e sua associação com características clínicas e sistemas de bombas de efluxo em *Staphylococcus aureus*. 2017. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

BELAY, Wubetu Yihunie et al. Mechanism of antibacterial resistance, strategies and next-generation antimicrobials to contain antimicrobial resistance: a review. *Frontiers in Pharmacology*, v. 15, p. 1444781, 2024. DOI: https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1444781.

BELL, G.; MACLEAN, C. The search for “evolution-proof” antibiotics. *Trends in Microbiology*, v. 26, n. 6, p. 471–483, 2018. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.005.

BELOTSERKOVSKY, Ilia; SANSONETTI, Philippe J. Shigella and enteroinvasive *Escherichia coli*. In: TORRES, Alfredo G. (org.). *Escherichia coli, a Versatile Pathogen*. Cambridge: Academic Press, 2018. p. 1–26. DOI: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811444-2.00001-5.

BLANCO, Paula et al. Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms*, v. 4, n. 1, p. 14, 2016. DOI: https://doi.org/10.3390/microorganisms4010014.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. *Advanced Organic Chemistry. Part A: Structure and Mechanisms*. 5. ed. New York: Springer, 2007.

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, n. 9, p. 629–641, 2009. DOI: https://doi.org/10.1038/nrmicro2200.

CHANG, C. C. et al. Potential impacts of hydralazine as a novel antioxidant on cardiovascular and renal disease—beyond vasodilation and blood pressure lowering. *Antioxidants*, v. 11, n. 11, p. 2224, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/antiox11112224.

CHEMICALBOOK. Hydralazine: chemical properties, uses, production. [s.d.]. Disponível em: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB1855362.htm. Acesso em: 22 abr. 2025.

CHEUNG, Gordon Y. C.; BAE, Justin S.; OTTO, Michael. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, v. 12, n. 1, p. 547–569, 2021. DOI: https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688.

CONG, Yanguang; YANG, Sijin; RAO, Xiancai. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: a review of case updating and clinical features. *Journal of Advanced Research*, v. 21, p. 169–176, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.11.005.

COUTINHO, H. D. M. et al. Inhibition of bacterial multidrug resistance by natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, n. 4, p. 775–780, 2008. DOI: https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000400026.

COUTINHO, H. D. M. et al. Molecular docking and pharmacological potential of hydrazone derivatives against bacterial resistance mechanisms. *Microbial Pathogenesis*, v. 176, p. 105999, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105999.

CROXEN, Matthew A.; FINLAY, B. Brett. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 1, p. 26–38, 2010. DOI: https://doi.org/10.1038/nrmicro2265.

CUSSOLIM, L. R. et al. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de queijos. *Segurança Alimentar e Nutricional*, v. 28, p. e021021, 2021. DOI: https://doi.org/10.20396/san.v28i0.8661095.

DA CRUZ, Rafael Pereira. Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais – PPGDR. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS. Universidade Regional do Cariri – URCA. Crato, [s.d.]. Documento institucional.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 42717, 2017. DOI: https://doi.org/10.1038/srep42717.

DASHTBANI-ROOZBEHANI, A.; BROWN, M. H. Efflux pump mediated antimicrobial resistance by staphylococci in health-related environments: challenges and the quest for inhibition. *Antibiotics*, v. 10, n. 12, p. 1502, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/antibiotics10121502.

DING, Yinhuan et al. Role of efflux pumps, their inhibitors, and regulators in colistin resistance. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, p. 1207441, 2023. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1207441.

DO NASCIMENTO, E. C. P.; DOS SANTOS, P. C.; DE CASTRO, S. H. M. A incidência de *Staphylococcus aureus* em hospitais: revisão de obra. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, v. 6, n. 5, p. 1646–1660, 2024.

DO NASCIMENTO, Francisca B. S. A. et al. Synergistic effect of hydralazine associated with triazoles on *Candida* spp. in planktonic cells. *Future Microbiology*, v. 18, n. 10, p. 661–672, 2023. DOI: https://doi.org/10.2217/fmb-2023-0012.

EHRENPREIS, E. D.; EHRENPREIS, S. L. Hydralazine: a reappraisal after 50 years. *Annals of Internal Medicine*, v. 135, n. 6, p. 479–486, 2001. DOI: https://doi.org/10.7326/0003-4819-135-6-200109180-00010.

FATIMA, Rawish; AZIZ, Muhammad. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/. Acesso em: 22 abr. 2025.

FERNANDES-SILVA, M. M. et al. Hidralazina e dinitrato de isossorbida na insuficiência cardíaca: da evidência à prática clínica. *ABC Heart Failure & Cardiomyopathy*, v. 4, n. 1, p. e20240019, 2024. DOI: https://doi.org/10.36660/abchfc.20240019.

FERNSTROM, A.; GOLDBLATT, M. Aerobiology and its role in the transmission of infectious diseases. *Journal of Pathogens*, v. 2013, p. 493960, 2013. DOI: https://doi.org/10.1155/2013/493960.

FERREIRA, Carolina et al. Occurrence and variability of the efflux pump gene *norA* across the *Staphylococcus* genus. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 23, p. 15306, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms232315306.

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

alteration. Biomedicine & Pharmacotherapy, 179, 117291. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117291

FREITAS, T. S. et al. Avaliação microbiológica por ensaio de microdiluição: protocolos e análise de dados. *Revista Brasileira de Microbiologia*, v. 52, n. 2, p. 977–987, 2021a. DOI: https://doi.org/10.1007/s42770-021-00473-2.

GAURAV, Amit et al. Role of bacterial efflux pumps in antibiotic resistance, virulence, and strategies to discover novel efflux pump inhibitors. *Microbiology*, v. 169, n. 5, p. 001333, 2023. DOI: https://doi.org/10.1099/mic.0.001333.

GE, B. et al. MRSA and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. retail meats, 2010–2011. *Food Microbiology*, v. 62, p. 289–297, 2017. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.008.

GIRMA, Abayeneh. *Staphylococcus aureus*: current perspectives on molecular pathogenesis and virulence. *The Cell Surface*, v. 10, p. 100137, 2024. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tcsw.2023.100137.

GUO, Xingfang et al. Hydralazine protects nigrostriatal dopaminergic neurons from MPP+ and MPTP-induced neurotoxicity: roles of Nrf2-ARE signaling pathway. *Frontiers in Neurology*, v. 10, p. 271, 2019. DOI: https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00271.

GUO, Y. et al. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, p. 107, 2020. DOI: https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107.

GURNEY, Alison M.; ALLAM, Marina. Inhibition of calcium release from the sarcoplasmic reticulum of rabbit aorta by hydralazine. *British Journal of Pharmacology*, v. 114, n. 1, p. 238–244, 1995. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb17155.x.

HAMADY, Asmaa B. et al. Expression of *norA*, *norB* and *norC* efflux pump genes mediating fluoroquinolones resistance in MRSA isolates. *The Journal of Infection in Developing Countries*, v. 18, n. 3, p. 399–406, 2024. DOI: https://doi.org/10.3855/jidc.18009.

HOU, Zhuru et al. Progress in the prevalence, classification and drug resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection and Drug Resistance*, v. 16, p. 3271–3292, 2023. DOI: https://doi.org/10.2147/IDR.S411915.

HUANG, Honghao et al. Tigecycline resistance-associated mutations in the MepA efflux pump in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology Spectrum*, v. 11, n. 4, p. e00634-23, 2023. DOI: https://doi.org/10.1128/spectrum.00634-23.

IRIANTI, M. I. et al. Prenylated isoflavonoids from Fabaceae against the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, v. 13, p. 22548, 2023. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-023-49764-4.

KAATZ, Glenn W.; DEMARCO, Carmen E.; SEO, Susan M. MepR, a repressor of the *Staphylococcus aureus* MATE family multidrug efflux pump MepA, is a substrate-responsive regulatory protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, n. 4, p. 1276–1281, 2006. DOI: https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1276-1281.2006.

KAPP, E.; MALAN, S. F.; JOUBERT, J.; SAMPSON, S. L. Small molecule efflux pump inhibitors in *Mycobacterium tuberculosis*: a promising approach to tackle drug resistance. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 61, n. 16, p. 7168–7184, 2018. DOI: https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00217.

KEREK, Ádám et al. Antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* – literature review. *Critical Reviews in Microbiology*, p. 1–35, 2025. DOI: https://doi.org/10.1080/1040841X.2024.2431131.

KHAN, F. A. et al. Bacterial peptide deformylase inhibition of cyano substituted biaryl analogs: synthesis, in vitro biological evaluation, molecular docking study and in silico ADME prediction. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 24, n. 13, p. 2851–2862, 2016. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.04.021.

KNOX, J.; UHLEMANN, A.-C.; LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections: transmission within households and the community. *Trends in Microbiology*, v. 23, n. 7, p. 437–444, 2015. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.03.007.

LATADO, A. L. et al. Existe evidência para tratar insuficiência cardíaca baseada na raça ou etnia? *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 55, n. 2, p. 110–116, 2009. DOI: https://doi.org/10.1590/S0104-42302009000200012.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, v. 1, n. 4, p. 337–341, 2004. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007.

LLORENTE, María Teresa et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* as etiological agent of endemic diarrhea in Spain: a prospective multicenter prevalence study with molecular characterization of isolates. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, p. 1120285, 2023. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1120285.

LOWY, Franklin D. *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine*, v. 339, n. 8, p. 520–532, 1998. DOI: https://doi.org/10.1056/NEJM199808203390806.

MACHADO, R. D. S.; SILVEIRA, G. P.. Técnicas in vitro para avaliação de potenciais inibidores da bomba de efluxo NorA em *Staphylococcus aureus*: uma breve revisão. *Revista Saúde dos Vales*, v. 11, n. 1, 2024.

MAGEE, Laura A. et al. Hydralazine for treatment of severe hypertension in pregnancy: meta-analysis. *BMJ*, v. 327, n. 7421, p. 955–960, 2003. DOI: https://doi.org/10.1136/bmj.327.7421.955.

MAHESHWARI, Mukesh et al. Hydralazine modifies Aβ fibril formation and prevents modification by lipids in vitro. *Biochemistry*, v. 49, n. 49, p. 10371–10380, 2010. DOI: https://doi.org/10.1021/bi101178e.

MAJOROV, K. B. et al. Isoniazid: mechanism of action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, v. 125, p. 102018, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.102018.

MARE, Anca Delia et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* – a summary of the literature. *Gastroenterology Insights*, v. 12, n. 1, p. 28–40, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/gastroent12010004.

MARIK, Paul E.; RIVERA, Racquel. Hypertensive emergencies: an update. *Current Opinion in Critical Care*, v. 17, n. 6, p. 569–580, 2011. DOI: https://doi.org/10.1097/MCC.0b013e32834c9d25.

MARTINSON, Jonathan N. V.; WALK, Seth T. *Escherichia coli* residency in the gut of healthy human adults. *EcoSal Plus*, v. 9, n. 1, p. ESP-0003-2020, 2020. DOI: https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0003-2020.

MEDICOVER HOSPITALS**.** Hydralazine mechanism of action. *Medicover Hospitals*, 13 ago. 2024. Disponível em: https://www.medicoverhospitals.in/articles/hydralazine-mechanism-of-action. Acesso em: 16 jan. 2026.

MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, B. et al. Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 15, p. 8088, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms23158088.

MONTEIRO, K. L. C.; DE AQUINO, T. M.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B. An update on *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 24, p. 2168–2185, 2020. DOI: https://doi.org/10.2174/1568026620666200901101325.

MURUGAIYAN, J. et al. Progress in alternative strategies to combat antimicrobial resistance: focus on antibiotics. *Antibiotics*, v. 11, n. 2, p. 200, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/antibiotics11020200.

NASCIMENTO, F. B. do et al. Synergistic effect of hydralazine associated with triazoles on *Candida* spp. in planktonic cells. *Future Microbiology*, v. 18, n. 10, p. 661–672, 2023. DOI: https://doi.org/10.2217/fmb-2023-0012.

NASCIMENTO, F. B. S. A. Avaliação da atividade antifúngica da hidralazina, seu efeito sinérgico com itraconazol e mecanismo de ação sobre cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol. 2018.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) — Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

NASCIMENTO, F. B. S. A. do et al. Antimicrobial activity of hydralazine against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology*, v. 19, n. 2, p. 91–106, 2024. DOI: https://doi.org/10.2217/fmb-2023-0216.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. Hydralazine – NIST Chemistry WebBook. [s.d.]. Disponível em: https://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=C86544&Mask=200. Acesso em: 22 abr. 2025.

NAYLOR, Nichola R. et al. Estimating the burden of antimicrobial resistance: a systematic literature review. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, v. 7, p. 1–17, 2018. DOI: https://doi.org/10.1186/s13756-018-0336-y.

NERY, K. L. F. B. et al. Ação antimicrobiana e moduladora da resistência de derivados da hidrazida em cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*: uma revisão integrativa. *Peer Review*, v. 5, n. 17, p. 499–514, 2023. DOI: https://doi.org/10.53660/819.prw2248.

NICOLSEN, N. C.; STANG, A. New antimicrobials: where they fit within the armamentarium. *Infectious Disease Special Edition*, 2019.

NIH – NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Hydralazine hydrochloride (CID 9351). *PubChem*. 2024. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydralazine-Hydrochloride. Acesso em: 21 abr. 2025.

NIKAIDO, Hiroshi. Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, v. 78, n. 1, p. 119–146, 2009. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923.

NIKAIDO, Hiroshi; PAGÈS, Jean-Marie. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 36, n. 2, p. 340–363, 2012. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00306.x.

OCHOA, Theresa J.; CONTRERAS, Carmen A. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 24, n. 5, p. 478–483, 2011. DOI: https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834a8d04.

PATEL, Hardi; RAWAT, Seema. A genetic regulatory see-saw of biofilm and virulence in MRSA pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, p. 1204428, 2023. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1204428.

PATINI, R. et al. The effect of different antibiotic regimens on bacterial resistance: a systematic review. *Antibiotics*, v. 9, n. 1, p. 22, 2020. DOI: https://doi.org/10.3390/antibiotics9010022.

PIRES, D. E.; KAMINSKAS, L. M.; ASCHER, D. B. Prediction and optimization of pharmacokinetic and toxicity properties of the ligand. In: LI, Xiaoli; ZHENG, Wenqing (org.). *Computational Drug Discovery and Design*. New York: Springer, 2018. p. 271–284. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7756-7_15.

REZENDE-JÚNIOR, Luís Mário et al. Chalcones isolated from *Arrabidaea brachypoda* flowers as inhibitors of NorA and MepA multidrug efflux pumps of *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, v. 9, n. 6, p. 351, 2020. DOI: https://doi.org/10.3390/antibiotics9060351.

SANAR MED. *Resumo de hidralazina: indicações, farmacologia e mais!*, 1 jul. 2023. Disponível em: https://sanarmed.com/resumo-de-hidralazina-ligas/. Acesso em: 16 jan. 2026.

SANTOS, J. F. S. In vitro e in silico inibição de bombas de efluxo de *Staphylococcus aureus* por compostos fenólicos. 2023. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) — Universidade Regional do Cariri, Crato, 2023.

SEUKEP, Armel Jackson et al. What approaches to thwart bacterial efflux pumps-mediated resistance? *Antibiotics*, v. 11, n. 10, p. 1287, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/antibiotics11101287.

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

SOUSA, T. C. M. et al. Doenças sensíveis ao clima no Brasil e no mundo: revisão sistemática. *Revista Panamericana de Salud Pública*, v. 42, p. e85, 2018. DOI: https://doi.org/10.26633/RPSP.2018.85.

SPINASSE, L. B. et al. Different phenotypes of the NAT2 gene influences hydralazine antihypertensive response in patients with resistant hypertension. *Pharmacogenomics*, v. 15, n. 2, p. 169–178, 2014. DOI: https://doi.org/10.2217/pgs.13.202.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010. DOI: https://doi.org/10.1002/jcc.21334.

TRUONG-BOLDUC, Q. C. et al. NorA efflux pump mediates *Staphylococcus aureus* response to *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin toxicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 68, n. 2, p. e01001-23, 2024. DOI: https://doi.org/10.1128/AAC.01001-23.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 2002. DOI: https://doi.org/10.1021/jm020017n.

WALVEKAR, P. et al. Self-assembled oleylamine grafted hyaluronic acid polymersomes for delivery of vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 182, p. 110388, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110388.

WANG, Yu et al. Hydralazine inhibits neuroinflammation and oxidative stress in APP/PS1 mice via TLR4/NF-κB and Nrf2 pathways. *Neuropharmacology*, v. 240, p. 109706, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2023.109706.

YUSUF, D. et al. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 48, n. 7, p. 1411–1422, 2008. DOI: https://doi.org/10.1021/ci800084x.

ZHOU, Jie et al. Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer Letters*, v. 237, n. 1, p. 10–21, 2006. DOI: https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.05.028.