

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
E DO AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS INDÓLICOS
FRENTE A ISOLADOS DE *S. aureus* SENSÍVEIS E RESISTENTES AOS
ANTIMICROBIANOS**

LAÍSA BORGES FERREIRA

Orientadora: Prof.^a Dr^a. Andreza F. Martins
Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Pozza Silveira

Porto Alegre
Março/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS INDÓLICOS
FRENTE A ISOLADOS DE *S. aureus* SENSÍVEIS E RESISTENTES A
ANTIMICROBIANOS**

Laísa Borges Ferreira
Bióloga

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia Ambiental

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Andreza F. Martins

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Pozza Silveira

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Março/2018

CIP - Catalogação na Publicação

Borges Ferreira, Laísa
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE
COMPOSTOS INDÓLICOS FRENTE A ISOLADOS DE S. aureus
SENSÍVEIS E RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS / Laísa
Borges Ferreira. -- 2018.
59 f.

Orientador: Andreza Francisco

Martins. Coorientador: Gustavo Pozza

Silveira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Atividade Antibacteriana. 2. Time-Kill. 3.
Indólicos calcogênicos. 4. Toxicidade. 5. Isolados de
Staphylococcus aureus. I. Francisco Martins,
Andreza, orient. II. Pozza Silveira, Gustavo,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Não se deve ir atrás de objetivos fáceis, é preciso buscar o que só pode ser alcançado por meio dos maiores esforços”.

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Dra. Andreza Martins pela orientação e ensinamentos durante este trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Gustavo Pozza, pela parceria realizada para o acontecimento deste trabalho e pela colaboração.

À minha família, Lásia Borges, Marcos Grade, Marcos Borges e Daniel Rodrigues que sempre me incentivaram a estudar e me apoiaram.

Às bolsistas de iniciação científica Victória Martins Lima Cupertino e Franciele Caroline Adam, que me auxiliaram nas etapas deste trabalho.

À Daiane Flores Dalla Lana, doutoranda do Laboratório de Micologia Clínica Aplicada, pela colaboração e amizade, pelos ensinamentos e todos os auxílios prestados neste projeto.

À Edilma Elayne da Silva, doutoranda do BIOLAB por toda colaboração e auxílio.

À Camila Wilhelm, pelos auxílios prestados neste trabalho.

À doutoranda Silvia Adriana Mayer Lentz, pela amizade, auxílio e colaboração.

Às minhas amigas de sempre, Alina Duarte e Luana Barreto pela presença ao longo dessa caminhada, pelo carinho, apoio, risadas e choros, que foram muito importantes.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Ao meu noivo Ronie Lentz Israel da Silva, por estar sempre ao meu lado e nos momentos mais difíceis, demonstrando toda a sua compreensão, apoio e amor.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma, acadêmica ou pessoalmente, durante este caminho.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS INDÓLICOS FRENTE A ISOLADOS DE *S. aureus* SENSÍVEIS E RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS

Autor: Laísa Borges Ferreira
Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Andreza Francisco Martins
Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Pozza Silveira

RESUMO

Devido à utilização indiscriminada de antimicrobianos e a consequente multirresistência dos microrganismos, faz-se necessário o desenvolvimento de novos compostos que sejam mais eficazes. Neste contexto, avaliamos a atividade antibacteriana de 14 compostos indólicos calcogênicos, contendo enxofre e selênio, usando cepas ATCC cujo perfil de resposta aos antimicrobianos já é bem conhecido, através da técnica de microdiluição em caldo. Após a triagem inicial, foram selecionadas 3 moléculas promissoras para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente a 42 isolados clínicos de *S. aureus* com diferentes perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos convencionais. A partir destes resultados, 9 isolados clínicos foram selecionados para avaliar a atividade bactericida/bacteriostática do composto A10 (selecionado devido a sua atividade) através do método de curva de crescimento tempo-morte (*Time Kill Assay*). O composto A10 apresentou atividade bactericida para os 9 isolados clínicos testados e para a cepa ATCC 29213, nas concentrações de 1x CIM e 2x CIM. Com relação aos testes de toxicidade realizados, o composto A10 não foi citotóxico, mutagênico e alergênico nas concentrações testadas, o que representa um resultado promissor no desenvolvimento de um novo antimicrobiano.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (58p.) Março, 2018.

EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF INDOLIC COMPOUNDS FRONT OF *S. aureus* ISOLATED SENSITIVE AND RESISTANT ANTIMICROBIAL

Author: Laísa Borges Ferreira
Advisor: Prof. Dr. Andreza Francisco Martins
Co-Advisor: Prof. Dr. Gustavo Pozza Silveira

ABSTRACT

Due to the indiscriminate use of antimicrobials and the consequent multiresistance of microorganisms, it is necessary to develop new classes of antimicrobials that are more effective. In this context, we evaluated the antibacterial activity of 14 calcogenic indole compounds containing sulfur and selenium using ATCC strains that antimicrobial susceptibility profile is already well known, through the broth microdilution technique. After the initial screening, 3 molecules were selected to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) against 42 clinical isolates of *S. aureus* with different susceptibility profiles to conventional antimicrobials. From these results, 9 clinical isolates were selected in order to evaluate the bactericidal / bacteriostatic activity of compound A10 through the Time Kill Assay method. Compound A10 showed bactericidal activity for the 9 clinical isolates tested and for strain ATCC 29213, in the concentrations of 1x MIC and 2x MIC. Regarding the toxicity tests performed, compound A10 was not cytotoxic, mutagenic and allergenic at the concentrations tested, which represents a promising result for development a new antimicrobial.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (58p.) March, 2018.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral.....	3
2.2	Objetivos Específicos	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	3
3.1.1	Características Microbiológicas	3
3.1.2	Epidemiologia	4
3.1.3	Fisiopatologia.....	6
3.2	Tratamento de Infecções causadas por <i>S. aureus</i>	7
3.2.1	Indólicos.....	9
3.3	Mecanismos de Resistência a Antimicrobianos em <i>S. aureus</i>	10
3.3.1	Resistência à meticilina.....	10
3.3.2	Resistência a macrolídeos	11
3.3.3	Resistência à vancomicina.....	12
3.3.4	Resistência à linezolida.....	12
3.4	Metodologias para Avaliação da Atividade Antibacteriana	13
3.4.1	Ensaio Qualitativos	13
3.4.2	Disco Difusão.....	13
3.4.3	Ensaio Quantitativos	14
3.4.4	Microdiluição	14
3.4.5	Gradiente de concentração.....	14
3.4.6	<i>Checkerboard</i>	15
3.4.7	<i>Time-Kill Curves</i>	15
4.	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1	Síntese dos compostos	16
4.2	Triagem inicial para avaliação da atividade antibacteriana	17
4.3	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	18
4.4	Atividade Antibacteriana – Isolados Clínicos.....	19
4.5	Testes de toxicidade.....	20
4.6	Técnica de <i>Time-Kill</i>	20
4.7	Estatística.....	21

5.	RESULTADOS	21
5.1	Avaliação da triagem inicial	21
5.2	Caracterização dos isolados clínicos e avaliação da CIM	24
5.3	<i>Time-kill</i>	25
5.4	Avaliação da Toxicidade.....	29
6.	DISCUSSÃO	29
7.	CONCLUSÃO	33
8.	REFERÊNCIAS	34
9.	ANEXO – A.....	42

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Triagem dos 14 compostos indólicos frente às cepas ATCC testadas na concentração de 32 µg/mL.	22
Tabela 2. Concentração inibitória mínima dos 10 compostos indólicos frente às cepas ATCC.	23
Tabela 3. Apresentação do resultado da CIM50 e CIM90 dos antibióticos e dos compostos indólicos frente aos isolados clínicos.	24
Tabela 4. Atividade do composto indólico A10 em diferentes concentrações no ensaio de <i>Time-Kill Curves</i> .	25
Tabela 5. Comparação da contagem de colônias nos tempos de 12 e 24 horas para a cepa ATCC 29213.	27
Tabela 6. Comparação da contagem de colônias nos tempos de 12 e 24 horas para a mediana dos 9 isolados.	27

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>S. aureus</i> semeado em placa de Ágar Sal Mantiol.	4
Figura 2. Anel indólico.	9
Figura 3. Estrutura química dos indólicos selecionados.	17
Figura 4. Imagem de uma microplaca de poliestireno de 96 poços do teste de suscetibilidade.	19
Figura 5. Curvas de tempo de morte, com a oxacilina frente a ATCC 29213 e do composto A10 frente a ATCC 29213 e aos 9 isolados clínicos.	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
PVL	Leucocidina de Panton-Valentine
EEs	Enterotoxinas Estafilocócicas
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensíveis à meticilina
SCCmec	Cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i>
PBPs	Proteínas ligantes de penicilina
MLSB	Macrolídeo-lincosamida-estreptogramina B
SCN	<i>Staphylococcus coagulase</i> - negativa
cMLSB	Resistente tanto a eritromicina quanto à clindamicina
iMLSB	Resistente à eritromicina e suscetível à clindamicina
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com suscetibilidade intermediária a vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina
<i>cfr</i>	Resistência ao cloranfenicol-florfenicol®
LRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a linezolida e meticilina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
Se	Selênio
S	Enxofre
DMSO	Dimetilsulfóxido
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
ASM	Ágar Sal Manitol
CIM50	Concentração mínima que inibe o crescimento de 50% dos isolados bacterianos.
CIM90	Concentração mínima que inibe o crescimento de 90% dos isolados bacterianos.

1. INTRODUÇÃO

A história da medicina avançou rapidamente com o desenvolvimento de drogas antibacterianas, principalmente com o advento da penicilina, no início dos anos 40. No entanto, ao longo do tempo, os microrganismos têm apresentado vários mecanismos de resistência que acabaram por diminuir as opções terapêuticas (BITENCOURT, PAVANELLI, 2014; TENOVER, 2006).

A utilização indiscriminada de antimicrobianos na clínica médica humana e veterinária, assim como o uso de fungicidas e bactericidas na agricultura, têm originado incrementos na diversidade e pressão seletiva de microrganismos resistentes, refletindo em falha terapêutica e aumento nas taxas de mortalidade (ALLEN et al., 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2017, do ponto de vista de importância epidemiológica, foram considerados como prioridade crítica os microrganismos: *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos, *Enterobacteriaceae* resistente a carbapenêmicos e produtoras de β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL). Prioridade alta: *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, com sensibilidade intermediária e resistência à vancomicina, *Helicobacter pylori* resistente à claritromicina, *Campylobacter* spp. resistentes às fluoroquinolonas, *Salmonella* resistentes às fluoroquinolonas, *Neisseria gonorrhoeae* resistente à cefalosporina e resistentes às fluoroquinolonas. Prioridade média: *Streptococcus pneumoniae* sem sensibilidade à penicilina, *Haemophilus influenzae* resistente à ampicilina e *Shigella* spp. resistente às fluoroquinolonas (WHO, 2017).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a resistência microbiana é um grave problema de saúde pública, estando associada ao aumento do tempo de internação, dos custos do tratamento e das taxas de morbimortalidade dos pacientes (BRASIL, 2017). Deste modo, o uso inadequado e indiscriminado dos antimicrobianos na comunidade e no ambiente hospitalar é reconhecidamente um importante fator de risco para emergência e a disseminação da resistência microbiana.

Por outro lado, a descoberta de novas classes de antimicrobianos teve um declínio constante nas últimas décadas devido ao desafio de identificar novos produtos de origem natural ou sintetizar moléculas atóxicas que possuam

propriedades antimicrobianas de espectro relevante, além de razões econômicas e legais (MOELLERING, 2011; OVERBYE; BARRETT, 2005).

Confirma-se na literatura o interesse na identificação de estruturas moleculares simples, essas estruturas são denominadas estruturas privilegiadas devido suas características que permitem a entrada em diversos sítios ativos ou sítios ligantes de proteínas que desempenham inúmeras funções celulares (WELSCH; SNYDER; STOCKWELL, 2010).

Neste contexto, um grupo de moléculas tem sido estudado com diferentes finalidades terapêuticas, inclusive antimicrobianas: os indólicos calcogênios, contendo enxofre e selênio. Desde a descoberta em 1993 do potencial de 3-sulfenil-indóis como produtos farmacêuticos, houve uma dedicação significativa ao desenvolvimento de novos derivados indólicos que apresentem interessantes propriedades farmacológicas (LI et al., 2011).

Estudos recentes têm apontado que 3-sulfenil-indóis agem em alvos específicos, atraindo a atenção de grande número de pesquisadores devido ao seu potencial diversificado, tais como antitumorais e atividade antiviral (ZHEN, HONG, ZHOU; 2011).

Do mesmo modo, compostos orgânicos contendo enxofre exercem diversas funções no sistema biológico. Por exemplo, o enxofre está presente na estrutura de muitos aminoácidos como a L-cisteína e L-metionina, formando a estrutura de várias proteínas. Do ponto de vista terapêutico, o enxofre é encontrado nas estruturas de importantes fármacos, tais como o antibiótico sulfametoxazol (MCGARRIGLE et al., 2007).

O selênio (Se), um elemento químico que pertence à família dos calcogênios, foi descoberto em 1817. Inicialmente, acreditava-se que seu forte odor fosse prejudicial à saúde. Entretanto, com a descoberta da existência de diversas seleno-proteínas envolvidas em diferentes processos bioquímicos nos anos 1970, houve um grande interesse na síntese de compostos contendo este elemento e suas avaliações terapêuticas (LANG, 2010).

Assim, neste estudo, foram testados indólicos calcogênios previamente sintetizados pelo Laboratório de Potencial Terapêutico e Biotecnológico de Moléculas Bioativas (BIOLAB), quanto ao seu potencial de ação contra bactérias sensíveis e resistentes aos antimicrobianos, a fim de avaliar o efeito bactericida e/ou bacteriostático destes agentes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antibacteriano de 14 compostos indólicos calcogênicos frente a isolados bacterianos.

2.2 Objetivos Específicos

a) Determinar a Concentração Inibitória mínima (CIM) para cada uma das moléculas usando cepas ATCC: *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700605), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27833), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Streptococcus agalactiae* (ATCC 27956);

b) Definir preliminarmente o espectro de ação das moléculas selecionadas e determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para cada uma das moléculas frente a amostras clínicas, pelo método de microdiluição em caldo;

c) Avaliar o tempo de exposição e a concentração necessária da molécula promissora, para atingir o efeito bactericida e/ou bacteriostático, através do ensaio de curva de tempo-morte (*Time-Kill Assay*);

d) Avaliar o perfil toxicológico da molécula promissora através dos ensaios in vitro de citotoxicidade, mutagenicidade, genotoxicidade e alergenicidade.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Staphylococcus aureus*

3.1.1 Características Microbiológicas

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae*, formado por bactérias classificadas como cocos Gram-positivos devido ao seu formato esférico na forma de cocos isolados, aos pares ou agrupados e na forma de “cachos de uva”. São microrganismos imóveis, não esporulados, anaeróbios facultativos com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, sendo considerados catalase positivos, característica que os diferenciam de outros gêneros. A parede celular é composta

por peptideoglicano e ácido teicóico. Estão presentes na pele e nas membranas mucosas dos humanos (MURRAY PR, ROSENTHAL KS, 2009).

O *S. aureus* produz a enzima coagulase, cresce em meios comuns, caldo ou ágar simples e a coloração das colônias varia desde o acinzentado até o amarelo-ouro, podendo ser beta-hemolítico. Cresce bem em ágar sal manitol (Figura1), meio com altas concentrações de sal, uma vez que consegue fermentar o manitol produzindo ácido lático, podendo suportar até 7,5% de cloreto de sódio (NaCl). A identificação da coagulase positiva é um teste importante para a caracterização desta espécie (CHEN et al., 2017).



Figura 1. *S. aureus* semeado em placa de Ágar sal manitol

3.1.2 Epidemiologia

Staphylococcus aureus foi reconhecido como um importante agente causador de doenças em todo mundo, não só em indivíduos hospitalizados, mas também naqueles que vivem na comunidade (THAPALIYA et al., 2017). Esse microrganismo é conhecido por sua capacidade de causar um conjunto diversificado de infecções que vão desde infecções superficiais de pele e intoxicação alimentar até infecções mais graves, como osteomielite, endocardite, síndrome do choque séptico e síndrome da pele escaldada (POLLITT, DIGGLE., 2017).

Embora o *S. aureus* seja um patógeno oportunista, é encontrado na pele e na nasofaringe em aproximadamente 30% de indivíduos saudáveis. No entanto, ele pode interagir com o hospedeiro como agentes patogênicos, por meio de lesões

ou por dispositivos médicos naqueles pacientes imunodeprimidos, ficando mais predisposto a infecções e aos mecanismos de virulência do patógeno (KRISMER et al., 2017).

A patogenicidade de *S. aureus* está relacionada a fatores de virulência, incluindo proteínas de ligação a fibronectina A e B, a leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), as hemolisinas, a toxina 1, sendo esta responsável pela síndrome de choque tóxico (TSST-1), e as enterotoxinas estafilocócicas (EEs) que causam intoxicação alimentar. Essas enterotoxinas estafilocócicas são classificadas em 23 diferentes tipos, incluindo os cinco principais tipos sorológicos EEA, EEB, EEC, EED e EEE. Alguns desses fatores de virulência estão envolvidos nas habilidades de aderência, colonização e invasão do tecido pelo patógeno (SCHELIN et al., 2011; RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2017).

A prevalência de infecção de sítio cirúrgico causada por *S. aureus* tem aumentado ao longo das últimas décadas, sendo ele considerado o principal causador de infecção de sítio cirúrgico. De acordo com dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de 1992 a 2002, a proporção de infecção em cirurgias, causadas pelo *S. aureus* nos hospitais aumentou de 16,6% para 30,9% entre os pacientes submetidos à revascularização miocárdica (ANDERSON, 2007).

Staphylococcus aureus é um importante patógeno humano, e as infecções causadas por ele estão associadas à morbidade e mortalidade consideráveis. O aumento da incidência de infecções é parcialmente uma consequência dos avanços no atendimento ao paciente e também da capacidade do patógeno de se adaptar a um ambiente em mudança. A frequência de infecções por *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) continua a crescer em ambientes hospitalares e, mais recentemente, em ambientes comunitários em todo o mundo (BOUCHER, COREY; 2008).

Em um estudo brasileiro, publicado em 2005, foram descritos os primeiros casos de infecções por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina adquiridos na comunidade (CA-MRSA) no Brasil. Os isolados de MRSA foram coletados de dois pacientes que apresentavam infecções cutâneas e de tecidos moles, e de outro paciente apresentando artrite séptica (RIBEIRO et al., 2005).

No Brasil, foi realizado um estudo transversal em dois principais centros de saúde em Porto Alegre, no período entre setembro de 2007 e março de 2008 com 104 pacientes. Neste estudo, foi isolado o *S. aureus* em 55,8% dos pacientes

com infecções na pele e nos tecidos moles e, desses, houve resistência à oxacilina e à cefoxitina em 8,6% dos casos (GELATTI et al., 2013). Em Vitória da Conquista, um estudo mostrou altas taxas de detecção de *S. aureus* e MRSA foi detectado em 7,4% em crianças brasileiras saudáveis (CARVALHO et al., 2017).

O MRSA está em constante mudança, tanto os clones circulantes como os seus perfis de resistência aos antimicrobianos modificam-se consideravelmente, dependendo da região. Contudo, a escolha adequada do antimicrobiano reduz as chances das infecções, gerando melhores resultados para o paciente (GUZMÁN-BLANCO et al., 2009).

No Brasil, dados de 2015 publicados pela ANVISA, referentes às UTIs, mostram que o *S. aureus* é classificado como o terceiro microrganismo mais frequentemente notificado como agente etiológico causador de infecções em pacientes adultos hospitalizados em UTIs (BRASIL, 2016).

3.1.3 Fisiopatologia

S. aureus pode abrigar-se dentro das células epiteliais, células endoteliais e até mesmo nos macrófagos. A capacidade da bactéria de sobreviver à fagocitose é determinada por vários fatores de virulência de uma forma que distingue suas interações com outros tipos de células. O *S. aureus* persiste dentro dos macrófagos durante dias, sem afetar a viabilidade dessas células móveis, que podem servir como veículos para a disseminação da infecção (LIU, 2009).

Durante a infecção, *S. aureus* produz inúmeras enzimas, como proteases, lipases e esterases, que permitem invadir e destruir os tecidos do hospedeiro (RACHEL; GORDON; FRANKLIN, 2008). Algumas cepas de *S. aureus* produzem toxinas que podem ocasionar efeitos sistêmicos, como a síndrome do choque séptico e intoxicação alimentar (DINGES et al., 2000).

O tipo mais comum de infecções por *S. aureus* são infecções superficiais de pele, tecidos moles e celulites, até infecções mais graves como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia, entre outras (WIDMER, PITTET; 1992).

Também a osteomielite é uma das complicações por *S. aureus*. O osso é um substrato ideal para a bactéria, uma vez que expressam várias adesinas que se ligam aos receptores químicos encontrados na superfície das células epiteliais do hospedeiro, promovendo a aderência da bactéria a essas células. Também feridas

profundas que infeccionam podem levar à osteomielite, pois a bactéria presente pode difundir-se e atingir um osso próximo ao ferimento (MONTANARO et al., 2011).

A dermatite atópica é uma doença alérgica de pele que está associada a lesões eczematosas e pruriginosas crônicas. Kyung-Duck e colaboradores recentemente apresentaram um estudo onde foi estabelecido o papel das toxinas de *S. aureus* que estão relacionadas a essa doença. Aproximadamente 90% dos pacientes com dermatite atópica são colonizados por *S. aureus* e de 50% a 60% são colonizados por cepas produtoras de toxinas (PARK; PAK; PARK, 2017).

Um estudo realizado por Jiménez e colaboradores em 2011 obteve 60 isolados de *S. aureus*, 30 sensíveis à meticilina (MSSA) e 30 resistentes (MRSA), provenientes de pacientes pediátricos, sendo 45% dos isolados secundários a infecções cutâneas e de tecidos moles, 13,3% de pneumonia, 10% infecção no local cirúrgico, 8,3% de bacteremia relacionada ao cateter venoso central, 5% de bacteremia primária, 5% de artrite, 1,7% de osteomielite e 11,7% de outras infecções.

Neste estudo foram identificados os genes que codificam alguns fatores de virulência, incluindo leucocidina de Panton-Valentine (PVL), Enterotoxinas A-E estafilocócicas, toxinas esfoliativas A e B e toxina da síndrome do choque tóxico 1. Os genes de virulência foram mais diversos e frequentes em MSSA do que nos isolados de MRSA (JIMÉNEZ et al., 2011).

Desta forma podemos observar a capacidade de colonização e a patogenicidade do *S. aureus*, sendo influenciada não só pela presença de genes de resistência antimicrobiana, mas principalmente pelos fatores de virulência.

3.2 Tratamento de Infecções causadas por *S. aureus*

A maioria dos isolados de *S. aureus*, tanto de hospitais quanto da comunidade, são resistentes a inúmeros antibióticos, dificultando o tratamento das infecções.

Assim, o tratamento bem-sucedido das infecções graves causadas por *S. aureus* multirresistente é possível apenas com a última linha de antibióticos, como vancomicina e linezolida (ECKMANN; DRYDEN, 2010).

A vancomicina é o antimicrobiano de escolha para o tratamento de infecções causadas por MRSA e atualmente é o segundo antibiótico mais

comumente utilizado em hospitais. Quando há suspeita de MRSA em pacientes hospitalizados com infecções da pele e dos tecidos moles, tais como celulite purulenta, a vancomicina é a melhor opção de tratamento (ECKMANN; DRYDEN, 2010). Nas infecções por MSSA, os antimicrobianos recomendados incluem penicilinas, tais como nafcilina ou oxacilina, e se o patógeno for resistente, é recomendada a clindamicina ou linezolida (LI et al., 2017).

A linezolida também é utilizada para infecções de pele, tecidos moles e pneumonia causada por MRSA. Clinicamente, a sua eficácia é semelhante à vancomicina e sua resistência é rara. Apesar do isolamento de cepas de *S. aureus* resistentes à vancomicina, essa droga é ainda muito utilizada para infecções causadas por MRSA (CHAMBERS; DELEO, 2010).

A clindamicina igualmente pode ser utilizada para tratamento de infecções por MRSA, devido a suas particularidades farmacocinéticas, bloqueando diretamente a síntese de proteína bacteriana. Apesar da clindamicina ser uma opção terapêutica, as cepas que expressam o fenótipo macrolídeo-lincosamida-estreptogramina B (MLSB) resistente podem não responder de modo eficaz ao tratamento (SILVA et al., 2016).

Algumas cepas de *S. aureus* produzem uma toxina conhecida como leucocidina de Panton-Valentine (PVL); essas toxinas causam pneumonia necrosante no paciente e o tratamento recomendado prontamente para esse tipo de infecção são os antibióticos linezolida e clindamicina (CHEN et al; 2014).

Para tratamento de infecções de pele complicadas, endocardites, bacteremia e meningite, o antibiótico daptomicina é um lipopeptídeo cíclico que pode ser usado. Entretanto, há relatos crescentes na literatura de *S. aureus* resistente a daptomicina. Essa resistência é principalmente observada em casos de tratamentos prolongados (HEIDARY et al., 2017; LOTHER; PRESS, 2017).

Delafloxacina é um novo derivado de fluoroquinolona aprovado para o tratamento de infecções bacterianas causadas por *S. aureus* na pele. Para avaliar sua eficácia, foram realizados estudos in vitro e estudos clínicos de fase I,II,III e IV. Os resultados dos ensaios relacionados a essa indicação demonstraram atividade in vivo e in vitro para ser considerada como uma alternativa oral frente aos MSSA e MRSA (ABDULLAH; IDRIS; SAPARON, 2017).

3.2.1 Indólicos

Os derivados indólicos são compostos que apresentam em sua constituição estrutural um anel benzênico (6 carbonos) fundido a um anel pirrólico (anel de 5 membros com um nitrogênio), sendo constituído por um sistema aromático com 10 pares de elétrons, em que um par não ligante encontra-se no átomo de nitrogênio. Esta aromaticidade encontra-se representada por tracejados na Figura 2.

Considerando a natureza da estrutura indólica, podemos observar que a mesma apresenta-se: na posição 1 o átomo de nitrogênio (cor azul), dando início a contagem anti-horária para os próximos 7 átomos de carbonos (cor cinza) que estão ligados aos átomos de hidrogênio (cor branca) (KHURANA et al., 2014).

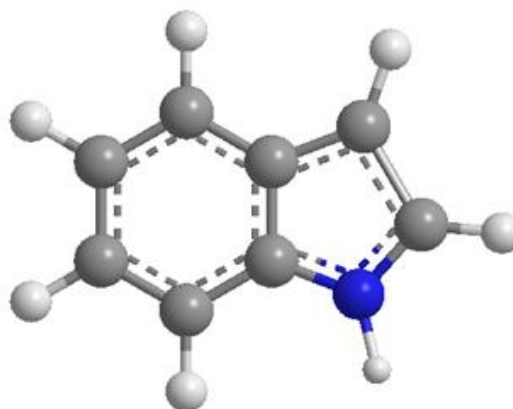


Figura 2. Anel indólico

Os indólicos podem apresentar um dos calcogênios, o enxofre (S) ou selênio (Se), pertencentes ao grupo 16 da tabela periódica. A classe dos 3-sulfenil-indóis, por exemplo, possui importantes atividades biológicas e farmacológicas. São empregadas no tratamento de diversas patologias, tais como: doenças cardíacas, alergias e obesidade (CLAYDEN, GREEVES, WARREN; 2001).

Contudo, os indólicos calcogênios contendo selênio também têm sido estudados, devido à descoberta das suas ações celulares que podem induzir apoptose e inibir o crescimento celular, podendo prevenir e até combater células cancerígenas no organismo. Finalmente, seleno-derivados orgânicos vêm sendo preparados e empregados em inúmeros estudos em que suas atividades antimicrobianas *in vitro* e *in vivo* são determinadas (SENG; TIEKINK, 2012).

3.3 Mecanismos de Resistência a Antimicrobianos em *S. aureus*

3.3.1 Resistência à metilina

A terapia antimicrobiana para infecções causadas por *S. aureus*, inicialmente, era simples. O primeiro antimicrobiano a ser utilizado clinicamente foi a penicilina, que funcionou muito bem até a década de 60. A partir do surgimento de cepas resistentes, foi então desenvolvido o β -lactâmico sintético metilina, que era resistente à ação das β -lactamases que o *S. aureus* produzia (CHAMBERS, 1997).

Contudo, com a introdução da metilina na prática clínica, as cepas passaram também a desenvolver resistência a esse β -lactâmico, além de expressarem multirresistência (KATAYAMA; ITO; HIRAMATSU, 2000).

As cepas resistentes à metilina foram denominadas de MRSA e são resistentes a todos os antimicrobianos β -lactâmicos. O MRSA associado às infecções hospitalares carrega o elemento genético móvel denominado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*SCCmec*) dos tipos I, II e III; o MRSA associado a infecções da comunidade carrega preferencialmente o *SCCmec* do tipo IV e eventualmente o do tipo V (CHAMBERS, 2001). Esse tipo de cassete cromossômico é menor que os outros tipos e não possui genes acoplados que codificam resistência a outros antimicrobianos não β -lactâmicos. Assim, de maneira geral, o CA-MRSA é susceptível à maioria dos antimicrobianos não β -lactâmicos.

Os antimicrobianos β -lactâmicos se ligam a proteínas que participam da síntese da parede celular, chamadas PBPs (proteínas ligantes de penicilina), impedindo a formação da parede celular e resultando em lise bacteriana. O mecanismo de resistência à metilina está relacionado ao desenvolvimento de uma PBP adicional, a PBP2a, que é plenamente funcional, mas não tem afinidade por antimicrobianos β -lactâmicos (FISHOVITZ et al., 2014).

A codificação dessas novas PBPs tornando esses patógenos resistentes à oxacilina está relacionada à aquisição do gene *mecA*, o qual faz parte de um elemento genético móvel detectado em isolados de MRSA (SAEED; MARSH; AHMAD, 2014; NASCIMENTO, 2017).

3.3.2 Resistência a macrolídeos

Os macrolídeos atuam inibindo a síntese de proteínas através da ligação em receptores na subunidade 50S do ribossomo, levando à inibição da transpeptidação, translocação, alongamento da cadeia e, em última análise, a síntese de proteínas bacterianas. Contudo, essa alteração na subunidade 50S confere resistência simultânea a todos os antibióticos macrolídeos. Além disso, a resistência pode se dar por meio da diminuição da permeabilidade celular e por inativação enzimática (LECLERCQ, 2002; ADALETI et al., 2010).

Os mecanismos de resistência à azitromicina ou à claritromicina são os mesmos ou semelhantes aos da eritromicina. Entretanto nenhuma diferença substancial de resistência à azitromicina, claritromicina e eritromicina pode ser observada, o que confirma a resistência cruzada entre os três antimicrobianos. Azitromicina, eritromicina e claritromicina são antibióticos da classe dos macrolídeos que são utilizados no tratamento de infecções do trato respiratório adquiridas na comunidade, particularmente pneumonia (ADALETI et al., 2010; ZUCKERMAN; QAMAR; BONO, 2009).

A telitromicina, um composto semi-sintético derivado da eritromicina, foi desenvolvida como alternativa às cepas resistentes aos macrolídeos. O espectro desse antibiótico abrange os agentes patogênicos respiratórios mais importantes, incluindo os pneumococos resistentes aos macrolídeos, mas não é eficaz contra as cepas de *Streptococcus pyogenes* e *S. aureus* com o perfil de resistência macrolídeo-lincosamida-estreptogramina B (MLS) (ACKERMANN; RODLOFF, 2003).

Em um estudo conduzido por Cetin e colaboradores em 2010, investigaram-se os genes de prevalência que codificam a resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (MLSB) e obtiveram 301 isolados clínicos de *S. aureus* e *Staphylococcus coagulase* - negativa (SCN) resistentes a eritromicina (CETIN et al; 2010). Destes, 63,5% exibiram um fenótipo de resistência o cMLSB (resistente tanto a eritromicina quanto à clindamicina); no entanto, 36,5% expressaram o fenótipo de resistência iMLSB (resistente à eritromicina e suscetível à clindamicina). Os determinantes de resistência foram mais prevalentes em *S. aureus* onde 62% dos isolados apresentaram o gene *ermA* e 30% em SCN devido à presença do gene *ermC*.

3.3.3 Resistência à vancomicina

A vancomicina é um antibiótico da classe dos glicopeptídicos. Foi aprovada para uso em seres humanos em 1958 e, no final da década de 1980, tornou-se um antibiótico de escolha para o tratamento de infecções por MRSA em ambientes hospitalares. Alguns anos depois, em 1996, houve o primeiro relato de *S. aureus* com suscetibilidade intermediária a vancomicina (VISA) no Japão e em 2002 foi relatado o primeiro isolado de *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA) nos Estados Unidos. Apesar disso, o isolamento de cepas de *S. aureus* resistentes à vancomicina ainda é pouco prevalente e essa droga continua sendo muito utilizada para tratar infecções causadas por MRSA (HIRAMATSU et al., 1997; CHANG et al, 2003; TARAI; DAS; KUMAR, 2013).

A resistência completa à vancomicina em *S. aureus* é conferida pelo gene *vanA* codificado no transposon *Tn1546* de *Enterococcus*, sendo causada por alterações no peptídeo terminal para D-alanina-D-lactato no lugar de D-alanina-D-alanina, impedindo que a vancomicina se ligue ao seu sítio alvo (MCGUINNESS; MALACHOWA; DELEO, 2017).

Outro aspecto a ser destacado, por constituir grande preocupação, é a transferência do gene de resistência *vanA* do *Enterococcus* para o *S. aureus* por meio de plasmídeos (DESHPANDE et al., 2007). A resistência à vancomicina é um problema crescente, particularmente nos hospitais.

3.3.4 Resistência à linezolida

A linezolida é um antibiótico sintético que pertence à classe das oxazolidinonas e tem sido utilizada para tratamento de infecções de pele, tecidos moles e pneumonia por MRSA. Clinicamente, a eficácia é semelhante à vancomicina e a resistência é rara. Entretanto não é um agente de escolha no tratamento de infecções em terapia prolongada, devido ao seu potencial de toxicidade hematológica e neurológica grave. O uso desse antibiótico é a última opção terapêutica, sendo geralmente reservado para o tratamento de infecções graves por *S. aureus* resistentes aos demais antibióticos (BIALVAEI et al., 2017).

O mecanismo de resistência envolve a aquisição do gene de *cfz* (resistência ao cloranfenicol-florfenicol), uma metil-transferase que modifica a posição A2503 do gene 23S rRNA levando à mutação nas proteínas ribossomais e pela mutação no domínio V do gene 23S rRNA (G2576T), sendo este último o

mecanismo mais comum de resistência à linezolida. A disseminação do gene *cfr* reduziria a eficácia da linezolida para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas resistentes (MORALES et al., 2010., LONG et al., 2006).

Em 2007, Toh e colaboradores descreveram o primeiro isolado clínico de MRSA na Colômbia resistente à linezolida. Essa resistência foi determinada pela presença do gene *cfr*. Dois novos casos de resistência à linezolida associada à presença do gene *cfr* em isolados clínicos de *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus* foram descritos em 2008 nos Estados Unidos (TOH et al; 2007).

Um estudo realizado por García e colaboradores em 2010 obteve entre abril e julho de 2008, 12 isolados de *S. aureus* resistentes à linezolida e meticilina (LRSA), sendo 6 de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica e 3 com bacteremia. Todos os isolados apresentaram o gene *cfr*. Devido à emergência da resistência a este fármaco, a administração de linezolida foi reduzida de 202 doses em abril de 2008 para 25 em julho de 2008. E então, a partir de julho de 2008 e abril de 2010, não foram identificados novos casos de infecção por *S. aureus* nas culturas semanais de vigilância ou nas amostras diagnosticadas. De acordo com os dados obtidos, o surto foi devido à combinação do aumento do uso da linezolida e da disseminação clonal de *S. aureus*. Entretanto, o controle precoce do surto LRSA, medidas de controle de infecção e a redução do uso de linezolida (SÁNCHEZ; 2010).

3.4 Metodologias para Avaliação da Atividade Antibacteriana

3.4.1 Ensaio Qualitativo

3.4.2 Disco Difusão

O teste de disco-difusão em ágar foi descrito em 1966, por Kirby & Bauer. É um dos métodos de detecção da suscetibilidade mais simples, confiável e mais utilizado na prática laboratorial. O seu princípio básico é a difusão do antimicrobiano na superfície do ágar a partir de um disco impregnado com o mesmo antimicrobiano (BAUER et al; 1996; JORGENSEN; FERRARO, 2009). Na leitura do teste, os resultados são interpretados comparando o diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano com os critérios estabelecidos no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Desta forma, os microrganismos podem ser classificados

em: sensíveis, intermediários ou resistentes. Esses resultados orientam os clínicos na seleção da melhor opção terapêutica para o paciente (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

3.4.3 Ensaios Quantitativos

3.4.4 Microdiluição

Atualmente, essa técnica de diluição é considerada como teste padrão-ouro, sendo utilizada para determinar a concentração mínima de um agente, necessária para inibir o crescimento de um microrganismo. Os agentes antimicrobianos são geralmente testados em diluições consecutivas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo é considerada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM) (JORGENSEN; FERRARO, 2009; CSI, 2015).

Segundo Andrews 2001, as CIM's são consideradas excelentes ferramentas para determinar a susceptibilidade dos microrganismos frente aos antimicrobianos. A técnica baseia-se na determinação da atividade inibitória *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano em placas de 96 poços com o fundo em forma de "U". As placas são inoculadas com uma suspensão padrão do microrganismo a ser testado. Após incubação *overnight*, a 35°C, por 16 a 20 horas, avalia-se os resultados e determina-se a CIM, que pode ser detectada a "olho nu" ou através de aparelhos baseados em leitura óptica (ANDREWS, 2001).

3.4.5 Gradiente de concentração

A metodologia de gradiente em uma fita plástica, como o Etest®, é de prática na rotina laboratorial por ser versátil e apresentar boa concordância com as metodologias de referência. Nessa metodologia, uma tira de plástico é revestida com um gradiente contínuo de concentrações de antibióticos de um lado e uma escala de interpretação do agente antimicrobiano do outro lado.

A tira é colocada na superfície de uma placa de ágar inoculada com bactérias e incubada *overnight*, e uma zona elíptica de inibição do crescimento é formada em torno da tira.

A CIM é lida na intersecção da zona com a tira. Entre as limitações dessa técnica podemos mencionar o custo das fitas e a quantidade limitada de antibióticos

que pode ser testada por placa (WHITE et al. 1996; JORGENSEN; FERRARO, 2009).

3.4.6 *Checkerboard*

O Método de *Checkerboard* é um teste de microdiluição, onde é avaliada a CIM dos fármacos isoladamente e em combinação. Os cálculos para avaliar o sinergismo são realizados a partir do índice de fração inibitória (FICI) (Vitorino et al, 2017).

É realizada uma microdiluição em placas de 96 poços que contêm diluições da associação de antimicrobianos e dos mesmos isoladamente. Após a incubação, a análise de crescimento é realizada apenas uma vez, entre 18 e 24 horas, e as seguintes fórmulas são utilizadas para calcular o índice de fração inibitória (FIC): $FICA = (CIMA \text{ em combinação}) / (CIMA \text{ sozinho})$, $FICB = (CIMB \text{ em combinação}) / (CIMB \text{ sozinho})$ e o índice $FIC = FICA + FICB$.

O valor da combinação é derivado da maior diluição da combinação antimicrobiana que não permitiu crescimento visível. Com este método, um FICI de ≤ 0.5 é considerado sinérgico, $>0.5-4$ considerado como aditivo e de >4.0 considerado antagonista (DONG et al; 2017).

3.4.7 *Time-Kill Curves*

O método *Time-Kill Curves* (Curvas de tempo-morte bacteriana) comprova o tempo em que a substância-teste leva para matar as células microbianas. Para realização de ensaios TKC, são seguidas recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). A concentração do antimicrobiano e a morte da bactéria são avaliadas em determinados intervalos de tempo. A contagem média das colônias (UFC/mL) recuperadas com antimicrobiano é comparada com o controle sem antimicrobiano. O resultado final é expresso em log de UFC/mL. O método pode também avaliar o sinergismo de dois ou mais antimicrobianos que visam inibir o crescimento bacteriano.

Define-se como sinergismo a diferença de ≥ 2 log na contagem de colônias, em 24 horas, da combinação testada frente ao agente isoladamente mais ativo (DONG et al., 2017).

A vantagem desta técnica é o fornecimento de dados sobre atividade bactericida dos antimicrobianos (definida como redução ≥ 3 log na contagem de

colônias comparado ao inóculo inicial) e também a possibilidade de analisar dinamicamente a ação antimicrobiana e o tempo de interação (WHITE et al., 1996).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Síntese dos compostos

Os compostos foram sintetizados e fornecidos pelo grupo do professor Dr. Gustavo Pozza Silveira do laboratório de Potencial Terapêutico e Biotecnológico de Moléculas Bioativas (BIOLAB), do Instituto de Química da UFRGS.

A preparação dos compostos foi realizada conforme metodologia de Braga e colaboradores, 2014, com modificações.

Uma mistura contendo indol (0,5 mmol), dissulfeto (0,25 mmol), iodo (5% molar) e dimetilsulfóxido (3 equiv.) foi agitada a 80 °C durante 16 horas. Após, removeu-se o solvente sob vácuo e o líquido obtido dissolvido em acetato de etila (20 mL).

Então, a fase orgânica foi lavada com 15 mL de uma solução aquosa de NaHSO₃ a 10%. A fase orgânica foi seca em Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando uma mistura de acetato de etila/hexano (20:80) como eluente. Todos os compostos foram caracterizados por ponto de fusão (quando sólidos), Infravermelho e ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C e comparados com a literatura (BRAGA et al; 2014).

Esses ensaios foram realizados no laboratório de Potencial Terapêutico e Biotecnológico de Moléculas Bioativas (BIOLAB) que fazem parte da tese de doutorado da aluna Edilma Elayne da Silva (PPG de Química Orgânica/ UFRGS).

Após a triagem, três compostos (Figura 3) seguiram para a realização dos demais ensaios.

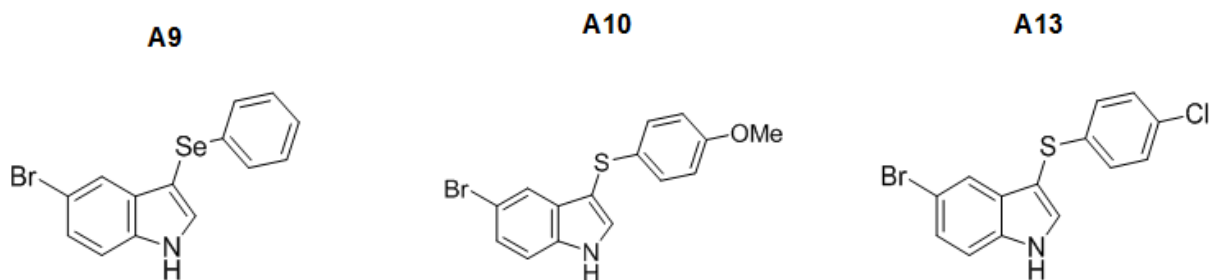


Figura 3. Estrutura química dos indólicos calcogênios selecionados.

4.2 Triagem inicial para avaliação da atividade antibacteriana

Inicialmente foi realizada uma triagem com 14 compostos indólicos frente às cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) dos principais agentes causadores de infecções, tais como *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700605), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27833), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Streptococcus agalactiae* (ATCC 27956).

As soluções foram preparadas diluindo-se os compostos em Dimetilsulfóxido 2% (DMSO). Posteriormente, foram realizadas diluições, também em caldo Muller Hinton (MH), até as concentrações desejadas em cada teste. As soluções dos compostos foram devidamente armazenadas sob refrigeração.

A partir de então, realizou-se a técnica de microdiluição em caldo somente em uma única concentração de 32 µg/mL. Para isso foram utilizadas microplacas de poliestireno de 96 poços, com fundo em forma de “U”, e, posteriormente, foi preparada uma suspensão bacteriana 0,5 da escala de McFarland e a suspensão foi diluída 1:100, seguindo a metodologia CLSI 2015 com modificações.

Na microplaca de 96 poços, a 1ª coluna corresponde ao controle de crescimento bacteriano; da 2ª até a 11ª coluna é o teste, e a 12ª coluna corresponde ao controle de esterilidade, somente o caldo MH. Os compostos que inibiram as cepas ATCC na concentração de 32 µg/mL foram selecionados para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM).

Também foi realizado o controle do diluente com a solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração de DMSO 2% para avaliação de toxicidade do solvente frente às bactérias.

A proposta da triagem era selecionar os indólicos que apresentassem a menor CIM frente às cepas ATCC para dar continuidade aos ensaios com os isolados clínicos.

4.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As CIMs de Indólicos foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015).

Para realização do teste, uma série de microplacas de poliestireno de 96 poços, com fundo em forma de “U”, foram preparadas com caldo MH (BECTON DICKINSON), e as moléculas de indólicos na concentração inicial de 64 µg/mL. Posteriormente foi preparada uma suspensão bacteriana 0,5 da escala de McFarland, que foi então diluída 1:100 em caldo MH.

Inicialmente, pipetou-se 50 µL de caldo MH da 3ª coluna até a 11ª e 100 µL nos poços da 12ª coluna (somente o caldo MH para controle de esterilidade do teste), na 2ª coluna adicionou-se 100 µL do composto, após foi retirado 50 µL e realizou-se a diluição seriada até a 11ª coluna, desprezando-se 50 µL, e, por último, foi adicionado 100 µL do inóculo na 1ª coluna (controle de crescimento bacteriano, caldo MH e inóculo) e posteriormente pipetou-se da 2ª até a 11ª coluna 50 µL do inóculo, ficando cada poço da microplaca com um volume final de 100 µL conforme representado na Figura 4.

As microplacas foram incubadas a 35°C por 18-20 horas. Todo o experimento foi realizado em duplicata. A CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano.

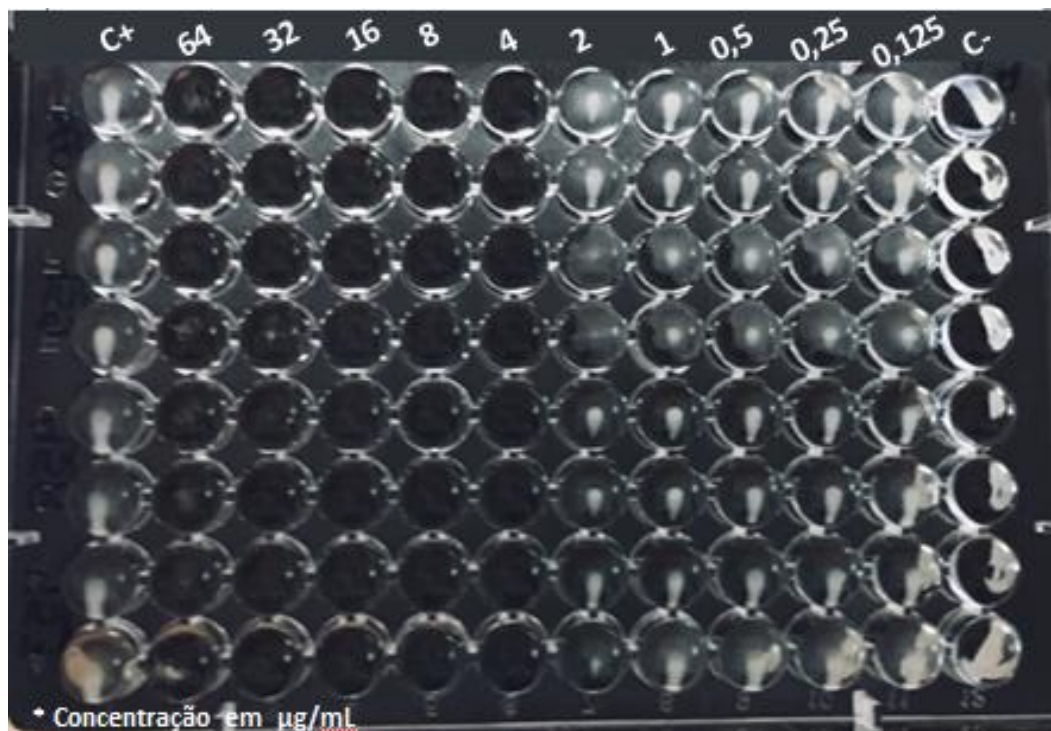


Figura 4. Imagem de uma microplaca de poliestireno de 96 poços do teste de suscetibilidade. ^aC+: controle de crescimento do inóculo; ^b Composto A10 na faixa de concentração de 0,125 a 64 µg/mL ; ^c C -: controle de esterilidade do caldo MH.

4.4 Atividade Antibacteriana – Isolados Clínicos

Diante dos resultados promissores obtidos com os compostos A9, A10 e A13 frente à cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, foram selecionados 42 isolados clínicos de *S. aureus* – cedidos pelo Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – com diferentes perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos para determinação da CIM. Os isolados clínicos foram semeados em placa de Ágar sangue e estocados em duplicata contendo caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) com glicerol 16%, a -20°C no Laboratório de Microbiologia Ambiental do ICBS (Instituto de Ciências Básicas em Saúde). A identificação dos isolados foi confirmada por meio da técnica por MALDI-TOF MS- *Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of light mass spectrometry*. A determinação da CIM foi realizada conforme descrito no item 4.3 para os compostos A9, A10, A13 e oxacilina. Em todos os ensaios, utilizou-se a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 com o antibiótico oxacilina para fins de controle de qualidade do teste.

O valor de CIM50 e CIM90 foram definidas como as concentrações inibitórias mínimas capazes de inibir o crescimento de 50% e 90%, respectivamente, dos isolados.

4.5 Testes de toxicidade

Os testes de viabilidade celular, mutagenicidade e genotoxicidade foram realizados no Laboratório de Imunologia Clínica e Toxicológica pelo Grupo de Toxicologia Celular (Toxcel) da UNIPAMPA – Uruguaiana. A descrição metodológica encontra-se no ANEXO A.

O teste de alergenicidade foi realizado na membrana cório-alantoide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM) no Laboratório de Toxicologia no Instituto Federal Catarinense/ Campus Concórdia. A descrição metodológica encontra-se no ANEXO A. Para todos os testes foi utilizada a concentração de 32 µg/mL do composto em estudo.

4.6 Técnica de *Time-Kill*

O ensaio de *Time-Kill* in vitro foi realizado de acordo com a metodologia de Isenberg, 1996, e recomendações do CLSI, 2015 (Isenberg HD, 1992; CLSI, 2015).

Foram selecionados 9 isolados clínicos a partir de perfis de susceptibilidade previamente conhecidos, sendo 4 isolados sensíveis e 5 isolados resistentes a Oxacilina.

As concentrações utilizadas no ensaio foram 0,5x, 1x e 2x vezes a CIM do composto ou da oxacilina para cada isolado e para a ATCC.

Para realização da técnica, os 9 isolados clínicos e a cepa *S. aureus* ATCC 29213 foram semeados em Ágar Sal Manitol e incubados *overnight* a 37°C. Para a obtenção do inóculo inicial, preparou-se uma suspensão bacteriana de 0,5 na escala de McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL) e incubada na estufa com agitação em torno de 4 horas a 35°C até a obtenção de uma turbidez 1,0 na escala de McFarland (aproximadamente 3×10^8 UFC/mL), a qual foi utilizada nos ensaios. Essa suspensão foi diluída 1:5 em caldo Mueller-Hinton, obtendo-se uma suspensão 6×10^5 UFC/mL.

Realizou-se o ensaio em tubos de vidros estéreis, contendo caldo MH com e sem o composto. Foram retiradas alíquotas de 50 µL da solução-teste para contagem nos tempos 0,1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas. Realizaram-se diluições seriadas das alíquotas coletadas em microplacas que posteriormente foram semeadas (20 µL) em placas com ágar Sal Manitol (ASM). As placas foram incubadas por 24 horas

em 35°C. Após a incubação, as colônias foram contadas manualmente (diluição ideal entre 20 e 200 UFC).

A atividade bactericida foi definida como a redução de ≥ 3 log do total de UFC/mL em relação ao inóculo original. A atividade bacteriostática foi definida como a redução entre ≥ 2 log e < 3 log do total de UFC/mL em relação ao inóculo original. Foi realizado o ensaio somente para o composto A10, pois o critério de escolha foi devido ao seu menor valor de lipofilicidade ($\log P$ 5,44), tendo em vista a possibilidade de se tornar um fármaco para tratamento por via oral.

4.7 Estatística

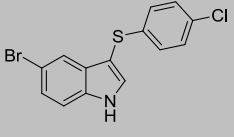
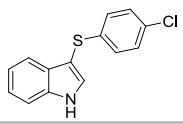
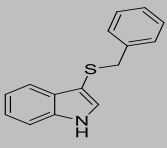
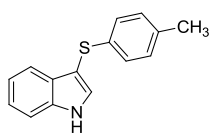
O teste não paramétrico de Wilcoxon foi aplicado para a comparação da contagem de colônias obtidas nos tempos 12h e 24h no ensaio realizado com o composto A10. As variáveis foram descritas por mediana, amplitude interquartílica (para os casos dos isolados clínicos) e amplitude de variação devido à assimetria da distribuição das mesmas. Nos casos onde a contagem foi zero, foi utilizado o valor arbitrário de 0,01 para a possível transformação logarítmica.

Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises foram conduzidas no software SPSS v.21.0.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da triagem inicial

Dos 14 compostos indólicos avaliados na triagem, 10 foram capazes de inibir o crescimento bacteriano na concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$ para duas cepas: *S. aureus* ATCC 29213 e *S. agalactiae* ATCC 27956. A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos na triagem.

<p>A13</p> 	N/I	N/I	N/I	N/I	I	N/I	N/I	I
<p>A14</p> 	N/I	N/I	N/I	N/I	N/I	N/I	N/I	I
<p>A15</p> 	N/I	N/I	N/I	N/I	I	N/I	N/I	I
<p>A16</p> 	N/I	N/I	N/I	N/I	I	N/I	N/I	I

Legenda I = Houve inibição do crescimento bacteriano; N/I = Não houve inibição do crescimento bacteriano.

O resultado da CIM dos 10 indólicos mostrou que os 3 compostos (A9, A10 e A13) apresentaram CIMs mais baixas frente a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, conforme apresentado na Tabela 2. Desta forma o experimento foi conduzido a partir daqui com os isolados clínicos de *S. aureus*.

Tabela 2: Concentração inibitória mínima dos 10 compostos indólicos frente às cepas ATCC.

Indólicos	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 (CIM µg/mL)	<i>S. agalactiae</i> ATCC 27956 (CIM µg/mL)
A7	32	16
A8	16	32
A9	4	32
A10	4	32
A11	32	32
A12	32	16
A13	2	32
A14	32	32
A15	16	32
A16	16	32

5.2 Caracterização dos isolados clínicos e avaliação da CIM

Dos 42 isolados clínicos selecionados para o estudo, 88,10% (37) foram oriundos do trato respiratório, 4,76% (2) da urina, 2,38% (1) de fluidos corporais, 2,38% (1) de ferida e 2,38% (1) de sangue.

Quanto ao perfil de susceptibilidade, 55% (23) dos isolados apresentaram resistência à amoxicilina + ácido clavulânico, piperacilina + tazobactam, ampicilina, penicilina, levofloxacina e ceftriaxona. Para os demais antibióticos testados: linezolida, minociclina, vancomicina, tigeciclina e meropenem mostraram-se sensíveis. Do total de isolados, 93% (38) foram resistentes à oxacilina, sendo considerados MRSA e 7% (4) foram sensíveis. Os resultados das CIM50 e CIM90 dos antibióticos avaliados e dos compostos indólicos selecionados, estão na tabela 3.

Tabela. 3 Resultados da CIM50 e CIM90 dos antibióticos e dos compostos indólicos frente aos isolados clínicos de *S. aureus*.

Antibióticos	CIM50 ($\mu\text{g/mL}$)	CIM90 ($\mu\text{g/mL}$)
Amoxicilina + ácido clavulânico	1	8
Piperacilina + Tazobactam	1	16
Levofloxacina	0,25	4
Ceftriaxona	2	64
Linezolida	2	4
Minociclina	0,25	0,25
Vancomicina	0,5	1
Ampicilina	4	16
Penicilina	8	8
Tigeciclina	0,12	0,25
Meropenem	0,12	0,25
Oxacilina	4	64
Composto A9	4	8
Composto A10	8	16
Composto A13	4	16

5.3 Time-kill

O composto A10 foi selecionado para o ensaio de *Time-Kill* devido ao seu menor valor de LogP (5,44) quando comparado aos compostos A9 (5,81) e A13 (6,27). Conforme mostram os resultados da Tabela 4, o composto A10 apresentou atividade bactericida para todos os isolados clínicos testados e para a ATCC 29213 nas concentrações de 1xCIM e 2xCIM.

Também foi possível observar nos isolados 442, 459, 460, 487 o efeito bacteriostático e nos isolados 444, 463, 467 e 480 o efeito bactericida na concentração de 0,5xCIM. Cabe ressaltar que os isolados 459, 460, 469 e 487 são MRSA.

Tabela 4. Atividade do composto indólico A10 em diferentes concentrações no ensaio de *Time-Kill Curves*.

Isolados	Log Δ UFC/mL			
	A10 ^a (CIM)	0.5xCIM	1xCIM	2xCIM
442	8	-2,813	-4,778 ^c	-4,778 ^c
444	8	-4,778 ^c	-4,778 ^c	-4,778 ^c
459^b	4	-2,222	-4,602 ^c	-4,778 ^c
460^b	8	-2,802	-4,301 ^c	-4,778 ^c
463	8	-4,778 ^c	-4,778 ^c	4,778 ^c
467^b	8	-4,778 ^c	-4,778 ^c	-4,778 ^c
469^b	8	-0,301	-4,778 ^c	-4,778 ^c
480	4	-4,778 ^c	-4,778 ^c	-4,778 ^c
487^b	4	-2,933	-4,778 ^c	-4,778 ^c
ATCC29213	4	-3,878 ^c	-4,778 ^c	-4,778 ^c

^aA10: composto, ^bMRSA: 459, 460, 487, 469 e 467, ^cEfeito bactericida.

Na Figura 5, podemos observar as curvas de tempo-morte bacteriana. A cepa ATCC apresentou recrescimento com a oxacilina na concentração 0,5xCIM em 12 horas. Nas concentrações de 1xCIM (Log -4,243 UFC/mL) e 2xCIM (Log -4,602

UFC/mL) houve redução na contagem de colônias até o zero e a atividade bactericida foi observada a partir de 4 horas. Já o composto A10 reduziu a contagem de colônias até o zero a partir de 2 horas na menor concentração testada, 0,5xCIM.

Para os isolados clínicos, o composto A10 exibiu atividade bactericida a partir de 1 hora (isolados 442, 444, 459, 460, 463, 467, 469, 480 e 487) nas concentrações de 1xCIM e 2xCIM. Esse fenômeno se manteve até o final do experimento nas duas maiores concentrações.

Quanto ao recrescimento, o fenômeno foi observado apenas na concentração 0,5xCIM para os isolados 459, 460 e 487.

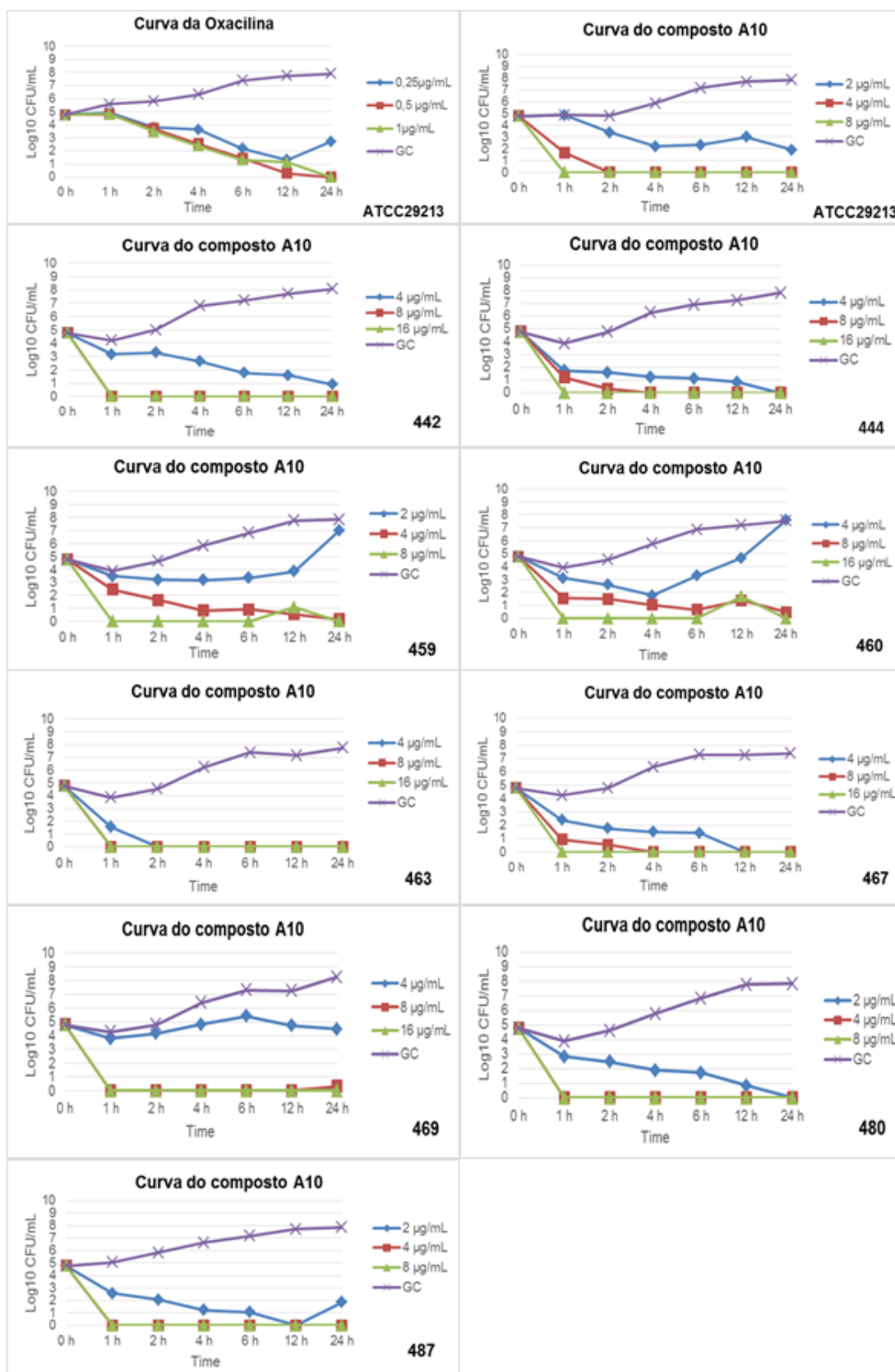


Figura 5. Curvas de tempo de morte, com a oxacilina frente a ATCC 29213, do composto A10 frente a ATCC 29213 e aos 9 isolados clínicos.

A análise estatística demonstrou que não houve diferença na contagem de UFC da cepa ATCC com o composto A10 nos tempos 12 e 24 horas, conforme Tabela 5.

Tabela 5. Comparação da contagem de colônias nos tempos de 12 e 24 horas para a cepa ATCC 29213.

Concentrações	12h	24h	P**
	Mediana (Min a Max)	Mediana (Min a Max)	
0,5xCIM	2,79 (2,30 a 3,28)	1,93 (1,90 a 1,95)	0,180
1xCIM	-2,00 (-2,00 a -2,00)*	-2,00 (-2,00 a -2,00)*	1,000
2xCIM	-2,00 (-2,00 a -2,00)*	-2,00 (-2,00 a -2,00)*	1,000

0,5xCIM: 2 µg/mL; 1xCIM: 4 µg/mL 2xCIM: 8µg/ mL. * foi utilizado o valor de 0,01 para o cálculo do logaritmo de base 10.

Em relação à contagem de colônias dos 9 isolados clínicos após a incubação do composto A10, foi possível observar diferença estatística somente na concentração de 0,5xCIM nos tempos 12 e 24 horas, resultado apresentado na Tabela 6 com as respectivas concentrações.

Tabela 6. Comparação da contagem de colônias nos tempos de 12 e 24 horas para a mediana dos 9 isolados.

Concentrações	12h	24h	p**
	Mediana (P25-P75) [Min a Max]	Mediana (P25-P75) [Min a Max]	
0,5 x CIM	2,06 (1,85 a 2,69) [-2,00* a 2,86]	2,00 (-2,00 a 2,35) [-2,00 a 2,78]	0,006
1 x CIM	-2,00 (-2,00 a -1,00) [-2,00 a 2,78]	-2,00 (-2,00 a -2,00) [-2,00 a 2,78]	0,144
2 x CIM	-2,00 (-2,00 a -0,98) [-2,00 a 2,69]	-2,00 (-2,00 a -2,00) [-2,00 a -2,00]	0,063

*442;444;460;463;467: 0,5xCIM: 4 µg/mL, 1xCIM: 8 µg/mL e 2xCIM: 16µg/mL.

*459;480;487: 0,5xCIM: 2µg/mL, 1xCIM: 4µg/mL e 2xCIM: 8µg/mL.

Legenda: P25=Percentil 25; P75=Percentil 75; Min = valor mínimo das amostras; Max=valor máximo das amostras; * foi utilizado o valor de 0,01 para o cálculo do logaritmo de base 10.

5.4 Avaliação da Toxicidade

O teste de citotoxicidade mostrou que o composto A10 não interferiu de modo significativo no processo de proliferação celular e nem inviabilizou as células leucocitárias humanas avaliadas. No teste de mutagenicidade, o composto não aumentou o índice de mutações nos leucócitos e também não influenciou no surgimento de micronúcleos (MN). No teste de genotoxicidade, mutações e alterações no DNA foram detectadas para o composto, nas concentrações testadas dentro dessas condições experimentais.

No teste de alergenicidade, realizado pela metodologia HET-CAM, o score de irritação (IS) para o composto na concentração de 32 µg/mL foi 3,47. Assim, a amostra foi caracterizada como não irritante pela metodologia utilizada.

Os gráficos dos resultados encontram-se no Anexo A.

6. DISCUSSÃO

S. aureus tem desenvolvido diversas estratégias para resistir à ação de praticamente todos os antibióticos, (ALVAREZ; LABARCA; SALLES, 2010) como observado com os isolados clínicos avaliados no presente estudo, já que 93% (38) dos isolados apresentaram resistência à oxacilina, sendo considerados MRSA. Além disso, foram considerados resistentes a pelo menos 3 classes de antimicrobianos analisados, configurando-se, dessa forma, como multirresistentes (MAGIORAKOS et al., 2012).

No Brasil, as taxas de isolamento de MRSA têm aumentado, representando um sério problema de saúde pública (BRASIL, 2017). Nos últimos anos, as infecções por *S. aureus* têm sido uma das causas mais comuns de infecções graves, tanto na comunidade, quanto em hospitais em todo o mundo (RAYGADA; LEVINE, 2009). Segundo afirmação de Saleem e colaboradores em seu estudo, recentemente houve um aumento acentuado com relação às infecções causadas por MRSA, o que vem resultando numa crescente utilização da vancomicina e o surgimento de cepas resistentes (SALEEM; FASIH; ZAFAR, 2017).

Segundo Su-Qin e colaboradores, o 3-selanil e o 3-sulfenil-indóis são uma classe importante de heterocíclicos que foram amplamente aplicados em muitos campos terapêuticos, como no tratamento de alergias, doença cardíaca, câncer, HIV e obesidade. Suas propriedades farmacêuticas importantes encorajaram os pesquisadores a desenvolverem métodos diferentes e eficazes para a síntese de

indólicos calcogênios (SU-QIN et al., 2015).

Contudo, este estudo é pioneiro em avaliar a determinação da atividade antibacteriana dos indólicos calcogênios contendo (S) e (Se) frente a isolados clínicos de *S. aureus*. A definição dos valores de CIM para estes isolados clínicos representam o avanço dos estudos por ampliar os dados na literatura referentes a essa classe de compostos testados.

Sendo assim, os 3 indólicos calcogênios avaliados neste trabalho foram capazes de inibir consideravelmente o crescimento bacteriano. Esses resultados fornecem evidências de que os indólicos são moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antimicrobiana.

O ensaio *Time-Kill* é um teste no qual se determina o tempo em que a substância-teste impede o desenvolvimento do microrganismo testado. Ele fornece a dinâmica de ação dessa substância e sua interação com o microrganismo ao longo do tempo. Os resultados do ensaio com o composto A10 foram significativos, pois inibiram completamente o crescimento dos diferentes isolados clínicos, tanto em 1xCIM quanto em 2XCIM, produzindo efeito bactericida que se manteve ao longo de todo o experimento.

Além disso, o composto A10 se mostrou mais ativo quando comparado com a oxacilina frente à cepa ATCC 29213 e apresentou efeito bactericida contra os 5 isolados MRSA avaliados.

Na literatura, há alguns estudos da cinética de outros compostos com ação bactericida contra isolados de *S. aureus* (LU et al., 2013). Em 2016, a atividade bactericida in vitro com compostos 2-fenil-1,2-benzisotiazol-3(2H)-1 chamado de ebsulfur, foram avaliados em relação às cepas de MRSA. Os ensaios de *time-kill* demonstraram que, em concentrações que variaram de (1-2µg/mL), o composto apresentou efeito bactericida e levou à morte celular completa em 24 horas (NGO et al., 2016).

Mohammad e colaboradores avaliaram a atividade bactericida dos compostos sintéticos de difenilureia 1 e 2 e do antibiótico Vancomina frente aos isolados de MRSA. Os resultados obtidos no *time-kill* demonstraram que, em duas horas, houve o efeito bactericida dos compostos frente aos isolados, já a Vancomicina exibiu atividade bactericida lenta e exigiu 24 horas para alcançar o mesmo efeito (MOHAMMAD et al., 2017).

Considerando os resultados estatísticos obtidos, o composto A10 se mostrou eficaz na redução das UFCs já em 12 horas de ensaio frente à cepa ATCC 29213. Em relação à mediana dos 9 isolados, nos tempos 12 e 24 horas, na concentração de 0,5xCIM, houve diferença significativa na contagem de colônias entre os tempos, já nas concentrações 1xCIM e 2xCIM, a contagem de colônias em 12 ou 24 horas não se diferem.

Com relação aos parâmetros que compõe a avaliação da toxicidade, o composto A10 não apresentou indícios de citotoxicidade, mutagenicidade ou irritabilidade, mas apresentou de genotoxicidade. Devido a esse resultado, poderíamos considerar que o composto A10 não seria promissor para o desenvolvimento de um novo fármaco para uso oral ou sistêmico.

Entretanto, cabe ressaltar que o ensaio do cometa (genotoxicidade) detecta lesões reversíveis, já o teste de MN (mutagenicidade) detecta lesões mais persistentes no DNA, que não podem ser reparadas (HARTMANN et al., 2003).

O HET-CAM é um teste muito sensível para determinar os parâmetros toxicológicos, desta forma, o uso de tal metodologia é aceitável, tornando-se uma alternativa para outros testes (BUBALO et al., 2015).

De acordo com os resultados obtidos, ainda que o composto não possa ser utilizado como antimicrobiano para administração oral, ressaltamos a possibilidade de futuros estudos para sua utilização na forma tópica, ou até mesmo como desinfetante e antibiofilme.

O desenvolvimento de novos métodos para a esterilização de materiais e a conscientização da técnica asséptica por aqueles que participam direta ou indiretamente da assistência ao paciente são algumas das preocupações para diminuir os altos índices de infecções cruzadas em hospitais (TAJEDDIN et al., 2016).

O biofilme bacteriano é uma matriz de células bacterianas e está altamente associado a infecções persistentes crônicas. Os antimicrobianos utilizados têm eficácia limitada contra os biofilmes, portanto, novas estratégias para prevenir e remover essas estruturas são necessárias (ZHOU et al., 2014). Os dispositivos médicos implantáveis são suscetíveis à colonização por *S. aureus* e muitas infecções tem sido associadas à formação de biofilme em dispositivos, como cateter venoso, próteses e equipo que funcionam como locais protegidos contra a ação dos antibióticos e do sistema imunológico do hospedeiro (HOGAN et al., 2015).

O *S. aureus* é um dos patógenos mais importantes nas infecções de pele e de tecidos moles que podem ser localmente severas ou evoluir para infecções invasivas (TONG et al., 2015). Em algumas situações os antimicrobianos de uso tópico oferecem vantagens em relação à administração sistêmica, como, por exemplo, a precaução de toxicidade sistêmica e os efeitos colaterais da droga, sendo utilizado para tratamento de infecções de pele. Como implicação, o antibiótico tópico ideal deve ter um fraco potencial de irritabilidade, penetrar a pele de forma eficiente e atingir doses locais adequadas no local da infecção (LIO; KAYE, 2011).

A mupirocina é um antimicrobiano de uso tópico padrão para descolonização nasal de MRSA, mas há uma preocupação com a emergência de resistência e são necessários outros agentes como alternativa. Também tem sido eficaz no tratamento de infecções de pele e tecidos moles causadas por *S. aureus*, bem como em infecções de feridas cirúrgicas (COATES; BAX; COATES, 2009). Semelhante à mupirocina, as principais indicações clínicas para administração do uso tópico de ácido fusídico são para tratamentos de infecções superficiais da pele e tecidos moles causadas por *S. aureus* (LONG, 2008).

Em um estudo na Coreia, em um Hospital Universitário, foram coletadas amostras da pele, ferida, pus, ponta de cateter venoso central, urina e sangue de pacientes no período de 2011 a 2012. De 497 isolados MRSA, 22 eram resistentes à mupirocina; dos 22 isolados, 13 eram resistentes ao ácido fusídico, mas todos foram sensíveis à retapamulina. (PARK; KIM; PARK, 2015).

Segundo Horner e colaboradores, ao longo da última década, houve um foco considerável na prevenção de infecções associadas à saúde, incluindo infecções causadas por MRSA. Uma das medidas preventivas foi o uso de agentes antissépticos como a clorexidina para higiene das mãos e descolonização da pele antes de procedimentos invasivos (HORNER; MAWER; WILCOX, 2012).

Em um estudo de meta-análise e revisão sistemática, observou-se que uma intervenção para descolonização com mupirocina, clorexidina, combinado com vancomicina oral, em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca ou ortopédica, foi eficaz na redução de infecções no local cirúrgico. Desta forma, elaborar programas de intervenção incluindo a descolonização nasal e a profilaxia para portadores de MRSA podem diminuir as taxas de infecções no local cirúrgico (SCHWEIZER; PERENCEVICH; MCDANEL, 2013).

Entretanto, o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos de uso tópico requer a descoberta e desenvolvimento de novos agentes antibacterianos e os estudos com os compostos avaliados nesse trabalho podem ser ampliados nesse sentido (THANGAMANI; YOUNIS; SELEEM, 2015a; THANGAMANI; YOUNIS; SELEEM, 2015b).

7. CONCLUSÃO

- Dos 14 indólicos avaliados na triagem inicial frente às 8 cepas ATCCs, 10 compostos indólicos inibiram o crescimento bacteriano das cepas *S. aureus* ATCC 29213 e *Streptococcus agalactiae* ATCC 27956.
- Os compostos A9, A10 e A13 foram os únicos que apresentaram CIM inferiores a 4 µg/mL e isso ocorreu somente frente à cepa de *S. aureus* ATCC 29213.
- Os 3 compostos indólicos calcogênicos (A9, A10, A13) avaliados neste trabalho foram capazes de inibir o crescimento bacteriano dos 42 isolados clínicos testados. A faixa de CIM desses compostos foi de 2 – 16 µg/mL para os isolados.
- Na determinação das curvas de crescimento-morte, constatou-se que o efeito bactericida do composto A10 inicia em 1 hora de incubação, permanecendo nas 24 horas de análise.
- Nas curvas de crescimento-morte constatou-se que o composto A10 apresentou atividade bactericida contra isolados MRSA e esse efeito permaneceu durante todo o experimento.
- Os ensaios de toxicidade mostraram que o composto A10 não foi citotóxico, mutagênico, mas foi genotóxico para leucócitos humanos.
- O composto A10 não causou irritabilidade no teste do HET-CAM.
- Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o composto pode ser promissor como um desinfetante, antibiofilme e antimicrobiano para uso tópico.

8. REFERÊNCIAS

Artigos:

- Abdullah E, Idris A, Saparon A. 2017. What is Old is New Again: Delafloxacin, a Modern Fluoroquinolone. *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences*, 12(10), 3218–3221.
- Ackermann G, Rodloff AC. 2003. Drugs of the 21st century: Telithromycin (HMR 3647) - The first ketolide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(3), 497–511.
- Adaleti R, Nakipoglu Y, Ceran N, Tasdemir C, Kaya F, Tasdemir S. 2010. Prevalence of phenotypic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates to macrolide, lincosamide, streptogramin B, ketolid and linezolid antibiotics in Turkey. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 14(1), 11–14.
- Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 8(4), 251–259.
- Alvarez C, Labarca J, Salles M. 2010. Prevention strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in Latin America. *Revista Chilena de Infectología: Órgano Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 27 Suppl 2(ext 4737), S81-93.
- Anderson DJ, Sexton DJ, Kanafani ZA, Auten G, Kaye KS. 2007. Severe surgical site infection in community hospitals: epidemiology, key procedures, and the changing prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection Control and Hospital Epidemiology: The Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*, 28(9), 1047–53.
- Andrews JM. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 Suppl 1, 5–16.
- Azeredo JB, Godoi M, Martins GM, Silveira CC, Braga AL. 2014. A Solvent- and Metal-Free Synthesis of 3 - Chacogenyl-indoles Employing DMSO/l 2 as an Eco-friendly Catalytic Oxidation System. *Journal of Organic Chemistry*, 79(Table 1), 4125–4150.
- Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2), 71–79.
- Bubalo MC, Radošević K, Srček VG, Das RN, Popelier P, Roy K. 2015. Cytotoxicity towards CCO cells of imidazolium ionic liquids with functionalized side chains: preliminary QSTR modeling using regression and classification based approaches. *Ecotoxicol Environ Saf*. 112:22-8.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. 1996 Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45(4):493-6.
- Bialvaei AZ, Rahbar M, Yousefi M, Asgharzadeh M, Kafil HS. 2017. Linezolid: A promising option in the treatment of Gram-positives. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(2), 354–364.

- Bitencourt JS, Pavanelli MF. 2014. Urinary infection in patients of public health care of Campo Mourão-PR, Brazil: bacterial prevalence and sensitivity profile. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 50(5), 346–351.
- Boucher HW, Corey GR. 2008. Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*.46(S5), S344–S349.
- Burow ME, Weldon CB, Tang Y, Navar GL, Krajewski S, Reed JC, Beckman BS. 1998. Differences in susceptibility to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. *Cancer Research*. 58(21), 4940–4946.
- Butler MS, Blaskovich MA, Cooper MA. 2017. Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. *The Journal of Antibiotics*.70(1):3-24.
- Carvalho SP, Almeida JB, Andrade YS, Silva LC, Oliveira AC, Nascimento FS, Marques LM. 2017. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCC mec type IV and V isolated from healthy children attending public daycares in northeastern Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*.21 (4), 464–467.
- Cetin ES, Gunes H, Kaya S, Aridogan BC, Demirci M. 2010. Distribution of Genes Encoding Resistance to Macrolides, Lincosamides and Streptogramins Among Clinical Staphylococcal Isolates in a Turkish University Hospital. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 43(6), 524–529.
- Chambers HF.1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews*.10 (4), 781–791.
- Chambers HF. 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerging Infectious Diseases*. 7(2), 178–182.
- Chambers HF, Deleo FR. 2010. Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic. *Nature Reviews Microbiology*. 7(9), 629–641.
- Chen J, Luo Y, Zhang S, Liang Z, Wang Y, Zhang Y, Zhou G, Jia Y, Chen L, She D. 2014. Community-acquired necrotizing pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin in a Chinese teenager: case report and literature review. *International Journal of Infectious Diseases* . 26:17-21.
- Chen BJ, Xie XY, Ni LJ, Dai XL, Lu Y, Wu XQ, Li HY, Yao YD, Huang SY. 2017. Factors associated with *Staphylococcus aureus* nasal carriage and molecular characteristics among the general population at a Medical College Campus in Guangzhou, South China. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*.16(1), 28.
- Coates T, Bax R, Coates A. 2009. Nasal decolonization of *Staphylococcus aureus* with mupirocin: strengths, weaknesses and future prospects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 64(1):9-15.
- Collins AR. 2009. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. 681(1), 24–32.
- Deshpande LM, Fritsche TR, Moet GJ, Biedenbach DJ, Jones RN. 2007. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe : a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 58, 163–170.

- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM, Dinges MM, Orwin P M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus* Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Rev.* 13 (1), 16–34.
- Dong C, Li LX, Cui ZH, Chen SW, Xiong, YQ. 2017. Synergistic Effect of Pleuromutilins with Other Antimicrobial Agents against *Staphylococcus aureus* In Vitro and in an Experimental *Galleria mellonella* Model. *Frontiers in Pharmacology.* 1–8.
- Eckmann C, Dryden M. 2010. Treatment of complicated skin and soft-tissue infections caused by resistant bacteria: value of linezolid, tigecycline, daptomycin and vancomycin. *European Journal of Medical Research.* 30;15(12):554-63.
- Fishovitz J, Hermoso JA, Chang M, Mobashery S. 2014. Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology.* 66(8):572-7.
- Gelatti LC, Bonamigo RR, Inoue FM, Carmo MS, Becker AP, Silva CFM, Alves P. 2013. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCC mec type IV in southern Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 46(1), 34–8.
- Guzmán-Blanco M, Mejía C, Isturiz R, Alvarez C, Bavestrello L, Gotuzzo E, Seas C. 2009. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. *International Journal of Antimicrobial Agents.*34(4), 304–308.
- Hogan S, Stevens NT, Humphreys H, O’Gara JP, O’Neill E. 2015. Current and future approaches to the prevention and treatment of staphylococcal medicaldevice-related infections. *Current Pharmaceutical Design.* 21(1):100-13.
- Hartmann A, Agurell E., Beevers C, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis.* 18(1), 45–51.
- Heidary, M, Khosravi AD, Khoshnood S, Nasiri MJ, Soleimani S, Goudarzi M. 2017. Daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*1–11.
- Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Kobayashi I. 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet.* 350(9092), 1670–1673.
- Horner C, Mawer D, Wilcox M. 2012. Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci: is it increasing and does it matter? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2547–2559.
- Jacobsen ID, Grosse K, Slesiona S, Hube B, Berndt A, Brock M. 2010. Embryonated eggs as an alternative infection model to investigate *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infect Immun.* Jul;78(7):2995-3006.
- Jiménez JN, Ocampo AM, Vanegas JM, Rodríguez EA, Garcés CG, Patiño LA, Correa MM. 2011. Characterisation of virulence genes in methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a paediatric population in a university hospital of medellín, Colombia. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz.* 106(8), 980–985.
- Jorgensen JH, Ferraro MJ. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases.* 1;49(11):1749-55.

- Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. 2000. A new class of genetic element, *staphylococcus cassette chromosome mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44 (6), 1549–1555.
- Khurana L, Ali HI, Olszewska T, Ahn KH, Damaraju A, Kendall DA, Lu D. 2014. Optimization of Chemical Functionalities of Indole-2-carboxamides To Improve Allosteric Parameters for the Cannabinoid Receptor 1 (CB1). *Journal of Medicinal and Chemistry* . 10;57(7):3040-52.
- Krismer B, Weidenmaier C, Zipperer A, Peschel A. 2017. The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. *Nature Reviews. Microbiology*. 15 (11), 675–687.
- Kirsch-Volders M, Fenech M. 2001. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis*. 16(1):51-8.
- Lang S. 2010. Selenium and Tellurium Chemistry: Historical Background. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 21(11), 2027–2031.
- Leclercq R. 2002. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clinical Infectious Diseases*. 34(4), 482–492.
- Li J, Zhao QH, Huang KC, Li ZQ, Zhang LY, Qin DY, Huang WX. 2017. Linezolid vs. vancomycin in treatment of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* infections: a meta-analysis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 21(17), 3974–3979.
- Li Z, Hong L, Liu R, Shen J, Zhou X. 2011. Copper-catalyzed chalcogenoamination of 2-alkynylanilines with dichalcogenides for one-step synthesis of 3-sulfenylindoles and 3-selenylindoles. *Tetrahedron Letters*. 52(12), 1343–1347.
- Lio PA, Kaye ET. 2011. Topical antibacterial agents. *Infectious Disease Clinics of North America*. 18(3):717-33.
- Liu GY. 2009. Molecular Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Infection. *Pediatric Research*. 65, 71–77.
- Long BH. 2008. Fusidic acid in skin and soft-tissue infections. *Acta Dermatol Venerol. Suppl* 216: 14–20
- Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, Schwarz S, Vester B. 2006. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50(7), 2500–2505.
- Lothar SA, Press N. 2017. Once-Daily Treatments for Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Are They Good Enough? *Current Infectious Disease Reports*. 19(11), 5–7.
- Lu X, Yang X, Li X, Lu Y, Ren Z, Zhao L, You X. 2013. In Vitro Activity of Sodium New Houttuynfonate Alone and in Combination with Oxacillin or Netilmicin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *PlosOne*. 2;8(7): e68053.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Monnet DL 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 18(3), 268–281.

- McGarrigle EM, Myers EL, Illa O, Shaw MA, Riches SL, Aggarwal VK. 2007. Chalcogenides as organocatalysts. *Chemical Reviews*. 107 (12):5841-83.
- McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. 2017. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 23; 90 (2):269-281.
- Moellering RC. 2011. Discovering new antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 37(1), 2–9.
- Mohammad H, Younis W, Ezzat HG, Peters CE, Abdelkhalek A, Cooper B, Seleem MN. 2017. Bacteriological profiling of diphenylureas as a novel class of antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Plos One*. 1–21.
- Montanaro L, Testoni, F, Poggi A, Visai L, Speziale P, Arciola CR. 2011. Emerging pathogenetic mechanisms of the implant-related osteomyelitis by *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Artificial Organs*. 34(9), 781–788.
- Morales G, Picazo JJ, Baos E, Candel FJ, Arribi A, Peláez B, Sánchez-García, M. 2010. Resistance to Linezolid Is Mediated by the *csr* Gene in the First Report of an Outbreak of Linezolid-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*. 50(6), 821–825.
- Mukhopadhyay I, Chowdhuri DK, Bajpayee M, Dhawan A. 2004. Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay. *Mutagenesis*. 19(2), 85–90.
- Nascimento TC, Diniz CG, Silva VL, Ferreira-Machado AB, Fajardo MO, de Oliveira TLR, Ferreira DC, Cavalcante FS, Santos KRND. 2017. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from an intensive care unit in Minas Gerais, Brazil, over a six-year period. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 22(1):55-59.
- Ngo HX, Shrestha SK, Green KD, Garneau-Tsodikova S. 2016. Development of ebsulfur analogues as potent antibacterials against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic Medicinal Chemistry*. 15;24 (24):6298-6306.
- Overbye KM, Barrett JF. 2005. Antibiotics: Where did we go wrong? *Drug Discovery Today*. 10 (1), 45–52.
- Park KD, Pak SC, Park KK. 2017. The pathogenetic effect of natural and bacterial toxins on atopic dermatitis. *Toxins*. 9(1), 1–19.
- Park SH, Kim JK, Park K. 2015. In Vitro Antimicrobial Activities of Fusidic Acid and Retapamulin against Mupirocin- and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Annals of Dermatology*. 27(5), 551–6.
- Pollitt EG, Diggle SP. 2017. Defining motility in the Staphylococci. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 74 (16), 2943–2958.
- Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK. 2003. Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* Resistance Gene. *New England Journal of Medicine*. 348(14): 1342-7.
- Rachel JG, Franklin DL. 2008. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clinical Infectious Diseases*. 46:S350–9.
- Raygada JL, Levine DP. 2009. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Growing Risk in the Hospital and in the Community. *Am Health Drug Benefits*. 2(2), 86–95.

- Ribeiro A, Dias C, Silva-carvalho MC, Berquó L, Ferreira FA, Neves R, Berquo, L. 2005. First Report of Infection with *Staphylococcus aureus* in South America. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(4), 1985–1988.
- Rodríguez-Lázaro D, Oniciuc EA, García PG, Gallego D, Fernández-Natal I, Dominguez-Gil M, Hernández M. 2017. Detection and characterization of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in foods confiscated in EU borders. *Frontiers in Microbiology*. 1–10.
- Saeed K, Marsh P, Ahmad N. 2014. Cryptic resistance in *Staphylococcus aureus*: a risk for the treatment of skin infection? *Current Opinion in Infectious Diseases*. 27(2), 130–6.
- Saleem F, Fasih N, Zafar A. 2017. Susceptibility pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* to vancomycin and other alternate agents: report from a private sector hospital laboratory. *Pakistan Medical Association*. 67(11), 1743–1746.
- Santos MGF. F., Sagrillo M, Machado MM, Almeida RC, Mostardeiro CP, Duarte MF, da Cruz IM. 2010. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicology in Vitro*. 24(5), 1410–1416.
- Sánchez GM, De la Torre MA, Morales G, Peláez B, Tolón MJ, Domingo S, Candel FJ, Andrade R, Arribi A, García N, Martínez Sagasti F, Fereres J, Picazo J. 2010. Clinical outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *Journal of the American Medical Association*. 303 (22):2260-4.
- Schelin J, Wallin-Carlquist N, Cohn, MT, Lindqvist R, Barker GC, Rådström P. 2011. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*. 2(6), 580–92.
- Schmid W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 31(1), 9–15.
- Schweize M, Perencevich E, Mcdanel J. 2013. Effectiveness of a bundled intervention of decolonization and prophylaxis to decrease Gram positive surgical site infections after cardiac or orthopedic surgery: systematic review. *British Medical Journal*. 1–13.
- Seng H, Tiekink ET. 2012. Anti-cancer potential of selenium- and tellurium-containing species: opportunities abound. *Applied Organometallic Chemistry*. 655–662.
- Silva CO, Silva CG, Oliveira SR, Silva AO, Silva RG, Oliveira SR. 2016. Clindamycin microbial resistance in clinical isolates of *Staphylococcus* sp. derived from blood cultures of hospitalized patients. *Jornal Brasileiro de Patologia E Medicina Laboratorial*. 52 (3), 165–170.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 175 (1), 184–191.
- Su-Qin C, Qian-Mei W, Ping-Chuan X, Shao-Peng G, Ping Z, Xiao-Hong Z. 2015. Iodine-promoted selective 3-selenylation and 3-sulfenylation of indoles with dichalcogenides under mild conditions. *Journal Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. 100-103
- Tajeddin E, Rashidan M, Razaghi M, Sarbazi MR, Mansouri N. 2016. The role of the intensive care unit environment and health-care workers in the transmission of bacteria associated. *Journal of Infection and Public Health*. 9(1), 13–23.

- Tarai B, Das P, Kumar D. 2013. Recurrent challenges for clinicians: emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin resistance, and current treatment options. *Journal of Laboratory Physicians*.5 (2), 71.
- Tenover FC. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*.119. S3-10-70.
- Thangamani S, Younis W, Seleem MN. 2015a. Repurposing Clinical Molecule Ebselen to Combat Drug Resistant Pathogens. *Plos One*. 1–16.
- Thangamani S, Younis W, Seleem MN. 2015b. Repurposing ebselen for treatment of multidrug-resistant staphylococcal infections. *Nature Publishing Group*.1–13.
- Thapaliya D, Taha M, Dalman MR, Kadariya J, Smith TC. 2017. Environmental contamination with *Staphylococcus aureus* at a large, Midwestern university campus. *Science of the Total Environment*. 1363–1368.
- Thomas P, Harvey S, Gruner T, Fenech M. 2008. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutation Research*. 638(1–2), 37–47.
- Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations and management. *Clinical Microbiology Reviews*. 28(3):603-61.
- Toh SM, Xiong L, Arias CA, Villegas MV, Lolans K, Quinn J, Mankin AS. 2007. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Molecular Microbiology*. Jun; 64 (6):1506-14.
- Vanega JM, Ocampo AM, Urrego, DM, Jiménez JN. 2017. In vitro susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from skin and soft tissue infections to vancomycin, daptomycin, linezolid and tedizolid. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*.21 (5), 493–499.
- Vitorino GP, Becerra C, Barrera D, Caira MR, Rosa M. 2017. Cooperative Behavior of Fluoroquinolone Combinations against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, 40(6), 758–764.
- Welsch ME, Snyder SA, Stockwell BR. 2010. Privileged scaffolds for library design and drug Discovery. *NIH Public Access*, 14 (3), 347–361.
- White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. 1996. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: *Time-kill*, checkerboard, and E test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40(8), 1914–1918.
- Widmer AF, Pittet D. 1992. Optimal Duration of Therapy for Catheter-Related *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*.14 (6), 1259.
- Zhen L, Hong J, Zhou X. 2011. An efficient and clean Cu-catalyzed chalcogenylation of aromatic azaheterocycles with dichalcogenides. *Tetrahedron*.67 (20), 3690–3697.
- Zhou G., Li L., Shi Q., Ouyang Y., Chen Y., Hu W. 2014. Efficacy of metal ions and isothiazolones in inhibiting *Enterobacter cloacae* BF-17 biofilm formation. 5–14.
- Zuckerman JM, Qamar F, Bono BR. 2009. Macrolides, Ketolides, and Glycylcyclines: Azithromycin, Clarithromycin, Telithromycin, Tigecycline. *Infectious Disease Clinics of North America*.23(4), 997–1026.

Livros:

- Murray P, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2013. **Staphylococcus e Outros Cocos Gram-positivos Relacionados**. Microbiologia Médica. 7 ed. São Paulo: Elsevier Editora Ltda. p. 174–187.
- Clayden J, Greeves N, Warren S. 2001. Organic Chemistry. Oxford Univ Press Usa. 2ª Ed. p.1147.
- Isenberg HD. 1992. **Clinical Microbiology Procedures Handbook** (American S). editor in chief. Washington, D.C: American Society of Microbiology. Book illustrated 12.

Internet:

- Brasil. Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde. 2017 Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271855/Plano+Nacional+para+a+Prevenção+e+o+Controle+da+Resistência+Microbiana+nos+Serviços+de+Saúde> Acesso em: Nov2017.
- Brasil. Programa nacional de prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/3074175/PNPCIRAS+2016-2020/f3eb5d51-616c-49fa-8003-0dcb8604e7d9>. Acesso em: Nov.2017.
- Brasil. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde no 14: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2015 . Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/category/boletins-estatisticos>
- CLSI, **Performance standards for antimicrobial susceptibility**. Twenty-second Information Supplement. CLSI document M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA; 2015.
- WHO-World Health Organization. 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Disponível em: http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/#.WP9byE7t_Zc Acesso em 20 Nov.2017.

9. ANEXO – A

Testes para Avaliação da Toxicidade

Preparo da cultura de leucócitos humanos

Inicialmente foi realizada a coleta de sangue venoso por venopunção, de doador maior de 18 anos, não usuário de medicação. Os leucócitos, obtidos através de gradiente de centrifugação são imediatamente transferidos para o meio de cultura contendo 9 mL de meio RPMI 1640 com glutamina e bicarbonato suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de estreptomicina/penicilina. O controle negativo foi preparado utilizando tampão fosfato salino (PBS) 7,4 e o controle positivo com Bleomicina 3 μ M para todos os testes.

Os frascos de cultura celular foram divididos em grupos (cada grupo em triplicata), para o tratamento, de tal modo: 3 frascos de cultura celular (9.0 mL) com 1.0 mL de PBS (controle negativo); 3 frascos de cultura celular (9.0 mL) com 1.0 mL de solução de bleomicina 3 μ M que é sabidamente tóxico para as células (controle positivo); 3 frascos de cultura celular (9.0 mL) com 1.0 mL de composto A10. Os frascos de cultura celular foram colocados em estufa a 37°C por 72 horas. Após esse período, foram estabelecidos os parâmetros citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos nos posteriores testes, a seguir descritos.

Avaliação da citotoxicidade (Viabilidade celular)

Seguiu-se metodologia de Burrow e colaboradores. Para análise do efeito do A10 sobre a viabilidade celular, 100 μ L de cada suspensão celular (pós-tratamento e incubação de 72 h) foi homogeneizada com 100 μ L de azul de tripan 0.2% (Sigma-Aldrich) em microtubos. Uma alíquota (10 μ L) do homogeneizado foi colocada em câmara de Neubauer para análise dos leucócitos, em microscópio (400x de ampliação), observando-se dois tipos de células: (a) células vivas e integras (viáveis), que apareceram incolores e (b) células mortas, com uma cor azul intensa. O resultado foi expresso em percentagem de células viáveis e comparado com o controle positivo (bleomicina 3 μ M) e negativo - PBS (diluyente). O ensaio foi realizado em triplicata (BUROW et al.,1998).

Avaliação da genotoxicidade (ensaio cometa)

Foram utilizadas as metodologias estabelecidas por Singh e colaboradores, em concordância com as diretrizes para uso do ensaio cometa. Após a incubação, as amostras de células de leucócitos são homogeneizadas com agarose de baixo ponto de fusão 0,75% e adicionadas em lâminas de microscópio pré-revestidas com agarose 1,5%. As lâminas são imersas em uma solução de lise, para na sequência realizar corrida eletroforética (20 min a 300 mA e 25 V) em tampão NaOH 300 mM e pH 13. Ao final da eletroforese, as lâminas são neutralizadas e submetidas à secagem em temperatura ambiente *overnight*. As lâminas secas são então reidratadas, fixadas, secas e coradas com solução de coloração à base de nitrato de prata 0,1 % (AgNO₃). Cem nucleóides por lâmina (em triplicata para cada grupo) são selecionados e analisados. Os nucleóides são classificados de acordo com o comprimento da cauda para calcular posteriormente o índice de dano de DNA. Para a classificação, os nucleóides recebem pontuação de 0 (sem migração) a 4 (migração máxima). Portanto, o índice de dano para as células varia de 0 (não ocorreu migração) a 400 (presença de migração máxima) (SINGH et al., 1988).

O fundamento dessa metodologia é que em condições eletroforéticas alcalinas e pós-tratamento específico das amostras, o DNA danificado (contendo quebras e clivagens) migrará mais do que o DNA intacto e produzirá uma "cauda de cometa", visualizada pela coloração com prata. O cometa é um dos testes de genotoxicidade mais promissores, precisos e sensíveis para análise de danos ao DNA em células individuais (MUKHOPADHYAY et al., 2004; COLLINS, 2009).

Avaliação da mutagenicidade (teste de micronúcleo)

O teste de micronúcleo foi realizado segundo a técnica descrita por Schmid e Thomas (Schmid, 1975). O volume de 20 µL de cada suspensão celular foram fixados em lâminas, as quais foram secas em temperatura ambiente. Neste ensaio, as lâminas são analisadas em microscópio com 1.000 vezes de ampliação.

Para cada lâmina, contou-se 100 células, sendo que todas as partículas no interior das células separadas do núcleo, não excedendo 1/3 do tamanho real do mesmo e com bordas bem visíveis foram contabilizadas e classificadas como MN (SCHMID, 1975., Thomas et al., 2008).

O teste do micronúcleo é uma das metodologias mais utilizadas para avaliar possíveis danos mutagênicos causados por fármacos ou novas moléculas. Os micronúcleos são definidos como pequenas massas esféricas, extranucleares, constituídas de cromatina não incorporada ao núcleo principal da célula, durante as etapas finais da mitose, sendo como um biomarcador de danos nos cromossomos, surgem por alterações genéticas espontâneas e, eventualmente, se houver uma exposição crônica à substância tóxica (KIRSCH-VOLDERS; FENECH, 2001).

Estatística

Para comparar os resultados dos controles positivos e negativos com o composto A10, realizou-se análise de variância (ANOVA), seguida por teste de Bonferroni, considerando significância quando $p < 0.05$. As análises foram conduzidas no software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA - versão 5.02 para Windows).

Resultados

Avaliação da citotoxicidade (efeito sobre a viabilidade celular)

Os resultados da análise sobre a citotoxicidade do A10 são apresentados na figura 1. O composto não interferiu de modo significativo no processo de proliferação celular e nem inviabilizou as células leucocitárias humanas na concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$.

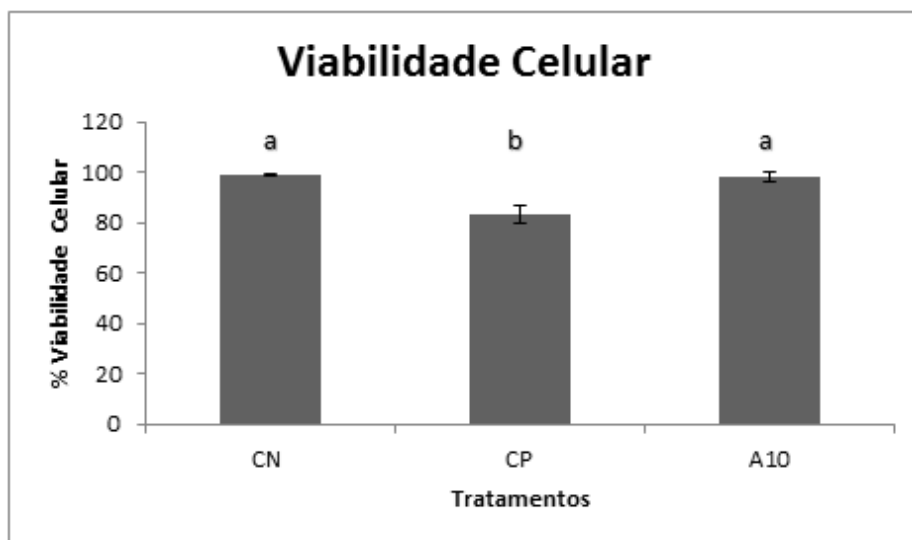


Figura 1. Representação gráfica da análise toxicológica. Efeito do composto sobre a viabilidade celular. CN: PBS; CP: bleomicina; A10: composto. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes.

Avaliação da mutagenicidade (análise da frequência de micronúcleos)

A análise da possibilidade de mutagênese esta apresentada na Figura 2. Dessa forma, mutações nos leucócitos não foram detectadas para o composto A10, na concentração de 32 µg/mL.

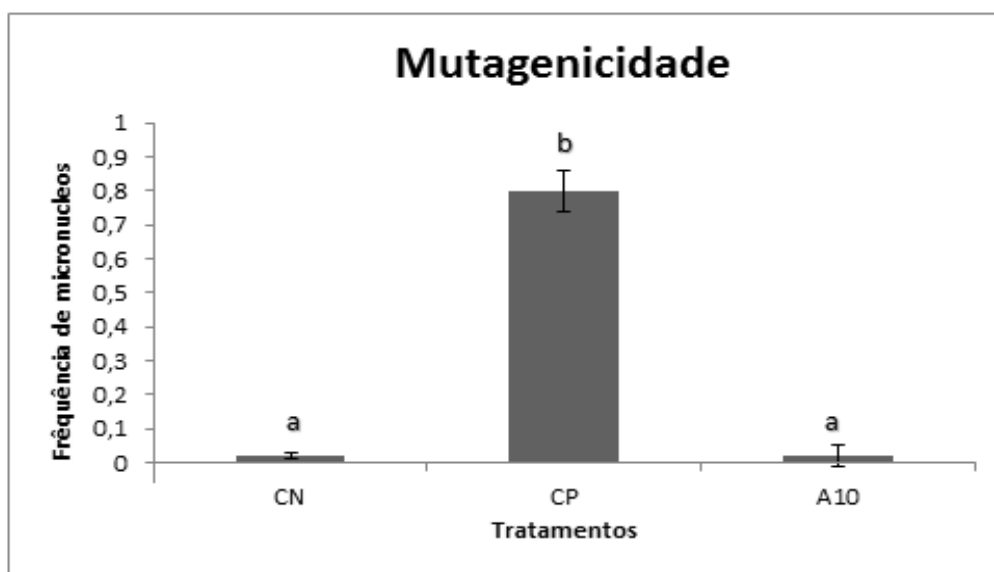


Figura 2. Representação gráfica da análise toxicológica. Efeito do composto sobre a frequência de micronúcleos. CN: PBS; CP: bleomicina; A10: composto. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes.

Avaliação da genotoxicidade (dano ao DNA)

Quanto à análise da possibilidade de genotoxicidade ocasionadas pelo A10 na concentração de 32 µg/mL, podemos observar que houve danos significativos ao DNA conforme Figura 3.

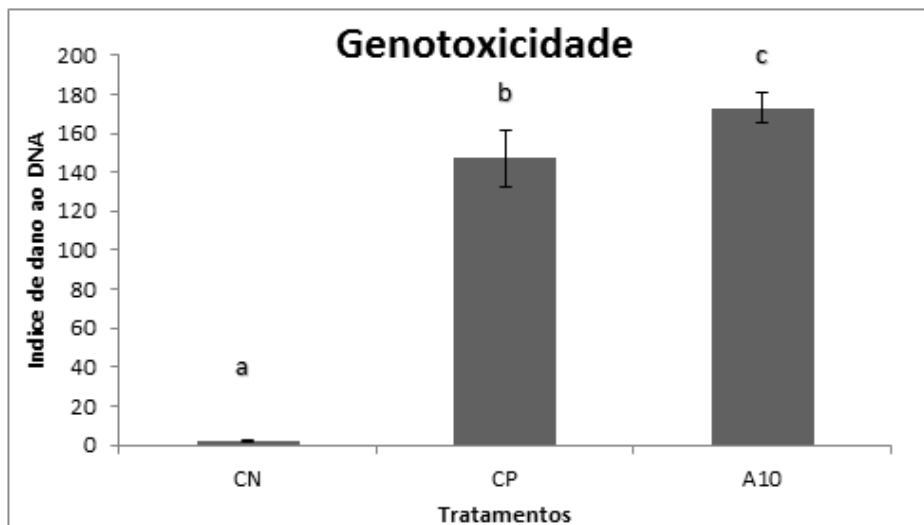


Figura 3. Representação gráfica da análise toxicológica. Efeito do composto sobre dano no DNA. CN: PBS; CP: bleomicina; A10: composto. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes.

Membrana cório-alantoide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM)

Ovos férteis branco fresco Lohmann (Lohmann selecionados Leghorn, LSL) foram utilizados no teste HET-CAM. Os ovos foram mantidos com condições de incubação otimizadas (temperatura entre 38 a 39 ° C e umidade entre 55 e 60% aos 10 dias). No dia 10, a casca de ovo, ao redor do espaço aéreo, foi cuidadosamente removida com uma ferramenta rotativa (Dremel, WI). Posteriormente, foram adicionados 0,3 ml de cada substância em cada ovo, respectivamente (controle negativo - solução salina a 0,9%, controle positivo - solução de NaOH 0,1 M e o composto A10 à concentração de 32 µg/mL, respectivamente) (JACOBSEN et al.,2010).

A observação do efeito irritante foi realizada em tempos de 30 segundos, 2 minutos e 5 minutos após a aplicação de cada substância. O resultado do escore de irritação (IS) foi dado de acordo com a equação abaixo, em uma escala de 0 a 4,9 denotada não irritativa (ou praticamente sem irritação) e 5,0 a 21 denotadas irritantes (irritação moderada / grave ou extrema) (ICCVAM, 2010).

A Figura 1 mostra a relação entre IS e os logaritmos das concentrações do composto A10 e o controle. Esta relação é representada pela equação 1 como função da concentração logarítmica para a substância testada. O IS para o A10 na concentração de 32 µg/mL foi 3,47. Assim, a amostra foi caracterizada como não irritante pela metodologia utilizada.

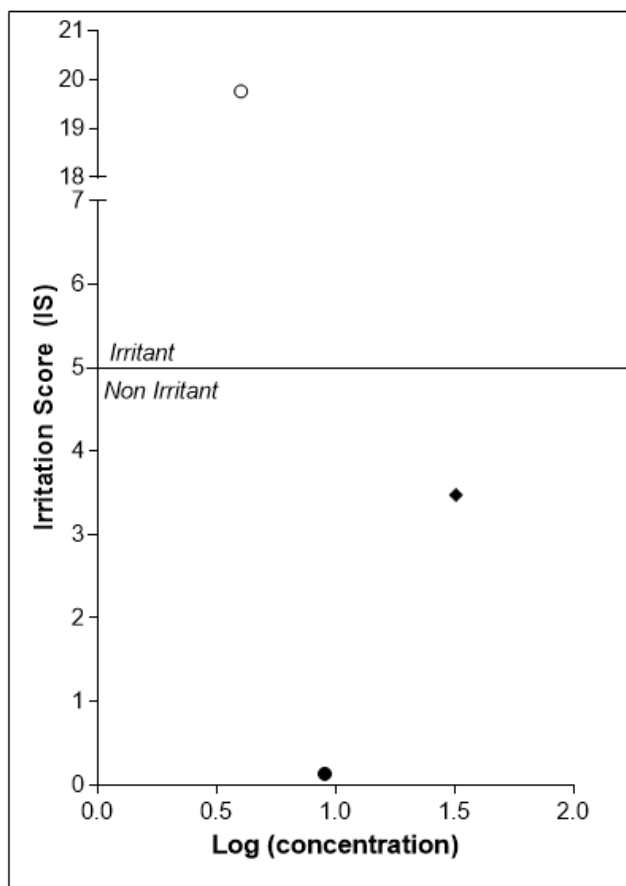


Figura 1. Relação dose-resposta para o composto A10 (concentração 32 µg.ml-1) (◆), controle negativo (0,9% NaCl) (●) e controle positivo (0,1 NaOH) (○). Cada ponto representa um experimento (n = três ovos).