

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 ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS
DE 8-HIDROXIQUINOLINA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
ROBERTA TAUFER BOFF

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

Co-orientador: Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade

Porto Alegre

Março/2019

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 ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS DE 8-
HIDROXIQUINOLINA**

Roberta Taufer Boff
Biomédica

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 do
ambiente

Linha de pesquisa: Microbiologia de ambientes
naturais e antropogênicos

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

Co-orientador: Prof. Dr. Saulo Fernandes de

CIP - Catalogação na Publicação

Boff, Roberta Taufer
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS
DE 8-HIDRÓXIQUINOLINA / Roberta Taufer Boff. -- 2019.
77 f.
Orientadora: Andreza Francisco Martins.

Coorientador: Saulo Fernandes de Andrade.

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, 2019.

1. Sinergismo. 2. Staphylococcus aureus. 3. MRSA.
4. 8-hidroxiquinolinas. I. Martins, Andreza Francisco,
orient. II. Andrade, Saulo Fernandes de, coorient.
III. Título.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

Marie Skłodowska Curie

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ou Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPGMAA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

À minha orientadora, Dra. Andreza F. Martins e ao meu co-orientador Dr. Saulo F. de Andrade pela oportunidade concedida e conhecimentos transmitidos. Gratidão pela paciência e interesse. Aos professores de microbiologia que passaram por meus caminhos e me ensinaram a amar essa área fascinante.

Aos meus colegas que muito me ajudaram e principalmente às que se transformaram em grandes amigas. Franciele Adam, Gabriele Z. Saldanha, Heloísa Giacomelli e Marcela P. Borba. Agradeço imensamente por ajudarem a fazer dessa jornada um caminho cheio de conhecimento, alegria e diversão.

Agradeço aos meus amigos do coração, que aceitaram minha distância e ausência neste período sem contestações ou cobranças, somente com mensagens e energias de incentivo e saudades.

Agradeço a todos que se aventuram pelo universo acadêmico e da pesquisa. Principalmente as grandes e valentes mulheres da ciência que abrem portas e quebram paradigmas. Este caminho é tão difícil de ser percorrido quanto é essencial para o bem-estar da humanidade.

Agradeço, acima de tudo, à minha família, Diacema Taufer Boff, Antônio Carlos Boff e Marcelo Taufer Boff, que me amaram e me concederam todas as oportunidades que uma mente curiosa gostaria de alcançar. Mãe, pai e mano, eu amo vocês incondicionalmente. Finalmente agradeço à pessoa que mais esteve presente nestes dois anos de muito estudo e ansiedades: Frederico Correa da Silva, sem a tua ajuda, compreensão e presença minha trajetória seria vazia. Agradeço por teu apoio, por tuas palavras de consolo e pelo amor imenso que compartilhamos.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS DE 8-HIDROXIQUINOLINA

Autora: Roberta Taufer Boff
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Andreza Francisco Martins
Co-orientador: Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade

RESUMO

Torna-se cada vez mais necessário o desenvolvimento de antimicrobianos diante do aumento da incidência de infecções por microrganismos multirresistentes. Diante disso, foi desenvolvida uma série de 5 análogos metilados da 8-hidroxiquinolona, um grupo presente em vários compostos que apresentam ação antimicrobiana. A atividade antibacteriana foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente a cepas ATCC de bactérias gram positivas e gram negativas de importância clínica. O análogo PH176 apresentou CIM de 8 µg/mL para o ATCC *S. aureus* 29213 e foi selecionado para testes posteriores. As CIM₅₀ e CIM₉₀ do PH176 foram de 16 e 32 µg/mL respectivamente, frente a uma coleção de 38 isolados clínicos de *S. aureus*, sendo 10 caracterizados como MRSA. As atividades antimicrobianas e o efeito sinérgico com antibióticos já conhecidos foram avaliadas através da técnica *Time-Kill* em 5 isolados MRSA. O PH176 utilizado isoladamente resultou em redução na contagem de colônias em 24 horas, sem recrescimento em 4 isolados, nas concentrações de 1x e 2xCIM. O efeito bactericida foi observado em um isolado na concentração de 2xCIM. A combinação com 1xCIM de Oxacilina resultou em sinergia com ½xCIM do PH176 em 3 isolados, com 1xCIM PH176 em 2 e com 2xCIM PH176 em 1 isolado. Na concentração de ponto de corte da Oxacilina o efeito sinérgico foi obtido em 2 isolados com 1xCIM e 2xCIM do PH176. Concentrações de PH176 acima dos valores de CIM foram consideradas não citotóxicas e não dermatotóxicas nos testes de HET-CAM, determinação da permeação e avaliação histopatológica em pele de suíno e viabilidade celular em leucócitos humanos. Esses resultados demonstram que a molécula PH176 é altamente promissora como uma nova alternativa para o combate a isolados MRSA.

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. (p.) Março, 2019.

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF 8-HYDROXYCHINOLINE ANALOGUES

Autora: Roberta Taufer Boff
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Andreza Francisco Martins
Co-orientador: Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade

ABSTRACT

The development of antimicrobials is becoming increasingly necessary in view of the increased incidence of multi-resistant microorganism. Thus, our group developed a series of 5 methylated analogs of 8-hydroxyquinoline, considering that this grouping is present in several compounds with antimicrobial action. Antibacterial activity of the analogues was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) against ATCC strains of gram positive and gram negative bacteria of clinical importance. The PH176 analog presented a MIC of 8µg/mL for ATCC *S. aureus* 29213 and was selected for further testing. When evaluate in a collection of 38 *S. aureus* clinical isolates, 10 of which characterized as MRSA, the MIC₅₀ and MIC₉₀ of PH176 were 16 and 32 µg/mL respectively. The antimicrobial activities and the synergistic effect with known antibiotics were evaluated by *Time-Kill* assay in 5 MRSA isolates. PH176 used alone resulted in a reduction in colony count at 24h with no regrowth in 4 isolates at concentrations of 1x MIC and 2xMIC. Bactericidal effect occur in one isolate in concentration of 2xCIM. The combination with 1xCIM of Oxacillin resulted in synergy with ½xCIM of PH176 in 3 isolates, with 1xCIM PH176 in 2 isolates and with 2xCIM PH176 in 1 isolate. Synergistic effect was also observed in 2 isolates with 1xCIM and 2xCIM of PH176 and the Oxacillin breakpoint (2µg/mL) concentration. Concentrations above MIC values of PH176 were considered non-cytotoxic and non-irritant in HET-CAM tests, permeation determination and histopathological evaluation in pig skin and in analysis of cell viability in human leukocytes. These results demonstrate that the PH176 is highly promising for the development of a novel therapy for the treatment of MRSA infections.

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. (p.) March, 2019.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Geral:	15
2.2. Específicos:.....	15
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1. Contexto Atual da Resistência Bacteriana	16
3.1.1 Gram negativos	17
3.1.2. Gram positivos.....	18
3.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	19
3.2.1. Características Microbiológicas	19
3.2.2. Epidemiologia	20
3.2.3. Fisiopatologia.....	22
3.2.4. Tratamento de infecções causadas pelo <i>S. aureus</i>	24
3.2.5 Resistência em <i>S. aureus</i>	27
3.3. Derivados de 8-Hidroxiquinolina	32
3.4 Metodologias Para Avaliação de Atividade Antimicrobiana	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1. Síntese da Série de Análogos de 8HQ	40
4.2. Atividade Antibacteriana dos Análogos de 8HQ, Nitroxolina e Oxacilina	41
4.2.1.Triagem da nova série de análogos de 8HQ frente a cepas ATCC42	
4.2.2. Análise da concentração inibitória mínima do PH176, Nitroxolina e Oxacilina frente à coleção de isolados clínicos de <i>S. aureus</i>	43
4.2.3. Análise da atividade antibacteriana e sinérgica entre PH176, Nitroxolina e Oxacilina frente a isolados MRSA através da técnica de Time-Kill	

(TK).....	43
4.3. Testes de Toxicidade	44
4.3.1. HET-CAM (Hen´s egg test on the chorioallantoic membrane) do PH176 e Nitroxolina	44
4.3.2. Determinação da permeação e avaliação histopatológica do PH176.....	45
4.3.3. Avaliação da viabilidade celular (leucócitos humanos).....	45
5. RESULTADOS	46
5.1. Atividade Antibacteriana dos Análogos de 8HQ, Nitroxolina e Oxacilina.....	46
5.1.1. Triagem da nova série de análogos de 8HQ frente a cepas ATCC	46
5.1.2. Análise da concentração inibitória mínima do PH176, Nitroxolina e Oxacilina frente à coleção de isolados clínicos de <i>S. aureus</i>	47
5.1.3. Análise da atividade antibacteriana e sinérgica entre PH176, Nitroxolina e Oxacilina frente a isolados MRSA através da técnica de Time-Kill (TK).....	48
5.2. Testes de Toxicidade	55
5.2.1. HET-CAM (Hen´s egg test on the chorioallantoic membrane) do PH176 e Nitroxolina	55
5.2.2. Determinação da permeação e avaliação histopatológica do PH176.....	56
5.2.3. Avaliação da viabilidade celular (leucócitos humanos).....	57
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÃO.....	64
8. PERSPECTIVAS	65
REFERÊNCIAS.....	66
APÊNDICE - ARTIGO “ANTIBACTERIAL AND SYNERGISTIC ACTIVITY OF	

A NEW 8-HYDROXYQUINOLINE ANALOGUE AGAINST METHICILLIN-RESISTANT <i>S. AUREUS</i> ". A SER SUBMETIDO À REVISTA <i>INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS</i>	73
ANEXOS - ESPECTROS DE RMN DO PH 176.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade antibacteriana da série de análogos de 8HQ, Nitroxolina e 8HQ frente a cepas ATCC gram positivas e gram negativas.35

Tabela 2: CIM50 e CIM90 dos antibióticos avaliados, Nitroxolina e PH176 frente à 38 isolados clínicos de *S. aureus*.36

Tabela 3: Concentração inibitória mínima do PH176, Nitroxolina e Oxacilina e perfil de suscetibilidade dos isolados selecionados para o ensaio de TK.37

Tabela 4: Atividade do PH176, Nitroxolina e Oxacilina em diferentes concentrações frente a cinco isolados MRSA e *S. aureus* ATCC 29213 no ensaio de TK.40

Tabela 5: Atividade do PH176, Nitroxolina e Oxacilina em diferentes concentrações e combinações frente a cinco isolados MRSA e no ensaio de TK.43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da 8-hidroxiquinolina (1), Clioquinol (2), 5-cloro-7-iodo-8-metoxiquinolina (3), Nitroxolina (4) e PH176.	28
Figura 2: Síntese do PH176. (a) CH ₃ I, K ₂ CO ₃ , DMF, t.a., 16h; (b) Pd(OAc) ₂ , Xantphos, Cs ₂ CO ₃ , 4-metoxianilina, dioxano, atm. argônio, 100 °C, 16h.	29
Figura 3- Sítios de coleta dos isolados de <i>S. aureus</i> [A]; Prevalência de isolados resistentes à penicilina (PENI), oxacilina e meticilina (OXAMET), levofloxacina (LEVO) e minociclina (MINO) [B].....	35
Figura 4: Time-kill de PH176 com os isolados MRSA. Concentração testada em µg/mL entre parênteses.	38
Figura 5: Time-Kill para Nitroxolina com os isolados MRSA. Concentração testada em µg/mL entre parênteses.	39
Figura 6: Time-Kill para Oxacilina com os isolados MRSA. Concentração testada em µg/mL entre parênteses.	39
Figura 7: Sinergismo entre PH176 e Oxacilina nos testes de Time-Kill com o MRSA 448. Concentração testada em µg/mL entre parênteses. CC= controle de crescimento. Oxacilina BP = ponto de corte de Oxacilina 2µg/mL.	41
Figura 8: Sinergismo entre PH176, Nitroxolina e Oxacilina nos testes de Time-Kill com o MRSA 459. Concentração testada em µg/mL entre parênteses. CC= controle de crescimento.	42
Figura 9: Sinergismo entre PH176 e Oxacilina nos testes de Time-Kill com o MRSA 487. Concentração testada em µg/mL entre parênteses. CC= controle de crescimento.	42
Figura 10: Teste de HET-CAM. Relação dose-resposta para PH176 e Nitroxolina. NaOH 0.1 M (o), NaCl a 0,9% (●), PH 176 128 µg/mL (x), PH176 64 µg/mL (□), Nitroxolina 64 µg/mL (◇) e Nitroxolina 32 µg/mL (◆). Cada ponto representa um experimento (n = três ovos). Concentrações foram convertidas logaritmicamente.	44
Figura 11: Avaliação histopatológica de células suínas tratadas com PH176, Nitroxolina, controle negativo (PBS) e controle positivo (NaOH 0,1 M) em ampliação de 100 e 400x. A: PBS pH 7,0 (1A = 100x e 2A = 400x); B: PH176 128 µg/mL (1B =100x e 2B =400x). C: Nitroxolina 64 µg/mL (1C =100x e 2C =400x). D: NaOH 0,1 M (1D =100x e 2D =400x) evidenciando dermatotoxicidade.....	45
Figura 12: Porcentagem de células viáveis após tratamento com PH176 (8, 16, 32 e 64 µg/mL), Nitroxolina (8, 16, 32 e 64 µg/mL), Controle Negativo (CN = PBS) e Controle Positivo (CP = bleomicina3µM).	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS: Organização Mundial de Saúde
MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
VRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina
VISA: *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina
hVISA: VISA heterogêneo ou hetero-VISA
ATCC: American Type Culture Collection
CIM: Concentração inibitória mínima
HET-CAM: Hen's egg test on the chorioallantoic membrane
ESBL: β -lactamase de espectro estendido
VRE: *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina
MBL: Metallo- β -lactamases
CDC: US Centers for Disease Control and Prevention
IRAS: Infecções relacionada à assistência à saúde
PBP: Proteína ligantes de penicilina
SCN: *Staphylococcus coagulase negativa*
CVC: Cateter venoso central
MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina
CA-MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina oriundo da comunidade
ICSA: *Staphylococcus aureus* intracelular
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
FDA: Food and Drug Administration
BlaZ: Serina β -lactamase de espectro estreito
SCCmec: Cassete cromossômico estafilocócico mec
LPV: Leucocidina de Pantón-Valentine
rRNA: RNA ribossomal
SMON: Neuropatia mielo-óptica subaguda
HQ: 8-hidroxiquinolina
NQ: 8-hidroxi-5-nitroquinolina, nitroxolina
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
EUCAST: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
BrCAST: Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
UFC: Unidades formadoras de colônias
TK: Teste de *time-kill*
PCR: Reação da cadeia de polimerase
MALDI-TOF MS: Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry
MBT-ASTRA: MALDI Biotyper-Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay
MBT-STAR-BL: MALDI Biotyper-Selective Testing of Antibiotic Resistance-Beta-Lactamase
MBT-RESIST: MALDI Biotyper-Resistance Test with Stable Isotopes
DMF: Dimetilformamida
MHCA: Caldo Mueller-Hinton cátion ajustado
LABRESIS: Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana
NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards
TSB: Caldo Trypticaseína de Soja
MH: Agar Mueller-Hinton
IS: Escore de irritação
PBS: Tampão fosfato salino
IS: Índice de seletividade

1. INTRODUÇÃO

O início da utilização de antibióticos foi uma revolução para a medicina como um todo. Além de tratar infecções bacterianas, aumentou a chance de sucesso de outros tratamentos, como cirurgias, transplantes e quimioterapias (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015). Nas últimas duas décadas, houve um aumento considerável na incidência de infecções causadas por microrganismos resistentes aos antibióticos, principalmente em ambientes hospitalares. A utilização indiscriminada de antibióticos desde sua descoberta colabora para a situação atual de disseminação de resistência e pressão seletiva de microrganismos e a melhor maneira de estender a eficácia dos medicamentos existentes ainda não foi bem compreendida (ASCIUGLU; SAMORE; LIPSITCH, 2014; JORGE et al., 2016). Infecções causadas por microrganismos resistentes ou multirresistentes têm tratamentos mais complicados, maior morbidade, mortalidade e custos, portanto representam um grande problema de saúde pública mundial (TANG et al., 2016).

A disponibilização de novos antibióticos vem decaindo consideravelmente ao longo dos anos. A classe das oxazolidinonas foi a primeira a ser lançada após uma lacuna de cerca de 20 anos, que culminou no lançamento da linezolida em 2000 (FOSTER, 2017). Considerando este contexto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou, em 2017, uma lista de microrganismos que necessitam de atenção prioritária. Foram citados nesta lista o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), resistente à vancomicina (VRSA), ou com resistência intermediária à vancomicina (VISA), *Acinetobacter baumannii*, e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, entre outros (WHO, 2017).

O *Staphylococcus aureus*, é um microrganismo oportunista que normalmente habita pele e fossas nasais de indivíduos hígidos (SAKR et al., 2018). Este patógeno é altamente adaptado e consegue sobreviver intracelularmente além de resistir à dessecação ambiental, característica que o habilita a colonizar vários sítios incluindo os abióticos, como superfícies, cateteres e próteses cirúrgicas. É uma preocupação no âmbito nosocomial e comunitário e pode causar desde infecções leves como foliculites e abscessos cutâneos, até infecções graves como endocardites, pneumonias e bacteremias (BALASUBRAMANIAN et al., 2017). Considerando a epidemiologia deste microrganismo, os altos custos de tratamento

de infecções causadas por esse patógeno e a grande habilidade de adaptação e desenvolvimento de resistência antimicrobiana, torna-se crítico o desenvolvimento de novas estratégias e antimicrobianos para o tratamento de infecções causadas por esta bactéria, principalmente isolados multirresistentes (BALASUBRAMANIAN et al., 2017).

Há muitas décadas os análogos da 8-hidroxiquinolina, como o 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (clioquinol) e a 8-hidroxi-5-nitroquinolina, têm sido utilizados na prática clínica como agentes antimicrobianos e, mais recentemente, estudos se focaram em analisar suas características de combater outras doenças não-infecciosas, como tumores malignos e Alzheimer (ARBISER et al., 1998; JIANG et al., 2011; KONAGAYA et al., 2004; MAO; SCHIMMER, 2008; SOBKE et al., 2012). Esses compostos são heterocíclicos e demonstram afinidade variável à íons metálicos como zinco e cobre (NABER et al., 2014).

Com base nesses conhecimentos, nosso grupo desenvolveu uma quimioteca de derivados de 8-hidroxiquinolina (8HQ) metilados com possíveis efeitos antibacterianos. Apesar da vasta análise das atividades antimicrobianas dos análogos de 8HQ, seus derivados metilados foram parcamente estudados e pouco se sabe sobre esses compostos (BEUGELMANS et al., 1998; JOAQUIM et al., 2018; PIPPI et al., 2017; 2019). Portanto o principal motivo deste trabalho foi caracterizar a atividade antibacteriana dessa classe pouco estudada de derivados metilados de 8-hidroxiquinolina, avaliar o potencial antimicrobiano e sinérgico destes análogos em relação a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* MSSA e MRSA, visando à obtenção de novos candidatos à fármacos.

OBJETIVOS

2.1. Geral:

Avaliar o potencial antibacteriano de novos compostos derivados de 8-hidroxiquinolinas a fim de identificar atividades antibacterianas e sinérgicas para o desenvolvimento de novos produtos.

2.2. Específicos:

- Avaliar a atividade antibacteriana de novos compostos derivados da 8-hidroxiquinolina, desenvolvidos pelo Pharmaceutical Synthesis Group da UFRGS, em cepas ATCC sendo elas: *Enterococcus faecalis* 29212, *Staphylococcus aureus* 29213, *Escherichia coli* 35218, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 e *Klebsiella pneumoniae* 70060.
- Avaliar a atividade antibacteriana do composto que apresentar maior atividade na triagem, frente a isolados clínicos através da determinação da sua concentração inibitória mínima (CIM).
- Avaliar a atividade bactericida e o sinergismo da molécula mais promissora com antibióticos de referência, em isolados clínicos pelo teste de Time-Kill.
- Avaliar a irritabilidade e dermatotoxicidade da molécula mais promissora através dos testes de HET-CAM (Hen's egg test on the chorioallantoic membrane) e da determinação da permeação e avaliação histopatológica em pele de suíno.
- Avaliar o potencial citotóxico da molécula mais promissora através do teste de viabilidade celular em cultura de leucócitos humanos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Contexto Atual da Resistência Bacteriana

Nos últimos 70 anos, os antibióticos foram um importante pilar para a medicina e foram utilizados em grande escala por todo o mundo. Medicamentos que combatem infecções, incluindo antibióticos, são diferentes de outros fármacos, pois não afetam somente o indivíduo em tratamento, afetam a comunidade (BLASER, 2016). Ao longo de várias décadas, as opções terapêuticas para a prática clínica vêm diminuindo devido à constante emergência de novos mecanismos de resistência e à constante redução da disponibilização de novos antibióticos (FOSTER, 2017; LEE et al., 2016). Como consequência, medicações que entraram em desuso pelos importantes efeitos colaterais que causam, como a colistina, foram reintroduzidas na prática terapêutica (AGUAYO et al., 2016; VINCENT et al., 2016).

Desde o início da vida no planeta os microrganismos evoluíram e se adaptaram à presença de vários compostos antimicrobianos presentes na natureza. Entre os fatores que influenciam a emergência de resistência estão aspectos do meio ambiente que geram estresse para a célula. Além disso, a atual utilização exagerada e incorreta de antibióticos também gera pressão seletiva, que favorece a emergência e a perpetuação de isolados que apresentam mecanismos de resistência (KHAN; MARYAM; ZARRILLI, 2017; MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015). A produção de enzimas bacterianas que hidrolisam antibióticos vem aumentando em número e prevalência desde o início da utilização deste recurso farmacológico, além de outros mecanismos como perda de porinas, alteração em bombas de efluxo e alterações de parede bacteriana (KHAN; MARYAM; ZARRILLI, 2017). O rápido e contínuo aumento da prevalência de microrganismos multirresistentes e panresistentes indica que podemos estar nos encaminhando para uma era “pós-antibiótico”, onde estratégias de tratamento que eram efetivas não serão mais relevantes (AGUAYO et al., 2016; JORGE et al., 2016; MAHLAPUU et al., 2016). Estes fatos sugerem que ações urgentes devem ser tomadas em relação ao controle da disseminação de resistência e no desenvolvimento de novos fármacos com potencial antibacteriano (BALASUBRAMANIAN et al., 2017; BOUCHER et al., 2009).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou, em fevereiro de 2017, uma lista de patógenos prioritários, que necessitam de impreteríveis pesquisas sobre mecanismos de resistência e desenvolvimento de novos antibióticos para

combatê-los. Esta lista está dividida em três categorias de prioridades: crítica, alta e média. Na lista crítica se encontram o *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos, *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos e *Enterobacteriaceae* resistente aos carbapenêmicos e produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL). Na lista de prioridades alta encontram-se o *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE), *Salmonella* spp. resistentes às fluorquinolonas, *Neisseria gonorrhoeae* resistente às fluorquinolonas e às cefalosporinas de terceira geração, *Helicobacter pylori* resistente à claritromicina e o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e com alta resistência (VRSA) ou resistência intermediária (VISA) à vancomicina (WHO, 2017).

3.1.1 Gram negativos

As bactérias gram negativas representam um grande desafio para a medicina por sua impressionante habilidade de adquirir genes que conferem diferentes perfis de resistência. Além disso, várias espécies apresentam resistência intrínseca a vários antibióticos. Com frequência, isolados podem produzir enzimas β -lactamases de amplo espectro (ESBL), que degradam o anel β -lactâmico dos antibióticos. Considerando bactérias não-fermentadoras da glicose, como *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. e fermentadoras como as Enterobacterales, a produção de carbapenemases é o mecanismo mais preocupante de resistência aos β -lactâmicos de amplo-espectro. São beta-lactamases específicas, normalmente transmitidas de um microrganismo a outro por plasmídeos e que hidrolisam a maior parte dos antibióticos β -lactâmicos, inclusive os carbapenêmicos, sendo sensíveis somente à monobactâmicos se não houver outros mecanismos de resistência coexistindo. Relatos de microrganismos capazes de produzir essas enzimas aumentaram muito na última década ao redor do mundo (LEE et al., 2016).

As beta-lactamases podem ser agrupadas nas classes A, B, C e D pela classificação de Ambler, conforme seu perfil de hidrólise (LEE et al., 2016). As classes A e B englobam as principais β -lactamases que hidrolisam carbapenêmicos em Enterobacterales (POIREL; POTRON; NORDMANN, 2012). A enzima KPC é a representante mais incidente da classe A de Ambler e tornou-se endêmica em países como Brasil, Estados Unidos, China, Argentina, entre outros. É mais comumente transmitida por plasmídeos e hidrolisa penicilinas, cefalosporinas, aztreonam e carbapenêmicos, restando assim limitadas opções terapêuticas, como por exemplo as

polimixinas (CHEN; ANDERSON; PATERSON, 2012). O grupo B de Ambler inclui as metalo- β -lactamases (MBL) sendo as principais representantes as enzimas IMP, VIM e NDM. Esta classe de β -lactamases tem a capacidade de hidrolisar a maior parte dos antibióticos β -lactâmicos disponíveis e possuem, em seu sítio ativo, um ou dois íons di-valentes de zinco, que são essenciais para o funcionamento da enzima (KHAN; MARYAM; ZARRILLI, 2017). As OXAs, em particular a OXA-48-*like*, são representantes da classe D e possuem atividade mais fraca de hidrólise de carbapenêmicos. Estas enzimas são de difícil identificação laboratorial por suas características fenotípicas, heterogeneidade dos perfis de susceptibilidade dos isolados, o fato dessas enzimas não serem inibida por ácido clavulânico, tazobactam ou sulbactam e por sua frequente coexistência com outras β -lactamases, fato preocupante se considerarmos sua possível disseminação silenciosa (POIREL; POTRON; NORDMANN, 2012).

3.1.2. Gram positivos

Os cocos gram positivos são responsáveis por uma variada gama de doenças nosocomiais e na comunidade. Causam desde infecções leves, principalmente em vias aéreas superiores e pele, até graves patologias como bacteremias, endocardites, infecções relacionadas a materiais abióticos em cirurgias, infecções intestinais graves, entre outras (BALASUBRAMANIAN et al., 2017; SANTOS et al., 2007). Dentre os cocos gram positivos patogênicos, os estafilococos, estreptococos, enterococos e o *Clostridium difficile* são os mais prevalentes e relevantes na clínica médica (ROSSOLINI et al., 2010). Segundo o US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) os maiores desafios no combate à resistência em gram positivos são a resistência do *Staphylococcus aureus* à meticilina, a resistência dos enterococos aos glicopeptídeos, a multirresistência dos estreptococos (principalmente *S. pneumoniae*) e as cepas hipervirulentas de *Clostridium difficile* (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015; ROSSOLINI et al., 2010).

Nos Estados Unidos, boa parte dos casos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são causadas por isolados de VRE e MRSA, sendo associados com aproximadamente 12.000 óbitos por ano. O *S. pneumoniae* resistente aos antibióticos é uma grande preocupação em casos de pneumonias e meningites comunitárias (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015). Mecanismos de resistência em gram positivos incluem a produção de β -lactamases, mudanças estruturais na proteína de

ligação à penicilina (PBP), modificação do alvo de ligação dos antibióticos, alterações de parede bacteriana entre outros (ROSSOLINI et al., 2010).

3.2. *Staphylococcus aureus*

3.2.1. Características Microbiológicas

Os *Staphylococcus* são cocos gram positivos e possuem formato esférico entre 0,5 e 1,5 µm de diâmetro, podendo se organizar individualmente, aos pares ou em cachos, devido a sua divisão celular que ocorre em três planos perpendiculares. São anaeróbios facultativos, imóveis, não esporulantes e produzem a enzima catalase que converte o peróxido de hidrogênio e diferencia este gênero dos *Streptococcus* (SANTOS et al., 2007). Todos os *Staphylococcus aureus* produzem também a enzima coagulase (coagulase clássica CoA e proteína ligadora do Fator de von Willebrand), que converte o fibrinogênio presente no plasma em fibrina, criando uma “rede” ao redor da célula bacteriana. Esta característica de virulência dificulta a fagocitose pelas células de defesa do hospedeiro. A habilidade deste microrganismo de coagular o sangue já havia sido observada por Loeb em 1903, característica que o diferencia dos *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) (CROSBY; KWIECINSKI; HORSWILL, 2016).

A grossa parede celular dos *Staphylococcus* é composta por várias camadas de peptidoglicano conectadas por ácidos teicóicos de parede, além da presença da proteína A e adesinas no glicocálix. Os ácidos teicóicos também têm importante papel nos mecanismos de divisão celular, morfogênese, resistência à antimicrobianos e interação com as células do hospedeiro (WINSTEL; XIA; PESCHEL, 2013). Esses microrganismos ainda podem produzir β-lactamases, hialuronidases, DNases, lipases, proteases, esterases e as toxinas alfa, beta e delta, leucocidinas, toxina esfoliativa, a toxina do choque tóxico (TSST-1) e as enterotoxinas A, B, C, D e E (SANTOS et al., 2007). É um microrganismo capaz de sobreviver à dessecação e ao frio, o que dificulta sua eliminação do ambiente, além de ser comensal e viver em vários locais do corpo humano, como pele (especialmente axilas) e principalmente fossas nasais (SANTOS et al., 2007). Não necessita de nutrientes/condições especiais para o cultivo, cresce em pH neutro, tolera NaCl (meios com 7,5% de NaCl estimulam a produção de coagulase), fermenta manitol produzindo ácido lático e sua temperatura ótima de crescimento é de 37° C. As colônias são arredondadas e brilhantes, sendo sua pigmentação variável. Alguns isolados apresentam a coloração

amarelada que aumenta conforme o tempo de incubação e, em agar sangue, é possível detectar a presença de β -hemólise (SANTOS et al., 2007).

3.2.2. Epidemiologia

S. aureus é um dos mais bem-sucedidos patógenos oportunistas conhecidos. Mesmo sendo um microrganismo descrito há mais de cem anos, se mantém como patógeno de grande importância clínica apesar de todos os avanços nos cuidados de controle de infecção (ARIAS; REYES; CARVAJAL, 2017; RASIGADE; DUMITRSCU; LINA, 2014; SANTOS et al., 2007). Constitui a microbiota normal do ser humano, mas pode causar uma grande variedade de infecções em diversos tecidos, desde infecções leves até infecções invasivas graves. Além disso, pode produzir toxinas estafilocócicas que causam a síndrome da pele escaldada (toxina esfoliativa estafilocócica) e a síndrome do choque tóxico (ARIAS; REYES; CARVAJAL, 2017; SANTOS et al., 2007; WINSTEL; XIA; PESCHEL, 2013; ZHANG; HU; RAO, 2017). A produção de exotoxinas está relacionada com casos de intoxicações alimentares e ocorre quando alimentos contaminados com *S. aureus* são estocados em temperatura inadequada (SANTOS et al., 2007).

Entre 20% e 80% da população mundial de indivíduos hígidos é colonizada por *S. aureus*. Vários estudos de prevalência da colonização das fossas nasais indicam a presença de três grupos, o que apresenta colonização persistente, os não-colonizados e o grupo que apresenta colonização intermitente (SAKR et al., 2018). Apesar da colonização não requerer tratamento, ela causa aumento de risco de infecções e piora do quadro clínico de pacientes debilitados ou que farão alguma cirurgia. Mesmo em pacientes não-cirúrgicos o maior risco de desenvolver infecções, ao longo da internação, é bem estabelecido e estudos demonstram chances até três vezes maiores de pacientes colonizados desenvolverem bacteremia (SAKR et al., 2018). Atualmente, a prevalência de casos de infecções sanguíneas por *S. aureus* em países industrializados é de 10 a 30 casos a cada 100 000 habitantes por ano e a taxa de mortalidade nesses casos fica em torno de 15-50% (GUDIOL et al., 2017; SANTOS et al., 2007).

Por sua grande habilidade de habitar e persistir em diversos locais, desde tecidos biológicos até materiais abióticos, torna-se um patógeno de difícil erradicação e pode causar reinfecções constantes (BALASUBRAMANIAN et al.,

2017). O *S. aureus* foi o patógeno mais prevalente em feridas crônicas de pacientes diabéticos em um estudo feito em dois hospitais franceses, onde cerca de 36% dos pacientes apresentavam colonização nasal e dentre esses 65% estavam colonizados com isolados idênticos aos causadores da infecção (SAKR et al., 2018). Também é o patógeno mais comumente isolado em bacteremias associadas ao cateter venoso central (CVC) e infecções relacionadas ao cateter de diálise peritoneal (SAKR et al., 2018). No âmbito hospitalar, infecções por *S. aureus* podem ocorrer por materiais e próteses cirúrgicas contaminadas ou pela colonização prévia do próprio paciente, gerando aumento de custos de tratamento (BALASUBRAMANIAN et al., 2017). Considerando pacientes com infecções em sítios operatórios, cerca de 80% dos patógenos causadores são geneticamente idênticos aos encontrados colonizando a cavidade nasal destes indivíduos. Dentre os procedimentos cirúrgicos onde é maior a prevalência de *S. aureus* podemos mencionar a cirurgia cardíaca e ortopédica, provavelmente pela habilidade deste microrganismo de formar biofilmes (SAKR et al., 2018). Em 2014, um estudo do Instituto Frances de Vigilância em Saúde Pública demonstrou a alta prevalência em infecções de sítio cirúrgico de cirurgias ortopédicas (51,9%), cirurgias coronárias (19,4%) e cirurgias ginecológicas/obstétricas (29,3%), resultados que corroboram com dados encontrados em outros países (SAKR et al., 2018).

O combate à essas infecções tornaram-se mais complicados e caros com a emergência de resistência aos antibióticos, principalmente à meticilina (MRSA) e em menor número à vancomicina (VRSA) (BALASUBRAMANIAN et al., 2017). Estudos constataram que pacientes colonizados com cepas MRSA que realizaram cirurgias tiveram quatro vezes mais chance de desenvolver uma infecção invasiva do que os pacientes colonizados com cepas sensíveis à meticilina (MSSA) (GUDIOL et al., 2017). Outros pesquisadores demonstram que os tratamentos de pacientes infectados com isolados MRSA custam até o dobro do valor dos tratamentos para infecções por MSSA além de maior mortalidade e tempo de internação, o que torna imprescindível o desenvolvimento de novas estratégias para o combate deste patógeno (BALASUBRAMANIAN et al., 2017; GUDIOL et al., 2017; SAKR et al., 2018).

Em 2017, Arias e colaboradores publicaram um estudo realizado em 24 hospitais da América Latina onde 1.185 isolados de *S. aureus* provenientes de bacteremias foram analisados. Cerca de 45% dos isolados em nove países

apresentaram resistência à metilina e o dado mais alarmante deste estudo, é a prevalência de MRSA no Brasil. Dos 204 isolados brasileiros, impressionantes 62% apresentavam esse perfil de resistência, valor consideravelmente maior do que o encontrado em países como Chile (45%) e Argentina (40%). A maior parte desses isolados apresentou altas taxas de resistência também para eritromicina (81%), clindamicina (74%) e ciprofloxacino (78%) (ARIAS; REYES; CARVAJAL, 2017). Isolados MRSA são um fator de risco independente para o aumento de mortalidade em bacteremias, não importando o tratamento realizado (GUDIOL et al., 2017). Dados da ANVISA, do ano de 2016, revelam que o *S. aureus* foi o terceiro agente etiológico de infecção de corrente sanguínea associadas ao CVC nas UTIs brasileiras, sendo identificado em 14,1% dos casos. Na região sul, esse índice é ainda mais alto e o *S. aureus* é o segundo patógeno mais prevalente. Dentre esses isolados, 63.1% eram MRSA, prevalência que aumentou mais de 10% desde 2012 (ANVISA, 2016).

No final dos anos de 1980 casos de *S. aureus* resistentes à metilina oriundos da comunidade (CA-MRSA) foram descritos na Oceania e logo já haviam sido descritos casos em quase todos os continentes (GUDIOL et al., 2017). Em alguns países da Ásia estes isolados são responsáveis por mais de 50% das infecções causadas por *S. aureus* (RASIGADE; DUMITRSCU; LINA, 2014). Estudos evidenciam que nas últimas décadas houve uma mudança na epidemiologia molecular dos isolados MRSA com a preocupante emergência de CA-MRSA (RASIGADE; DUMITRSCU; LINA, 2014). Dados encontrados por Arias e colaboradores em 2017 corroboram com a mudança de prevalência de MRSA no Brasil, onde inicialmente a maioria dos clones era da cepa brasileira ST239 (SCCmec III) e atualmente 89% dos clones encontrados são USA-100 (ST5, SCCmec II) (ARIAS; REYES; CARVAJAL, 2017). Finalmente nos anos 2000, isolados de CA-MRSA emergiram em infecções nosocomiais e se tornaram competidores das cepas MRSA hospitalares (GUDIOL et al., 2017).

3.2.3. Fisiopatologia

A capacidade do *S. aureus* de colonizar e infectar tecidos e células hospedeiras está relacionada com presença de diversos fatores de virulência como adesinas, toxinas e proteínas de proteção contra o sistema imunológico (CROSBY; KWIECINSKI; HORSWILL, 2016). Esta colonização, normalmente não causa

graves infecções, podendo ser assintomática ou causando manifestações leves como impetigo, foliculite, abscessos cutâneos e furunculose recorrente. Apesar disso, pode aumentar entre 2 e 10 vezes a predisposição a infecções graves e aumenta muito o risco em casos cirúrgicos. Casos mais graves na comunidade podem se apresentar como piomiosite, fascite necrosante e pneumonia (BALASUBRAMANIAN et al., 2017).

Além de ser um organismo altamente adaptado e produzir diversos fatores de virulência, o *S. aureus* pode se apresentar como célula plantônica livre, como parte de biofilmes ou em agregados (micro colônias). Algumas infecções estão claramente relacionadas à formação de biofilmes, como infecções relacionadas à cateteres, marca-passos, órteses e próteses. As micro colônias não costumam estar fixadas em superfícies e provavelmente estão relacionadas a infecções em feridas crônicas, osteomielite, infecções de tecidos moles e endocardites (CROSBY; KWIECINSKI; HORSWILL, 2016). Os *S. aureus* estão presentes na maior parte das osteomielites relacionadas à implantes pois além deste microrganismo conseguir se estabelecer na superfície abiótica, ele consegue “ancorar” na matriz óssea e sobreviver no meio intracelular (ICSA) nos osteoblastos (SCHUMACHER et al., 2018). Cerca de 25% dos isolados são capazes de expressar adesinas e sua produção permite a entrada do patógeno em células não-fagocíticas como osteoblastos, células epiteliais, endoteliais e inflamatórias (SAKR et al., 2018; SCHUMACHER et al., 2018). Após sua inserção na célula, a bactéria reduz sua toxicidade e pode persistir por longos períodos, o que dificulta a ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro e também da maior parte dos antimicrobianos. Em um momento apropriado, a bactéria latente aumenta sua virulência novamente para infectar células vizinhas e perpetuar a infecção (SAKR et al., 2018; SCHUMACHER et al., 2018). Esta característica pode ser a explicação para falhas na descolonização, re-colonização e infecções recorrentes, como em pacientes com rinosinose (SAKR et al., 2018).

Outros fatores de virulência dos *S. aureus* são as leucocidinas e as alfa-hemolisinas (alfa-toxina Hla), que lisam plaquetas, células endoteliais, epiteliais e leucócitos. Diferentemente das alfa-toxinas, as leucocidinas são heterooligoméricas constituídas de duas subunidades (S e F) formando um octômero de quatro subunidades F e quatro subunidades S. A diferenciação entre as atividades hemolíticas e de lise de leucócitos foi primeiramente observada em 1922 e

confirmada por Panton e Valentine em 1932, o que dá nome à leucocidina de Panton-Valentine (SEILIE; BUBECK, 2017). Esta toxina está relacionada a infecções severas como a pneumonia necrosante e inicialmente estava presente em isolados CA-MRSA (SANTOS et al., 2007). A regulação da expressão genética dos fatores de virulência nessa espécie depende de um complexo circuito que detecta sinais no ambiente em que estão, além de regulações auto induzidas por um sinal de quorum sensing (BALASUBRAMANIAN et al., 2017). A apoptose celular, causada por toxinas estafilocócicas e proteínas estafilocócicas de superfície, é essencial para a patogênese de infecções como sepse e dermatite atópica. A lise das células de sistema de defesa do hospedeiro facilita a instalação da infecção enquanto a apoptose dos tecidos inibe o sistema imunológico influenciando a produção de citocinas e a diferenciação das células T (ZHANG; HU; RAO, 2017). Estas habilidades combinadas aumentam a virulência, resistência à antibióticos e capacidade de se proteger do sistema imunológico (CROSBY; KWIECINSKI; HORSWILL, 2016; ZHANG; HU; RAO, 2017)

3.2.4. Tratamento de infecções causadas pelo *S. aureus*

Como em outras infecções bacterianas, a identificação rápida e correta do microrganismo, o início imediato da antibioticoterapia e a atenção às possíveis complicações geradas são primordiais e estão relacionadas com um melhor desfecho desses casos (FOSTER, 2017; GUDIOL et al., 2017). O tratamento de infecções causadas pelo *S. aureus* torna-se cada vez mais desafiador pela prevalência de isolados nosocomiais e comunitários resistentes à metilicina e pelo fato de já existirem isolados resistentes à uma das últimas opções terapêuticas, a vancomicina (ARIAS; REYES; CARVAJAL, 2017; CROSBY; KWIECINSKI; HORSWILL, 2016).

β-lactâmicos

Os antibióticos pertencentes à classe dos β-lactâmicos inibem a síntese de parede bacteriana, em sua maior parte, através da inibição da atividade da transpeptidase Proteína Ligante de Penicilina (PBP). (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015). Por ser um microrganismo de crescimento rápido, os antibióticos beta-lactâmicos, que se ligarão na PBP2, são uma boa opção de tratamento quando o isolado é sensível (FOSTER, 2017; GUDIOL et al., 2017). Atualmente, quase a

totalidade de isolados de *S. aureus* é resistente às penicilinas pela produção de penicilinases. A meticilina, oxacilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina e cefalosporinas de primeira geração ainda podem ser utilizados nesses isolados devido à incapacidade desta β -lactamase de hidrolisá-los (GUDIOL et al., 2017).

A ceftarolina fosamila, é uma cefalosporina de quinta geração, tempo-dependente com atividade anti-MRSA e é indicada pela Food and Drug Administration (FDA) para tratar infecções cutâneas e pneumonias adquiridas na comunidade, principalmente as causadas por isolados resistentes aos glicopeptídeos. Este antibiótico se liga fortemente à PBP2a do MRSA e essa característica permite que as CIMs da maior parte dos isolados se mantenha baixa (BUSH, 2015; MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015).

Glicopeptídeos

A vancomicina, aprovada para utilização clínica em 1985 e utilizada a mais de 50 anos, ainda é um dos principais medicamentos utilizados no tratamento de infecções nosocomiais causadas por cocos gram positivos resistentes a outros antibióticos de primeira escolha (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015; ROSSOLINI et al., 2010). Inibe a síntese da parede celular bacteriana ligando-se à terminação D-Ala-D-Ala do Lipídeo II, precursor dos peptídeoglicanos. Assim, inibe a transglicosilação (cross-link) da biossíntese do peptídeoglicano o que prejudica a síntese da parede bacteriana (CHASTRE et al., 2014; GUDIOL et al., 2017; ROSSOLINI et al., 2010). Apesar de sua utilização extensiva nas últimas décadas a prevalência de resistência à vancomicina permanece baixa, porém falhas terapêuticas podem acontecer devido a necessidade de redução de dose pela toxicidade causada, atividade bactericida lenta, baixa distribuição tecidual e dificuldades na previsão de níveis séricos. Por estas dificuldades, essa escolha de antibioticoterapia requer atenção, principalmente em pacientes com problemas renais prévios (CHASTRE et al., 2014; GUDIOL et al., 2017; ROSSOLINI et al., 2010).

Outro glicopeptídeo utilizado no tratamento de MRSA é a teicoplanina, se mostrando ativa inclusive contra isolados VISA. A teicoplanina apresenta atividade antibacteriana semelhante à vancomicina, porém, menos efeitos colaterais. Entre esses efeitos estão a trombocitopenia, nefrotoxicidade e ototoxicidade (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015). Infecções causadas por isolados com CIMs mais altos, próximos do limite do *break-point*, tem maiores chances de falhas no tratamento e de

risco de morte do que isolados com CIMs mais baixos para os glicopeptídeos (GUDIOL et al., 2017).

Oxazolidinonas

O principal mecanismo de ação das oxazolidinonas é a inibição da síntese de proteínas bacterianas por sua interação com a subunidade 50S ribossomal em um ponto próximo à interface com a 30S, impedindo assim a síntese de novas cadeias polipeptídicas (KOKKORI et al., 2014). A linezolida, primeiro antibiótico dessa classe, inibe a síntese de proteínas bacterianas e é uma boa alternativa terapêutica para infecções persistentes ou refratárias por MRSA (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015). A principal preocupação na sua utilização é a possibilidade de ocorrer mielossupressão, que pode levar a anemia, leucopenia, trombocitopenia e pancitopenia (CHASTRE et al., 2014). Em 2014, a FDA aprovou a utilização de outro antibiótico da classe das oxazolidinonas, a tedizolida, que tem se mostrado ativa em isolados que carregam o gene de resistência *crf* (gene de resistência ao florfenicol/cloranfenicol) (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015).

A maior parte dos estudos que comparam tratamentos com linezolida e vancomicina, em diferentes países, conclui que apesar do custo da linezolida ser maior, o menor tempo de internação e menor incidência de falência renal entre os pacientes faz deste medicamento uma boa opção para o tratamento de infecções nosocomiais causadas por cocos gram positivos resistentes (CHASTRE et al., 2014; LIN et al., 2017; RELLO et al., 2016).

Lipopeptídeos

A daptomicina age na membrana celular bacteriana na região do septo, principalmente no momento da divisão celular e seu mecanismo é dependente de cálcio (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015). É um agente com rápido efeito bactericida dose-dependente e está na primeira linha de opções de tratamento de infecções causadas por MRSA, porém, a resistência pode surgir em tratamentos longos de infecções com alta carga bacteriana, como endocardites (FOSTER, 2017; GUDIOL et al., 2017). Outro lipopeptídeo, a telavancina, possui potente atividade bactericida contra *S. aureus* MRSA e VISA. (GUDIOL et al., 2017).

Glicilciclinas

A tigeciclina, um antibiótico da classe das glicilciclinas, age na subunidade 30S dos ribossomos e inibe a translação proteica nas bactérias e a síntese de cadeias peptídicas. É um antibiótico de amplo espectro bastante utilizado para no tratamento de infecções graves por MRSA (ROSSOLINI et al., 2010).

Outros agentes e combinações

As fluoroquinolonas, que agem na DNA girase e na topoisomerase da bactéria, também podem ser utilizadas em infecções por cocos gram positivos. Porém a resistência pode ocorrer em mutantes (topoisomerase) ou por bombas de efluxo (FOSTER, 2017). O cloranfenicol, que inibe a síntese de proteínas na subunidade 50S ribossomal, pode ser utilizado topicamente, principalmente em conjuntivites (FOSTER, 2017). Em pacientes de risco onde a descolonização é necessária, normalmente são utilizadas a mupirocina e a clorexidina. Aminoglicosídeos como a neomicina, também de utilização tópica, pode ser uma alternativa para a descolonização. A gentamicina também é muito utilizada, porém, seu uso está cada vez mais comprometido devido à emergência de resistência (FOSTER, 2017; SAKR et al., 2018; SANTOS et al., 2007).

Além disso, combinações entre antimicrobianos podem aumentar as chances de sucesso no tratamento e diminuir a seleção de isolados resistentes. Algumas opções de combinações para o tratamento de infecções causadas por esse microrganismo são sulfametoxazol/trimetropim, vancomicina/ β -lactâmico, daptomicina/ β -lactâmico e combinações com fosfomicina (GUDIOL et al., 2017).

3.2.5 Resistência em *S. aureus*

Como em outros microrganismos, a aquisição de elementos genéticos extra-cromossomais transferíveis horizontalmente (plasmídeos) pelo *S. aureus* é uma grande preocupação na emergência de resistência aos antibióticos. Outros mecanismos de resistência podem se desenvolver por mutações que causam uma alteração no sítio de ligação do antibiótico, aumento da expressão de genes de bombas de efluxo e regulação ou alterações na parede bacteriana (FOSTER, 2017).

β-lactâmicos: Penicilinas

A resistência aos β-lactâmicos se dá de três formas principais: a aquisição de genes que produzem PBPs com afinidade reduzida aos β-lactâmicos; mutações em genes que regulam e expressam proteínas que irão alterar a conformação da parede bacteriana; hidrólise enzimática do anel β-lactâmico através da produção de β-lactamases (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015).

Devido a sua grande capacidade de adaptar-se e de desenvolver resistência aos antimicrobianos utilizados na prática clínica, atualmente, quase a totalidade das cepas de *S. aureus* são resistentes à penicilina. Isso foi possível através da aquisição de plasmídeos com genes que codificavam β-lactamases (tipos A, B, C e D) nos anos de 1950 (DE ARAÚJO, et al., 2016; FERREIRA et al., 2017; MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015). Pouco tempo depois do início da utilização desse antibiótico, penicilinas da classe A já estavam sendo produzidas pelos isolados de *S. aureus* (GUDIOL et al., 2017).

Estas enzimas são classificadas como serina β-lactamases (BlaZ) de espectro estreito que hidrolisam o anel beta-lactâmico do antibiótico. Normalmente o gene *blaZ* está no transposon *Tn522*, que pode estar localizado em um plasmídeo ou estar inserido no cromossomo da bactéria. São lipoproteínas que ficam em parte no meio externo e em parte entre a parede celular e a membrana citoplasmática (FOSTER, 2017). Poucas décadas depois da introdução da penicilina, as penicilinas foram se tornando cada vez mais comuns em cepas responsáveis por infecções nosocomiais e logo após, essas cepas se espalharam rapidamente na comunidade, sendo encontradas atualmente em cerca de 90% dos isolados de *S. aureus* (FERREIRA et al., 2017; GUDIOL et al., 2017).

β-lactâmicos: Meticilina e Oxacilina

A metilina foi a primeira penicilina semissintética que não era degradada pela ação das penicilinas (SANTOS et al., 2007). A resistência a este antibiótico, que se disseminou na década de 1970, está muito associada a infecções graves. Os *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA), foram isolados e identificados pela primeira vez em 1961, tornando-se um importante grupo de patógenos nosocomiais no mundo pelas décadas que se seguiram (CHOO; CHAMBERS, 2016; GOOTZ, 1990). A resistência a metilina se dá pela aquisição do gene *mecA*, que se encontra no cassete cromossômico estafilocócico SCCmec. Este gene, por sua vez,

é responsável pela codificação de um análogo da PBP-2 (PBP-2a) que possui baixa afinidade aos β -lactâmicos (com exceção às cefalosporinas de última geração), sendo sua expressão associada com o tratamento prévio com β -lactâmicos (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015). Esta modificação altera o posicionamento da serina no sítio ativo da PBP-2 o que impede a ligação do antibiótico β -lactâmico nessa enzima, permitindo que o *cross-link* da parede bacteriana ocorra normalmente (FOSTER, 2017; LOZANO; TORRES, 2017). Apesar da alta prevalência do gene *mecA* associado com resistência aos β -lactâmicos, já houveram relatos, principalmente na Europa, de cepas MRSA contendo uma PBP2a distinta, associada ao gene *mecC* (FOSTER, 2017). Além disso, a presença de outros mecanismos de resistência restringe ainda mais opções terapêuticas, sendo os glicopeptídeos mais utilizados para tratamento nesses casos (GUDIOL et al., 2017; MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015; FOSTER, 2017)

Inicialmente, isolados MRSA eram uma preocupação relacionada à pacientes hospitalares, porém, atualmente isolados resistentes à meticilina são endêmicos na comunidade (ARIAS; REYES; CARVAJAL, 2017). Casos de CA-MRSA foram descritos no início dos anos 1990 e se tornaram endêmicos em várias partes do mundo, sendo o clone MRSA USA-300 uma grande preocupação nos Estados Unidos (GUDIOL et al., 2017; RASIGADE; DUMITRSCU; LINA, 2014). Esses isolados resistentes foram descritos primariamente em pacientes hígidos sem internações prévias ou contato com instituições de assistência à saúde, ou seja, sem fatores de risco prévios para o estabelecimento de MRSA, o que sugere que casos de CA-MRSA emergem em populações e áreas imprevisíveis (ARIAS; REYES; CARVAJAL, 2017; RASIGADE; DUMITRSCU; LINA, 2014). Normalmente os isolados CA-MRSA apresentam resistência a um menor número de antibióticos, porém apresentam mais fatores de virulência como a leucocidina de Pantón-Valentine (LPV) e o gene *mec* se encontra em cassetes SCCmec tipos IV e V (FOSTER, 2017; GUDIOL et al., 2017; STEFANI et al., 2012) diferente das cepas hospitalares cujos SCCmec eram normalmente dos tipos I, II e III. Atualmente, já existem relatos em vários países, como Brasil e Estados Unidos, de cepas hospitalares contendo cassetes que normalmente eram relacionados com isolados CA-MRSA (STEFANI et al., 2012).

Glicopeptídeos: Vancomicina

A resistência em enterococos aos glicopeptídeos foi descrita em 1986 na Europa em bactérias comensais de indivíduos da comunidade. Sua emergência foi relacionada ao uso veterinário da avoparcina, porém, anos depois essa forma de resistência foi descrita mesmo em países que nunca utilizaram esse antibiótico nos animais de produção (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015).

Atualmente, a redução da suscetibilidade das cepas frente à vancomicina é preocupante e demonstra cada vez mais a urgência do desenvolvimento de novas drogas (CHOO; CHAMBERS, 2016). Cepas de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA, com CIM entre 4–8 µg/mL) e com alto grau de resistência (VRSA, com CIM >16 mg/l) já circulam em ambientes hospitalares de várias partes do mundo, principalmente no norte da Índia, tanto em infecções como em colonizações (LOZANO; TORRES, 2017; RASIGADE; DUMITRSCU; LINA, 2014). A resistência intermediária costuma surgir durante o tratamento com o próprio antibiótico, provavelmente por um espessamento de parede bacteriana, diferentemente das cepas com alto grau de resistência que adquirem essa capacidade através da aquisição de um plasmídeo altamente transferível contendo o gene *van* (mais comum *vanA*), localizado originalmente no transposon Tn1546 de enterococos (LOZANO; TORRES, 2017; SANTOS et al., 2007).

O primeiro relato de VRSA foi em 2002 nos Estados Unidos e a partir daí, houveram relatos esparsos de isolados que continham o gene *mecA* e eram resistentes à vancomicina. No Brasil foi reportado um isolado CA-MRSA (USA300) portando o gene *VanA*, que confere ao microrganismo a habilidade de produzir proteínas que alteram as terminações D-Ala-D-Ala do peptídeoglicano para D-Ala-D-Lac ou D-ala-D-Ser (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015). O fenótipo VISA, reportado pela primeira vez em 1997, é mais comum e pode ocorrer tanto em MRSA como em MSSA. Está relacionado com casos de infecções invasivas graves por *S. aureus* que foram tratadas por longos períodos com vancomicina. Em isolados susceptíveis, subpopulações resistentes com CIMs >2 µg/mL podem emergir, categorizando os isolados VISA heterogêneos ou hetero-VISA (hVISA). Este mecanismo é muito complexo e parece depender de várias mutações subsequentes que vão gerar uma mudança de conformação da parede bacteriana. Ocorre um espessamento da parede que aumenta a quantidade de terminações D-Ala-D-Ala, o que irá reter a vancomicina

e a impedir de atingir os precursores de peptidoglicano que emergem do citoplasma da bactéria (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015).

Oxazolidinonas: Linezolida

A resistência as oxazolidinonas pode emergir por mutações nos genes que codificam o 23S do RNA ribossomal (rRNA), alterações nas proteínas ribossomais L3/L4 ou, pela presença do gene *cf*r (cloranfenicol/florfenicol resistente), que pode metilar 23S rRNA, alterando o sítio de ligação do antibiótico no ribossomo (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015).

Uma das últimas opções terapêuticas no tratamento de infecções graves causadas por *S. aureus* resistente é a linezolida. É o primeiro antibiótico da classe das oxazolidinonas comercializado para utilização na clínica e inibe a síntese proteica de bactérias gram positivas pela ligação na subunidade ribossomal 50S (CHASTRE et al., 2014; FOSTER, 2017; LIN et al., 2017; MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015). Embora raro, o desenvolvimento de resistência à linezolida costuma estar relacionado à sua utilização prolongada ou intermitente juntamente com mutações cromossômicas acumuladas dos genes do 23S rRNA (ROSSOLINI et al., 2010). Já crescem relatos de isolados que adquiriram plasmídeos com genes que codificam as Crf rRNA metiltransferases e o determinante de resistência OptrA, que provavelmente emergiram pela utilização veterinária de fluorfenicol (FOSTER, 2017). O gene *crf* está presente em cerca de 13% dos *S. aureus* resistentes à linezolida, é transmitido por vários elementos genéticos móveis e confere resistência à vários antibióticos com ação anti-ribossomal (fenicóis, lincozamidas, streptogramina A), sendo assim uma preocupante forma de resistência (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015; ROSSOLINI et al., 2010). Além disso, também podem ocorrer substituições nas proteínas L3 /L4 ribossomais que prejudicarão a síntese proteica, apesar deste mecanismo ser mais comum em *S. epidermidis* (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015).

Lipopeptídeos: Daptomicina

A resistência aos lipopeptídeos costuma se desenvolver ao longo do tratamento com vancomicina ou daptomicina, o que pode diminuir a eficácia dos tratamentos, principalmente em infecções com alta carga bacteriana. Este mecanismo

de resistência se dá de forma complexa e multifatorial (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015).

A emergência do fenótipo de resistência à daptomicina está relacionada a infecções com alta carga bacteriana e exposição ao tratamento com vancomicina. Esse mecanismo de resistência é complexo e envolve principalmente alterações na carga eletrostática da superfície da bactéria (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015). Mutações nos genes *yycFG*, *mprF*, ou superexpressão do operon *dltABCD* estão associados com este fenótipo, que pode coexistir com o fenótipo VISA no mesmo isolado (ROSSOLINI et al., 2010). A enzima bifuncional MprF realiza a inserção de lisinas aos fosfolipídeos de membrana e a superexpressão do operon *dltABCD* aumenta a quantidade de D-alanina nos ácidos teicóicos de parede o que altera a carga eletrostática da parede bacteriana. Essa carga positiva é responsável pela repulsão eletrostática do complexo daptomicina/cálcio (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015; ROSSOLINI et al., 2010).

3.3. Derivados de 8-Hidroxiquinolina

A estrutura química dos fármacos influencia a forma como eles interagem com bioreceptores e modificações nessa estrutura podem ser realizadas a fim de buscar ou otimizar a atividade desejada (OLENDER; ŻWAWIAK; ZAPRUTKO, 2018). As 8-hidroxiquinolinas (HQ) e seus derivados são uma subclasse de quinolinas com amplas funções biológicas, inclusive antimicrobianas. Essa ampla gama de atividades biológicas pode ser obtida a partir das modificações apropriadas dos substituintes do núcleo 8-hidroxiquinolina fazendo com que este seja considerando uma estrutura privilegiada. (JOAQUIM et al., 2018; PIPPI et al., 2019). São compostos com um anel heterocíclico de seis membros fundido a um anel benzênico, que se ligam aos íons metálicos pelos átomos de oxigênio do grupamento hidroxila e pelo nitrogênio do anel quinolínico e demonstram mais afinidade aos íons de cobre e zinco (NABER et al., 2014; PRACHAYASITTIKUL et al., 2014). Nas últimas décadas a HQ foi um farmacóforo muito utilizado para o desenvolvimento de compostos otimizados, principalmente através de alterações nos carbonos 2, 5 e 7 (JOAQUIM et al., 2018; KANIZSAI et al., 2018; PAVLOV; PIPPI et al., 2017; TAKUCHEV; GEORGIEVA, 2012). O grupo hidroxila na posição 8 no anel da quinolina está relacionado com suas atividades antimicrobianas (LAURIE et al., 2018; PRACHAYASITTIKUL et al., 2014). A maior parte das atividades biológicas dos derivados de 8-hidroxiquinolinas ocorrem

pela potente propriedade quelante de íons metálicos, característica que faz desses compostos candidatos promissores para otimização a fim de desenvolver tratamentos não somente para doenças infecciosas, mas também para doenças que envolvem distúrbios no metabolismo de metais (PRACHAYASITTIKUL et al., 2014).

O clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina) é um derivado de HQ (Fig. 1) halogenado, inicialmente utilizado como antisséptico tópico (JIANG et al., 2017). Foi comercializado em 1934, pela Ciga-Geyge (atual Novartis), para uma grande variedade de infecções intestinais (JOAQUIM et al., 2018; NABER et al., 2014; PIPPI et al., 2019). Este medicamento foi amplamente utilizado entre as décadas de 1950 e 1970, principalmente como antiparasitário oral, no tratamento e prevenção da amebíase intestinal, mas também no tratamento da acrodermatite enteropática e de outras desordens relacionadas à absorção de zinco (ARBISER et al., 1998; JIANG et al., 2011; MAO; SCHIMMER, 2008). O complexo clioquinol-íon é formado com vários íons comuns no intestino humano, como zinco, cálcio, magnésio e cobre, porém demonstra maior afinidade pelo zinco, aumentando seus níveis sistêmicos graças a formação do complexo clioquinol-zinco que é mais lipossolúvel (aumento da biodisponibilidade) (ARBISER et al., 1998; JIANG et al., 2011; NABER et al., 2014). A característica altamente lipofílica do complexo é a provável causa de interação do clioquinol com a membrana celular das bactérias, permitindo sua entrada e interação com seu alvo, que pode ser os sítios ligantes de metais nas enzimas bacterianas (PRACHAYASITTIKUL et al., 2014).

Apesar da sua notória atividade, o uso oral do clioquinol foi descontinuado, no início da década de 1970, devido à manifestação de sintomas compatíveis com a neuropatia mielo-óptica subaguda (SMON) em cerca de dez mil indivíduos no Japão (ARBISER et al., 1998; MAO; PIPPI et al., 2019; SCHIMMER, 2008). Nessa neuropatia ocorre um início subagudo de desordens sensoriais e motoras acometendo a metade inferior do corpo com concomitante comprometimento ótico, sinais precedidos por sintomas abdominais. Em alguns casos a paralisia bulbar causada pelo comprometimento do tronco cerebral pode levar à morte (KONAGAYA et al., 2004). Os sintomas da SMON ocorrem devido a uma desmielinização simétrica dos funículos laterais e posteriores da medula espinhal, dos nervos óticos e periféricos (MAO; SCHIMMER, 2008). Algumas teorias de como o clioquinol favoreceria o desenvolvimento dessa síndrome foram estudadas desde então, nenhuma se mostrando definitiva (ARBISER et al., 1998; KONAGAYA et al., 2004; MAO;

SCHIMMER, 2008). Estas teorias incluem os efeitos da toxicidade sinérgica com agentes virais e pesticidas, dano tecidual devido à radicais de oxigênio e hiperoxidação lipídica, anormalidades na metabolização de vitamina B12, diferenças na produção e utilização do clioquinol e o aumento sérico e celular de metais como ferro e zinco (ARBISER et al., 1998; KONAGAYA et al., 2004).

Considerando que os efeitos neurotóxicos só foram observados em pacientes japoneses e por um curto período de tempo, comparado ao seu período de utilização, novos estudos têm sido desenvolvidos com o clioquinol, direcionados para o combate de doenças não-infecciosas, além de seu uso como antimicrobiano tópico nunca ter cessado em formulações tópicas como Drenifórmio® (Biolab SANUS Farmacêutica) (PIPPI et al., 2017; 2019). Este fármaco tem a capacidade de induzir a morte de células malignas de carcinomas de diferentes formas, incluindo a inibição do proteossoma, além de ter a habilidade de se ligar com o cobre, o que dissocia esse metal dos agregados de proteínas β -amiloides relacionados com a doença de Alzheimer (MAO; SCHIMMER, 2008). Devido à dados promissores obtidos em testes com animais, o clioquinol tem sido utilizado em estudos clínicos contra a doença de Alzheimer sem a manifestação de SMON (JIANG et al., 2011; LAWUNG et al., 2018; PIPPI et al., 2017).

A NQ é outro derivado, não-halogenado (Fig. 1), da 8HQ amplamente utilizados na Europa e na Ásia como agente antimicrobiano de amplo espectro e sua atividade é potencializada por íons (JIANG et al., 2011; LAURIE et al., 2018). Foi descrita no início dos anos 1950 e desde a década de 1960 tem sido utilizado no tratamento e profilaxia de infecções do trato urinário por suas características farmacocinéticas (excreção urinária), mostrando atividade contra bactérias gram negativas, gram positivas, *Mycoplasma* e *Candida* spp, além de ter bom efeito contra a formação de biofilmes (NABER et al., 2014; OLENDER; ŻWAWIAK; ZAPRUTKO, 2018). O mecanismo de ação deste antimicrobiano também está relacionado com suas propriedades de quelar íons, a hipótese é que a NQ forme complexos com íons (Mg^{2+} , Ca^{2+}) presentes na membrana externa das bactérias tornando sua superfície hidrofóbica, o que diminui sua capacidade de aderência, além de inibir a síntese de RNA em leveduras em divisão. O tratamento utilizando NQ oral tem se mostrado bastante seguro e apenas alguns efeitos colaterais leves são reportados (LAURIE et al., 2018; NABER et al., 2014).

A NQ é considerada um “lead compound”, onde modificações estruturais

podem levar à otimização de atividade e variações no seu mecanismo de ação (LAURIE et al., 2018). Nos últimos anos, a NQ tem sido foco de vários estudos relacionados com a forte atividade de inibição da angiogenese, indução de apoptose celular, e bloqueio da invasão de células tumorais e como antineurodegenerativo no tratamento do mal de Alzheimer. Estas características farmacológicas levam cada vez mais ao aumento das pesquisas da atividade anti-câncer deste antibiótico (LAWUNG et al., 2018; OLENDER; ŻWAWIAK; ZAPRUTKO, 2018).

O desenvolvimento de novos antimicrobianos tem se tornado, cada vez mais, o foco de estudos em diversas áreas de pesquisa. A utilização de compostos naturais e extratos de plantas têm sido bastante estudados pelo conhecido efeito antimicrobiano de alguns deles (OYAMA et al., 2016). Paralelamente, a síntese de novos compostos bioativos e sua correlação estrutural com as propriedades biológicas demonstradas, apresenta um dos principais assuntos a serem tratados no estudo da química orgânica (LUBENETS et al., 2017). Além disso, sabe-se que uma das melhores estratégias para controlar a disseminação das bactérias multirresistentes e aumentar o tempo de utilização de antibióticos na prática clínica é a associação entre drogas (DE ARAÚJO, et al., 2016; GUDIOL et al., 2017). A terapia com dois ou mais fármacos que apresentem mecanismos de ação diferentes reduz a possibilidade de um microrganismo sobreviver ao tratamento, mesmo apresentando algum mecanismo de resistência, o que diminui a seleção de bactérias mais resistentes. Além deste fato, a menor dosagem necessária para atingir a dose terapêutica contribui para a diminuição de reações de toxicidade dose-dependente (DEUPREE et al., 2010). Consequentemente, a descoberta de novos agentes sinérgicos pode ajudar a reverter os mecanismos de resistência já existentes e diminuir a concentração terapêutica de antibióticos, recuperando fármacos que já estão quase em desuso (DE ARAÚJO, et al., 2016).

3.4 Metodologias Para Avaliação de Atividade Antimicrobiana

Desde o início da sua utilização nos anos de 1920s, os testes *in vitro* de detecção de suscetibilidade bacteriana ainda são a principal ferramenta na utilização de antimicrobianos para tratamento de infecções (SCHUMACHER et al., 2018). Existem vários métodos disponíveis para a avaliação da atividade antimicrobiana de antibióticos comerciais e novos produtos a serem testados. A escolha do método a ser utilizado deve levar em conta a epidemiologia local,

antibióticos mais utilizados e a realidade financeira do laboratório de microbiologia. Todos os métodos devem ser interpretados conforme indicações de manuais de agências reguladoras (CLSI, EUCAST, BrCAST). Além disso, é imprescindível a identificação correta do patógeno e a escolha correta dos antimicrobianos testados conforme a prévia identificação da bactéria, sítio de infecção e realidade da disponibilidade de antimicrobianos nos ambientes de assistência à saúde (JORGENSEN; FERRARO, 2009).

Ensaio qualitativo: Disco-difusão

O teste de disco-difusão é simples, prático e de baixo custo, além de estar bem padronizado para a maior parte das bactérias patogênicas e antibióticos disponíveis (JORGENSEN; FERRARO, 2009). O resultado do teste se dá de forma qualitativa, classificando o isolado como sensível, intermediário ou resistente (MOODY, 1992; SCHUMACHER et al., 2018). O método de Kirby–Bauer foi apresentado em 1959 e aprovado em 1975, o princípio do teste se baseia na difusão em agar de uma quantidade conhecida do antimicrobiano contido em discos de papel. Uma concentração padronizada do microrganismo a ser testado ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL) é semeada homogeneamente em uma placa de agar (Mueller-Hinton ou agar enriquecido) e incubada entre 16 e 24 horas em 35°C. A leitura dos halos de inibição se dá em milímetros e deve ser comparada com valores padronizados nos manuais (JORGENSEN; FERRARO, 2009; SCHUMACHER et al., 2018).

A principal desvantagem deste teste é que ele não fornece o resultado da CIM, que cada vez mais é essencial no tratamento eficaz de bactérias resistentes. Além de sua realização não ser possível para bactérias anaeróbias fastidiosas e do peso molecular do antibiótico testado influenciar a sua difusão no agar (JORGENSEN; FERRARO, 2009; SCHUMACHER et al., 2018).

Ensaio quantitativo: Gradiente de concentração de antibiótico (elipsometria)

O princípio deste ensaio também é a difusão do antimicrobiano em agar (Mueller-Hinton ou agar enriquecido) semeado com uma concentração conhecida de UFC, porém, são utilizadas fitas comerciais com diferentes concentrações do antibiótico a ser testado. Ao longo da fita existe uma escala que indica a concentração do fármaco. Após incubação entre 16 e 24 horas a 35°C a leitura da

elipse de inibição de crescimento onde o inóculo toca na fita fornece o resultado da CIM (SCHUMACHER et al., 2018).

Este ensaio permite a determinação do perfil de sensibilidade de microrganismos anaeróbios fastidiosos que necessitam de ambientes ou nutrientes específicos para seu crescimento, porém, em alguns casos como o da vancomicina, os valores de CIMs podem ser diferentes dos testados por microdiluição em caldo que é o método de referência para determinar a CIM para a maioria dos patógenos (JORGENSEN; FERRARO, 2009; SCHUMACHER et al., 2018).

Ensaio quantitativo: Diluição seriada em caldo

Este teste é realizado com meios de cultura líquidos, normalmente Mueller-Hinton para bactérias não-fastidiosas. Uma diluição seriada do antibiótico pode ser feita em tubos (macrodiluição) ou em placas estéreis de 96 poços (microdiluição), onde concentração conhecida ($1-5 \times 10^5$ UFC/mL) do inóculo bacteriano é semeada em cada tubo ou poço com o antimicrobiano totalizando um volume final de 100µl em cada poço. O teste deve ser coberto e incubado *overnight* a 35°C e a leitura se dá através da turbidez gerada pelo crescimento bacteriano visível. A CIM é representada pela concentração de antibiótico utilizada que inibiu o crescimento visível da bactéria (MOODY, 1992).

Existem placas comerciais prontas com os antibióticos liofilizados e equipamentos automatizados para a leitura de fluorescência ou turbidimetria produzidas pelo crescimento bacteriano. Com as facilidades da miniaturização da técnica e o grau de automação atingido, este é considerado o padrão ouro para a maioria das pesquisas de suscetibilidade bacteriana (SCHUMACHER et al., 2018).

Ensaio quantitativo: Ensaio de Time-kill (TK)

Também conhecido como curvas de tempo/morte, este teste é capaz de determinar concentrações bacteriostáticas e bactericidas dos antibióticos testados, além de determinar o tempo necessário para esse efeito ocorrer. Este ensaio pode ser realizado com mais de um fármaco, determinando assim, se ocorre efeito sinérgico ou antagônico nas concentrações e combinações utilizadas (NCCLS, 1999).

Para a realização deste ensaio, uma concentração conhecida de inóculo

bacteriano é semeada em tubos de caldo Mueller-Hinton cátion ajustado com concentrações pré-definidas do antimicrobiano a ser testado (normalmente sub-inibitórias, 1xCIM, 2xCIM). Esses tubos devem ser incubados em estufa com agitação a 35°C e pequenas alíquotas retiradas em horários pré-determinados. Estas alíquotas são diluídas e semeadas em agar para posterior contagem de UFC (MOODY, 1992).

O efeito sinérgico é definido por uma redução na contagem de colônias $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL após 24 horas em comparação ao resultado obtido com o antibiótico mais ativo que foi testado isoladamente. Já o antagonismo é definido pelo aumento na contagem de colônias $> 2 \log_{10}$, após 24 horas. A atividade bactericida é definida quando houver a redução $\geq 3 \log_{10}$, na contagem de colônias após 24 horas, em relação ao inóculo inicial (hora zero) e a bacteriostática quando houver redução $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL após 24 horas (MOODY, 1992; NCCLS, 1999).

Metodologias automatizadas e semi-automatizadas : Detecção fenotípica rápida

As metodologias automatizadas de baseiam na semeadura de um inóculo bacteriano de concentração conhecida em cassetes comerciais com concentrações diferentes de vários antibióticos a serem testados. Após inseridos no equipamento de incubação e leitura, a turbidez ou fluorescência é lida em intervalos curtos e os padrões de suscetibilidade expressos em poucas horas (SCHUMACHER et al., 2018). Equipamentos como o Phoenix®, o MicroScan® e o Vitek 2® são bastante utilizados nos laboratórios de microbiologia clínica (VRIONI et al., 2018). Pela detecção ótica do equipamento, muito mais sensível que o olho humano, esse tipo de ensaio pode economizar várias horas para o diagnóstico correto do patógeno e seu perfil de sensibilidade. Existe a desvantagem da inflexibilidade dos painéis de antimicrobianos e além disso, novos métodos aprimorados vêm sendo lançados, o que mostra que mesmo métodos bem estabelecidos apresentam limitações (SCHUMACHER et al., 2018).

Sistemas automatizados como o Vitek 2® da BioMerieux são extensamente utilizados na prática clínica (JORGENSEN; FERRARO, 2009), porém, recentemente este método passou por um *recall* dos cartuchos utilizados para teste de suscetibilidade à oxacilina de gram positivos e triagem de MRSA com cefoxitina, ambos por apresentarem taxas acima do aceitável de resultados falso

sensíveis ou falso negativos respectivamente. Conforme a FDA reportou neste caso, diagnósticos de falsa sensibilidade causam tratamento inapropriado e severas consequências nos prognósticos dos pacientes (FDA, 2017).

Metodologias automatizadas e semi-automatizadas : Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

Esta técnica de espectrometria de massa é baseada na análise proteômica das células, que caracteriza a expressão genética e produção metabólica dos microrganismos. A análise de proteínas altamente abundantes, principalmente ribossômicas de microrganismos, na faixa de massa de 2000 a 20000 Daltons ocorre através de pulsos de laser para ionização de biomoléculas. Ocorre uma aceleração de íons onde os tempos de passagem por uma distância específica em um tubo de vácuo variam conforme seu tamanho. Pela medição do “tempo de voo” dos íons é gerado um padrão de espectros chamado de *Peptide Mass Fingerprint* que é então comparado com um banco de dados. Apesar do alto valor do equipamento, o custo de cada teste realizado é muito baixo e sua realização bastante rápida (SCHUMACHER et al., 2018; VRIONI et al., 2018).

A detecção de resistência por esse método pode ser realizada de algumas formas diferentes. A medida direta pode ser feita pela análise do crescimento bacteriano após incubação na presença e ausência de determinado antibiótico em comparação com o crescimento de uma cepa ATCC sensível nas mesmas condições (MALDI Biotyper-Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay, MBT-ASTRA). A suscetibilidade resulta em intensidades baixas de pico de biomassa bacteriana pelo baixo crescimento bacteriano com o antibiótico, já a resistência gera picos intensos de proteína pelo o crescimento bacteriano. A detecção da produção de enzimas que conferem resistência, pode ser feita indiretamente através da hidrólise dos antibióticos (MALDI Biotyper-Selective Testing of Antibiotic Resistance-Beta-Lactamase Assay, MBT-STAR-BL). Cada antibiótico irá produzir um pico característico, se a bactéria a ser testada produzir uma enzima que cause sua degradação esse pico não será mais observado. Surgirão novos picos característicos dos produtos de degradação do antimicrobiano (VRIONI et al., 2018).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Síntese da Série de Análogos de 8HQ

Foi preparada uma série de 5 novos derivados de 8HQ metilados utilizando a moderna reação de acoplamento cruzado de Buchwald-Hartwig (HARTWIG, 2008), em parceria com o Pharmaceutical Synthesis Group, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os reagentes e o Clioquinol foram obtidos de fornecedores comerciais (Sigma-Aldrich®). A cromatografia em coluna foi realizada em sílica Fluka (FLUKtuierende KAskade) (Sigma-Aldrich) 0,035-0,070 mm. Os solventes utilizados foram destilados antes de serem utilizados. O espectro ^1H e ^{13}C foi obtido em espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker 400 (Anexo 1). Os deslocamentos químicos (δ) foram dados em relação ao TMS.

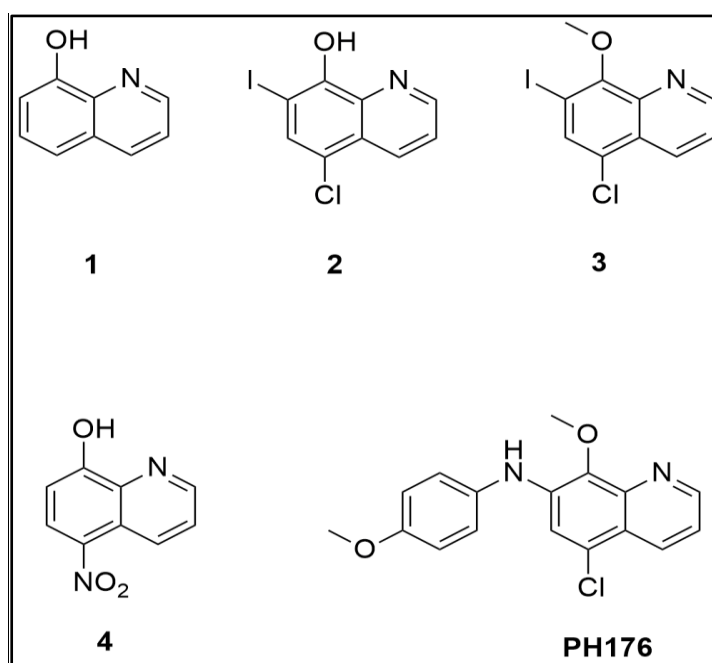


Figura 1 - Estrutura química da 8-hidroxiquinolina (1), Clioquinol (2), 5-cloro-7-iodo-8-metoxiquinolina (3), Nitroxolina (4) e PH176.

4.1.1 Síntese do 5-cloro-7-iodo-8-metoxiquinolina (3)

O intermediário 3 foi obtido através de reação de metilação adaptada de Zhai e colaboradores (2010). A uma solução de clioquinol (2,0 g, 6,5 mmol) dimetilformamida (DMF) (15 mL), foi adicionado K_2CO_3 (1,81 g, 13 mmol) em temperatura ambiente. Após 30 minutos sob agitação, foi adicionado CH_3I (1,23 mL, 13 mmol) gota a gota. Após 16 horas, a reação foi interrompida pela adição de acetato de etila (300 mL). A fase orgânica foi lavada com NaOH 0,5 M (200 mL), água (200 mL), seca sobre Na_2SO_4 , filtrada e concentrada sob pressão reduzida, o

que resultou no produto 5-cloro-7-iodo-8-metoxiquinolona (3) como um sólido roxo que foi utilizado no passo seguinte sem purificação adicional (96% de rendimento).

4.1.2 Síntese do 5-Cloro-7-(4-metoxifenilamino)-8-metoxiquinolona (PH 176)

A uma solução de 5-cloro-7-iodo-8-metoxiquinolona (300 mg, 0,94 mmol) em dioxano (3 mL) foi adicionado Pd(OAc)₂ (5mol %), Xantphos (5 mol%), 4-metoxianilina (1,41 mmol) e Cs₂CO₃ (613 mg, 1,88 mmol) sob atmosfera de argônio em tubo selado. Após 16 h a 100° C, a solução foi resfriada à temperatura ambiente, concentrada sob pressão reduzida e purificada por cromatografia em coluna de sílica (eluente: ciclohexano:EtOAc 8:2), resultando em uma cera amarela escura. O rendimento final foi de 48% (duas etapas).

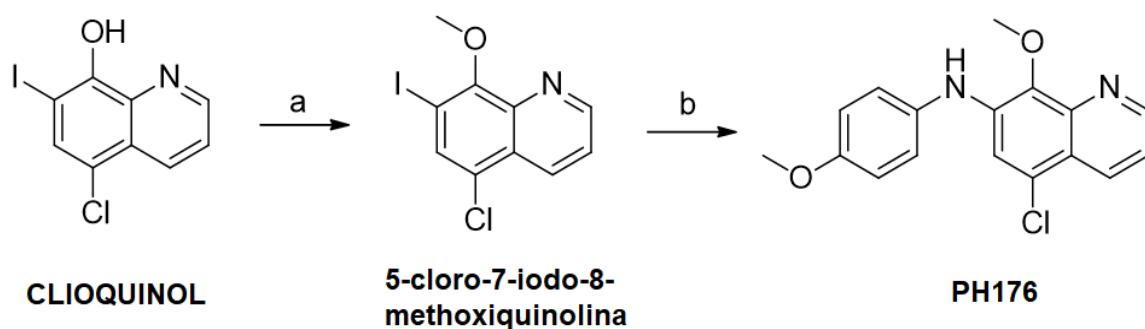


Figura 2 - Síntese do PH176. (a) CH₃I, K₂CO₃, DMF, temperatura ambiente, 16h; (b) Pd(OAc)₂, Xantphos, Cs₂CO₃, 4-metoxianilina, dioxano, atm. argônio, 100 °C, 16h.

4.2. Atividade Antibacteriana dos Análogos de 8HQ, Nitroxolina e Oxacilina Os testes de atividade antibacteriana foram realizados no Laboratório de Microbiologia Aplicada do ICBS/UFRGS. Os isolados e cepas ATCC utilizados neste estudo foram estocados congelados (-20°) em uma mistura de glicerol 16% e caldo Tripticaseína de Soja (TSB). Para a realização dos testes, foram repicados em agar não-seletivo e incubados *overnight* em estufa microbiológica à 35° ± 2. Os compostos foram diluídos em dimetilsulfóxido, não ultrapassando a concentração de 2%, para utilização nos testes.

4.2.1.Triagem da nova série de análogos de 8HQ frente a cepas ATCC

Para determinar a [CIM](#) dos 5 novos análogos de 8HQ (PH158, PH159, PH176, PH177 e PH178) frente a cepas ATCC, foi utilizada a técnica de [microdiluição seriada em caldo](#). Para comparação de resultados, testes com 8HQ e Nitroxolina também foram realizados.

Para a triagem da atividade dos derivados de 8HQ foi testada a concentração máxima de 64 µg/mL, pois o objetivo do nosso grupo é desenvolver um composto que possa ser utilizado em antibioticoterapias orais. Foram selecionadas cepas ATCC de bactérias gram positivas e gram negativas de interesse clínico (*Escherichia coli* 35218, *Klebsiella pneumoniae* 700605, *Pseudomonas aeruginosa* 27833, *Staphylococcus aureus* 29213, *Staphylococcus epidermidis* 35984 e *Enterococcus faecalis* 29212).

A metodologia para a realização da microdiluição seriada em caldo foi adaptada do CLSI (NCCLS, 1999). Foram utilizadas microplacas estéreis de poliestireno de 96 poços e caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (MHCA). A solução de trabalho dos antibióticos e compostos a serem testados foi preparada, na concentração desejada, em água ultrapura. As diluições seriadas foram realizadas do poço 3 ao poço 11 da placa.

Foram selecionadas e diluídas em salina 3 a 5 colônias de cada ATCC após crescimento *overnight* em agar não-seletivo para preparo do inóculo. A partir de uma suspensão de $1,5 \times 10^8$ UFL/mL (equivalente a 0,5 na escala de McFarland) foi realizada uma diluição de 1% em MHCA e 50 µl desta solução foi adicionada em cada poço nas colunas de 3 a 11 (cerca de 7×10^5 UFL/mL por poço), totalizando o volume final de 100µl. Os controles de crescimento (100µl de inóculo na coluna 1), de esterilidade (100µl de MHCA na coluna 12) e de qualidade (*S. aureus* ATCC 29213 com Oxacilina), foram realizados em todas as cepas testadas e em todos os experimentos.

As placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas 18-20 horas à 35° em estufa bacteriológica. O resultado das CIM foi considerado na concentração de antibiótico que inibiu o crescimento bacteriano visível. Para análise do controle de qualidade, foram seguidos os critérios de interpretação do CLSI (CLSI, 2016). Em caso de falhas nos controles o teste foi repetido. Todos os testes foram realizados em duplicata.

4.2.2. Análise da concentração inibitória mínima do PH176, Nitroxolina e Oxacilina frente à coleção de isolados clínicos de *S. aureus*

Para determinar a CIM da PH176, Nitroxolina e Oxacilina frente à uma coleção de 38 isolados clínicos de *S. aureus*, a mesma metodologia de microdiluição seriada em caldo foi realizada. Os isolados com diferentes perfis de suscetibilidade são provenientes do banco de amostras do Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

A faixa de concentração dos antibióticos e compostos avaliada inicialmente foi de 0,125-64 µg/mL. Para os isolados que apresentaram crescimento em 64 µg/mL, a faixa de concentração foi ampliada até o valor de CIM ser definido.

4.2.3. Análise da atividade antibacteriana e sinérgica entre PH176, Nitroxolina e Oxacilina frente a isolados MRSA através da técnica de Time-Kill (TK)

Foi utilizada a técnica adaptada de TK para a determinação das atividades antibacterianas ao longo do tempo e interações sinérgicas *in vitro* do PH176, Nitroxolina, Oxacilina e combinações entre eles conforme metodologia adaptada do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1999). Foram selecionados 5 isolados MRSA (448, 453, 454, 459 e 487) do banco de isolados clínicos e a cepa *S. aureus* ATCC 29213 que é sensível a oxacilina, para realização dos testes.

Foram utilizados tubos de vidro estéreis com MHCA e concentrações variadas dos compostos e antibióticos a serem testados, totalizando um volume de 1,980 ml em cada tubo. Foram selecionadas 3 a 5 colônias de *S. aureus*, após crescimento *overnight* em agar não-seletivo, para diluição em um tubo com MHCA até uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (0,5 na escala de McFarland). Para a obtenção do inóculo em crescimento logarítmico, este tubo foi incubado em incubadora shaker à 35° por cerca de 6 horas até obtenção de turbidez equivalente a 1,0 na escala de McFarland (3×10^8 UFC/mL). Após a obtenção da turbidez desejada, foi realizada uma diluição de 1/5 em MHCA (6×10^7 UFC/mL) e imediatamente após a homogeneização, foi adicionado 20 µL deste inóculo bacteriano em cada tubo com as diluições de antibióticos e nos tubos de controle

de crescimento, totalizando o volume final de 2 mL (cerca de 6×10^5 UFC/mL). Controles de esterilidade (sem inóculo) e de crescimento (sem antibióticos) foram realizados em todos os experimentos e todos os testes foram realizados em duplicata.

As concentrações do PH176 e Nitroxolina testadas foram $\frac{1}{2}$ CIM, 1xCIM e 2xCIM. As da Oxacilina foram 1xCIM de cada isolado e o valor de breakpoint clínico (2 μ g/mL) conforme o CLSI (CLSI, 2016). Além disso, foram testadas as seguintes combinações entre esses agentes: oxacilina BP (2 μ g/mL) e CIM de oxacilina com $\frac{1}{2}$ CIM, 1xCIM, 2xCIM do PH176 e 1xCIM Nitroxolina, além da combinação 1xCIM PH176 com 1xCIM da Nitroxolina. Os tubos foram incubados incubadora shaker à 35° e alíquotas de 50 μ l foram retiradas nas horas 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24. As alíquotas foram diluídas e semeadas em [agar](#) Sal Manitol para posterior contagem de UFC. Após incubação das placas a 37°C *overnight*, foi realizada a contagem de colônias (diluição ideal entre 20 e 200 UFC) e os resultados foram expressos em log de UFC/mL.

A atividade bactericida de cada composto isoladamente foi definida pela redução $\geq 3 \log_{10}$, na contagem de colônias após 24 horas, em relação ao inóculo inicial (hora zero) e a bacteriostática pela redução $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL após 24 horas (MOODY, 1992; NCCLS, 1999). O efeito sinérgico foi definido quando houve uma redução na contagem de colônias $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL após 24 horas em comparação ao resultado obtido com o antibiótico mais ativo que foi testado isoladamente. O antagonismo é definido pelo aumento na contagem de colônias $> 2 \log_{10}$, após 24 horas em comparação ao resultado obtido com o antibiótico menos ativo que foi testado isoladamente.

4.3. Testes de Toxicidade

4.3.1. HET-CAM (Hen's egg test on the chorioallantoic membrane) do PH176 e Nitroxolina

Os testes de HET-CAM foram realizados no Laboratório de Bioquímica do Curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal Catarinense - Campus Concórdia. Ovos brancos férteis frescos (Lohmann) foram mantidos em condições otimizadas de incubação (entre 38 e 39 ° C e umidade entre 55 e 60% por 10 dias) (JACOBSEN et al., 2010). No décimo dia, a casca do ovo, ao redor do espaço aéreo, foi removida com uma ferramenta rotativa. Foi adicionado 0,3 ml de cada composto em cada ovo nas concentrações de 64 μ g/mL e 128 μ g/mL para PH176

e 32 µg/mL e 64 µg/mL para Nitroxolina, além dos controles negativo (NaCl 0,9%) e positivo (NaOH 0.1 M). A observação do efeito foi em 30 segundos, 2 minutos e 5 minutos após a aplicação de cada substância. O resultado do escore de irritação (IS) foi calculado e avaliado em uma escala onde valores de 0 a 4,9 são considerados não irritantes e de 5,0 a 21 são considerados de irritação moderada, severa ou extrema (ICCVAM, 2010). Os testes foram realizados em parceria com o Laboratório de Toxicologia no Instituto Federal Catarinense/ Campus Concórdia.

4.3.2. Determinação da permeação e avaliação histopatológica do PH176

Os testes de Permeação e Avaliação Histopatológica foram realizados no Laboratório de Bioquímica do Curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal Catarinense - Campus Concórdia. Amostras de tecido de suínos machos adultos, recém-abatidos foram utilizadas para avaliar a formação de dano tecidual devido à ação do PH176 e Nitroxolina. Os suínos foram abatidos de acordo com as regras do Ministério da Agricultura do Brasil, respeitando o bem-estar animal ([Brasil, Portaria 47/2013, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento](#)). A pele da orelha foi utilizada neste estudo. Os tecidos foram removidos em um período de 5 minutos após o abate e transportados para o laboratório em tampão Krebs-Hepes gelado. As amostras de pele foram montadas em células de difusão de Franz com área de difusão de aproximadamente 1,75 cm². O lado epidérmico da pele foi exposto a PBS pH 7,0 (controle negativo), solução de NaOH 0.1 M (controle positivo), PH176 dissolvido em PBS pH 7,0 em concentração de 128 µg/mL e Nitroxolina dissolvida em PBS pH 7,0 em concentração de 64 µg/mL durante um período de 6 horas. Fragmentos foram colhidos, fixados em formalina tamponada neutra a 10%, corados com hematoxilina e eosina (HE), e examinados sob microscopia. Os experimentos foram realizados em triplicata (ICCVAM, 2010). Os testes foram realizados em parceria com o Laboratório de Toxicologia no Instituto Federal Catarinense/ Campus Concórdia.

4.3.3. Avaliação da viabilidade celular (leucócitos humanos)

Os testes de citotoxicidade foram realizados pelo Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Sangue venoso de doador maior de 18 anos foi centrifugado e os leucócitos separados por

gradiente de centrifugação. Imediatamente foram transferidos para 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 com tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 e o controle positivo com Bleomicina 3 μ M, que é sabidamente tóxico para as células, para todos os testes.

Os frascos de cultura celular foram divididos em 3 grupos sendo cada grupo realizado em triplicata. Para controle negativo foram feitos 3 frascos de cultura celular (9.0 mL) com 1.0 mL de PBS, para controle positivo, 3 frascos de cultura celular (9.0 mL) com 1.0 mL de solução de bleomicina 3 μ M e 3 frascos de cultura celular (9.0 mL) com 1.0 mL do PH176 ou 1.0 mL da Nitroxolina em cada concentração a ser testada (concentrações 8, 16, 32 e 64 μ g/mL). Os frascos de cultura celular foram então incubados a 37°C por 72 horas. Após esse período, 100 μ L de cada suspensão celular foi homogeneizada com 100 μ L de azul de tripan 0.2% (Sigma-Aldrich®) em microtubos. Uma alíquota de 10 μ L desta solução foi retirada e procedeu-se a contagem celular em câmara de Neubauer. Foram analisadas duas formas de leucócitos, células incolores que são as viáveis (vivas e integras) e células coradas de azul (leucócitos não-viáveis). O resultado foi expresso em porcentagem de células viáveis e comparado com o controle positivo (bleomicina 3 μ M) e negativo (PBS). O ensaio foi realizado em triplicata (BUROW et al., 1998). Para análise estatística foram utilizados os testes ANOVA e Turkey's.

5. RESULTADOS

5.1. Atividade Antibacteriana dos Análogos de 8HQ, Nitroxolina e Oxacilina

5.1.1. Triagem da nova série de análogos de 8HQ frente a cepas ATCC

Os novos análogos não demonstraram atividade contra as cepas gram negativas, sendo a Nitroxolina o único composto testado que apresentou atividade, com CIM de 32 μ g/mL contra *P. aeruginosa* 27833 e *K. pneumoniae* 700605 e CIM de 2 μ g/mL contra *E. coli* 35218. Quanto aos gram positivos, uma boa atividade foi observada contra o *S. aureus* 29213, onde a CIM foi de 8 μ g/mL para o PH176. O composto PH176 (5-Cloro-7-(4-metoxifenilamino)-8-metoxiquinolina), possui massa molar de 314,77 e LogP previsto de 3,89 e por apresentar atividade contra *S. aureus* (Tabela 1), foi então selecionado para demais experimentos.

Tabela 1 –Atividade antibacteriana da série de análogos de 8HQ, Nitroxolina e 8HQ frente a cepas ATCC gram positivas e gram negativas.

Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) em cepas ATCC					
Análogos de 8HQ*	<i>S. aureus</i> 29213	<i>E. faecalis</i> 29212	<i>E. coli</i> 35218	<i>P. aeruginosa</i> 27833	<i>K. pneumoniae</i> 700605
PH158	>64	>64	>64	>64	>64
PH159	>64	>64	>64	>64	>64
PH176	8	>64	>64	>64	>64
PH177	>64	>64	>64	>64	>64
PH178	>64	>64	>64	>64	>64
8HQ	0,5	2	>64	>64	>64
Nitroxolina	2	8	2	32	32

*Concentração máxima testada de 64 $\mu\text{g/mL}$.

5.1.2. Análise da concentração inibitória mínima do PH176, Nitroxolina e Oxacilina frente à coleção de isolados clínicos de *S. aureus*

Foram selecionados 38 isolados clínicos, de pacientes internados, para o estudo. Os *S. aureus* eram provenientes de diversos sítios de infecção e com diferentes perfis de susceptibilidade à antibióticos (Figura 3).

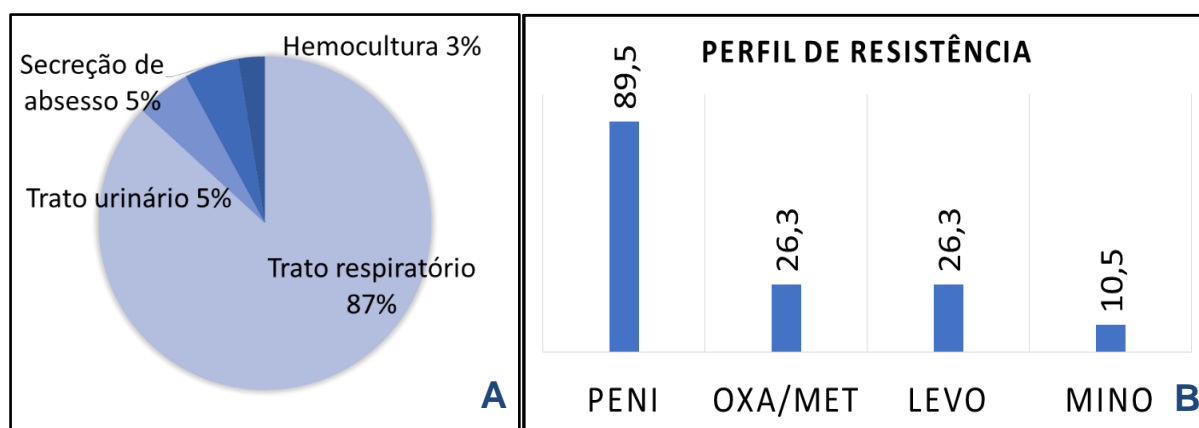


Figura 3- Sítios de coleta dos isolados de *S. aureus* [A]; Prevalência de isolados resistentes à penicilina (PENI), oxacilina e meticilina (OXA/MET), levofloxacina (LEVO) e minociclina (MINO) [B].

As CIM₅₀ e CIM₉₀ do PH176 foram de 16 e 32 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, da Nitroxolina 4 e 8 $\mu\text{g/mL}$ e da Oxacilina 1 e 16 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados das CIM₅₀ e CIM₉₀ dos antibióticos avaliados, da Nitroxolina e PH176 estão representados na tabela 2. Os dados das CIMs com amoxicilina/clavulanato, levofloxacina, linezolida, minociclina,

vancomicina, ampicilina, penicilina e tigeciclina foram cedidos pelo LABRESIS.

Tabela 2 - CIM₅₀ e CIM₉₀ dos antibióticos avaliados, Nitroxolina e PH176 frente à 38 isolados clínicos de S. aureus.

Antibióticos e novos compostos	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)
Amoxicilina/clavulanato	1	8
Levofloxacina	0,25	4
Linezolida	2	4
Minociclina	0,25	0,25
Vancomicina	0,5	1
Ampicilina	4	16
Penicilina	>8	>8
Tigeciclina	0,12	0,25
Oxacilina	1	16
Nitroxolina	4	8
PH176	16	32

5.1.3. Análise da atividade antibacteriana e sinérgica entre PH176, Nitroxolina e Oxacilina frente a isolados MRSA através da técnica de Time-Kill (TK)

Para os ensaios de TK foram selecionados 5 isolados clínicos MRSA com diferentes perfis de suscetibilidade aos demais antimicrobianos e a cepa de *S. aureus* ATCC 29213. As CIM para Oxacilina dos MRSA selecionados variam de 16 µg/mL a 512 µg/mL e estão representadas na tabela 3.

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima do PH176, Nitroxolina e Oxacilina e perfil de suscetibilidade dos isolados selecionados para o ensaio de TK.

Antibióticos e novos compostos	Perfil de susceptibilidade dos isolados (µg/mL)					
	MRSA 448	MRSA 453	MRSA 454	MRSA 459	MRSA 487	ATCC 29213

PH176	16	32	32	16	16	8
Nitroxolina	4	4	8	8	8	2
Oxacilina	16	64	128	512	16	0,25
Amox/clavulanato	2	8	>8	>8	>8	
Levofloxacina	2	4	>32	4	4	
Linezolida	4	2	1	2	2	
Minociclina	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	2	
Vancomicina	1	0,5	0,5	1	1	*
Ampicilina	16	>16	>16	16	>16	
Penicilina	>8	8	>8	>8	>8	
Tigeciclina	0,12	0,06	0,12	0,12	0,12	

* Não testado

No ensaio de TK foi observado efeito bactericida com o PH176 para o isolado 454 na concentração de 2xCIM, o efeito bacteriostático ocorreu com este mesmo isolado em 1xCIM. A ação do PH176 também foi bacteriostática no isolado 453 na concentração de 2xCIM além de reduzir a contagem de UFC em $-1,93 \log_{10}$ na concentração de $\frac{1}{2}$ xCIM e $-1,94 \log_{10}$ na concentração 1xCIM, praticamente atingindo o mesmo efeito. Além disso, para 4 isolados (453, 454, 459 e 487) o PH176 utilizado sozinho (1xCIM e 2xCIM) resultou em redução na contagem de colônias em 24 horas sem recrescimento. (Figura 4).

A Nitroxolina reduziu a contagem de colônias nas concentrações de 1xCIM e 2xCIM mas não apresentou efeito bactericida ou bacteriostático (Figura 5). A Oxacilina, teve resultados ruins quando testada isoladamente, tanto nas concentrações de 1xCIM (Figura 6) quanto na concentração de ponto de corte, sendo bactericida somente contra a cepa ATCC (Tabela 4).

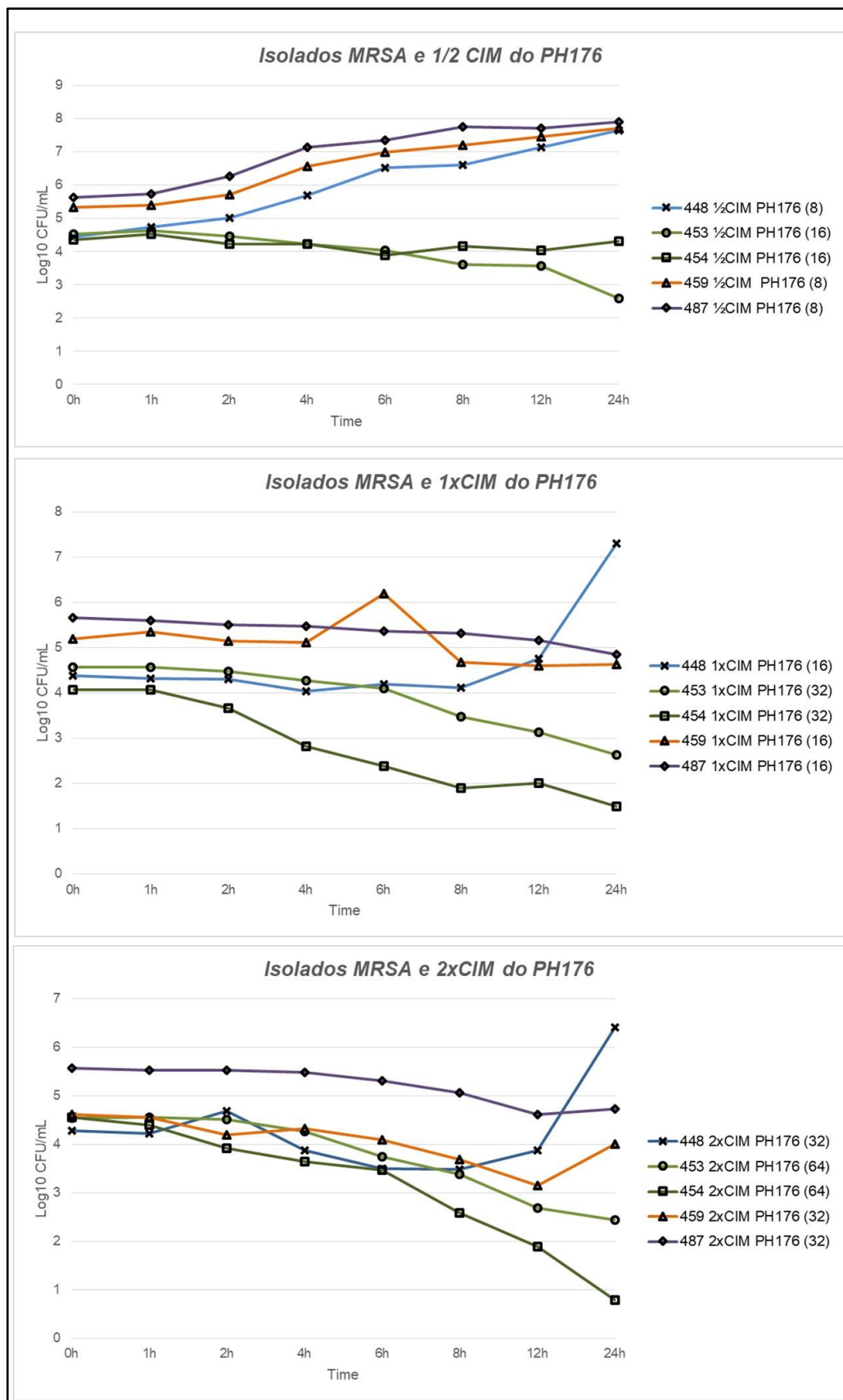


Figura 4 – Time-kill de PH176 com os isolados MRSA. Concentração testada em $\mu\text{g/mL}$ entre parênteses.

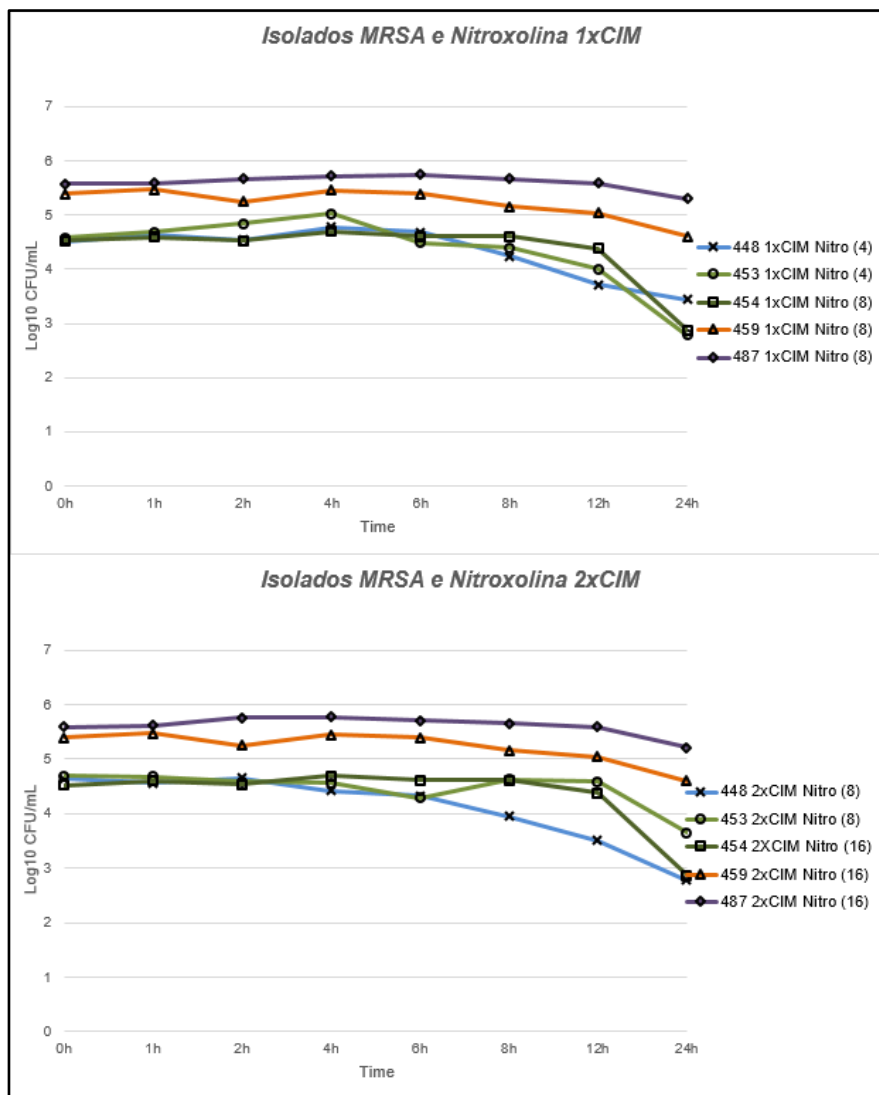


Figura 5 - Time-Kill para Nitroxolina com os isolados MRSA. Concentração testada em $\mu\text{g}/\text{mL}$ entre parênteses.

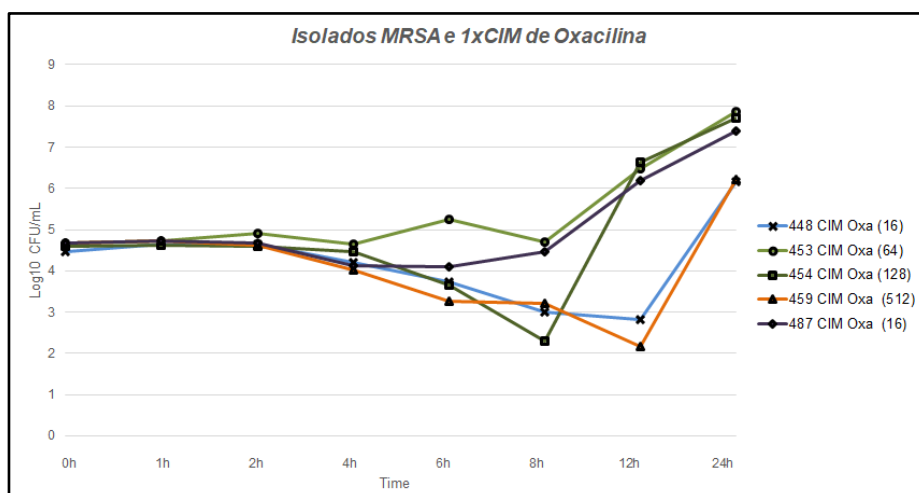


Figura 6 - Time-Kill para Oxacilina com os isolados MRSA. Concentração testada em $\mu\text{g}/\text{mL}$ entre parênteses.

Tabela 4- Atividade do PH176, Nitroxolina e Oxacilina em diferentes concentrações frente a cinco isolados MRSA e *S. aureus* ATCC 29213 no ensaio de TK.

Isolados (Concentração inibitória mínima em $\mu\text{g/mL}$)	CC ^c	$\Delta\text{Log UFC}^a$ com compostos ^b							
		PH176 $\frac{1}{2}$ CIM	PH176 1x CIM	PH176 2x CIM	Nitro $\frac{1}{2}$ CIM	Nitro 1x CIM	Nitro 2x CIM	Oxa CIM	Oxa BP ^d
MRSA 448 Oxa (16) PH176 (16) Nitro (4)	3,42	3,21	2,91	2,13	2,05	-1,07	-1,86	2,78	1,68
MRSA 453 Oxa (64) PH176 (32) Nitro (4)	3,66	-1,93	-1,94	-2,11	2,54	-1,8	-1,04	3,36	3,19
MRSA 454 Oxa (128) PH176 (32) Nitro (8)	3,15	-0,06	-2,57	-3,77	-1,99	-1,65	-1,3	3,13	2,74
MRSA 459 Oxa (512) PH176 (16) Nitro (8)	2,83	2,37	-0,56	-0,6	2,09	-0,79	-0,99	1,53	2,67
MRSA 487 Oxa (16) PH176 (16) Nitro (8)	2,78	2,27	-0,81	-0,83	2,49	-0,27	-0,37	2,71	2,14
ATCC Oxa (0,25) PH176 (8) Nitro (2)	3,00	2,99	2,59	-1,93	2,83	-1,7	-2,82	-3,16	*

a Contagem de UFC na hora 24 menos a contagem de colônias na hora inicial (\log_{10} UFC/mL). Atividades bactericida (redução $\geq 3 \log_{10}$) e bacteriostáticas (redução $\geq 2 \log_{10}$) destacadas em negrito

b PH176, Nitroxolina (Nitro) e Oxacilina (Oxa)

c Controle de crescimento sem antimicrobianos

e Breakpoint da Oxacilina = 2 $\mu\text{g/mL}$

* Não se aplica

Nas combinações de antibióticos testadas, diferentes resultados foram obtidos. A combinação PH176 com Oxacilina apresentou sinergismo para 3 isolados, sendo que para o isolado 448 esse efeito foi observado em todas as concentrações testadas exceto quando foi utilizado $\frac{1}{2}$ CIM PH176 e Oxacilina *breakpoint* (Figura 7).

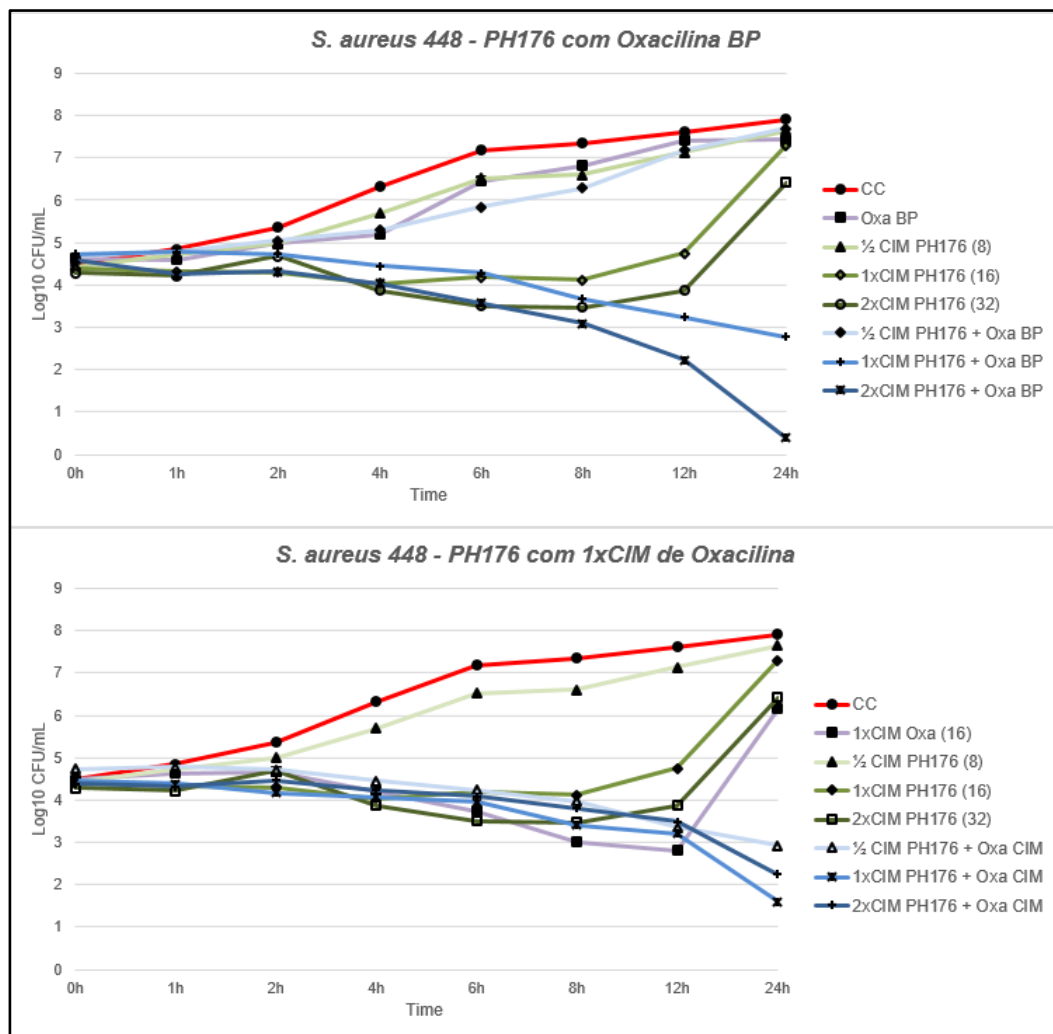


Figura 7 - Sinergismo entre PH176 e Oxacilina nos testes de Time-Kill com o MRSA 448. Concentração testada em $\mu\text{g/mL}$ entre parênteses. CC= controle de crescimento. Oxacilina BP = ponto de corte de Oxacilina $2\mu\text{g/mL}$.

Quando avaliamos a concentração ½CIM PH176 com Oxacilina 1xCIM, observou-se sinergia nos isolados 459 (Figura 8) e 487 (Figura 9) além do isolado 448. Na concentração 1xCIM PH176 com Oxacilina 1xCIM, observamos atividade sinérgica para o isolado 487 (Figura 9).

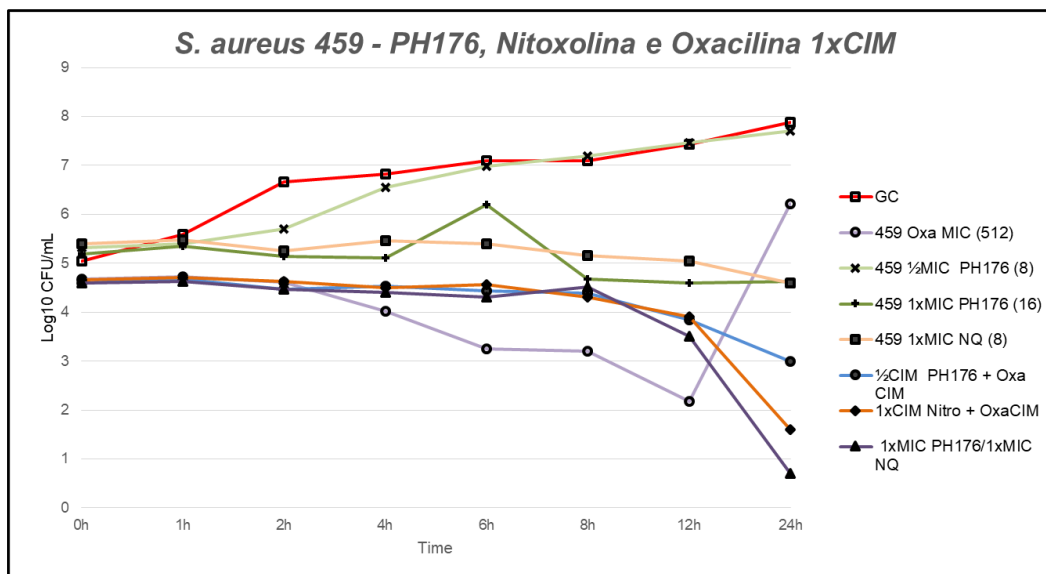


Figura 8 - Sinergismo entre PH176, Nitroxolina e Oxacilina nos testes de Time-Kill com o MRSA 459. Concentração testada em $\mu\text{g/mL}$ entre parênteses. CC= controle de crescimento.

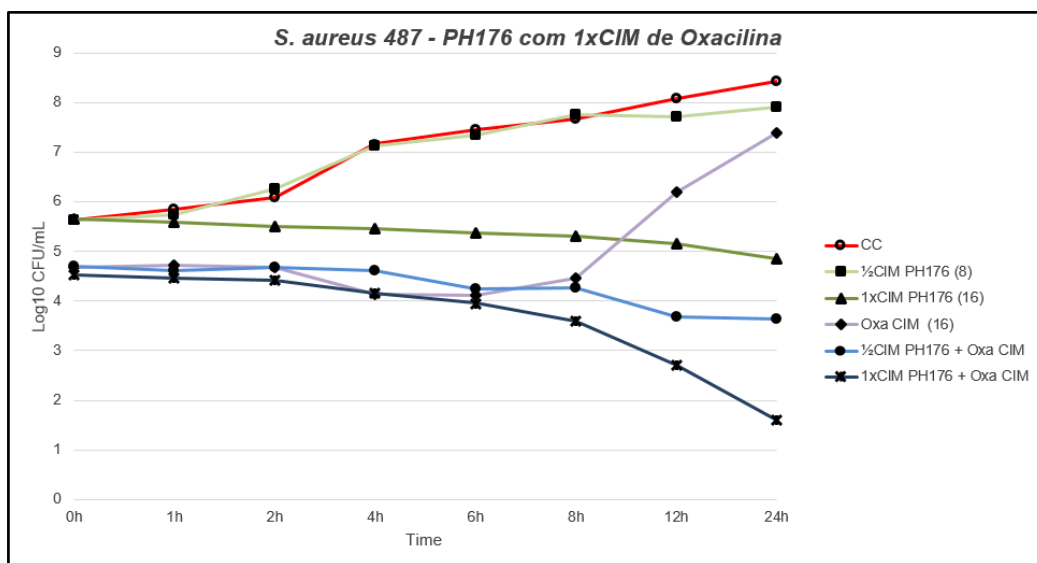


Figura 9 - Sinergismo entre PH176 e Oxacilina nos testes de Time-Kill com o MRSA 487. Concentração testada em $\mu\text{g/mL}$ entre parênteses. CC= controle de crescimento.

A combinação entre Nitroxolina e Oxacilina apresentou sinergismo com 1xCIM de Oxacilina nos isolados 448 e 459. Os testes com o isolado 453 não demonstraram a redução de UFC/mL necessária para caracterizar sinergismo em nenhuma combinação. A combinação entre 1xCIM do PH176 + 1xCIM da Nitroxolina também foi testada e o sinergismo foi observado no isolado 459 (Figura 7). O efeito antagônico não foi observado em nenhuma combinação testada (Tabela 5).

Tabela 5 - Atividade do PH176, Nitroxolina e Oxacilina em diferentes concentrações e combinações frente a cinco isolados MRSA e no ensaio de TK.

Isolados (Concentração inibitória mínima em $\mu\text{g/mL}$)	ΔLog^a UFC/mL								
	$\frac{1}{2}$ CIM PH176 + Oxa BP	$\frac{1}{2}$ CIM PH176 + Oxa 1xCIM	1x CIM PH176 + Oxa BP	1x CIM PH176 +Oxa 1xCIM	2x CIM PH176 + Oxa BP	2x CIM PH176 +Oxa 1xCIM	1x CIM Nitro + Oxa BP	1x CIM Nitro + Oxa 1xCIM	1x CIM PH176 +1xCIM Nitro
MRSA 448 Oxa (16) PH176 (16) Nitro (4)	-0,42	-3,48	-4,74	-4,54	-6,34	-3,82	-0,80	-2,77	-0,89
MRSA 453 Oxa (64) PH176 (32) Nitro (4)	0,13	0,91	0,04	0,68	-0,20	0,37	-0,78	-1,49	0,80
MRSA 454 Oxa (128) PH176 (32) Nitro (8)	-1,02	-1,99	-0,10	-1,91	0,93	1,62	0,42	0,77	1,86
MRSA 459 Oxa (512) PH176 (16) Nitro (8)	-0,04	-3,13	-0,45	-0,65	-1,34	-1,1	-0,73	-2,26	-3,10
MRSA 487 Oxa (16) PH176 (16) Nitro (8)	-0,04	-3,33	-0,92	-2,11	-1,05	-1,86	-0,57	-0,32	-1,11

^a ΔLog (\log_{10} UFC/mL) avaliado em 24h, da combinação de antibióticos em relação ao antibiótico mais ativo testado isoladamente. Efeito sinérgico (em negrito) caracterizado por redução $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL após 24 horas em comparação ao resultado obtido com o antibiótico mais ativo que foi testado isoladamente.

5.2. Testes de Toxicidade

5.2.1. HET-CAM (Hen's egg test on the chorioallantoic membrane) do PH176 e Nitroxolina

Em uma escala entre 0-4,9 (não irritante ou praticamente sem irritação) e 5,0-21 (irritação moderada ou severa/extrema irritação), o resultado do escore de irritação (IS) do PH176 nas concentrações de 64 e 128 $\mu\text{g/mL}$ foi de 2,94 e 3,49 respectivamente. Para a Nitroxolina, nas concentrações de 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$, o IS foi de 2,43 e 2,82 respectivamente. Desta forma ambos os compostos foram classificados como não irritantes. O IS do controle positivo (NaOH 0,1 M) ficou acima de 19 enquanto que o controle negativo abaixo de 1 (Figura 10).

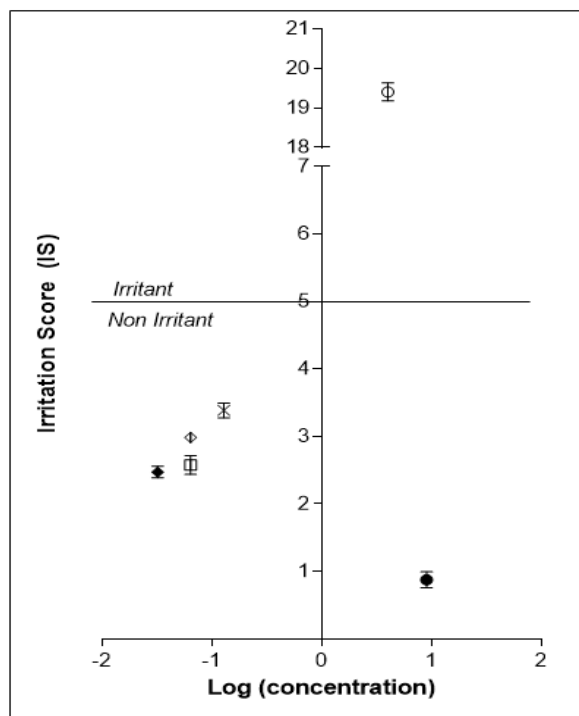


Figura 10 – Teste de HET-CAM. Relação dose-resposta para PH176 e Nitroxolina. NaOH 0,1 M (o), NaCl a 0,9% (●), PH 176 128 µg/mL (x), PH176 64 µg/mL (□), Nitroxolina 64 µg/mL (◇) e Nitroxolina 32 µg/mL (◆). Cada ponto representa um experimento ($n = \text{três ovos}$). Concentrações foram convertidas logaritmicamente.

5.2.2. Determinação da permeação e avaliação histopatológica do PH176

Na análise histopatológica das células epidérmicas de tecido epitelial de suínos expostas por 6 horas ao PH176 na concentração de 128 µg/mL e à Nitroxolina na concentração de 64 µg/mL, não houve caracterização de dermatotoxicidade, equivalente ao controle negativo (Figura 11).

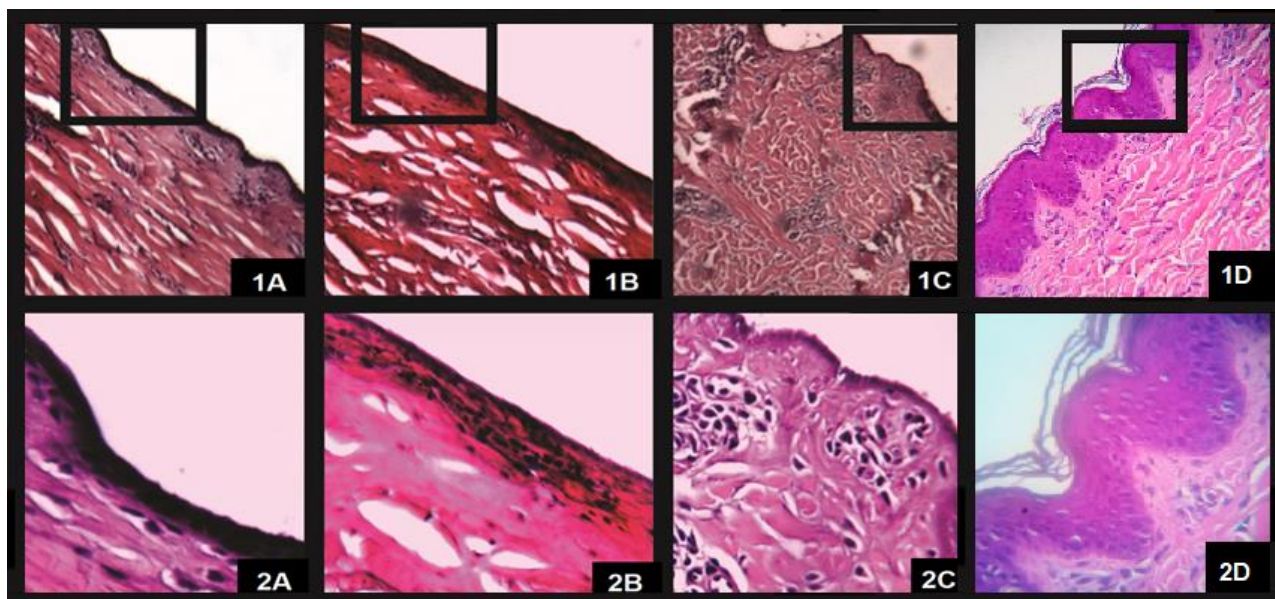


Figura 11- Avaliação histopatológica de células suínas tratadas com PH176, Nitroxolina, controle negativo (PBS) e controle positivo (NaOH 0,1 M) em ampliação de 100 e 400x. A: PBS pH 7,0 (1A = 100x e 2A = 400X); B: PH176 128 µg/mL (1B =100x e 2B =400x). C: Nitroxolina 64 µg/mL (1C =100x e 2C =400x). D: NaOH 0,1 M (1D =100x e 2D =400x) evidenciando dermatotoxicidade.

5.2.3. Avaliação da viabilidade celular (leucócitos humanos)

Após a análise estatística (testes ANOVA e Turkey's), os resultados demonstraram diferença estatística significativa na viabilidade celular do PH176 e da Nitroxolina em relação ao controle positivo (bleomicina 3µM) e entre os controles positivo e negativo (PBS) (ANOVA $p < 0,05$). A viabilidade celular encontrada no teste com o PH176 foi de 97%, 96%, 94% e 73% nas concentrações de 8, 16, 32 e 64µg/mL, o controle negativo e o controle positivo apresentaram 96% e 9% de células viáveis respectivamente. No teste com a Nitroxolina a viabilidade foi de 97%, 88%, 89% e 87% nas concentrações de 8, 16, 32 e 64µg/mL, o controle negativo e o positivo apresentaram 96% e 12% de células viáveis respectivamente.

Houve diferença significativa nos resultados do PH176 somente na concentração de 64 µg/mL (73% de células viáveis) quando comparada ao controle negativo, entretanto, esse valor se manteve estatisticamente diferente do controle positivo (9% de células viáveis). Esses dados evidenciam que tanto o PH176 quanto a Nitroxolina podem ser considerados não citotóxicos em teste com leucócitos humanos, nas concentrações testadas (Figura 12).

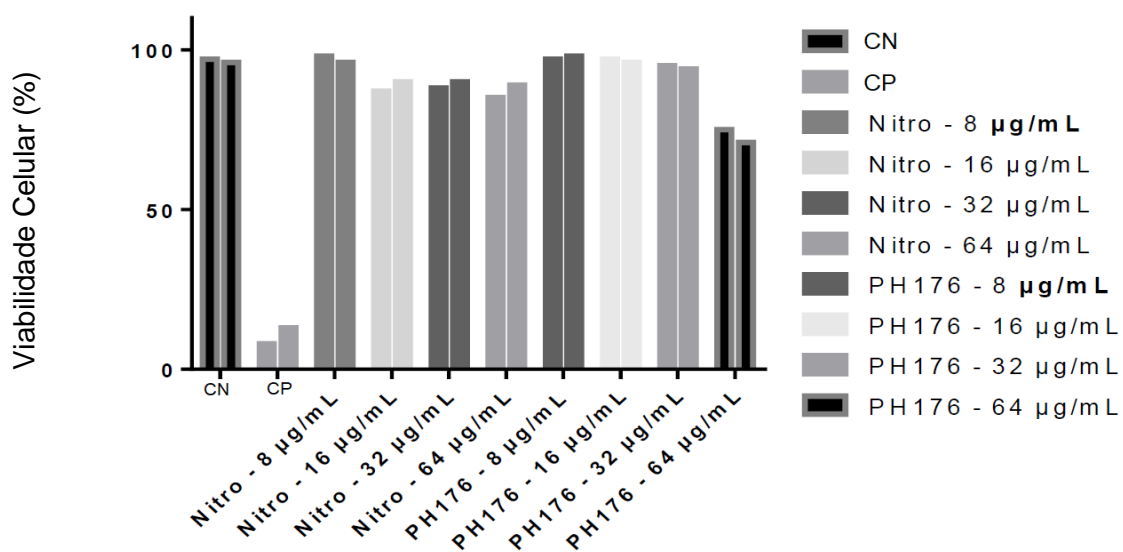


Figura 12 - Porcentagem de células viáveis após tratamento com PH176 (8, 16, 32 e 64 µg/mL), Nitroxolina (8, 16, 32 e 64 µg/mL), Controle Negativo (CN = PBS) e Controle Positivo (CP = bleomicina 3µM).

6. DISCUSSÃO

É urgente a pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos para combater isolados cada vez mais resistentes e difíceis de tratar tais como MRSA, VISA e VRSA (BOUCHER et al., 2009; CHERDTRAKULKIAT et al., 2016; WHO, 2017). A 8HQ e seus derivados apresentam bioatividade potente e variadas e são bons candidatos para o desenvolvimento de novos compostos com ação antimicrobiana contra microrganismos resistentes (CHERDTRAKULKIAT et al., 2016). A Nitroxolina e o Clioquinol são exemplos importantes de antimicrobianos derivados da 8HQ. Suas estruturas moleculares podem ser utilizadas para o planejamento e realização de modificações estruturais, buscando melhorar sua atividade e reduzir efeitos colaterais dos compostos (CHERDTRAKULKIAT et al., 2016; LAWUNG et al., 2018).

Poucos estudos publicaram dados testando a atividade antimicrobiana de derivados metilados da 8HQ (BEUGELMANS et al., 1998; JEON; LEE; LEE, 2009). Jeon e colaboradores testaram a atividade da 2-metil-8HQ contra cepas ATCC de *E.coli*, *C. perfringens* e *C. difficile* e representantes da microbiota intestinal humana normal como *Bifidoacterium* sp. e *Lactobacillus* sp. Eles detectaram, através do teste de disco-difusão, alta capacidade de inibição do crescimento das cepas de *Clostridium* sp. e *E.coli*, enquanto que as bactérias comensais intestinais sofreram pouca ou nenhuma inibição. Estes dados indicam que essa otimização das 8HQ pode levar ao desenvolvimento de um antibiótico seletivo para o tratamento de infecções intestinais, evitando efeitos indesejados na microbiota comensal (JEON; LEE; LEE, 2009). Nos resultados do nosso estudo, o PH176 demonstrou alta seletividade por *S. aureus* e ainda, para esse 3 isolados, as combinações de PH176 com OXA e NITRO foram mais ativas em diferentes concentrações quando comparadas com o PH176 isolado. Diferente dos outros 2 isolados, onde o oposto foi observado.

Em nosso estudo, a triagem dos 5 análogos metilados de 8HQ frente às cepas ATCC diversas, demonstrou a presença de atividade do PH176 contra *S. aureus* sensíveis e resistentes à meticilina. Não foi observada atividade antimicrobiana dos compostos testados em cepas gram negativas (Tabela 1). Em 2012, Pavlov e colaboradores encontraram atividade antibacteriana, através da determinação da CIM de 24 análogos de 8HQ, principalmente frente a isolados

gram positivos, como *S. aureus* (PAVLOV; TAKUCHEV; GEORGIEVA, 2012). Cherdtrakulkiat e colaboradores também encontraram maior atividade de derivados de 8HQ em relação aos gram positivos quando testaram análogos comercialmente disponíveis contra 27 cepas ATCC (CHERDTRAKULKIAT et al., 2016). Nossos resultados sugerem que os derivados metilados tentem a ter uma atividade seletiva para *S. aureus*, enquanto a presença da hidroxila da Nitroxolina poderia levar a um antibiótico de espectro amplo. A relação entre a estrutura química e a atividade biológica de um fármaco ou composto é fundamental. Podemos presumir empiricamente, através da análise de vários parâmetros, que compostos com semelhanças em sua estrutura química terão atividades semelhantes nos mesmos sítios de interação (PAVLOV; TAKUCHEV; GEORGIEVA, 2012). Ainda, a síntese racional de novos antimicrobianos depende do conhecimento e predição da influência que alterações químicas estruturais terão sobre a bioatividade do composto através das investigações da relação estrutura/atividade (PAVLOV; TAKUCHEV; GEORGIEVA, 2012).

A distribuição da CIM do PH176 e Nitroxolina, com os isolados clínicos de *S. aureus* em nosso estudo, ficou entre 16 -32 µg/mL e entre 2-8 µg/mL respectivamente (Tabela 3). Em relação à CIM da Oxacilina, os valores variaram de 0,25 até 512 µg/mL. Os resultados do nosso estudo indicam que a atividade do PH176 não sofreu influência do mecanismo de resistência presente nos isolados MRSA. Da mesma forma, em um estudo publicado em 2018, a atividade antimicrobiana de derivados de 8HQ não teve alteração significativa quando testada contra isolados de *N. gonorrhoeae* resistentes a um ou dois antibióticos, multirresistentes ou isolados com alta resistência à tetraciclina (LAWUNG et al., 2018). O mesmo pode ser observado em diferentes estudos que demonstraram uma elevada atividade da 8HQ contra isolados de *S. aureus* MRSA e VISA que sugerem que a 8HQ e seus derivados não sofreram influência de mecanismos de resistência que poderiam estar presentes (PRACHAYASITTIKUL et al., 2014; SHORT et al., 2006).

Quanto ao mecanismo de ação dos derivados de 8HQ, em análise de microscopia eletrônica, células bacterianas de MSSA e VISA tratadas com 8HQ apresentaram parede celular difusa com aparente espalhamento dos seus componentes, além da presença de células lisadas e células fantasmas, o autor sugere uma ação em parede celular que não sofre influência do fenótipo de

resistência VISA (SHORT et al., 2006).

Nosso grupo utilizou o ensaio de TK para analisar a dinâmica da ação do novo análogo de 8HQ metilado PH176, da Nitroxolina (análogo comercialmente disponível e bastante utilizado em infecções urinárias na Europa) e da Oxacilina (antibiótico de referência) contra isolados clínicos MRSA e uma cepa de *S. aureus* ATCC sensível (Tabela 4). Nos ensaios com a Oxacilina isoladamente, todos os isolados apresentaram recrescimento durante as 24 horas de experimento tanto nas concentrações de 1xCIM (Figura 6) quanto no ponto de corte. O efeito bactericida da oxacilina só foi observado na cepa ATCC 29213 (1xCIM 0,25 µg/mL; tabela 4), resultado esperado, considerando que os isolados clínicos testados eram MRSA. Short e colaboradores realizaram o ensaio de TK em cepas de MSSA, MRSA e VISA e a Oxacilina também não teve efeito bactericida mesmo em isolados sensíveis, corroborando os resultados do nosso estudo. Já a 8HQ na forma aquosa foi bactericida rapidamente (concentração dependente) contra os isolados sensíveis e resistentes de *S. aureus* (SHORT et al., 2006). O efeito redutor de contagem de colônias na maioria das concentrações de PH176, quando testado isoladamente, é um resultado bastante promissor encontrado em nosso estudo, considerando que os isolados testados têm CIM para oxacilina de até 512 µg/mL (Figura 4).

A combinação de PH176 com a Oxacilina na concentração de *breakpoint* (2 µg/mL) produziu efeito sinérgico para um isolado (448; tabela 5). Já quando foi testada a combinação usando a 1xCIM da oxacilina, o efeito foi observado em 3 isolados (448, 459 e 487; tabela 5). A decisão de utilizar o ponto de corte da Oxacilina, mesmo sabendo que os isolados testados apresentavam CIMs entre 16 e 512 µg/mL, foi baseada no fato de que essas concentrações de Oxacilina nunca seriam atingidas na antibioticoterapia e que, se o efeito sinérgico é observado com concentrações de ponto de corte, este dado torna-se muito mais promissor para utilização na prática terapêutica. De toda forma, o efeito sinérgico entre compostos é um dado importante quando altas concentrações de antibiótico são testadas, pois demonstra a interação das moléculas. Estes efeitos sinérgicos sugerem que o PH176 interage com a célula bacteriana de forma a permitir, ou até mesmo melhorar, a ação antimicrobiana da Oxacilina, mesmo em baixas concentrações e em isolados muito resistentes. É sabido que a combinação de antibióticos, para tratamento de infecções bacterianas, reduz efeitos colaterais, tempo de tratamento,

emergência de resistência e aumenta as probabilidades de um bom desfecho no tratamento das infecções por microrganismos multirresistentes (GUDIOL et al., 2017).

Além de ter apresentado resultados promissores no teste de TK, o PH176 e a Nitroxolina foram considerados não irritantes nos testes de HET-CAM realizados, mesmo em concentrações acima da CIM (128 µg/mL e 64 µg/mL respectivamente) de todos os isolados testados em nosso estudo (Figura 10). Em células epidérmicas de tecido epitelial de suínos, não foi observada dermatotoxicidade mesmo em altas concentrações (PH176 128 µg/mL e Nitroxolina 64 µg/mL) e 6 horas de exposição aos compostos (Figura 11). Estes resultados indicam baixa probabilidade de que a utilização do PH176 de forma tópica possa resultar em reações alergênicas ou tóxicas. O teste de viabilidade celular em leucócitos humanos demonstrou que a taxa de células viáveis nos testes com o maior valor de CIM do PH176 dos isolados clínicos (32 µg/mL = 94% das células viáveis) e da Nitroxolina (8 µg/mL = 97% das células viáveis) não difere ou difere muito pouco da taxa encontrada no controle negativo (97% das células viáveis). Houve diferença significativa na concentração de 64 µg/mL do PH176 (73% de células viáveis) quando comparada ao controle negativo, entretanto, esse valor se manteve estatisticamente diferente do controle positivo (11% de células viáveis) (Figura 12). A baixa citotoxicidade e dermatotoxicidade do PH176 nas concentrações de CIM dos isolados clínicos testados, incluindo os MRSA, é um resultado bastante promissor para o desenvolvimento de produtos com aplicação farmacológica tanto sistêmica como tópica.

A estratégia de redefinição de fármacos, que é a utilização de compostos conhecidos para outras indicações, que não a de origem, é uma das formas mais eficientes de desenvolver tratamentos para novas e antigas patologias. Dentre os benefícios dessa estratégia estão a economia de tempo e custos necessários para o desenvolvimento de fármacos (CHERDTRAKULKIAT et al., 2016; CORSELLO et al., 2017). Cerca de 85% dos compostos em desenvolvimento não são aprovados pelo FDA atualmente, apesar de boa parte deles demonstrar bioatividade segura para os pacientes. Então, modificações estruturais em compostos já aprovados representam uma boa estratégia no desenvolvimento de novos antibióticos (CORSELLO et al., 2017). Entre os anos de 1983 e 2007, houve uma preocupante redução de 73% de novos compostos antibióticos aprovados para uso sistêmico

pelo FDA, dado que demonstra a urgência de novas pesquisas nesse campo (BOUCHER et al., 2009). As 8HQs apresentam uma estrutura química privilegiada e apesar da utilização de seus derivados ter sido restrita ao tratamento antimicrobiano (tratamento e prevenção de amebíase intestinal), esses compostos já tem atividades relatadas contra tumores, doenças neurodegenerativas e como agentes antioxidantes (CHERDTRAKULKIAT et al., 2016; LAWUNG et al., 2018). Novas indicações para antigos medicamentos trazem benefícios para os pacientes, mesmo em casos em que o medicamento em questão traz efeitos colaterais graves. A Talidomida, que há décadas atrás entrou em desuso devido aos graves efeitos teratogênicos causados, vem sendo utilizada com sucesso no tratamento de pacientes com mieloma múltiplo (CORSELLO et al., 2017).

7. CONCLUSÃO

- A triagem dos 5 análogos de 8HQ demonstrou atividade de 1 análogo (PH176) em cepa ATCC de *S. aureus*.
- O análogo PH176 foi capaz de inibir o crescimento bacteriano de todos *S. aureus* da coleção de isolados clínicos em concentrações que variaram de 16 a 32 µg/mL.
- A atividade sinérgica observada com a Oxacilina, mesmo em concentrações sub-inibitórias, indica que este análogo tem potencial para atingir este efeito em terapias combinadas.
- Não houve recrescimento em 4 isolados, diferente da Oxacilina 1xCIM que apresentou recrescimento em todos os isolados MRSA.
- Concentrações de PH176 acima da CIM de todos os isolados testados em nosso estudo foram consideradas não irritantes nos testes de HET-CAM.
- Não foi observada dermatotoxicidade em células epidérmicas de tecido epitelial de suínos, mesmo em altas concentrações e 6 horas de exposição ao composto.
- Houve baixa citotoxicidade do PH176 nas concentrações de CIM dos isolados clínicos em leucócitos humanos.
- A combinação de resultados encontrados nos testes realizados com o novo análogo metilado de 8HQ (PH176) pode representar uma grande oportunidade de desenvolvimento de um novo antimicrobiano para o tratamento de infecções por *S. aureus* MRSA.

8. PERSPECTIVAS

O potencial anti-biofilme dos derivados de 8HQ pode ser avaliado e indica a necessidade de futuros testes complementares com essa série de análogos especificamente para pesquisa dessa atividade *in vitro*. Além disso, testes em modelos de infecção *in vivo* para determinação da farmacocinética e maiores avaliações de possíveis efeitos tóxicos (atividade hepática e renal). Por fim, novas modificações estruturais no PH176, podem levar a otimização deste já promissor derivado de 8HQ.

REFERÊNCIAS

- Aguayo A, Mella S, Riedel G, Bello H, Domínguez M, González-Rocha G. 2016. Colistín en la era post-antibiótica. *Revista chilena de infectología*. 33(2), 166-176.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000200006>
- ANVISA. 2016. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 16: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016. Disponível em
<https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/boletim-seguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude-n-16-avaliacao-dos-indicadores-nacionais-das-infecoes-relacionadas-a-assistencia-a-saude-iras-e-resistencia-microbiana-do-ano-de-2016> . Acessado em 12/12/2018.
- Arbiser JL, Kraeft SK, van Leeuwen R, et al. 1998. Clioquinol-zinc chelate: a candidate causative agent of subacute myelo-optic neuropathy. *Mol Med*. 4(10):665-670.
- Arias CA, Reyes J, Carvajal LP. 2017. Prospective Cohort Multicenter Study of Molecular Epidemiology and Phylogenomics of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Nine Latin American Countries. *Antimicrob Agents Chemother*. 22;61(10).
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00816-17>
- Ascioglu S, Samore MH, Lipsitch M. 2014. A new approach to the analysis of antibiotic resistance data from hospitals. *Microb Drug Resist*. 20(6): 583–590.
<http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2013.0173>
- Balasubramanian D, Harper L, Shopsin B, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments. 2017. *Pathog Dis*. 1;75(1).
<http://dx.doi.org/10.1093/femspd/ftx005>
- Beugelmans R, Choussy MB, Gayral P, Rigotherier MC. 1998. SRN1 synthesis and amebicide activity of new quinoline derivatives. *Eur. J. Med. Chem*. 23: 539-546.
[https://doi.org/10.1016/0223-5234\(88\)90097-9](https://doi.org/10.1016/0223-5234(88)90097-9)
- Blaser MJ. 2016. Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. *Science*. 352(6285):544-545.
<http://dx.doi.org/10.1126/science.aad9358>
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 1;48(1):1-12.
<http://dx.doi.org/10.1086/595011>
- 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 Res*. 58(21), 4940–4946.
- Bush K. A resurgence of β -lactamase inhibitor combinations effective against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. 2015. *Int J Antimicrob Agents*.46(5):483-93.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.08.011>
- Chastre J, Blasi F, Masterton RG, Rello J, Torres A, Welte T. 2014. European perspective and update on the management of nosocomial pneumonia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after more than 10 years of experience with linezolid. *Clin Microbiol Infect*. 20 (4): 19–36. <http://dx.doi.org/10.1111/1469->

[0691.12450](#)

- Chen LF, Anderson DJ, Paterson DL. 2012. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Infect Drug Resist.* 5:133-41. <http://dx.doi.org/10.2147/IDR.S26613>
- Cherdtrakulkiat R, Boonpangrak S, Sinthupoom N, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. 2016. Derivatives (halogen, nitro and amino) of 8-hydroxyquinoline with highly potent antimicrobial and antioxidant activities. *Biochemistry and Biophysics Reports.* 6:135–141. <http://dx.doi.org.10.1016/j.bbrep.2016.03.014>
- Choo EJ, Chambers HF. 2016. Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Infection & Chemotherapy.* 48(4), 267–273. <http://dx.doi.org/10.3947/ic.2016.48.4.267>
- Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS: Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline M26-A, Wayne, PA, USA, 1999
- Corsello SM, Bittker JA, Liu Z, Gould J, McCarren P, Hirschman JE, Johnston SE, Vrcic A, Wong B, Khan M, Asiedu J, Narayan R, Mader CC, Subramanian A, Golub TR. 2017. The Drug Repurposing Hub: a next-generation drug library and information resource. *Nat Med.* 7;23(4):405-408. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4306>
- Crosby HA, Kwiecinski J, Horswill AR. 2016. *Staphylococcus aureus* aggregation and coagulation mechanisms and their function in host-pathogen interactions. *Adv Appl Microbiol.* 96: 1–41. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.aambs.2016.07.018>
- De Araújo RSA, Barbosa-Filho JM, Scotti MT, Scotti L, da Cruz RMD, Falcão-Silva VS, Mendonça-Junior FJB. 2016. Modulation of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus* with Coumarin Derivatives. *Scientifica.* 6894758. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6894758>
- Deupree SM, Privett BJ, Backlund CJ, Rao KS, Johnson CB, Coneski PN, Schoenfisch MH. 2010. Synergy of nitric oxide and silver sulfadiazine against Gram-negative, -positive, and antibiotic-resistant pathogens. *Molecular Pharmaceutics.* 7(6), 2289–2296. <http://dx.doi.org/10.1021/mp100248e>
- FDA. 2018. BioMerieux Recalls VITEK 2 Gram Positive Antimicrobial Susceptibility Testing (AST) Cards Due to False Results for some strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Disponível em: <https://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/ListofRecalls/ucm618135.htm>. Acessado em 15/12/2018.
- Ferreira AM, Martins KB, Silva VR, Mondelli AL, Cunha MRS. 2017. Correlation of phenotypic tests with the presence of the *blaZ* gene for detection of beta-lactamase. *Brazilian Journal of Microbiology.* 48(1), 159–166. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.011>
- Foster TJ. 2017. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol Rev.* 1;41(3):430-449. <http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fux007>
- Gootz TD. 1990. Discovery and development of new antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews,* 3(1), 13–31.
- Gudiol C, Cuervo G, Shaw E, Pujol M, Carratalà J. 2017. Pharmacotherapeutic options

- for treating *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Expert Opin Pharmacother*. 18(18):1947-1963. <http://dx.doi.org/10.1080/14656566.2017>
- Hartwig, J. 2008. Carbon–heteroatom bond formation catalysed by organometallic complexes. *Nature* 455:314-322.
- Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM). The Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. Research Triangle Park: National Toxicology Program, 2010. Disponível em <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/protocols/ivocular-hetcam.pdf>. Acesso em 17/12/2018.
- Jacobsen I.D, Grosse K., Slesiona S., Hube B., Berndt A. and Brock M. (2010). Embryonated eggs as an alternative infection model to investigate *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infect Immun*, 78, 2995-3006. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00268-10>
- Jeon J-H, Lee C-H, Lee H-S. 2009. Antimicrobial Activities of 2- Methyl-8-Hydroxyquinoline and Its Derivatives against Human Intestinal Bacteria. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 52(2), 202-205. <http://dx.doi.org/10.3839/jksabc.2009.037>
- Jiang H, Taggart JE, Zhang X, Benbrook DM, Lind SE, Ding W-Q. 2011. Nitroxoline (5-amino-8-hydroxyquinoline) is more a potent anti-cancer agent than clioquinol (5-chloro-7-iodo-8-quinoline). *Cancer Letters*. 312(1):11-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2011.06.032>
- Joaquim AR, Pippi B, de Cesare MA, Rocha DA, Boff RT, Staudt KJ, Ruaro TC, Zimmer AR, de Araújo BV, Silveira GP, Martins AF, Teixeira ML, Dos Santos FP, Fuentefria AM, de Andrade SF. 2018. Rapid tools to gain insights into the interaction dynamics of new 8-hydroxyquinolines with few fungal lines. *Chem Biol Drug Des*. Nov 19. <http://dx.doi.org/10.1111/cbdd.13435>
- Jorge P, Pérez-Pérez M, Pérez Rodríguez G, Fdez-Riverola F, Pereira MO, Lourenço A. 2016. Construction of antimicrobial peptide-drug combination networks from scientific literature based on a semi-automated curation workflow. *The Journal of Biological Databases and Curation*. 2016,143. <http://dx.doi.org/10.1093/database/baw143>
- Jorgensen JH, Ferraro MJ. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*. 1;49(11):1749-55. <http://dx.doi.org/10.1086/647952>
- Kanizsai I, Madácsi R, Hackler L, Gyuris M, Szebeni GJ, Huzián O, Puskás LG. 2018. Synthesis and Cytoprotective Characterization of 8-Hydroxyquinoline Betti Products. *Molecules*. 23(8):1934. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23081934>
- Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. 2017. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiology*. 17:101. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-017-1012-8>
- Kokkori S, Apostolidi M, Tsakris A, Pournaras S, Stathopoulos C, Dinos G. 2014. Linezolid-Dependent Function and Structure Adaptation of Ribosomes in a *Staphylococcus epidermidis* Strain Exhibiting Linezolid Dependence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 58(8):4651-4656. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02835-14>
- Konagaya M, Matsumoto A, Takase S, Mizutani T, Sobue G, Konishi T, Hayabara T,

- Iwashita H, Ujihira T, Miyata K, Matsuoka Y. 2004. Clinical analysis of longstanding subacute myelo-optico-neuropathy: sequelae of clioquinol at 32 years after its ban. *J Neurol Sci.* 218(1):85 – 90.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2003.11.007>
- Lawung R, Cherdtrakulkiat R, Nabu S, Prachayasittikul S, Isarankura-Na-Ayudhya C, Prachayasittikul V. 2018. Repositioning of 8-hydroxyquinoline derivatives as a new promising candidate for combating multidrug resistant *Neisseria gonorrhoeae*. 17:840-846. <http://dx.doi.org/10.17179/excli2018-1602>
- Laurie MT, White CV, Retallack H, Wu W, Moser MS, Sakanari JA, Ang K, Wilson C, Arkin MR, DeRisi JL. 2018. Functional Assessment of 2,177 U.S. and International Drugs Identifies the Quinoline Nitroxoline as a Potent Amoebicidal Agent against the Pathogen *Balamuthia mandrillaris*. *MBio.* 30;9(5).
<http://dx.doi.org/10.1128/mBio.02051-18>
- Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. 2016. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol.* 13;7:895.
<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00895>
- Lin PC, Wang BC, Kim R, Magyar A, Lai CC, Yang YW, Huang YC. 2016. Estimating the cost-effectiveness of linezolid for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia in Taiwan. *Microbiol Immunol Infect.* 49(1):46-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2015.08.002>
- Lozano C, Torres C. 2017. Actualización en la resistencia antibiótica en Gram positivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 35(1) :2-8.
- Lubenets V, Vasylyuk S, Monka N, Bolibrukh K, Komarovska-Porokhnyavets O, Baranovych D, Musyanovych R, Zaczynska E, Czarny A. 2017. Synthesis and antimicrobial properties of 4-acylaminobenzenethiosulfoacid S-esters. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 25(2), 266-274. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.06.007>
- Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. 2016. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect Microbiol.* 6:194.
<http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>
- Mao X, Schimmer AD. 2008. The toxicology of Clioquinol. *Toxicol Lett.* 10;182(1-3):1-6.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.08.015>
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2013. PORTARIA Nº 47, DE 19 DE MARÇO DE 2013. Disponível em:
<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=143662794>. Acesso em 17/12/2018.
- Moody, J. A. 1992. Synergy testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. p. 5.18.1–5.18.23. In H. D. Eisenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Munita JM, Bayer AS, Arias CA. 2015. Evolving resistance among Gram-positive pathogens. *Clin Infect Dis.* 15;61 Suppl 2:S48-57.
<http://dx.doi.org/10.1093/cid/civ523>
- Naber KG, Niggemann H, Stein G, Stein G. 2014. Review of the literature and individual patients' data meta-analysis on efficacy and tolerance of nitroxoline in the

- treatment of uncomplicated urinary tract infections. *BMC Infectious Diseases*. 14:628. <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-014-0628-7>
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: Approved guideline M26-A*. v. 19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 1999.
- Olender D, Żwawiak J, Zaprutko L. 2018. Multidirectional Efficacy of Biologically Active Nitro Compounds Included in Medicines. *Pharmaceuticals (Basel)*. 29;11(2). <http://dx.doi.org/10.3390/ph11020054>
- Oyama, K, Kawada-Matsuo M, Oogai Y, Hayashi T, Nakamura N, Komatsuzawa H. 2016. Antibacterial Effects of Glycyrrhetic Acid and Its Derivatives on *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*. 11(11), e0165831.
- Pavlov A, Takuchev N, Georgieva N. 2012. Drug Design by Regression Analyses of Newly Synthesized Derivatives of 8-Quinolol. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 26(1):164-169. <https://doi.org/10.5504/50YRTIMB.2011.0030>
- Pippi B, Lopes W, Reginatto P, Silva FÉK, Joaquim AR, Alves RJ, Silveira GP, Vainstein MH, Andrade SF, Fuentefria AM. 2019. New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. *Saudi Pharm J*. 27(1):41-48. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.017>
- Pippi B, Reginatto P, Machado GDRM, Bergamo VZ, Lana DFD, Teixeira ML, Franco LL, Alves RJ, Andrade SF, Fuentefria AM. 2017. Evaluation of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Hits for Antifungal Drug Design. *Med Mycol*. 1;55(7):763-773. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx003>
- Poirel L, Potron A, Nordmann P. 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother*. 67(7):1597-606. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks121>
- Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. 2014. 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Des Devel Ther*. 4;7:1157-78. <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S49763>
- Rasigade JP, Dumitrescu O, Lina G. 2014. New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Microbiol Infect*. 20(7):587-8. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12718>
- Rello J, Nieto M, Solé-Violán J, Wan Y, Gao X, Solem CT, De Salas-Cansado M, Mesa F, Charbonneau C, Chastre J. 2016. Nosocomial pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* treated with linezolid or vancomycin: A secondary economic analysis of resource use from a Spanish perspective. *Medicina Intensiva*. 40 (8), 474-482. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medin.2016.01.007>
- Rossolini GM; Mantengoli E; Montagnani F; Pollini F. 2010. Epidemiology and clinical relevance of microbial resistance determinants versus anti-Gram-positive agents. *Curr Opin Microbiol*. 13(5):582-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.08.006>
- Sakr A, Brégeon F, Mège JL, Rolain JM, Blin O. 2018. *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. *Front Microbiol*. 9:2419. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.02419>
- Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR, Castro HC.

2007. *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. J Bras Patol Med Lab. 43(6):413-423. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442007000600005>
- Schumacher A, Vranken T, Malhotra A, Arts JJC, Habibovic P. 2018. In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 37(2):187-208. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-017-3089-2>
- Seilie ES, Bubeck JW. 2017. Staphylococcus aureus pore-forming toxins: The interface of pathogen and host complexity. Seminars in Cell and Developmental Biology. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.04.003>
- Short BR, Vargas MA, Thomas JC, O'Hanlon S, Enright MC. 2006. In vitro activity of a novel compound, the metal ion chelating agent AQ+, against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 57(1):104-9. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dki428>
- Sobke A, Klinger M, Hermann B, et al. 2012. The Urinary Antibiotic 5-Nitro-8-Hydroxyquinoline (Nitroxoline) Reduces the Formation and Induces the Dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms by Chelation of Iron and Zinc. Antimicrob Agents Chemother. 56(11):6021-6025. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01484-12>
- Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, Mackenzie FM. 2012. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. Int J Antimicrob Agents. 39(4):273-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.09.030>
- Tang HJ, Hsieh CF, Chang PC, Chen JJ, Lin YH, Lai CC, Chuang YC. 2016. Clinical Significance of Community- and Healthcare-Acquired Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolates. PLoS ONE. 11(3), e0151897. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0151897>
- Vincent JL, Bassetti M, François B, Karam G, Chastre J, Torres A, Antonelli M. 2016. Advances in antibiotic therapy in the critically ill. Crit Care. 20, 133. <http://dx.doi.org/10.1186/s13054-016-1285-6>
- Vrioni G, Tsiamis C, Oikonomidis G, Theodoridou K, Kapsimali V, Tsakris A. 2018. MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. Ann Transl Med. 6(12):240. <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2018.06.28>
- WHO- World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. [Publicado em 2017 Fev 27]. Disponível em: http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/#.WP9byE7t_Zc. Acessado em 05 de março 2017.
- Winstel V, Xia G, Peschel A. 2013. Pathways and roles of wall teichoic acid glycosylation in *Staphylococcus aureus*. International Journal of Medical Microbiology. 304: 215–221. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.10.009>
- Zhai S, Yang L, Cui QC, Sun Y, Dou QP, Yan B. 2010. Tumor cellular proteasome inhibition and growth suppression by 8-hydroxyquinoline and clioquinol requires their capabilities to bind copper and transport copper into cells. J Biol Inorg Chem. 15(2):259-69. <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-009-0594-5>
- Zhang X, Hu X, Rao X. 2017. Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* toxins.

Microbiological Research. 205:19-24.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.006>

APÊNDICE - Artigo “Antibacterial and synergistic activity of a new 8-hydroxyquinoline analogue against methicillin-resistant *S. aureus*”. A ser submetido à revista *INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS*.

Antibacterial and synergistic activity of a new 8-hydroxyquinoline analogue against methicillin-resistant *S. aureus*

Roberta T. Boff^{1,2}, Angélica R. Joaquim^{3,4}, Franciele C. Adam², Taís F.A. Kaminski⁵, Mário L. Teixeira⁶, Saulo F. de Andrade^{3,4}, Andreza F. Martins^{1,2,4*}

¹ Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Laboratório de Microbiologia Aplicada, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

³ Pharmaceutical Synthesis Group (PHARSG), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁴ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁵ Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁶ Laboratório de Farmacologia, Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia, Concórdia, Brazil

*Corresponding author at: Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) Sarmiento Leite, 500/12101 Code 90050-170 Porto Alegre, Brazil. E-mail address: andreza_fm20@gmail.com

ABSTRACT

The development of antimicrobials it is becoming increasingly necessary in view of the increased incidence of multi-resistant microorganism. Thus, our group develop a new methylated analogue of 8-hydroxyquinoline, considering that this grouping is present in several compounds with antimicrobial action. Antibacterial activity of the analogue was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) against ATCC strains of gram positive and gram negative bacteria of clinical importance. The PH176 analog presented a MIC of 8 µg/mL for ATCC *S. aureus* 29213 and was selected for further testing. When compared to a collection of 38 *S. aureus* clinical isolates, 10 of which characterized as MRSA, the MIC₅₀ and MIC₉₀ of PH176 were 16 and 32 µg/mL respectively. The antimicrobial activities and the synergistic effect with known antibiotics were evaluated by Time-Kill assay in 5 MRSA isolates. PH176 used alone resulted in a reduction in colony count at 24h with no regrowth in 4 isolates at concentrations of 1x MIC and 2xMIC. Bactericidal effect occur in one isolate in concentration of 2xCIM. The combination with 1xCIM of Oxacillin resulted in synergy with ½xCIM of PH176 in 3 isolates, with 1xCIM PH176 in 2 isolates and with 2xCIM PH176 in 1 isolate. Synergistic effect was also observed in 2 isolates with 1xCIM and 2xCIM of PH176 and the Oxacillin breakpoint (2 µg/mL) concentration. Concentrations above MIC values of PH176 were considered non-cytotoxic and non-irritant in HET-CAM tests, permeation

determination and histopathological evaluation in pig skin and in analysis of cell viability in human leukocytes. These results demonstrate that the PH176 is highly promising for the development of a novel therapy for the treatment of MRSA infections.

Keywords: 8-hydroxyquinoline, antibacterial activity, synergistic activity, MRSA

1. INTRODUCTION

In the last two decades, there has been a considerable increase in the incidence of infections caused by antibiotic-resistant microorganisms, especially in hospital settings. The start of the use of antibiotics was a revolution for medicine; nevertheless, their indiscriminate use contributes to the current alarming situation of dissemination of resistance and selection of resistant bacteria^{1,2}. In 2017, the World Health Organization (WHO) published a list of microorganisms that need priority attention, which included methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistant (VRSA) or vancomycin intermediate-resistant *S. aureus* (VISA), among others³. The *S. aureus* is a highly adapted gram-positive bacterium and is able to survive intracellularly in addition to resisting desiccation in environments. It is a nosocomial and community pathogen and can cause from mild infections such as folliculitis and cutaneous abscesses, to severe infections as endocarditis, pneumonia and bacteremia⁴.

MRSA isolates are responsible for about 40% of the healthcare-associated infections (HAI) in the world. Some studies show that treatments of patients infected with this pathogen cost up to twice the value of treatments for methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) infections in addition to increased mortality and length of hospital stay^{5,6}. Considering the epidemiology of this microorganism, the high costs of infections treatment and its great ability to adapt and develop antimicrobial-resistance, it is critical to develop new strategies and drugs for the treatment of infections, mainly by resistant isolates⁴.

The chemical structure of drugs influences how they interact with bioreceptors and modifications in their structure can be performed in order to seek or optimize the desired activity⁷. The 8-hydroxyquinoline (8HQ) and its analogues belong to the quinoline class, and present a six-membered heterocyclic ring fused to a phenol and bind to the metal ions through the oxygen atoms of the hydroxyl

group and through the nitrogen of the quinolitic ring, showing more affinity to copper and zinc ions. They also show broad biological functions, including antimicrobial activity^{8,9}. In the last decades, the HQ was a pharmacophore often used for the development of optimized compounds, mainly through alterations in carbons 2, 5, and 7^{10,11}.

Clioquinol (5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline) (CQ) was widely used in the 1950s through 1970s mainly as an oral antiparasitic, for treatment and prevention of intestinal amebiasis and in the treatment of enteropathic acrodermatitis and other disorders related to zinc absorption^{12,13,14}. Nitroxoline (8-hydroxy-5-nitroquinoline) (NQ) is a non-halogenated derivative of 8HQ widely used in Europe and Asia as a broad-spectrum antimicrobial agent and its activity is potentiated by ions. It is considered a lead compound, where structural modifications can lead to optimization of activity and variations in its mechanism of action^{13,15}. The mechanism of action of both antimicrobials is due its properties of chelating ions. The hypothesis is that the NQ forms complexes with ions (Mg^{2+} , Ca^{2+}) present in the outer membrane of the bacteria making its surface hydrophobic, decreasing its capacity of adhesion.^{8,15}

Despite the extensive exploration of the antibacterial activity of 8HQ derivatives, there are few published studies of the methylated derivatives^{16,17,18,19}. Based on this knowledge, our group developed a novel CQ derivative, 5-chloro-7-iodo-8-methoxyquinoline (PH176) and research its antibacterial and synergistic activity. After screening against different ATCC strains, it was observed that PH176 showed important activity mainly *S. aureus*. Therefore, this study aims to evaluate the antibacterial activity and synergistic effect of PH176 with NQ and Oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Synthesis of a methylated 8HQ derivative

In partnership with the Pharmaceutical Synthesis Group, from the Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, a novel methylated 8HQ derivative was prepared using the modern Buchwald-Hartwig cross coupling reaction²⁰. Reactants and CQ were obtained from commercial suppliers. Column chromatography was performed on silica gel Fluka (Sigma-

Aldrich®) 0.035-0.070 mm. The solvents used were distilled prior to use. The ^1H and ^{13}C spectra were obtained on Bruker 400 or Varian 400 nuclear magnetic resonance spectrometer. The proton and carbon shifts (δ) are given with respect to TMS. FT-IR was performed on PerkinElmer Spectrum BX. Melting points were determined on Buchi B-545 apparatus.

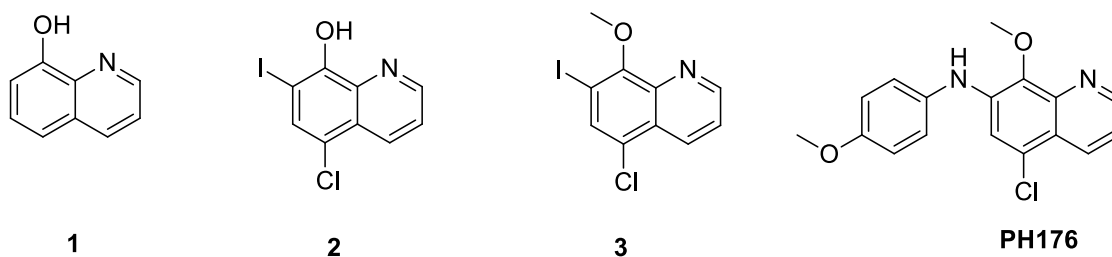


Figure A. Chemical Structure of 8-hydroxyquinoline derivatives. 1) 8-hydroxyquinoline; 2) 5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline; 3) 5-chloro-7-iodo-8-methoxyquinoline; 4) PH176.

Intermediate 3 was obtained by methylation reaction adapted from Zhai et al.²¹. To a stirred solution of 8-hydroxyquinoline (2.0 g, 6.5 mmol) in DMF (15 mL) was added K_2CO_3 (1.81 g, 13 mmol) at room temperature. After 30 minutes, CH_3I (1.23 mL, 13 mmol) was added dropwise. After 16 hours, the addition of ethyl acetate (300 mL) stopped the reaction. The organic layer was washed with 0.5 M NaOH (200 mL), water (200 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure to give 5-chloro-7-iodo-8-methoxyquinoline (**3**) as a purple solid that was used in the next step without further purification (96% yield).

Then, to a stirred solution of 5-chloro-7-iodo-8-methoxyquinoline (300 mg, 0.94 mmol) in dioxane (3 mL) was added, in order, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (5 mol%), Xantphos (5 mol%), 4-methoxyaniline (1.41 mmol), and Cs_2CO_3 (613 mg, 1.88 mmol) under argon atmosphere in a sealed tube. After 16 h at 100 °C, the solution was allowed to cool at room temperature, concentrated under reduced pressure, and purified by silica gel column chromatography - eluent hexane:EtOAc (8:2). Dark yellow wax. 48% overall yield (two steps).

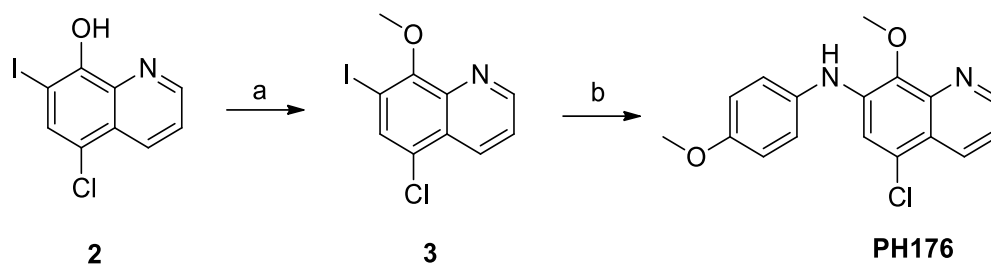


Figure B. Synthesis of PH 176 (a) CH_3I , K_2CO_3 , DMF, t.a., 16h; (b) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, Xantphos, Cs_2CO_3 , 4-methoxyaniline, dioxin, atm. argon, 100 °C, 16h. 2) clioquinol; 3) 5-chlorine-7-iodine 8-methoxyquinoline;

2.2. Antibacterial and Synergic Activities

All tests and controls were carried out in duplicate in cation-adjusted Mueller-Hinton broth. All culture media and Oxacillin were obtained from commercial suppliers (Kasvi®, Sigma-Aldrich®).

S. aureus Isolates

We tested the activity and interaction of PH176, NQ and Oxacillin with a clinical bacterial collection of *S. aureus* nosocomial isolates and *S. aureus* ATCC 29213. Of the 38 clinical isolates selected for the study, 33 (86.8%) originated from the respiratory tract, 2 (5.3%) urinary tract, 2 (5.3%) abscess secretions and 1 (2.6%) from blood culture. Regarding the susceptibility profile, 34 (89.5%) isolates are resistant to penicillin, 10 (26.3%) are MRSA, 10 (26.3%) resistant to levofloxacin and 4 (10.5%) resistant to minocycline. For synergy analysis, 5 MRSA isolates (448, 453, 454, 459 and 487) with oxacillin MICs between 16-512 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were selected.

Antibacterial Activity

To determine their [minimum inhibitory concentrations](#) (MICs), strains were screened against PH176, NQ, Oxacillin, Amoxicillin/Clavulanate, Levofloxacin, Linezolid, Minocycline, Vancomycin, Ampicillin, Penicillin and Tigecycline by broth microdilution method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)²². All experiments were carried out using duplicate samples and ATCC control for each test agent.

Time-Kill Assay

Time-kill (TK) assay was adapted from National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)²³ and applied to determine *in vitro* activity and

synergistic effect of PH176 against 5 MRSA clinical isolates and ATCC *S. aureus* 29213^{22,23}. For this assay, serial microdilution bacterial plate counts were made in 96 well sterile with ultrapure water. Initial inoculum used of each antibiotic concentration tested contained 6×10^5 CFU/ml in early to mid-logarithmic growth. The PH176 and NQ concentrations tested were $\frac{1}{2}$ MIC, 1xMIC and 2xMIC. Those of Oxacillin were 1xMIC of each isolate and the clinical breakpoint (BP $2 \mu\text{g}/\text{mL}$) according to CLSI²². In addition, the following combinations were tested: Oxacillin BP with $\frac{1}{2}$ xCIM, 1xCIM and 2xCIM of PH176 (PH176/OXA-BP) and with 1xCIM of NQ (NQ/OXA-BP); Oxacillin MIC with the same concentrations of PH176 (PH176/OXA-MIC) and with 1xCIM of NQ (NQ/OXA-MIC); and 1xCIM PH176 with 1xCIM of NQ (PH176/NQ). The tubes were then incubated at 35°C for 24 hours.

Aliquots of 0.1 mL were removed at defined time points (0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24h) and viable CFU counts were determined by [serial dilution](#) and plating on Mannitol salt [agar plates](#). The experiment was performed using two samples for each test agent. A ≥ 3 log CFU/ml decrease in colony count compared to initial inoculum defined bactericidal activity. Synergism was defined by a ≥ 2 log CFU/ml decrease in colony count of the combined antimicrobials compared to colony count of the most active antimicrobial alone in 24 hours²³.

2.3. Toxicity assays

Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane (HET-CAM), Determination of Permeation and Histopathological Evaluation (DPHE) and Cell Viability Assay (CVA) with human leukocytes were performed. For HET-CAM, fresh white fertile eggs (Lohmann selected Leghorn, LSL) were used and test performed as described by Jacobsen et al.²⁴. The observation of irritant effect was made at 30 seconds, 2 minutes and 5 minutes after the application of negative control (0.9% saline solution), positive control (0.1 M NaOH solution), PH176 ($128 \mu\text{g}/\text{mL}$) and NQ ($64 \mu\text{g}/\text{mL}$). The result of the irritation score (IS) was given on a scale from 0 to 4.9 denoted nonirritant and 5.0 to 21 denoted irritant²⁵. For DPHE assay tissue samples from adult male swine freshly slaughtered were used to evaluate the formation of damage, respecting animal welfare²⁶. Epidermal side of the skin was subjected for 6 hours to PH176 ($128 \mu\text{g}/\text{mL}$) and NQ ($64 \mu\text{g}/\text{mL}$), both dissolved in PBS pH 7.0, negative control (PBS pH 7.0) and positive control (0.1 M NaOH). Fragments of these tissues were harvested, fixed in 10% neutral-buffered formalin,

processed and stained with hematoxylin and eosin (HE), and examined under light microscopy. CVA were performed according BUROW et al. ²⁷. Cell culture flasks were prepared with negative control (PBS), positive control (bleomycin 3 μ M), PH176 and NQ (concentrations 8, 16, 32 and 64 μ g/mL) and incubated at 37°C for 72 hour. Then the cell suspension was mixed 2% trypan blue (cell viability) followed by microscopic observation. All toxicity experiments were carried out in triplicate.

3. RESULTS

3.1. Antibacterial Activity

The novel 8HQ analogue, PH176 (5-Chloro-7- (4-methoxyphenylamino)-8-methoxyquinoline) has a molar mass of 314.77 and predicted LogP of 3.89. When tested with the ATCC strain, PH176 MIC were 8 μ g/mL. The MIC distribution of PH176 and NQ for the 38 clinical *S. aureus* isolates, ranged from 16 -32 μ g/mL and 2-8 μ g/mL, respectively. Whereas Oxacillin, the values ranged from 0.25-512 μ g/mL and 10 isolates were classified as MRSA²². The MIC₅₀ and MIC₉₀ were 1 μ g/mL and 16 μ g/mL for Oxacillin, 4 μ g/mL and 8 μ g/mL for NQ and 16 μ g/mL and 32 μ g/mL for PH176 respectively. *Table A* shows the MIC for all antibiotic tested with the 5 MRSA isolates used to performed TK.

Table A - Minimum inhibitory concentration of PH176 and other antibiotics for 5 MRSA isolates selected to Time-Kill assay.

Agents	Susceptibility profile of isolates (MIC μ g/mL)					
	MRSA 448 ^a	MRSA 453 ^a	MRSA 454 ^a	MRSA 459 ^a	MRSA 487 ^a	ATCC 29213
PH176	16	32	32	16	16	8
Nitroxoline	4	4	8	8	8	2
Oxacillin	16	64	128	512	16	0.25
Amoxicillin/Clavulanate	2	8	>8	>8	>8	b
Levofloxacin	2	4	>32	4	4	
Linezolid	4	2	1	2	2	
Minocycline	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	2	
Vancomycin	1	0.5	0.5	1	1	
Ampicillin	16	>16	>16	16	>16	
Penicillin	>8	8	>8	>8	>8	
Tigecycline	0.12	0.06	0.12	0.12	0.12	

^a Number of the isolate

^b Not tested

3.2. Time-Kill Assay

PH176 bactericidal effect was observed with 454 isolate at 2xMIC concentration and in 1xCIM, bacteriostatic effect occurred. The action of PH176 was also bacteriostatic with 453 isolate at 2xCIM concentration and reduced the CFU count by $-1.93 \log_{10}$ in the $\frac{1}{2}$ xMIC concentration and by $-1.94 \log_{10}$ in 1xCIM, practically reaching the same effect. In addition, for other 2 isolates (459 and 487) PH176 in 1xCIM and 2xCIM concentration also resulted in a reduction in the colony count. In these 4 isolates the reduction in CFU/mL occur without regrowth in 24 hours. NQ reduced colony counts at concentrations of 1xCIM and 2xCIM without regrowth but showed no bactericidal or bacteriostatic effect. Oxacillin had poor results when tested alone, both at concentrations of 1xCIM and at BP concentration, showing regrowth in 24 hours for all 5 MRSA isolates and being bactericidal only against the ATCC strain (Table B).

The combination of PH176/OXA-MIC presented synergism in 3 isolates (448, 459,487) in $\frac{1}{2}$ xMIC concentration of PH176 and in 2 isolates (448,487) in 1xMIC PH176. Regarding Oxacillin BP concentration, the combination with 1xMIC and 2xMIC of PH176 caused synergistic effect in 448 isolate. Combination of 1xMIC PH176/NQ caused synergistic effect in 1 isolate (459).The NQ/OXA-MIC combination was synergic for 2 isolates (448 and 459). Tests with isolate 453 did not demonstrate the reduction of CFU/mL required to characterizing synergism in any combination. With 454 isolate, PH176/OXA-CIM combinations resulted in a reduction in colony count by $-1.99 \log_{10}$ compared to the most active antimicrobial alone. The antagonistic effect was not observed in any combination tested. (Figure C; Table B).

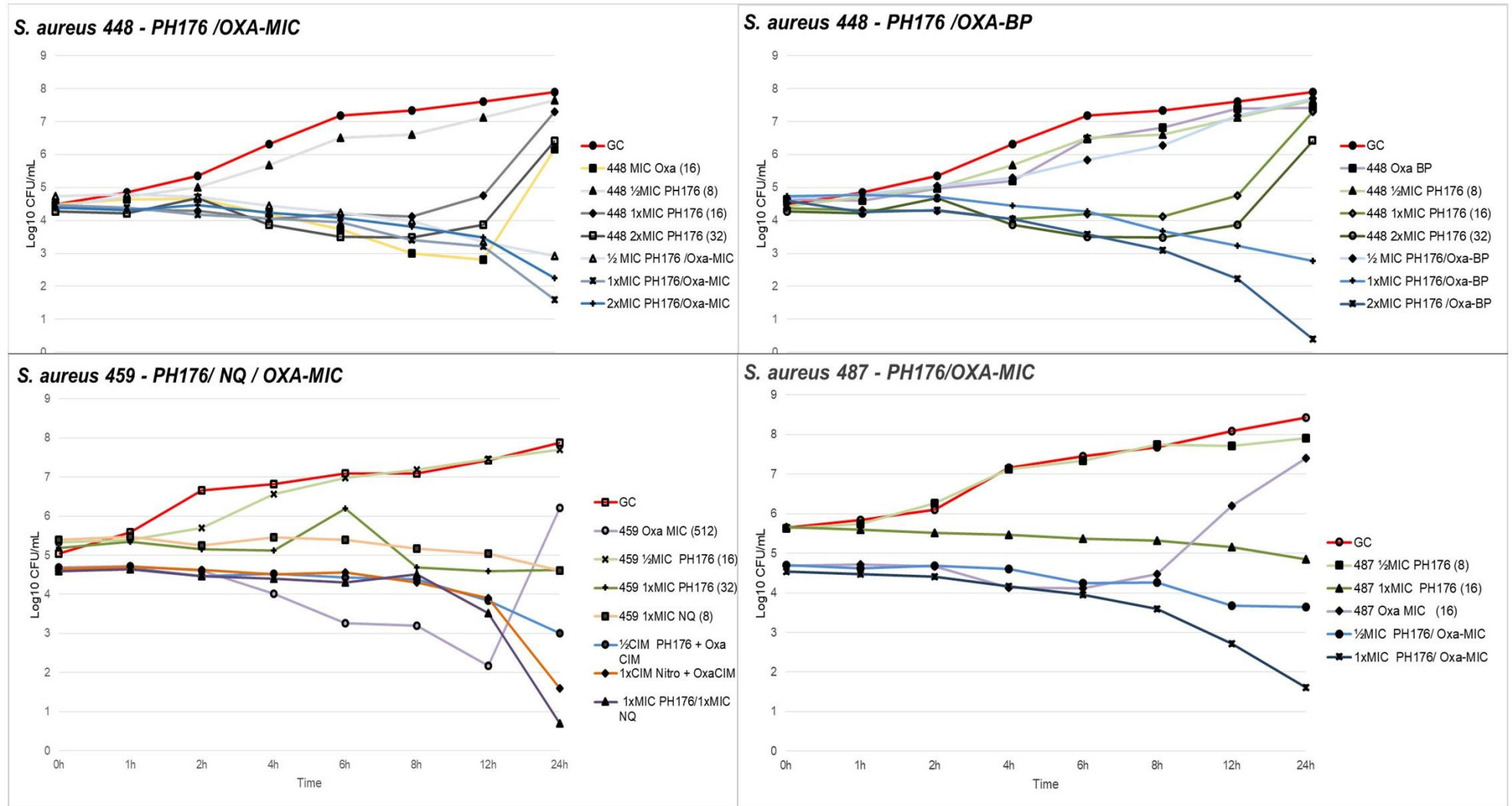


Figure C. Synergistic effect in MRSA isolates in Time-Kill assay (MIC of each isolate in µg/mL). GC: Growth control; BP: Oxacillin breakpoint (2µg/mL).

Table B. Log₁₀ ΔCFU/mL obtained in Time-kill assay with MRSA isolates for PH176, Nitroxoline (NQ) and Oxacillin (Oxa) in monotherapy and in combinations.

<i>S. aureus</i> isolates (MIC µg/mL)	Log ΔCFU ^a with agents ^b in monotherapy and in combinations																
	PH176 ½xMIC	PH176 1xMIC	PH176 2xMIC	NQ ½xMIC	NQ 1xMIC	NQ 2xMIC	Oxa 1xMIC	Oxa BP ^c	PH176 ½xMIC		PH176 1xMIC		PH176 2xMIC		NQ 1xMIC		PH176 1xMIC
									Oxa 1xMIC	Oxa BP	Oxa 1xMIC	Oxa BP	Oxa 1xMIC	Oxa BP	Oxa 1xMIC	Oxa BP	NQ 1xMIC
MRSA 448 Oxa (16) PH176 (16) NQ (4)	3,21	2,91	2,13	2,05	2,05	-1,07	-1,86	2,78	-3,48	-0,42	-4,54	-4,74	-3,82	-6,34	-2,77	-0,80	-0,89
MRSA 453 Oxa (64) PH176 (32) NQ (4)	-1,93	-1,94	-2,11	2,54	-1,8	-1,04	3,36	3,19	0,91	0,13	0,68	0,04	0,37	-0,20	-1,49	-0,78	0,80
MRSA 454 Oxa (128) PH176 (32) NQ (8)	-0,06	-2,57	-3,77	-1,99	-1,65	-1,3	3,13	2,74	-1,99	-1,02	-1,91	-0,10	1,62	0,93	0,77	0,42	1,86
MRSA 459 Oxa (512) PH176 (16) NQ (8)	2,37	-0,56	-0,6	2,09	-0,79	-0,99	1,53	2,67	-3,13	-0,04	-0,65	-0,45	-1,1	-1,34	-2,26	-0,73	-3,10
MRSA 487 Oxa (16) PH176 (16) NQ (8)	2,27	-0,81	-0,83	2,49	-0,27	-0,37	2,71	2,14	-3,33	-0,04	-2,11	-0,92	-1,86	-1,05	-0,32	-0,57	-1,11

^a Calculated by subtracting the final colony count from the initial inoculum in each concentration tested. Synergism was calculated by subtracting the final colony count in the most active antibiotic in monotherapy from the final colony count in the combination and is define by a ≥2 log₁₀ units decrease (highlighted in bold type).

^b Oxacillin, PH176 and Nitroxoline and were tested alone and in combinations.

^c BP: breakpoint for Oxacillin (2µg/mL)

3.3. Toxicity Assay

PH176 were classified as non-irritating in the HET-CAM tests performed. The IS of the PH176 at 128 µg/mL was 3.49, of NQ at 64 µg/mL concentration was 2.82. The IS of the positive control (0.1M NaOH) was above 19 whereas the negative control below one. In DPHE assay, there were no lesions in the swine epidermal cells in histopathological analysis for any compounds after six-hour exposition demonstrating a low topical toxicity of the compound.

The cell viability results obtained in CVA assay for PH176 was 97%, 96%, 94% and 73% of the viable cells at the concentrations of 8, 16, 32 and 64 µg/mL, respectively. The negative control had 96% (PBS) and the positive control (bleomycin 3µM) 9% of the viable cells. To the NQ the results were 97%, 88%, 89% and 87% of the viable cells at the concentrations of 8, 16, 32 and 64µg / mL, respectively. The negative control (PBS) had 96% and the positive control (bleomycin 3µM) 12% of the viable cells.

After the statistical analysis (ANOVA and Turkey's tests), the results showed a significant statistical difference in the cell viability of PH176 and NQ in relation to the positive control ($p < 0, 05$). Both PH176 and NQ were considered non-cytotoxic in human leukocyte test at the concentrations tested.

4. DISCUSSION AND CONCLUSION

The 8HQ and its derivatives have potent and varied bioactivity and are good prototype for the development of new antimicrobial compounds against resistant microorganisms²⁸. NQ and Clioquinol are important examples of antimicrobials derived from 8HQ. Their molecular structures can be used for the planning and realization of structural modifications, seeking to improve their activity and reduce the collateral effects of the compounds^{28,29}.

Results of our study indicate that PH176 activity was not influenced by the mechanism of resistance present in the MRSA isolates, since the distribution of MIC values varied little among them. Similar action can be observed in different studies that demonstrated a high activity of 8HQ against isolates of *S. aureus* MRSA and VISA, suggesting that 8HQ and its derivatives were not influenced by resistance mechanisms that could be present in those isolates^{9,30}. Our group used the TK

analysis to analyze the action of the PH176, NQ (analogue commonly used for the treatment of urinary infections in Europe) and Oxacillin (reference antibiotic) against MRSA clinical isolates and *S. aureus* ATCC 29213.

The Oxacillin had poor activity when used alone since all isolates showed regrowth during the 24-hours at BP and 1xMIC concentrations. The bactericidal effect found only on the ATCC strain was expected due to methicillin-resistance present in the isolates. Different from Oxacillin, PH176 tests showed no regrowth in 4 out of 5 isolates. In comparison with NQ activity, PH176 had a better action when used alone being bactericidal and bacteriostatic, whereas the use of NQ did not reach this effect in any tested isolate

It is known that the combination of antibiotics for the treatment of bacterial infections reduces emergence of resistance in addition to increase the likelihood of a good outcome in the treatment of infections by multiresistant microorganisms⁵. In our study, the combination of PH176/OXA-MIC produced a synergistic effect for three isolates (448, 459 and 487). It should be noted that for these 3 isolates, combinations of PH176 with OXA and NITRO were more active at different concentrations when compared to PH176 alone. In contrast, for the other 2 isolates, the opposite was observed.

The results obtained from the toxicity tests applied at concentrations above MIC values demonstrated that PH176 was considered non-cytotoxic in human leukocyte, non-irritating in the HET-CAM and there were no lesions observed in the swine epidermal cells in histopathological analysis. These results indicate a low probability of allergenic or toxic reactions in topical or oral use of PH176. Data from other studies that analyzed antimicrobial activity of 8HQ analogues corroborates with our low toxicity results^{18,19}.

The antibacterial activity against MRSA and synergistic effects observed in our study, associate to the low cytotoxicity of PH176 in high concentrations were a very promising result for the development of products with pharmacological application.

Funding: This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS - EDITAL 04/2016 - PRONUPEQ 2016), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Declarations of interest: none.

REFERENCES

- 1- Ascioğlu S, Samore MH, Lipsitch M. A new approach to the analysis of antibiotic resistance data from hospitals. *Microb Drug Resist* 2014; 20(6): 583–590.
<http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2013.0173>
- 2- Jorge P, Pérez-Pérez M, Pérez Rodríguez G, Fdez-Riverola F, Pereira MO, Lourenço A. Construction of antimicrobial peptide-drug combination networks from scientific literature based on a semi-automated curation workflow. *Database (Oxford)* 2016; 2016,143. <http://dx.doi.org/10.1093/database/baw143>
- 3- WHO- World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/#.WP9byE7t_Zc; 2017 [accessed 25 June 2017].
- 4- Balasubramanian D, Harper L, Shopsin B, Torres VJ. Staphylococcus aureus pathogenesis in diverse host environments. *Pathog Dis* 2017; 1;75(1).
<http://dx.doi.org/10.1093/femspd/ftx005>
- 5- Gudiol C, Cuervo G, Shaw E, Pujol M, Carratalà J. Pharmacotherapeutic options for treating Staphylococcus aureus bacteremia. *Expert Opin Pharmacother* 2017; 18(18):1947-1963. <http://dx.doi.org/10.1080/14656566.2017>
- 6- Sakr A, Brégeon F, Mège JL, Rolain JM, Blin O. Staphylococcus aureus Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. *Front Microbiol* 2018; 9:2419.
<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.02419>
- 7- Olender D, Żwawiak J, Zaprutko L. Multidirectional Efficacy of Biologically Active Nitro Compounds Included in Medicines. *Pharmaceuticals (Basel)* 2018; 29;11(2). <http://dx.doi.org/10.3390/ph11020054>
- 8- Naber KG, Niggemann H, Stein G, Stein G. Review of the literature and individual patients' data meta-analysis on efficacy and tolerance of nitroxoline in the treatment of uncomplicated urinary tract infections. *BMC Infect Dis* 2014; 14:628. <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-014-0628-7>
- 9- Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Des Devel Ther* 2014; 4;7:1157-78.
<http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S49763>
- 10- Pavlov A, Takuchev N, Georgieva N. Drug Design by Regression Analyses of Newly Synthesized Derivatives of 8-Quinololinol. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2012; 26(1):164-169. <https://doi.org/10.5504/50YRTIMB.2011.0030>
- 11- Kanizsai I, Madácsi R, Hackler L, Gyuris M, Szebeni GJ, Huzián O, Puskás LG. Synthesis and Cytoprotective Characterization of 8-Hydroxyquinoline Betti Products. *Molecules* 2018; 23(8):1934.
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules23081934>
- 12- Arbiser JL, Kraeft SK, van Leeuwen R, et al. Clioquinol-zinc chelate: a

candidate causative agent of subacute myelo-optic neuropathy. *Mol Med* 1998; 4(10):665-670.

13- Jiang H, Taggart JE, Zhang X, Benbrook DM, Lind SE, Ding W-Q. Nitroxoline (5-amino-8-hydroxyquinoline) is more a potent anti-cancer agent than clioquinol (5-chloro-7-iodo-8-quinoline). *Cancer Lett* 2011; 312(1):11-17.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2011.06.032>

14- Mao X, Schimmer AD. The toxicology of Clioquinol. *Toxicol Lett* 2008; 10;182(1-3):1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.08.015>

15- Laurie MT, White CV, Retallack H, Wu W, Moser MS, Sakanari JA, Ang K, Wilson C, Arkin MR, DeRisi JL. Functional Assessment of 2,177 U.S. and International Drugs Identifies the Quinoline Nitroxoline as a Potent Amoebicidal Agent against the Pathogen *Balamuthia mandrillaris*. *MBio* 2018; 30;9(5).

<http://dx.doi.org/10.1128/mBio.02051-18>

16- Beugelmans R, Choussy MB, Gayral P, Rigotherier MC. SRN1 synthesis and amebicide activity of new quinoline derivatives. *Eur. J. Med. Chem* 1998; 23: 539-546. [https://doi.org/10.1016/0223-5234\(88\)90097-9](https://doi.org/10.1016/0223-5234(88)90097-9)

17- Pippi B, Lopes W, Reginatto P, Silva FÉK, Joaquim AR, Alves RJ, Silveira GP, Vainstein MH, Andrade SF, Fuentefria AM. New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. *Saudi Pharm J.* 2019 Jan;27(1):41-48. doi: 10.1016/j.jsps.2018.07.017

18- Pippi B, Reginatto P, Machado GDRM, Bergamo VZ, Lana DFD, Teixeira ML, Franco LL, Alves RJ, Andrade SF, Fuentefria AM. Evaluation of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Hits for Antifungal Drug Design. *Med Mycol.* 2017 1;55(7):763-773. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx003>

19- Joaquim AR, Pippi B, de Cesare MA, Rocha DA, Boff RT, Staudt KJ, Ruaro TC, Zimmer AR, de Araújo BV, Silveira GP, Martins AF, Teixeira ML, Dos Santos FP, Fuentefria AM, de Andrade SF. Rapid tools to gain insights into the interaction dynamics of new 8-hydroxyquinolines with few fungal lines. *Chem Biol Drug Des.* 2018 Nov 19. <http://dx.doi.org/10.1111/cbdd.13435>

20- Hartwig, J. Carbon–heteroatom bond formation catalysed by organometallic complexes. *Nature* 2008; 455:314-322.

21- Zhai S, Yang L, Cui QC, Sun Y, Dou QP, Yan B. Tumor cellular proteasome inhibition and growth suppression by 8-hydroxyquinoline and clioquinol requires their capabilities to bind copper and transport copper into cells. *J Biol Inorg Chem* 2010; 15(2):259-69. <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-009-0594-5>

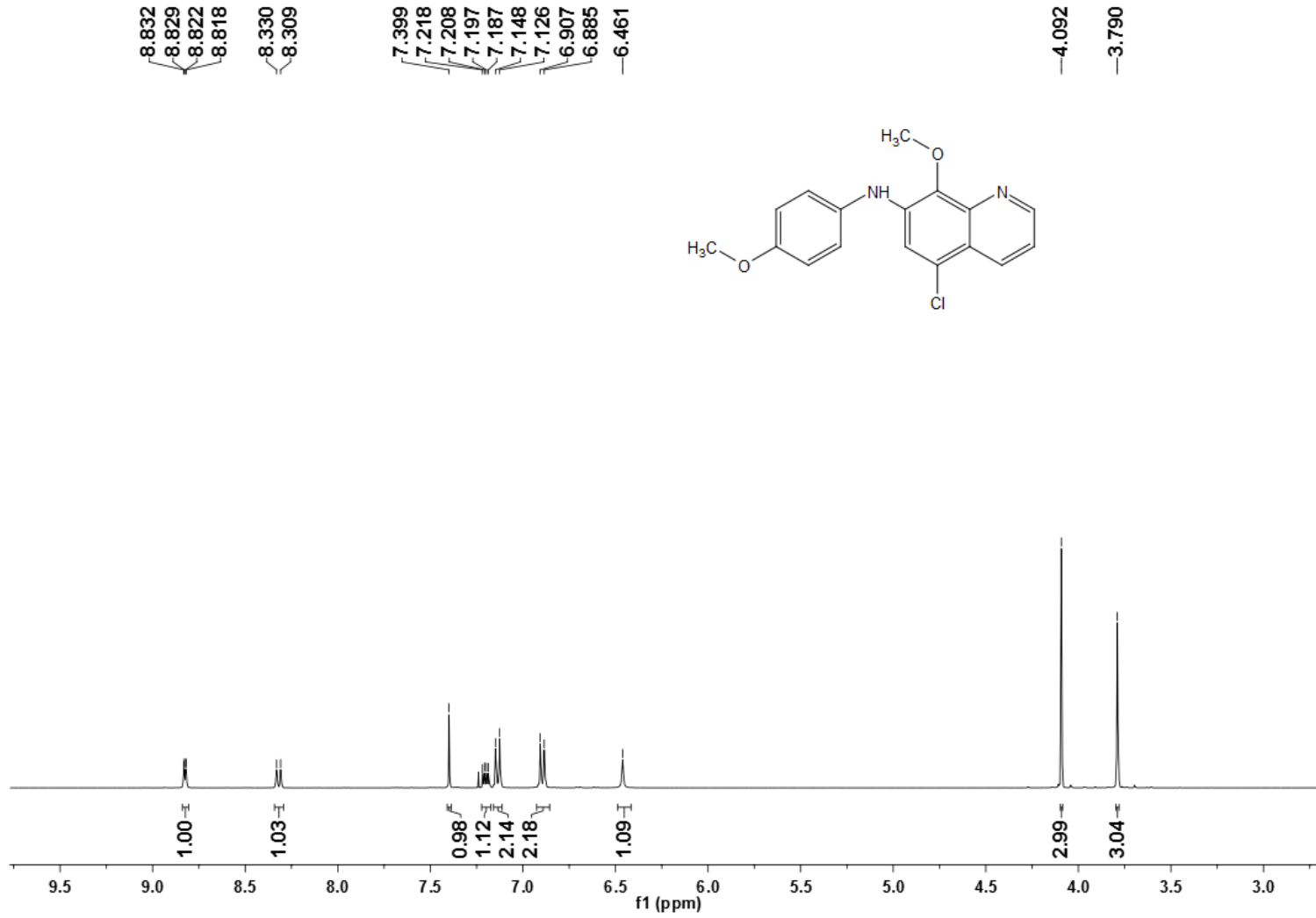
22- Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 26th ed. M100S, Wayne, PA, USA, 2016

23 -National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: Approved guideline M26-A. v. 19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 1999

24- Jacobsen ID, Grosse K, Slesiona S, Hube B, Berndt A, Brock M. Embryonated eggs as an alternative infection model to investigate *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infect Immun* 2010; 78(7):2995-3006.

<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00268-10>

- 25- Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVMA). *The Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method*. Research Triangle Park: National Toxicology Program, 2010.
- 26- Brazil, Ordinance 47/2013, Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=143662794>; 2013 [accessed 13 March 2018].
- 27- 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 Res.* 58(21), 4940–4946.
- 28- Cherdtrakulkiat R, Boonpangrak S, Sinthupoom N, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. 2016. Derivatives (halogen, nitro and amino) of 8-hydroxyquinoline with highly potent antimicrobial and antioxidant activities. *Biochemistry and Biophysics Reports.* 6:135–141. <http://dx.doi.org.10.1016/j.bbrep.2016.03.014>
- 29- Lawung R, Cherdtrakulkiat R, Nabu S, Prachayasittikul S, Isarankura-Na-Ayudhya C, Prachayasittikul V. 2018. Repositioning of 8-hydroxyquinoline derivatives as a new promising candidate for combating multidrug resistant *Neisseria gonorrhoeae*. 17:840-846. <http://dx.doi.org/10.17179/excli2018-1602>
- 30- Short BR, Vargas MA, Thomas JC, O'Hanlon S, Enright MC. 2006. In vitro activity of a novel compound, the metal ion chelating agent AQ+, against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 57(1):104-9. <http://dx.doi.org/0.1093/jac/dki428>

ANEXO 1 - Espectro de RMN de ^1H em DMSO-d_6 do PH 176.

ANEXO 2 - Espectro de RMN de ^{13}C em DMSO- d_6 do PH 176.