



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

NATHALIE HELEN PAES BARRETO BORGES

**ANÁLISE IN SILICO DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E
TOXICOLÓGICAS DOS ORGANOSSELÊNIOS E ENSAIOS IN VITRO
DE ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E MODULADORA DA
RESISTÊNCIA A DROGAS EM *Staphylococcus aureus***

JOÃO PESSOA – PB

2018

NATHALIE HELEN PAES BARRETO BORGES

ANÁLISE IN SILICO DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E
TOXICOLÓGICAS DOS ORGANOSSELÊNIOS E ENSAIOS IN VITRO
DE ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E MODULADORA DA
RESISTÊNCIA A DROGAS EM *Staphylococcus aureus*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e sintéticos Bioativos, com área de concentração em Farmacologia

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Edeltrudes de Oliveira Lima
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Junior

JOÃO PESSOA – PB

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B732a Borges, Nathalie Helen Paes Barreto.

ANÁLISE IN SILICO DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E TOXICOLÓGICAS DOS ORGANOSSELÊNIOS E ENSAIOS IN VITRO DE ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E MODULADORA DA RESISTÊNCIA A DROGAS EM *Staphylococcus aureus* / Nathalie Helen Paes Barreto Borges. - João Pessoa, 2018.

99 f. : il.

Orientação: Edeltrudes de Oliveira Lima Lima.

Coorientação: José Pinto de Siqueira Júnior Siqueira Júnior.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Microbiologia. 2. Inibidores de bomba de efluxo. 3. Organosselênios. I. Lima, Edeltrudes de Oliveira Lima.

II. Siqueira Júnior, José Pinto de Siqueira Júnior.

III. Título.

UFPB/BC

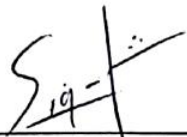
NATHALIE HELEN PAES BARRETO BORGES

**ANÁLISE IN SILICO DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E
TOXICOLÓGICAS DOS ORGANOSSELÊNIOS E ENSAIOS IN VITRO
DE ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E MODULADORA DA
RESISTÊNCIA A DROGAS EM *Staphylococcus aureus***

Tese avaliada em: 17/04/2018

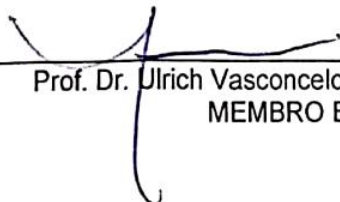
COMISSÃO EXAMINADORA

Profª. Drª. Edeltrudes de Oliveira Lima
ORIENTADORA



Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior
CO-ORIENTADOR

Profª. Drª. Louisa Maria de Andrade e Sousa
MEMBRO EXTERNO



Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
MEMBRO EXTERNO

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
MEMBRO INTERNO

Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior
MEMBRO INTERNO

Prof. Dr. Hemerson Yuri Ferreira Magalhães
MEMBRO INTERNO SUPLENTE

Profª. Drª. Caliandra Maria Bezerra Luna Lima
MEMBRO EXTERNO SUPLENTE

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética de Micro-organismos, do Departamento de Biologia Molecular, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba, subvencionado pelo CNPq, CAPES e FAPESQ/PB

*A Deus e toda a espiritualidade,
aos meus pais, Rildo e Vera,
e ao meu namorado, Mauro.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior, por me aceitar novamente como orientada, por acreditar em mim sempre, por ter paciência e compreensão nos momentos em que tive escolher entre o doutorado e o meu trabalho. Não tenho palavras para agradecer por todos esses anos de ensinamento.

À Prof^a. Dr^a. Edeltrudes de Oliveira Lima, por aceitar ser minha orientadora no último ano do doutorado e por ser tão dedicada e atenciosa com seus orientandos. Não é a toa que é tão querida pelos alunos que a cercam.

Aos pesquisadores do departamento de química, Prof. Dr. Petronio F. de Athayde-Filho, Dr. Helivaldo D. da S. Souza e Dr. Bruno F. Lira, por aparecerem no momento mais que perfeito com as substâncias que fizeram acontecer esta tese. Helivaldo, muito obrigada por sua disponibilidade e ajuda com minhas dúvidas durante estes 4 anos.

Aos membros da banca de qualificação: Dr. Fábio Correia Sampaio, Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior, Dr. Luis Fernando Marques dos Santos e Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida, pela disponibilidade para participarem do exame de qualificação e principalmente por todas as contribuições sugeridas no trabalho. Aprendi muito neste dia e todas as colocações foram muito importantes para aperfeiçoar o presente trabalho.

Aos técnicos de Laboratório de Genética de Microrganismos (LGM), Dona Severina (que se aposentou pouco tempo depois) e Sr. Bosco, por toda a dedicação e comprometimento ao LGM, sempre dispostos para nos ajudar com o preparo de material para experimentos, sempre com um sorriso no rosto e alegria no coração.

Aos meus queridos colegas que durante no doutorado, pelas trocas de experiência e de conhecimento, pelos momentos divertidos e também pelo apoio nos momentos mais complicados e estressantes.

À minha família, pela educação, por todo o esforço, dedicação, preocupação nos estudos e, principalmente, pelo amor incondicional.

A Mauro Castro, meu namorado, pelas palavras de motivação, otimismo, carinho e muita paciência nos momentos mais críticos.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Molecular, pela disponibilidade e convívio agradável.

A Caroline Manguiera e Nilmar de Medeiros, funcionárias do curso de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pela ajuda com a parte burocrática do curso, esclarecimentos, lembretes de prazos e apoio aos alunos.

Aos meus professores da Graduação (Farmácia e Análises Clínicas) e Pós-Graduação, por todos os ensinamentos, de sala de aula e de vida, que foram de grande importância na minha formação profissional e pessoal.

À CAPES, ao CNPq e a FAPESQ-PB, pelo apoio financeiro para elaboração deste trabalho.

*“Não é o mais forte que sobrevive,
nem o mais inteligente,
mas o que melhor se **adapta** às mudanças”.*

Charles Darwin

RESUMO

BORGES, N. H. P. B. Análise *in silico* das propriedades farmacológicas e toxicológicas dos organosselênios e ensaios *in vitro* de atividades antibacteriana e moduladora da resistência a drogas em *Staphylococcus aureus*. Doutorado - Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, 2018.

Dentre diversas classes de compostos sintéticos, os organosselênios têm se mostrado importantes devido ao efeito antibacteriano frente a diferentes espécies. O objetivo do trabalho foi avaliar uma classe de organosselênios, derivados do ácido selenoglicólico, referente a estudos *in vitro* de atividades antibacteriana, moduladora da resistência a drogas e de sinergismo com antibióticos frente às cepas SA-199B, RN-4220 e IS-58, que apresentam resistência a antibióticos por superexpressão das bombas TetK (tetraciclina), MsrA (macrolídeos) e NorA (fluoroquinolonas e múltiplas drogas), respectivamente. Além disso, os organosselênios também foram avaliados quanto às características físico-químicas, tóxicas, de biodisponibilidade oral e de permeabilidade pela barreira hematoencefálica, bem como a interação com Glicoproteína-P e enzimas do citocromo P-450, realizado em estudos *in silico* por meio do software gratuito Swissadme. Além disso, foram realizados estudos *in vitro* referente as atividades antibacteriana, moduladora da resistência a drogas e de sinergismo com antibióticos frente às cepas SA-199B, RN-4220 e IS-58, que apresentam resistência a antibióticos por superexpressão das bombas TetK (tetraciclina), MsrA (macrolídeos) e NorA (fluoroquinolonas e múltiplas drogas), respectivamente. Os organosselênios avaliados se apresentaram de um modo geral como bons candidatos a novos fármacos, por apresentar boa permeabilidade em membrana celular, boa solubilidade em líquidos biológicos, biodisponibilidade oral adequada, interagiram com poucas isoformas do citocromo P-450 e alguns organosselênios apresentaram risco tóxico teórico baixo, quando comparado com antibióticos comerciais. Além disso, HSe-02 e HSe-11 apresentaram capacidade teórica de atravessar barreira hematoencefálica, importante no tratamento de meningites bacterianas. Nos estudos *in vitro*, HSe-01, HSe-06 e HSe-09 mostraram atividade antibacteriana moderada, com CIM de até 64 µg/mL em cepas que superexpressam bombas de efluxo. No ensaio da modulação da resistência a drogas, todas as combinações em HSe/Tet reduziram a CIM de tetraciclina em até 256 vezes. Combinações HSe/Eri também mostraram atividade moduladora promissora, com redução da CIM de eritromicina em até 16 vezes. A associação entre organosselênios e brometo de etídio reduziu a CIM deste em até 8 vezes, sugerindo algum tipo de interação, direta ou indireta com bombas de efluxo. Vários organosselênios foram capazes de reduzir a CIM do substrato de bomba NorA, berberina, potencializando o efeito desta substância. Os resultados aqui apresentados mostraram que derivados do ácido selenoglicólico podem ser utilizados para potencializar o efeito de agentes antimicrobianos, de modo a facilitar a reintrodução de antibióticos atualmente ineficazes para o tratamento clínico de infecções multirresistentes.

Palavras-chave: Organosselênios, inibidores de bombas de efluxo, derivados do ácido selenoglicólico, antibióticos.

ABSTRACT

BORGES, N. H. P. B. **In silico analysis of pharmacological and toxicological properties of organoselenes and in vitro assays of antibacterial and drug resistance modulating activities in *Staphylococcus aureus***. Doctoral thesis - Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, 2018.

Among several classes of synthetic compounds, organelles have been shown to be important due to the antibacterial effect of different species. The objective of this study was to evaluate a class of organoselenium compounds, derived from selenoglycolic acid, regarding the physical-chemical, toxic, oral bioavailability and permeability characteristics of the blood-brain barrier, as well as interaction with P-glycoprotein and cytochrome P-450 enzymes, performed *in silico* studies through a free software, Swissadme. In addition, *in vitro* studies on antibacterial activities, drug resistance modulators and antibiotic synergism were carried out against SA-199B, RN-4220 and IS-58 strains, which are resistant to antibiotics due to overexpression of TetK (tetracycline), MsrA (macrolides) and NorA (fluoroquinolones and multiple drugs) efflux pumps, respectively. The organoselenium compounds evaluated were generally good candidates for new drugs because they had good cell membrane permeability, good solubility in biological fluids, adequate oral bioavailability, interacted with few cytochrome P-450 isoforms and some organoselenium compounds presented theoretical toxic risk when compared with commercial antibiotics. In addition, HSe-02 and HSe-11 presented theoretical ability to cross a blood-brain barrier, important in the treatment of bacterial meningitis. In the *in vitro* studies, HSe-01, HSe-06 and HSe-09 showed moderate antibacterial activity, with MIC up to 64 µg/mL in strains that overexpress efflux pumps. In the drug resistance modulation assay, all HSe/Tet combinations reduced tetracycline MIC by up to 256-fold. HSe/Eri combinations also showed promising modulatory activity, with erythromycin MIC reduced by up to 16-fold. The association between organoselenium compounds and ethidium bromide reduced its MIC up to 8-fold, suggesting some kind of interaction, either directly or indirectly with efflux pumps. Several organoselenium compounds were able to reduce the MIC of the NorA pump substrate, berberine, potentializing the effect of this substance. The results presented herein have shown that class of selenoglycolic acid derivatives can be used to potentiate the effect of antimicrobial agents in order to facilitate the reintroduction of currently ineffective antibiotics for the clinical treatment of multiresistant infections.

Keywords: Organoselenium, efflux pumps inhibitors, selenoglycolic acid derivatives, antibiotics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de resistência a drogas em bactérias e antibióticos relacionados.	19
Figura 2. Diagrama esquemático de bombas de efluxo em bactérias Gram-positivas	22
Figura 3. Estrutura dos organosselênios analisados no estudo	34
Figura 4. Gráficos <i>BOILED-Egg</i> e <i>Bioavailability Radar</i>	35
Figura 5. Esquema representativo da distribuição dos antibióticos e organosselênios na microplaca no ensaio de sinergismo	37
Figura 6. Radar de biodisponibilidade	41

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Análise *in silico* de organosselênios em estudo

Quadro 1. Comportamento farmacocinético dos organosselênios mediante padrões de absorção, interação com p-GP e inibição das isoformas da enzima citocromo P-450 oxidase 42

Tabela 2. Estudo de toxicidade dos organosselênios 45

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima de organosselênios e antibióticos em cepas de *Staphylococcus aureus* 46

Tabela 4. CIM e índice de concentração inibitória fracionada (FICI) da combinação entre antibióticos e organosselênios frente a *Staphylococcus aureus* 49

Tabela 5. Ensaio combinado entre organosselênios e berberina, brometo de etídio e norfloxacino em cepa SA-1199B (NorA) 51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Correlação entre WLogP e TPSA, na forma de BOILED-Egg, para os organosselênios. 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABC** - Superfamília *ATP binding cassette*
- ADMET** - Absorção, Distribuição, Metabolismo, Eliminação, Toxicidade
- AMPs** - Peptídeos antimicrobianos
- AST** - Teste de Sensibilidade Antimicrobiana
- ATCC** - *American Type Culture Collection*
- BAB** - *Blood Agar Base*
- BHE** - Barreira hematoencefálica
- BHI** - *Brain and Heart Infusion*
- CBM** - Concentração Bactericida Mínima
- CIM** - Concentração Inibitória Mínima
- CPZ** - Clorpromazina
- DMSO** - Dimetilsulfóxido
- EPI** - *Efflux Pump Inhibitors*
- MDR** - Resistência múltipla as drogas
- MM** - Massa Molar
- MRSA** - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
- MSF** - *Major Facilitator Superfamily*
- MsrA** - Proteína de efluxo para eritromicina
- MSSA** - *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina
- NAB** - *Nucleic acid binding*
- nALD** - Número de aceptores de Hidrogênio
- NCCLS** - *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
- nDLH** - Número de doadores de Hidrogênio
- NorA** - Proteína de efluxo para fluoroquinolonas e outras substâncias
- Orf's** - *Opened Read Frame*
- P-gp** - Glicoproteína-P
- PMF** - Força Motriz Protônica
- RND** - *Resistance/Nodulation/Division*
- SMR** - *Small Multidrug Resistance*
- TetK** - Proteína de efluxo para tetraciclina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Evolução da resistência bacteriana	17
2.2 Mecanismos de resistência bacteriana	19
2.3 Bombas de efluxo (Proteínas transportadoras)	22
2.4 Inibidores de bomba de efluxo naturais e sintéticos	24
2.5 Organosselênios de interesse biológico	28
2.6 Estudos <i>in silico</i> na seleção ou otimização de candidatos a novos fármacos	29
3. OBJETIVOS	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Local de estudo	34
4.2 Linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i>	34
4.3 Antibióticos, brometo de etídio e berberina	34
4.4 Organosselênios	35
4.5 Análise <i>in silico</i> em relação a parâmetros farmacocinético, toxicidade e interação com proteínas e enzimas	35
4.6 Avaliação da atividade antibacteriana	37
4.6.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	37
4.6.2 Atividade moduladora da resistência a agentes antimicrobianos	37
4.6.3 Ensaio de sinergismo	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Estudo <i>in silico</i> dos organosselênios	40
5.1.1 Propriedades físico-químicas	40
5.1.2 Interações de organosselênios com proteínas e enzimas	43
5.1.3 Toxicidade <i>in silico</i>	45
5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos organosselênios	47
5.3 Atividade moduladora frente antibióticos, brometo de etídio e berberina	49
5.4 Ensaio de sinergismo entre antibióticos e organosselênios	52
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
REFERÊNCIAS	59
APÊNDICE	84

Introdução

O número crescente de infecções e o surgimento de micro-organismos cada vez mais resistentes a antibióticos tornam a química medicinal imprescindível para a saúde pública. Desde o sucesso com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming (1928), grandes esforços ocorreram por parte do governo, empresas farmacêuticas e grupos de pesquisa acadêmicos, a fim de se descobrir outras alternativas para o tratamento de infecções bacterianas.

A introdução dos antibióticos para quimioterapia das infecções bacterianas foi uma das mais importantes realizações da medicina nos últimos 70 anos. Entretanto, o consequente aparecimento da resistência aos antimicrobianos minou a utilidade terapêutica dos agentes existentes, criando a necessidade, cada vez maior, da descoberta de novas drogas antibacterianas. Para tanto, diversas estratégias emergiram, incluindo o aperfeiçoamento de antibióticos existentes por manipulação química e a procura por novos alvos de drogas.

Uma estratégia alternativa é a busca por um melhor entendimento sobre mecanismo de ação dos antibióticos já existentes. Assim, o conhecimento dos sítios de ação de agentes antimicrobianos já em uso clínico pode direcionar para a descoberta de novos alvos ainda não explorados. Atualmente, os estudos se preocupam mais em desvendar os processos bioquímicos e as vias metabólicas que envolvem a ação de antibióticos, podendo assim, lançar mão de protocolos mais eficientes para o tratamento de infecções.

Uma abordagem para o problema da resistência envolve o desenvolvimento de análogos aos antibióticos existentes, mas que não sofram ação enzimática, não sejam substratos de bombas de efluxo ou se liguem ao alvo modificado presente na bactéria resistente. Essa abordagem clássica em muito contribuiu para contornar o problema da resistência durante todos esses anos. No entanto, os efeitos biológicos por muitas vezes tiveram vida curta, já que novas variantes bacterianas surgiram com mecanismos de resistência que faziam frente aos novos análogos.

Neste contexto, os produtos naturais são de grande importância a partir do momento que estão disponíveis na natureza os metabólitos secundários com potente atividade antibacteriana, que atuam como agentes defensores de plantas contra pragas e outros animais, por exemplo. No entanto, o tempo destinado à pesquisa inicial para a busca de um composto natural com atividade antibacteriana, além dos custos para o processo de extração, isolamento e identificação destas

substâncias, se faz necessário o uso de outras ferramentas para a otimização do tempo entre a descoberta e o possível uso de determinado fármaco na clínica.

A química medicinal tem sido importante no processo de pesquisa de novos fármacos, pois é uma ciência que estuda aspectos que envolvem a descoberta, invenção e preparação de moléculas bioativas de interesse terapêutico, incluindo a compreensão da interação entre o alvo e a droga, ou relação entre estrutura química e atividade (SAR, do inglês, *Structure-activity Relationships*). Juntamente com abordagens *in silico*, ou seja, análises computacionais que permitem obter informações técnicas da molécula, com base em suas propriedades físico-químicas e também prever possíveis efeitos biológicos, é possível aperfeiçoar moléculas e avaliar análogos, de modo a otimizar o tempo de síntese de determinada molécula com algum valor biológico.

O interesse de utilizar compostos orgânicos contendo selênio no presente estudo parte da importância de suas propriedades fisiológicas em sistemas vivos, bem como de suas propriedades tóxicas também. O selênio é um elemento muito ativo em sítios biológicos e a presença deste componente na molécula pode ser crucial para o efeito antibacteriano e/ou modulador da resistência a drogas em *Staphylococcus aureus* resistentes por superexpressão de bombas de efluxo.

Diante disso, o que se espera é que futuras estratégias de pesquisa devam ir além do antigo paradigma da “manipulação sintética das classes estruturais já existentes”. A prioridade deveria ser a busca por novas alternativas, seja para identificar novas estruturas com diferentes mecanismos de ação ou descobrir novos compostos que atuem em associação com antibióticos existentes, renovando o uso destes.

Referencial teórico

2.1 EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA

No início do século XX, as doenças infecciosas foram a principal causa de morte em todo o mundo e, com o passar dos anos, as reduções na morbidade e mortalidade por infecções bacterianas foram atribuídas, principalmente, a introdução de drogas antimicrobianas (COHEN, 2000; GOLD; MOELLERING, 1996). No Brasil, as doenças infecciosas ainda representam um grave problema de saúde pública, muito embora a proporção do total de mortes causadas pelas mesmas tenha caído de 50% para 15% ao longo dos últimos 50 anos (WALDMAN; SATO, 2016).

O surgimento de uma era de tecnologias avançadas e inovadoras para a elucidação do mecanismo de diversas patologias e a descoberta de novas drogas concebidas molecularmente, induziu a uma percepção otimista de que doenças infecciosas perderiam sua relevância com o aumento do desenvolvimento econômico e melhores condições de vida.

No entanto, os fatos contrariam essas expectativas e as infecções bacterianas ainda continuam a ser um dos maiores desafios da área de saúde em todo o mundo (FAUCI; MORENS, 2012). Um dos exemplos mais impactantes do efeito do intenso crescimento populacional, foi a disseminação de epidemias mortais durante a expansão e colonização europeia, que dizimaram diversas populações nativas nas Américas e na Oceania (FIDLER, 1996).

Em meados do século XIX, a alta prevalência de doenças infecciosas, como tuberculose, sífilis e febre puerperal, já havia despertado o conhecimento sobre medidas sanitárias, como técnicas de lavagem das mãos e esterilização, adotadas previamente a procedimentos cirúrgicos e obstétricos. Nesta mesma época, grandes esforços foram empregados para a descoberta de antibióticos eficazes (LISTER, 1937).

Os primeiros antibióticos eram substâncias produzidas por diversas espécies de micro-organismos que inibiam o desenvolvimento de outros micro-organismos. Assim, começou a se associar tais substâncias como uma forma de tratamento de doenças infecciosas (FERREIRA; PAES; LICHTENSTEIN, 2008). Em 1928, Alexander Fleming descobriu a penicilina a partir de uma grande ação do acaso, ao deixar acidentalmente amostra de *Staphylococcus aureus* ser contaminada por esporos do fungo *Penicillium notatum*, que cresceu na placa e causou um halo de

inibição do crescimento de *S. aureus*. Porém, muito antes deste acontecimento, por volta de 1850, pesquisadores como Paul Ehrlich e John Tyndall já relatavam que a presença de *P. notatum* levava a um estado de morte ou "inativação" nas bactérias (KENNEDY, 2004).

Até a década de 60, os agentes antimicrobianos naturais descobertos até então, apresentavam o inconveniente de permitir o desenvolvimento da resistência a drogas, sem mencionar os efeitos adversos ao organismo humano, muitas vezes causando toxicidade intolerável (FERNEBRO, 2011). Alternativas para resolver tais problemas incluíam a descoberta de novos agentes antimicrobianos ou a modificação química de drogas utilizadas na clínica. Assim, os compostos semissintéticos foram relatados após os primeiros casos de resistência aos antibióticos naturais descritos na literatura, a fim de otimizar a atividade antimicrobiana de moléculas que não eram mais eficazes (TRABULSI, 2005; RAWAT; NAIR, 2010).

A descoberta do processo semissintético de obtenção de novas penicilinas, tais como meticilina e oxacilina, trouxe certa tranquilidade na terapêutica antiestafilocócica e consequente desaceleração nos investimentos de empresas farmacêuticas em programas de desenvolvimento de novos agentes antibacterianos (STEFANI; VARALDO, 2003; RANJAN; RANJAN; GANDHI, 2013). No entanto, o uso acelerou o aparecimento de cepas resistentes, denominadas MRSA (*Staphylococcus aureus* meticilina-resistente), cujo padrão de resistência se estende a outros antibióticos beta-lactâmicos (DELEO et al., 2010; STRYJEWSKI; COREY, 2014).

Bactérias multirresistentes, como MRSA, eram comuns apenas em ambientes hospitalares, até que começaram a surgir em infecções na comunidade, devido à fácil disponibilidade de muitos antibióticos e consequente uso excessivo e indiscriminado. A grande preocupação de MRSA não é devido somente a resistência à meticilina, mas também porque geralmente é resistente a vários outros antibióticos utilizados comumente, o que torna mais preocupante o tratamento de infecções (WILCOX et al., 2017).

A utilidade clínica de outros antibióticos importantes, como aqueles das classes das fluoroquinolonas, tetraciclina e macrolídeos também foi significativamente impactada pelo surgimento e difusão de traços de resistência

baseados no efluxo de drogas. No entanto, caracterização dos sistemas de efluxos em bactérias Gram positivas e Gram negativas forneceram uma base de conhecimento para a geração de derivados orgânicos capazes de contornar este mecanismo de resistência (CHOPRA, 2002; ASAKA; MANAKA; SUGIYANA, 2003; BUTAYE; CLOECKAERT; SCHWARZ, 2003; SUBRAMANI et al., 2017).

Nas classes das tetraciclinas e macrolídeos, foram desenvolvidos análogos semissintéticos denominados de glicilciclinas e cetolídeos, respectivamente, que diferem dos seus progenitores devido ao fato de não serem substratos de alta afinidade para as bombas de efluxo pertinentes, mostrando atividade antibacteriana eficaz em cepas clínicas que ostentam de sistemas ativados de efluxo (CHOLLET et al., 2004; SHORTRIDGE et al., 2002; ZHANEL et al., 2003). Da mesma forma ocorreu com as novas fluoroquinolonas desenvolvidas, tais como: moxifloxacina, gemifloxacina, gatifloxacina e garenoxifloxacina, que também não são afetadas pelas proteínas de efluxo MDR, NorA (*Staphylococcus aureus*) e PmrA (*Streptococcus pneumoniae*) (LOMOVSKAYA; BOSTIAN, 2006).

Até o momento, não havia garantia de que o desenvolvimento de novas drogas poderia retardar ou bloquear o surgimento de resistência bacteriana. Infecções causadas por cepas multirresistentes têm crescido de forma alarmante e a evolução rápida e contínua da resistência a agentes antimicrobianos tem prejudicado a saúde humana, de modo que a inclusão de novos antibióticos é uma necessidade crítica não atendida (HUMPHRIES; HINDLER, 2016). Um exemplo desta problemática é a classe de antibióticos oxazolidinonas, a qual tem como representante mais conhecido a linezolida, que teve seu uso clínico aprovado no ano de 2000 para o tratamento de infecções causadas por cepas resistentes à vancomicina e, no entanto, no ano seguinte já haviam sido descritas linhagens resistentes a este antibiótico (GONZALES et al., 2001; ANDEREGG et al., 2005).

É visível que o uso generalizado e indevido de antibióticos, mesmo daqueles recentemente adicionados à terapia clínica, esteja associado à seleção e disseminação de cepas resistentes em curto período de uso. Medidas de administração são necessárias para otimizar o uso de antimicrobianos, o que inclui relatórios específicos, prescrição diversificada para evitar o uso excessivo de antibióticos e uso de testes de susceptibilidade antimicrobiana (AST) para prever

eficácia clínica e por fim controlar o surgimento de resistência bacteriana (LEEKHA; TERRELL; EDSON, 2011).

Ao contrário do que se espera, foi verificado um atraso considerável entre a aprovação de novos antibióticos para uso clínico e a disponibilidade de painéis comerciais de AST, o que impossibilita a aplicação de um tratamento adequado. Estudo realizado com tedizolida, uma nova e potente oxazolidinona, mostrou que o tempo estimado para a inclusão do painel de AST em equipamentos automatizados seria de aproximadamente 5 anos. Atualmente, este fármaco é utilizado em países da América do Norte e União Europeia para tratamento de infecções graves de pele causadas por MRSA e VRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina), porém não é possível determinar sua susceptibilidade, pois os dados são extrapolados utilizando linezolida como substituto (BARTSCH et al., 2016; WILCOX et al., 2017).

O uso clínico de antibióticos para tratamento de infecções bacterianas acelera o surgimento de resistência bacteriana, porém outra possibilidade, ainda pouco explorada, é que a resistência pode ocorrer coincidentemente devido a outras pressões seletivas presentes no meio. Um importante estudo de Knöppel e colaboradores (2017) mostrou que a adaptação de bactérias em ambientes naturais, na ausência de antibióticos, pode impulsionar a um acúmulo de mutações e conferir a diminuição da susceptibilidade a antibióticos. Foram avaliadas 52 cepas evoluídas frente a 10 antibióticos de diferentes classes e foi observado um aumento significativo da CIM (2 a 32 vezes) em 3,5% (18/520) das combinações testadas.

Estudos anteriores mostraram o mesmo comportamento relacionado a outros antibióticos. Cepas resistentes a rifampicina e ácido nalidíxico, por exemplo, foram selecionadas na ausência destes antibióticos em colônias tardias (KATZ; HERSHBERG, 2013) e cepas resistentes a estreptomicina foram selecionadas a partir de meios pobres em carbono (VERDUGO; TENAILLON, 2013), sugerindo que o aumento da aptidão em bactérias mutantes de RNA polimerase, *gyrA*, e *rpsL*, respectivamente, poderiam ter causado diminuição da susceptibilidade a antibióticos devido à resposta ao estresse bacteriano.

Uma explicação para o surgimento de resistência bacteriana é que não há fronteira estrita entre mutações de resistência e mutações de adaptação ao meio. Desta forma, mutações com efeitos regulatórios globais, com a finalidade de

aumentar a aptidão física do micro-organismo podem diminuir também a susceptibilidade de antibióticos por mecanismos pleiotrópicos, ou seja, quando a mutação de um único gene pode influenciar várias características da bactéria (BRANDIS et al., 2012; KNÖPPEL; NÄSVALL; ANDERSSON, 2017).

Este padrão desafiador e dinâmico das doenças infecciosas e o aparecimento de cepas resistentes a múltiplos antibióticos demandam soluções em longo prazo. De forma concomitante às classes de antibióticos tradicionais, outras alternativas têm sido levadas em consideração para o tratamento de doenças infecciosas, como por exemplo, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) (MAHLAPUU, 2016), estratégias de anti-virulência (RAMPIONI et al., 2017), terapia com fagos (FRANKLIN et al., 2015), anticorpos terapêuticos (BAGNOLI, 2017), inibidores de bombas de efluxo (VARGIU et al., 2016), nanopartículas antimicrobianas (SMEKALOVA et al., 2016) e vacinas antibióticas (BAGNOLI, 2017).

AMPs com ação em Gram-positivas foram isolados do conteúdo de leite humano (POWERS; HANCOCK, 2003) e da hemolinfa de *Triatoma infestans* (DINIZ, 2016). Tetrapeptídeos constituído de aminoácidos incomuns foram isolados dos fungos *Streptomyces* spp. e *Phoma* spp. com atividade antibiótica (ONDEYKA et al., 2014).

A busca pela descoberta de promissores candidatos a antibióticos envolve também estudos químicos de bactérias endossimbiontes, ou seja, micro-organismos que normalmente não apresentam efeito deletério aparente aos seus hospedeiro. Estudos químicos deste tipo de bactéria isolada de tecidos de pulga *Ceratophyllus* spp. e do intestino da larva da libélula *Ceoenagrion* spp. permitiram o isolamento de dois compostos antibacterianos: bacitracina e amicoumacina B, respectivamente (GEBHARDT et al., 2002).

Além disso, uma variedade de substâncias empregadas no tratamento de doenças não infecciosas têm mostrado algum tipo de ação inibitória frente a bactérias em estudos *in vitro* e *in vivo*. Tais compostos são chamados de drogas “não-antibióticas” e tem como principais exemplos a prometazina, clorpromazina, tioridazida, verapamil, diclofenaco de sódio, clavulanato, entre outros (MAZUMDAR et al., 2006; KONG et al., 2016). O aumento do efeito antimicrobiano e a reversão da resistência aos antibióticos tradicionais proporciona a classificação destes compostos como modificadores da atividade antibacteriana.

2.2 MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA

As bactérias estão em processo de evolução há mais de 3,5 bilhões de anos e são, indiscutivelmente, os organismos mais adaptáveis da terra, com capacidade de habitar os lugares mais inóspitos possíveis. O surgimento de bactérias resistentes a drogas pode ser considerado uma manifestação natural regida pelo princípio evolutivo de organismos a partir de mudanças que ocorrem no seu ambiente, bem como pode estar relacionada com o uso de agentes antimicrobianos (GOLDSTEIN; CITRON, 2011). Desta forma, cepas variantes podem ser selecionadas a partir de uma população naturalmente susceptível ou pela aquisição dos chamados “genes de resistência” (CANTÓN; RUIZ-GARBAJOSA, 2011).

A frequência de mutações em populações bacterianas é extremamente baixa, aproximadamente uma a cada 10^9 a 10^{10} células por divisão (BRIDGE, 2001). No entanto, durante um processo infeccioso é formado um número bem maior de micro-organismos no local afetado, podendo ter alvos de antimicrobianos alterados, supressão dos sistemas de inativação ou aumento do efluxo de drogas (LIVERMORE et al., 2003). De modo semelhante ocorre com tratamentos em nível subterapêutico, com crescimento e proliferação de cepas resistentes (KOHANSKI; DePRISTO; COLLINS, 2010).

Desta forma, a resistência bacteriana pode ocorrer de forma ativa, como resultado de uma determinada pressão evolutiva que leva à adaptação, gerando um mecanismo de defesa contra um antibiótico ou uma classe de antibióticos, ou, passiva, como consequência de processos adaptativos não necessariamente relacionados à presença do fármaco (WRIGHT, 2005; WILLERS et al., 2016). O principal mecanismo para rápida disseminação de genes de resistência a antibióticos é por meio dos plasmídios, produzidos de forma independente e facilmente transportados entre bactérias, seja patogênica ou não-patogênica (WRIGHT, 2007). Além disso, alguns destes genes podem ser segregados dentro de *transposons*, a partir do DNA cromossômico e transferir-se para outros locais, movendo a carga genética que confere resistência ao agente antimicrobiano (HUGHES; DATTA, 1987).

No geral, os micro-organismos podem usar um ou vários mecanismos contra um droga específica ou uma classe de antibióticos, bem como uma única alteração

do alvo pode comprometer a ação de diferentes agentes não relacionados estruturalmente (CHEN; CHOPRA; KAYE, 2011). De acordo com a figura 1, dentre os mecanismos de resistência descritos para bactérias, aqueles que ocorrem especificamente em bactérias Gram-positivas podem ser classificados em quatro grupos distintos (ASTOLFI et al., 2017):

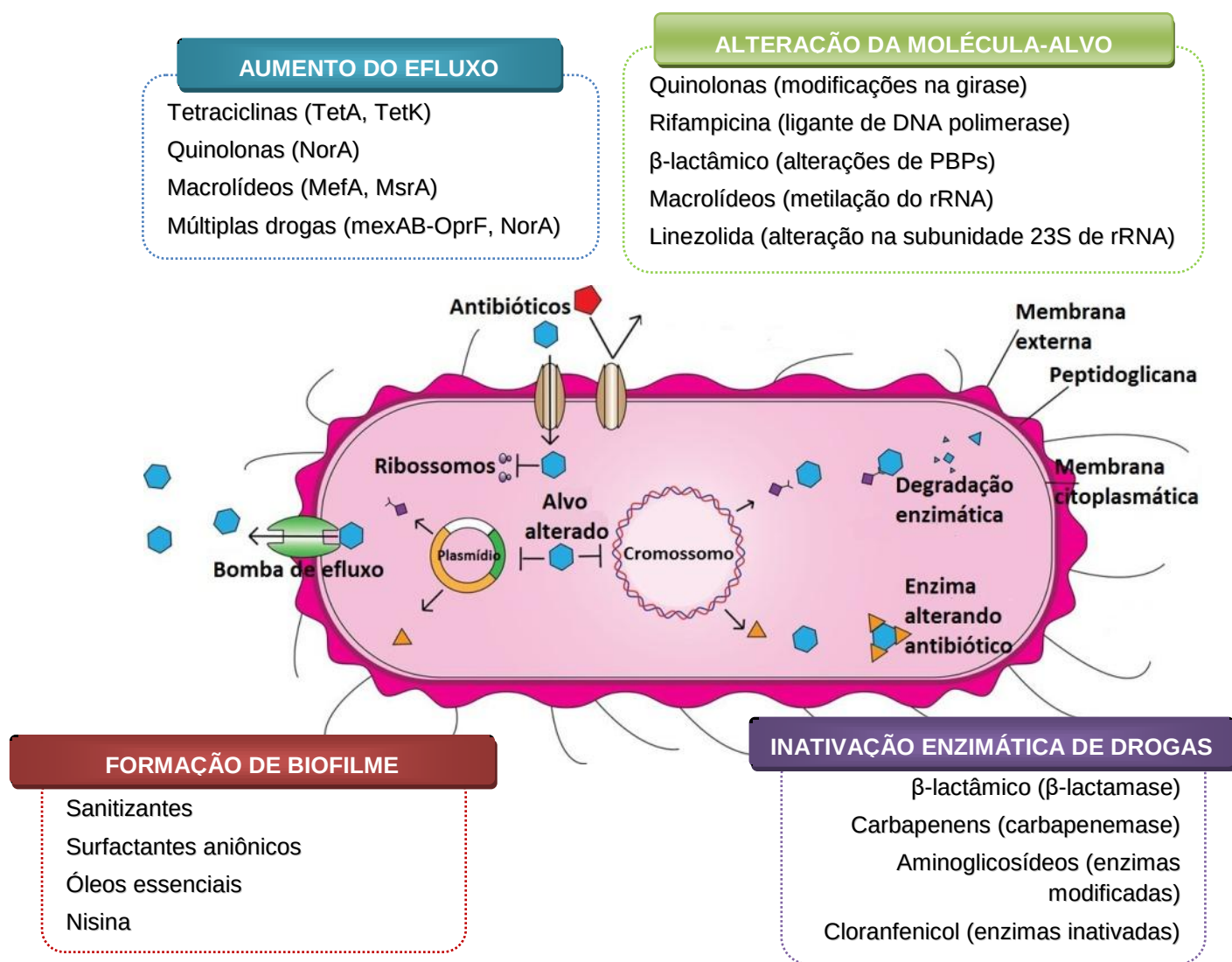


Figura 1. Mecanismos de resistência a drogas em bactérias e antibióticos relacionados.

Fonte: adaptado (MUKERJI et al., 2017).

I. Inativação enzimática de drogas: Um dos exemplos clássicos é a inativação do anel beta-lactâmico de penicilinas e cefalosporinas pela produção de enzimas hidrolíticas por cepas resistentes, denominadas β -lactamases. O arranjo firme dos quatro membros do anel β -lactâmico permite funcionalidade ativa das drogas, que

atuam por modificar irreversivelmente a configuração estrutural da parede celular (ABRAHAM; CHAIN, 1940). Outros exemplos de enzimas também incluem esterases, que tem sido associada à resistência aos macrolídeos e resistência a fosfomicina, por meio da abertura do anel pela ação das epoxidases (MORAR et al., 2012; D'COSTA; WRIGHT, 2017).

II. Alteração da molécula-alvo: Penicilina, bacitracina, vancomicina e novobiocina são alguns exemplos de agentes antimicrobianos que inibem a síntese da parede celular, ao se ligarem no dipeptídeo terminal D-Ala-D-Ala do peptídeoglicano de bactérias Gram-positivas. A resistência a estes antibióticos envolve genes que codificam uma via de expressão incomum de enzimas que reduzem o piruvato a D-lactato e adiciona D-alanina e D-lactato juntos para produzir ligações do tipo D-Ala-D-Lac (WALSH, 1996). Esta modificação produz uma interação eletrostática repulsiva no lugar da ligação do hidrogênio e em consequência, a afinidade do fármaco com a camada de peptídeoglicano diminui em um fator superior a 1000 vezes (BUGG, 1991).

III. Formação de biofilme: Bactérias aderidas a biofilmes resistem melhor a condições desfavoráveis do ambiente, dentre eles, ação de antibióticos e sanitizantes, em razão da dificuldade de difusão dos mesmos. A pesquisa de antimicrobianos que impeçam ou reduzam a formação de biofilme bacteriano é de importância estratégica (CHAO; BERGENFELZ; HAKANSSON, 2016). Nisina, uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis*, tem uso autorizado em alimentos em diversos países e é eficaz contra diversas bactérias, principalmente em Gram-positivas (GUPTA; SINGH; KHAN, 2017).

IV. Aumento do efluxo: Proteínas transportadoras de membrana, denominadas bombas de efluxo, são responsáveis pela saída de substâncias do meio citoplasmático de organismos vivos, incluindo bactérias. O transporte do fármaco para o meio extracelular permite uma concentração insuficiente para atuar como bloqueador das funções celulares bacterianas (VARELA et al, 2017).

2.3 BOMBAS DE EFLUXO (PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS)

O efluxo ativo foi descrito pela primeira vez em bactérias no ano de 1980, como mecanismo causador de resistência a tetraciclinas (McMURRY; PETRUCCI; LEVY, 1980). Posteriormente, as bombas de efluxo foram relacionadas como um mecanismo de amplo espectro, que comprometem a eficácia de uma ampla variedade de antibióticos e são expressas de diferentes formas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (KALIA et al., 2012).

O mecanismo de resistência por proteínas de efluxo envolve a utilização de energia metabólica para transportar drogas e substâncias tóxicas contra o gradiente de concentração, que pode ser específico a uma determinada droga ou pode conferir afinidade a uma variedade de compostos estruturalmente e funcionalmente não relacionados, caracterizando a resistência a múltiplas drogas (MDR - *MultiDrug Resistance*) (ABULROB et al., 2004; CHITSAZ; BROWN, 2017). De um modo geral, as bombas de efluxo podem ser classificadas em dois grupos principais (Figura 2):

I. Transportadores dependentes de ATP (ABC Transporters): realizam o transporte ativo primário e utilizam a energia de hidrólise da molécula de ATP para expelir a droga da célula contra o gradiente de concentração. Um dos membros desta família, a proteína MsrA confere resistência induzida a eritromicina e estreptograminas do tipo B no gênero *Staphylococcus* (AWADY et al., 2016).

II. Força motriz protônica (PMF): transportadores do tipo antiporte que expulsam a droga à custa da energia liberada pelo transporte secundário dos íons H^+ ou Na^+ a favor do gradiente eletroquímico. Podem ser subdivididas em diversas famílias baseada na homologia da sequência de aminoácidos e estrutura secundária. Fazem parte destes transportadores: *Major Facilitator Superfamily* (MFS), *Small Multidrug Resistance* (SMR), *Multi Antimicrobial Extrusion* (MATE) e *Resistance/Nodulation/Division* (RND). A última, em particular, tem papel clinicamente relevante na resistência de bactérias Gram-negativas (POOLE; PORTUGAL, 2005; VARELA et al., 2017).

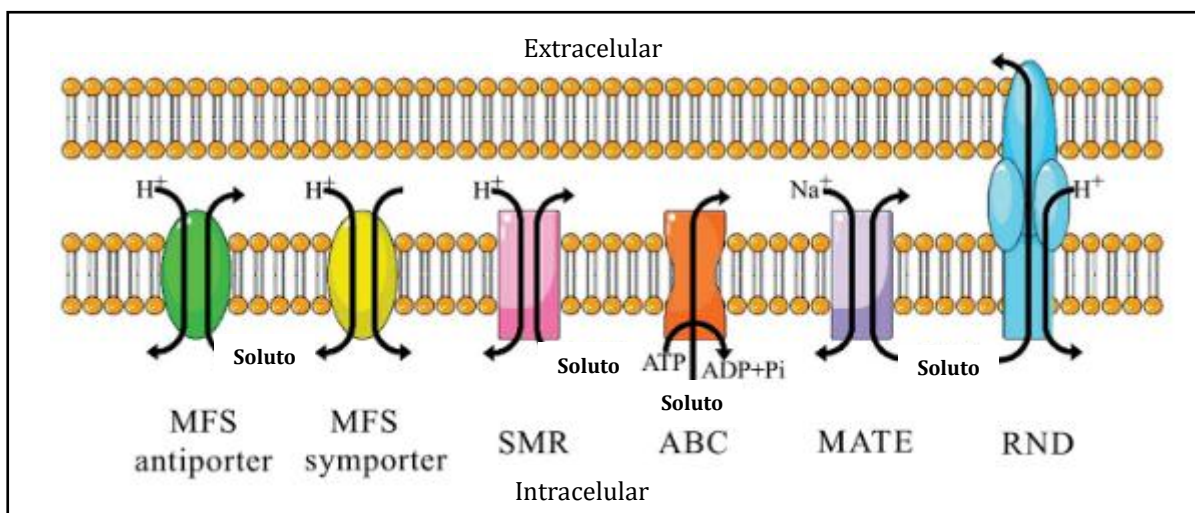


Figura 2. Diagrama esquemático de bombas de efluxo em bactérias Gram-positivas
Fonte: Varela et al., 2017.

Além dos diferentes tipos de energia metabólica que as compõem, as bombas de efluxo ainda podem ser caracterizadas pelo número de proteínas que compõem a bomba, o número de domínios da proteína transportadora que abrangem a membrana plasmática, tipos de substratos expulsos através da bomba, tipos de compostos que inibem o efluxo de substratos por competição com o sítio ativo do transportador ou por inibição não competitiva.

O efluxo ativo de substâncias confere um nível moderado de resistência, levando a um aumento da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em até 64 vezes, em detrimento do aumento da expressão de bombas de efluxo, além do sinergismo com outras formas de resistência (BROSKEY, 2000). A superexpressão das bombas de efluxo também pode estar relacionada à quimioterapias subinibitórias (LOMOVSKAYA, 1999; CHITSAZ; BROWN, 2017).

As famílias de bombas de efluxo ABC, SMR e MFS representam sistemas de efluxos importantes em bactérias Gram-positivas, sendo a última a mais prevalente, que inclui proteínas transportadoras de 12 a 14 domínios transmembrana, com capacidade de transportar açúcares, metabólitos intermediários e drogas, que podem ser representadas pelas proteínas NorA e TetK (GIBBONS, 2008).

Por outro lado, a superfamília ABC transporta uma variedade de substâncias não relacionadas molecularmente: açúcares, aminoácidos, íons, drogas, polissacarídeos e proteínas, representada principalmente pela proteína MsrA, específica para macrolídeos (REYNOLDS et al., 2003). Como representante da

família SMR, tem-se a proteína QacA que possui 4 domínios transmembrana e expulsa corantes, drogas e cátions (CHAN et al., 2013).

Um número importante destas proteínas tem sido relacionado com infecções comunitárias e nosocomiais por *S. aureus*, incluindo principalmente NorA, transportador MDR responsável pelo efluxo de uma ampla variedade de compostos orgânicos não relacionados, incluindo fluoroquinolonas hidrofílicas e compostos NAB (*Nucleic Acid Binding*), tais como os compostos de amônio quaternário (cloreto de benzalcônio e cetrimida) e corantes intercalantes de DNA (brometo de Etídio e acriflavina) (KAATZ, 2003; TINTINO et al., 2016), os quais tem grande importância em estudos com bombas de efluxo.

A medição do acúmulo brometo de etídio no interior da bactéria é o estudo mais detalhado para avaliação de atividade moduladora de novos compostos, por ser substrato de diversas bombas de efluxo MDR e a única forma de resistência bacteriana adquirida pelo brometo de etídio ocorre exclusivamente por meio de bomba de efluxo (BLAIR; PIDDOCK, 2016). Outros ensaios similares podem ser realizados com acriflavina ou pironina Y (KAATZ et al., 2000; KAATZ et al., 2003).

2.4 INIBIDORES DE BOMBA DE EFLUXO (EPis) NATURAIS E SINTÉTICOS

Diversos compostos químicos, de origem natural ou sintética, têm sido relatados como inibidores de bombas de efluxo, de modo a atuar como importantes ferramentas adicionais no desenvolvimento de fármacos co-formulados com o antibiótico apropriado, com interesse similar aos inibidores de beta-lactamases.

A identificação e desenvolvimento de inibidores de bombas de efluxo (EPis - *efflux pump inhibitors*) seguros e eficazes são de grande importância e espera-se que tais moléculas tenham características específicas: capacidade de redução da resistência intrínseca de bactérias a antibióticos, reverter à resistência adquirida até mesmo em cepas MDR, além de reduzir a frequência de aparecimento de resistência em cepas mutantes (KVIST; HANCOCK; KLEMM, 2008; JOSHI et al., 2014). Esta abordagem, no entanto, parece ser muito difícil por conta dos efeitos potenciais e colaterais em transportadores de efluxo de células eucarióticas, podendo gerar efeitos adversos graves em seres humanos.

Deve ser enfatizado que a maioria dos inibidores disponíveis exibem efeitos em células humanas, dentre eles vários medicamentos não antibióticos: reserpina, omeprazol, derivados da fenotiazina, verapamil, sertralina, paroxetina, clorpromazina e sideróforos. Além disso, altas concentrações são necessárias para a atividade dos EPIs, resultando em janelas terapêuticas muito estreitas (BAMBEKE et al., 2003). Diversos candidatos a inibidores foram testados em ensaios pré-clínicos, porém, até então, nenhum inibidor foi aprovado para uso clínico (WILLERS et al., 2016).

Clorpromazina, uma droga amplamente utilizada na clínica como antagonista de receptores dopaminérgicos, tem sido relatada como inibidor do sistema de efluxo MDR em *S. aureus*, exibindo ação sinérgica ou aditiva sobre os substratos da bomba (KAATZ et al., 2003). Outros fármacos, como trifluoperazina, verapamil e ciclosporina A, são conhecidos como inibidores da resistência MDR em mamíferos, atuando em bombas de efluxo de *Saccharomyces cerevisiae*, bem como na proteína transmembrana glicoproteína-P (P-gp), responsável por modular o efluxo de xenobióticos e fármacos de diversas classes medicamentosas (ZHOU, 2008). A trifluoperazina foi evidenciada também como inibidor putativo de bomba de efluxo em bactéria (FALCÃO-SILVA, 2009).

Outra alternativa para a descoberta de novos EPIs é a exploração de recursos naturais, o que pode levar à identificação de metabólitos secundários valiosos para atuar como fármacos ou conduzir ao desenvolvimento de novas substâncias terapêuticas. Estes metabólitos possuem estruturas químicas diferentes dos antibióticos obtidos naturalmente de bactérias e fungos, além do que possuem diversas funções biológicas, tais como defesa contra herbívoros e micro-organismos, proteção UV, atração de polinizadores, entre outras (FUMAGALI et al., 2008). A mono ou multicominação entre antibióticos comerciais e produtos naturais podem atuar em vários sítios de ação na bactéria, por mecanismos sinérgicos ou aditivos.

Estudos de Costa e colaboradores (2016) mostraram que riparinas, alcanidas naturais isoladas da *Aniba riparia*, reduziram significativamente as CIM dos antibióticos norfloxacino e ciprofloxacino em cepas que superexpressam NorA. Estes compostos também foram capazes de modular a CIM do brometo de etídio, o que faz das riparinas potenciais candidatos a EPI.

Cumarinas também têm sido consideradas importantes metabólitos com atividade antifúngica (ARAÚJO et al., 2013), antibacteriana (HAMDI et al., 2012) e

moduladora da resistência a antibióticos (BAZZAZ et al., 2010). Araújo e colaboradores (2016) relataram a ação de cumarinas semi-sintéticas como moduladores da resistência de norfloxacino e tetraciclina, com redução da CIM em até 16x, contribuindo como adjuvantes destes antibióticos frente a cepas resistentes. Um estudo mais recente evidenciou que Isopimpinellina, Xantotoxina e Imperatorina, cumarinas isoladas de plantas do gênero *Rutaceae*, potencializaram efeito antibacteriano de eritromicina e norfloxacino em até 4 vezes em *S. aureus* (MADEIRO et al., 2017).

Outro composto fitoquímico amplamente estudado devido as suas diversas funções biológicas, a berberina mostrou-se de grande importância no bloqueio de bombas de efluxo. É um alcaloide isoquinolina isolado de diversas espécies de plantas como *Coptis chinensis* Franch, *Coptis japonica* Makino, *Berberis vulgaris* L., *Hydrastis canadensis* L. e *Berberis aquifolium* Pursh (IMANSHAHIDI; HOSSEINZADEH, 2008) e possui ação antidiabética, antidiarreica, imunomoduladora, hipotensiva, antiinflamatória, antimicrobiana, entre outros (SINGH et al, 2010; TILLHON et al, 2012), somada a uma baixa toxicidade em células humanas e já é utilizada na clínica há muitos anos para o tratamento de gastroenterite (CHUNG et al, 1999; XIANG et al., 2017).

Berberina possui propriedade antibacteriana fraca, por ser substrato de várias bombas MDR (*multidrug-resistant*), ainda assim se mostra mais ativa em bactérias Gram-positivas, incluindo *Mycobacterium tuberculosis* e o gênero *Staphylococcus*, por meio da interação com a bomba NorA (SARKAR; APPIDI; RANGANATH, 2011). Por outro lado, o uso da berberina combinado com antibióticos tem capacidade de potencializar a eficácia dos mesmos contra bactérias importantes, como MRSA por exemplo, reduzindo a CIM dos antibióticos e tornando-os ativos em cepas que antes eram consideradas resistentes (WOJTYCZKA et al, 2014).

Os avanços da química, farmacologia e biologia molecular, aliados à introdução de novos ensaios bioquímicos, conduziram ao desenvolvimento da química medicinal, com planejamento racional de fármacos relacionados com a ação fisiológica. Neste contexto, os produtos sintéticos ganham posição de destaque no arsenal terapêutico, principalmente no que se refere à estratégia para obtenção de insumos em grande escala (COSTA, 2009).

Em um estudo de Rishton (2008), de 847 fármacos lançados entre 1981 a 2006, 43 eram produtos naturais, 232 produzidos por hemi-síntese a partir de produtos naturais e 572 obtidos por síntese total. É importante ressaltar em relação a este estudo, que praticamente metade das substâncias sintéticas possuíam grupo farmacofórico inspirado em produtos naturais.

Dentre os compostos sintéticos com amplo espectro de atividades biológicas, os nitrofuranos foram as primeiras moléculas nitroheterocíclicas a serem usadas na quimioterapia antimicrobiana. São importantes principalmente pela ação antibacteriana, antifúngica e antiparasitária, a exemplo dos fármacos furazolidona, nitrofurantoína e nitrofurazona, que são usados no tratamento de infecções bacterianas há mais de 50 anos (OLIVEIRA et al., 2012). Outro composto que também contém grupo nitrofurano, os compostos mesoiônicos heterocíclicos foram relatados como inibidores putativos de bomba de efluxo em *S. aureus*, com redução da CIM de tetraciclina em até 32 vezes (OLIVEIRA et al., 2011).

O composto sintético diseleneto de difenila é um organosselênio de grande importância biológica, mostrou ter potencial antimicrobiano em Gram-positivas e em *Candida albicans*, com ação bactericida, bacteriostática e fungistática, possivelmente por mecanismos de ação pró-oxidantes, que ao reduzir defesas celulares enzimáticas e não enzimáticas, pode causar dano celular e consequente produção de espécies reativas de oxigênio (PESARICO et al., 2013).

Diante disso, é essencial que a escolha e desenvolvimento de moléculas não sejam somente projetados especificamente para inibir bombas de efluxo de procariotos, mas também que possua alguma distância da estrutura molecular de outras drogas utilizadas na terapêutica. As propriedades farmacocinética/dinâmicas dos inibidores destas proteínas representam outra dificuldade, pois devem corresponder estreitamente as propriedades do antibiótico de escolha (BAMBEKE et al., 2003; ASTOLFI, 2017; GUPTA; SINGH; KHAN, 2017).

A procura por substâncias que possam atuar como inibidores de proteínas transportadoras aposta em drogas capazes de evitar o efluxo, seja pela síntese de compostos considerados substratos fracos, produtos que suprimem ou bloqueiam a atividade da bomba, pelo esgotamento da energia da proteína ou por modificar a sua conformação por interação do inibidor com a membrana celular bacteriana (ZLOH; KAATZ; GIBBONS, 2004; THOTA et al., 2010, KAPP; MALAN; SAMPSON, 2017).

2.5 ORGANOSSELÊNIO DE INTERESSE MICROBIOLÓGICO

Desde a década de 30, os organosselênios têm sido alvo de interesse para a química devido à descoberta de suas aplicações sintéticas como importantes intermediários muito utilizados em síntese (COMASSETO, 1983; BRAGA, 1996; JAIN; PRIYADARSINI, 2017). As propriedades farmacológicas do selênio foram evidenciadas a partir da descoberta da presença do átomo como selenocisteína, no centro ativo de enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase, hidropéroxidos lipídicos, tioredoxina redutase e a selenoproteína P (HOLMGREN, 1985; NOGUEIRA et al., 2004). Desde então, o papel biológico do selênio tem recebido considerável importância, principalmente referente à sua atividade antioxidante, responsável pela eficácia no tratamento de doenças que tem o estresse oxidativo como processo central no seu desenvolvimento.

O elemento químico selênio foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Jons J. Berzelius, pertence ao grupo 16 da tabela periódica e pode apresentar-se sob quatro estados de oxidação: - 2 (seleneto), 0 (selênio elementar), +4 (selenito) e +6 (selenato). É um importante micronutriente em muitos processos bioquímicos e fisiológicos, pela formação de várias selenoproteínas com papéis fundamentais nos processos metabólicos. Por outro lado, é considerado tóxico em quantidade levemente acima dos níveis recomendados, que é de 70 µg de Se/dia para homens e 55µg de Se/dia para mulheres. Estudos demonstraram que quantidades de aproximadamente 200 µg de Se/dia não provocam efeitos adversos em humanos, além disso, tem efeitos benéficos ao estimular o sistema imune a responder frente a infecções, como a do vírus *Influenza* (IVORY et al., 2017).

Diversas propriedades biológicas importantes referentes a este elemento químico foram discutidos em outros estudos, tais como ação antibacteriana (REFAT; ABDEL-HAFEZ, 2016), antifúngica (ABDEL-HAFEZ, 2010), antiinflamatória e antinociceptiva (CHAGAS et al., 2014), anti-parasitária (FERNÁNDEZ-RUBIO et al., 2015) , anti-viral (SAHU et al., 2015), entre outros.

Deidda et al. (1997) relataram atividades antibacteriana e antifúngica de compostos contendo selênio e enxofre, selenozóis e selenotiazóis, frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus* , *Escherichia coli* e *Candida albicans*. No

entanto, o efeito antimicrobiano dos compostos foi detectado, em alguns casos, apenas em concentrações próximas daquelas consideradas tóxicas para humanos.

Atividade antibacteriana relevante foi relatada a partir de análogos selênicos de glutathione peroxidase contra *Helicobacter pylori* em modelos *in vitro* e *in vivo*, além de baixa toxicidade (KUMAR et al., 2010). Organosselênios também se mostraram importantes compostos antibacterianos contra patógenos causadores de intoxicação alimentar, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* e *Salmonella typhimurium*, apresentando frente a este último patógeno concentração inibitória mínima de 0,03 mM (VICTORIA et al., 2012).

Pesquisas na literatura indicam que poucas publicações mencionaram a incorporação de um átomo de selênio em ácido glicólico, devido à complexa via de síntese. Consequentemente, a síntese e triagem biológica do ácido selenoglicólico é considerada uma área ainda pouco explorada e poucos estudos foram publicados até então (ABDEL-HAFEZ et al., 2014).

Levando em consideração o risco de tóxico de organosselênios em humanos, o estudo de modelagem molecular se mostra promissor no processo de descoberta de novos fármacos, por permitir a detecção precoce de moléculas inadequadas para o uso clínico e por orientar a pesquisa na direção de moléculas com maior potencial (HANSCH et al., 2004; MEEK et al., 2006).

Cerca de 80% dos candidatos a novos fármacos em desenvolvimento clínico são eliminados do processo. Dentre os principais fatores, 39% dos candidatos são descartados por não apresentarem propriedades farmacocinéticas requeridas para um fármaco, 11% por apresentar elevada toxicidade em animais e 10% devido aos efeitos adversos (WATERBREEMD et al., 2003; DAINA et al., 2016). Diante desta problemática, os estudos computacionais se mostram promissores durante o processo de descoberta e em estágios de melhoramento de futuros candidatos a fármacos.

2.6 ESTUDOS *IN SILICO* NA SELEÇÃO OU OTIMIZAÇÃO DE CANDIDATOS A NOVOS FÁRMACOS

A obtenção de um novo fármaco envolve diversas etapas desde a identificação de um grupo de moléculas que apresentam um potencial de interação com o alvo, passando pela análise da atividade biológica das moléculas em ensaios

in vitro, testes pré-clínicos para avaliação da eficácia, toxicidade e efeitos colaterais das moléculas em condições fisiológicas e finalmente a realização dos testes clínicos em seres humanos (TROULLIER et al, 2002).

A farmacocinética teórica *in silico* (do latim *in silicio*, simulação computacional) é uma abordagem atualmente muito utilizada no estudo inicial das propriedades da droga no processo de absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade (ADMET) e tem como objetivo diminuir gastos de tempo e investimento desnecessários em ensaios biológicos de derivados com alta probabilidade de problemas farmacocinéticos e tóxicos no futuro, visto que 50% das razões que levam ao fracasso no desenvolvimento de um fármaco estão diretamente associadas ao perfil farmacotécnico e toxicológico (LIPINSKI, 2001; DAINA et al, 2017).

As técnicas de modelagem molecular variam, a depender das informações estruturais disponíveis sobre o alvo terapêutico (enzima/receptor) e os ligantes (agonista, substrato, antagonista ou inibidor). Quando a estrutura tridimensional (3D) do alvo é conhecida é realizado o método direto, que se baseia na análise do complexo do ligante-receptor (ACHARYA et al., 2005). Por outro lado, quando se trata de um alvo desconhecido, é possível fazer a predição molecular com informações sobre compostos ativos e inativos, tais como: grupos hidrofóbicos, ligações de hidrogênio e momentos dipolo. A partir destas informações, gera-se um modelo que pode ser usado para a seleção de compostos dentro de um banco de dados (BRANDÃO, 2017)

Levando em consideração os parâmetros farmacodinâmicos de um fármaco, uma boa disponibilidade oral é uma das propriedades mais desejáveis, pois permite redução da dose e da frequência da administração do medicamento, proporcionando melhor adesão do paciente ao tratamento. Na predição da biodisponibilidade ocorrem múltiplos fatores biológicos e químicos como dissolução no trato gastrointestinal, permeação pelas membranas intestinais e metabolismo de primeira passagem intestinal e hepático (GOODMAN, 2012).

Várias pesquisas relacionando padrões físico-químicos com os parâmetros ADMET foram realizadas na década de 90. O estudo mais difundido foi o do pioneiro Lipinski et al. (1997) que apresentou uma relação entre parâmetros farmacocinéticos e físico-químicos, indicando que uma determinada molécula terá alta potencialidade

como fármaco se apresentar elevada semelhança com fármacos já existentes, conhecido como *druglikeness*.

Considerando tais fatores, Lipinski e colaboradores (1997) propuseram um conjunto de regras que avaliam a biodisponibilidade oral de novas moléculas com potencial terapêutico, conhecida como “Regra dos Cinco de Lipinski” e que considera quatro parâmetros (cujos valores são múltiplos de 5) que identificam fármacos com possíveis problemas de absorção e permeabilidade, sendo eles:

- I. Massa Molar $\leq 500\text{g/mol}$
- II. $\text{LogP} \leq 5$ ou $\text{MLogP} \leq 4,15$ (que representa a lipofilicidade da molécula a partir de uma partição de um sistema octanol/água)
- III. Número de aceptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 (contabilizados em função de átomos de N ou O na molécula)
- IV. Número de doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5 (contabilizados em função de grupos NH ou OH na molécula)

Esta predição teórica é baseada em uma coleção de 5300 fragmentos moleculares, obtidos de 3300 fármacos comerciais e 15000 compostos da coleção Fluka, fármacos não comerciais. No entanto, é importante ressaltar que os alertas de risco são considerados apenas um indicativo de que a molécula possua um fragmento que cause efeito tóxico, de modo a orientar a seleção ou alteração estrutural de compostos para futuros estudos *in vitro* e *in vivo* (LIPINSKI et al., 1997).

Os diferentes *softwares* adotam diferentes padrões para determinação de um mesmo parâmetro. Por exemplo, para determinação de lipofilicidade, na forma do coeficiente de partição n-octanol/água há descrição de vários métodos (MANNHOLD et al., 2009). O mais atual *software* para estudo *in silico*, o SwissADME (DAINA et al., 2017) considera o parâmetro LogP em cinco formas diferentes: 1) XLogP3, que aplica fatores de correção (CHING et al. 2007); 2) WLogP, que considera apenas a fragmentação da molécula, sendo um método puramente atomístico (WILDMAN; CRIPPEN, 1999; BRANDÃO, 2017); 3) MLogP, calculado por relação linear entre 13 descritores moleculares (MORIGUCHI et al. 1994); 4) SILICOS-IT, método híbrido que considera 27 fragmentos e 7 descritores, calculado pelo programa FILTER-IT

(<http://silicos-it.be.s3-website-eu-west-1.amazonaws.com/>) e 5) iLogP, que considera também a energia livre de solvatação. Há um consenso de que o valor considerado deve ser a média aritmética entre os cinco valores obtidos (BRANDÃO, 2017; DAINA et al, 2017).

Considerando o ciclo preocupante que envolve o aumento de infecções bacterianas e a consequente aquisição de resistência frente à diversos antibióticos, torna-se necessária a busca por novas alternativas para que tais antibióticos tornem-se eficazes novamente. Neste contexto, o presente estudo se mostra de grande importância, uma vez que pretende investigar substâncias quanto às suas propriedades antibacterianas e/ou modificadoras da atividade bacteriana, com ênfase em inibição de bombas de efluxo, para o uso associado com antibióticos tradicionais.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar uma série de nove organosselênios em estudos *in silico* de propriedades físico-químicas e de interação com componentes importantes do nosso organismo, atividade antimicrobiana, atividade moduladora da resistência a drogas e efeito sinérgico com antibióticos em linhagens de *Staphylococcus aureus* que superexpressam bombas de efluxo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil físico-químico e tóxico dos organosselênios como potenciais candidatos a fármacos, baseado nos parâmetros ADMET, por meio do software Swissadme;
- Analisar, por estudo *in silico*, interações de organosselênios com a proteína p-GP e enzimas do citocromo P-450 oxidase, por meio do software Swissadme;
- Determinar Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos organosselênios frente a cepas de *S. aureus* IS-58, RN-4220 e SA-1199B, que superexpressam as bombas de efluxo TetK, MsrA e NorA respectivamente, bem como cepa ATCC 25923, pela técnica de microdiluição em placa de 96 poços;
- Determinar capacidade moduladora da resistência bacteriana em ensaios de microdiluição *in vitro* para os compostos norfloxacino, tetraciclina, eritromicina, berberina e brometo de etídio nas cepas IS-58, RN-4220 e SA-1199B de *S. aureus*;
- Investigar o tipo de interação (sinergismo ou antagonismo) da combinação entre organosselênios e antibióticos norfloxacino, tetraciclina e eritromicina frente às cepas IS-58, RN-4220 e SA-1199B, em ensaios *in vitro* pela técnica de microdiluição.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DA PESQUISA

Os estudos para avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da resistência foram realizados no Laboratório de Genética de Micro-organismos (LGM), do Departamento de Biologia Molecular (DBM), do Centro de Ciência Exatas e da Natureza (CCEN), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Em parceria, para o apoio no desenvolvimento do trabalho, foram realizadas com as equipes dos seguintes locais:

- Laboratório de Micologia – CCS – UFPB;
- Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica (LPBS) - CCEN - UFPB;

4.2 LINHAGENS DE *Staphylococcus aureus*

Para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e atividade moduladora da resistência, foram utilizadas as cepas ATCC 25923 e cepas geneticamente modificadas, cedidas pelo Prof. Simon Gibbons (*University of London*): SA-1199B, que superexpressa o gene *norA*, codifica a proteína de efluxo NorA, responsável pelo efluxo de fluoroquinolonas (KAATZ et al., 1993; KAATZ; SEO, 1995); RN-4220 que possui o plasmídeo *pUL5054*, o qual, carrega o gene que codifica a proteína MsrA, para efluxo de macrolídeos (ROSS et al., 1989) e IS-58, que possui a proteína de efluxo para tetraciclina (TetK) (GIBBONS; UDO, 2000).

Todas estas linhagens foram mantidas em meio de cultura Agar sangue base (*Blood Agar Base* – BAB, Difco) inclinado. Antes de serem utilizadas, as células cresceram em caldo nutritivo de infusão (*Brain Heart Infusion* - BHI, Difco) por 18-24h a 37°C.

4.3 ANTIBIÓTICOS, BROMETO DE ETÍDIO E BERBERINA

Os estoques dos antibióticos norfloxacino, tetraciclina, eritromicina e cloranfenicol foram preparados de acordo com o manual do CLSI - *Clinical and*

Laboratory Standards Institute (2007). Soluções-mãe de brometo de etídio, berberina e clorpromazina foram preparados com água destilada e esterilizada. Todos os antibióticos e demais substâncias foram obtidos da Sigma-Aldrich.

4.4 ORGANOSSELÊNIOS

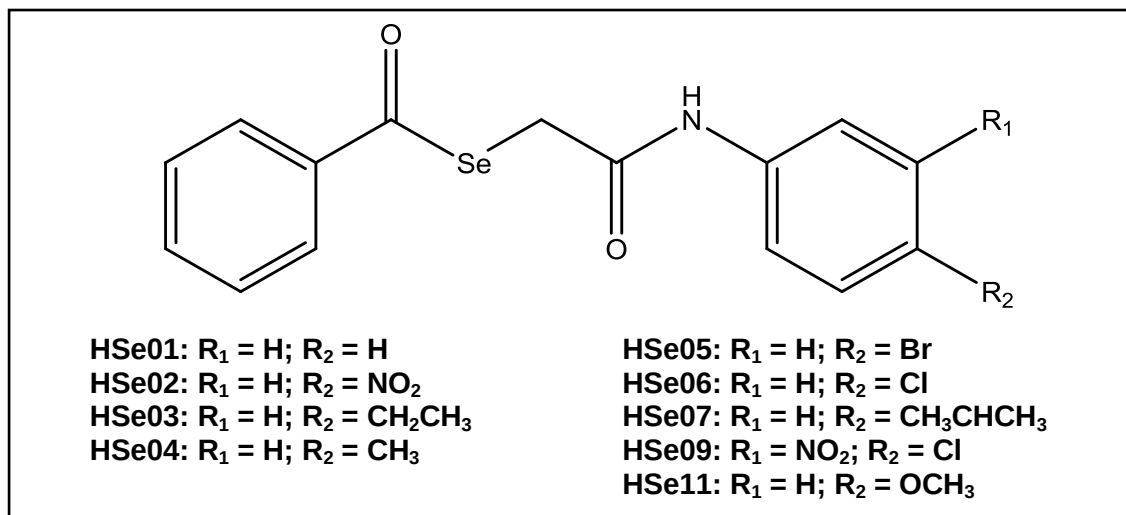


Figura 3. Estrutura dos organosselênios analisados no estudo

Fonte: Nathalie Borges (desenhado por meio do ChemBioDraw Ultra 2010)

Os organosselênios analisados (figura 4) são compostos derivados do ácido selenoglicólico e foram cedidos pelo Prof. Dr. Petrônio Filgueras Athayde Filho, do Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica (LPBS) - CCEN - UFPB. As soluções-estoque, com concentração inicial de 2560 $\mu\text{g/mL}$, foram preparadas com água destilada esterilizada e dimetilsulfóxido (DMSO) e a maior concentração de DMSO obtida após a diluição em caldo nutritivo (4%) não causou inibição do crescimento bacteriano.

4.5 ANÁLISE *in silico* EM RELAÇÃO A PARÂMETROS FARMACOCINÉTICO, TOXICIDADE E INTERAÇÃO COM PROTEÍNAS E ENZIMAS

Foram realizadas metodologias de caracterização das moléculas em relação a parâmetros físico-químicos, tóxicos e de interação com grupos importantes de alvos biológicos, como proteínas e enzimas, com a finalidade de direcionar informações em relação a ação antibacteriana exercida pelos organosselênios.

A porcentagem de absorção (%ABS) foi calculado pela fórmula (ZHAO et al., 2000):

$$\%ABS = 109 - [0,345 \times TPSA] \quad (1)$$

Os parâmetros da regra de Lipinski (LIPINSKI et al., 2001), a área de superfície polar topológica (TPSA), a solubilidade aquosa (LogS), parâmetros de toxicidade, *drug-likeness* e *drug-score* foram avaliados utilizando *softwares* livres, tais como: Osíris Property Explorer, disponível online (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>) e o software SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>).

O SwissADME permitiu fazer uma varredura de todos os parâmetros físico-químicos que possam interferir na farmacocinética de um candidato a fármaco (DAINA et al, 2017). Este programa também apresenta dados na forma de dois gráficos de correlação de parâmetros bastante inovadores e eficientes, são eles: o gráfico *BOILED-Egg* (figura 4a), desenvolvido por Daina e Zoete (2016) com base numa análise computacional de moléculas catalogadas como fármacos pela FDA (*Food and Drugs Administration*) nos anos de 2014 e 2015 e analisa a molécula quanto a sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, quanto à absorção passiva pelo trato gastrointestinal e a possibilidade de ligação com a p-Glicoproteína.

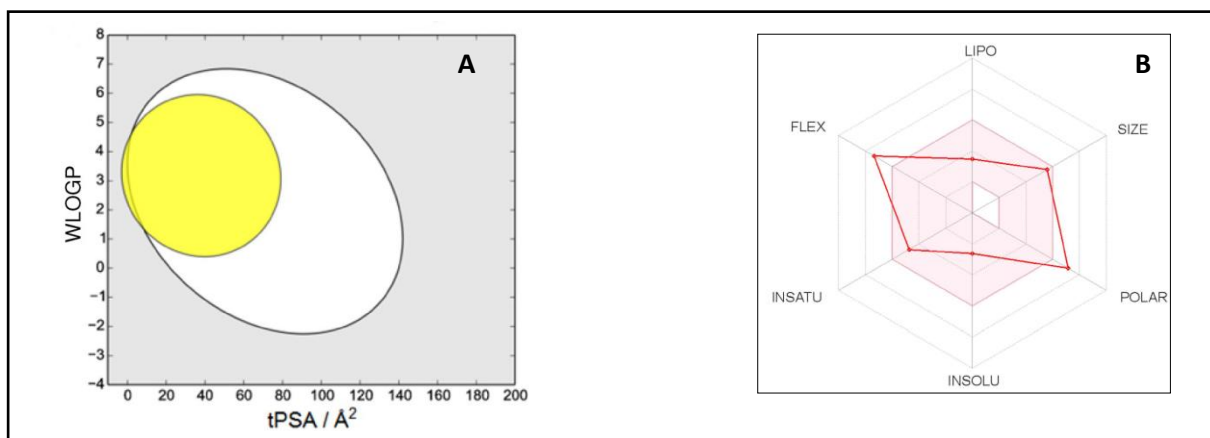


Figura 4. A) gráfico *BOILED-Egg*: Na região amarela – moléculas com potencialidade para atravessar a barreira hematoencefálica; na região branca - moléculas com características possíveis de serem absorvidas passivamente pelo trato gastrintestinal; na região cinza – moléculas que apresentam condições farmacocinéticas desfavoráveis. B) gráfico *Bioavailability Radar*: Moléculas plotadas completamente na área rósea apresentam um conjunto de propriedades favoráveis a uma ótima biodisponibilidade via oral (DAINA et al, 2017; BRANDÃO, 2017).

O *Bioavailability Radar* (radar de biodisponibilidade), apresenta uma avaliação rápida da *druglikeness*, na qual são levadas em consideração seis propriedades físico-químicas: lipofilicidade, tamanho, polaridade, solubilidade, flexibilidade e saturação, sendo assim definida uma faixa físico-química em cada eixo por descritores adaptados a partir dos estudos de Ritchie et al. (2011) e Lovering et al. (2009), representados como uma área de cor rósea, na qual o diagrama de radar da molécula deve estar completamente dentro desta área para ser considerado uma substância com características ideais de um fármaco (figura 4b).

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

4.6.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação CIM dos organosselênios, dos antibióticos, brometo de etídio, berberina e clorpromazina foram realizadas por meio da técnica de microdiluição, utilizando placa de placa de 96 cavidades. Foi preparada uma solução-mãe contendo caldo nutritivo (BHI – *Brain and Heart Infusion*) e 1% da suspensão bacteriana (10^5 ufc/mL em solução salina a 0,9% de NaCl). Foram utilizadas as cepas SA-1199B, RN-4220, IS-58 e ATCC 25923, sendo que esta última foi utilizada como controle de qualidade do teste.

A solução-mãe foi distribuída na placa de 96 cavidades por colunas e os organosselênios foram dispensados por meio da diluição seriada a uma razão de dois, com concentrações finais variando de 256 µg/mL a 0,25 µg/mL ou 128 µg/mL a 0,125 µg/mL. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e a CIM foi definida como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento bacteriano após 24 horas (incubada em estufa a 37°C) (SMITH et al, 2005). Para melhor visualização do resultado, foi utilizada solução (0,01%) de resazurina (Sigma-Aldrich), indicador de viabilidade celular. Cloranfenicol foi utilizado como controle-positivo para a determinação da CIM.

4.6.2 Avaliação da atividade moduladora da resistência a antibióticos, berberina e brometo de etídio

Para avaliar a atividade dos organosselênios como inibidores putativos de bomba de efluxo, foi determinada a CIM de antibióticos, brometo de etídio e berberina, na presença e na ausência dos organosselênios frente às cepas SA-1199B, RN-4220 e IS-58 (GIBBONS et al., 2003) Foi preparada uma solução-mãe contendo caldo nutritivo (BHI – *Brain and Heart Infusion*), suspensão bacteriana (10^5 ufc/mL em solução salina a 0,9% de NaCl) e organosselênios em concentração correspondente a $\frac{1}{4}$ de sua CIM, considerada concentração subinibitória (STAVRI et al., 2007).

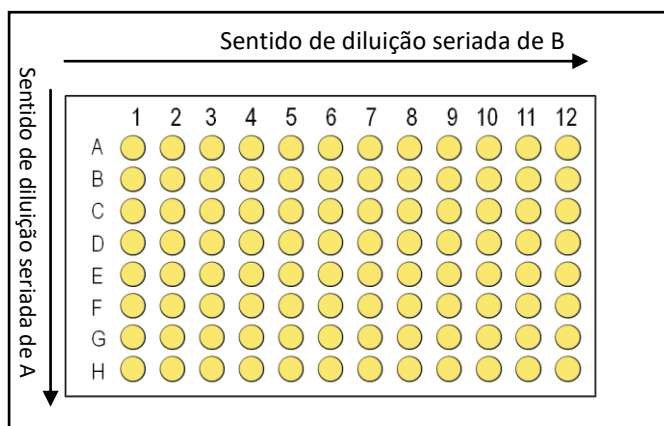
Cada solução-mãe foi distribuída na placa por colunas e os respectivos antibióticos foram dispensados por meio da diluição seriada a uma razão de dois, com concentrações variando de 256 µg/mL a 0,25 µg/mL ou 128 µg/mL a 0,125µg/mL (SMITH et al, 2005). Após incubação em estufa a 37°C por 24 horas, foi feita a visualização da presença/ausência de atividade bacteriana, com o uso da solução (0,01%) de resazurina (Sigma-Aldrich). Os experimentos foram realizados em duplicata. A atividade moduladora foi definida quando ocorreu redução da CIM do antibiótico/outros compostos na presença de concentração subinibitória de organosselênio.

4.6.3 Ensaio de sinergismo

O método de checkerboard (ODDS, 2003; OO et al, 2010) foi realizado para todos os organosselênios em combinação com os antibióticos tetraciclina, eritromicina e norfloxacino frente às cepas IS-58, RN-4220 e SA-1199B, respectivamente, a fim de se determinar o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI). As soluções-estoque das substâncias e antibióticos foram preparadas de acordo com o valor das suas respectivas CIM.

Inicialmente, foram adicionados caldo nutritivo (BHI – *Brain and Heart Infusion*) e 1% de suspensão bacteriana na placa de microdiluição de 96 cavidades. Em seguida, foi adicionado o organosselênio (substância B) em diversas concentrações (CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIM×2, CIM×4 e CIM×8) no sentido

vertical, da mesma forma ocorreu com cada antibiótico (substância A), sendo que no sentido horizontal da microplaca (figura 5).



Fonte: Nathalie Borges.

Figura 5. Esquema representativo da distribuição dos antibióticos e organosselênios na microplaca no ensaio de sinergismo. Na vertical, a concentração do antibiótico (A) é diluída de cima para baixo e na horizontal, o organosselênio é diluído da esquerda para direita (B).

Após incubação em estufa a 37°C por 24h, foi feita a visualização da presença/ausência de crescimento bacteriano, com o uso da solução (0,01%) de resazurina (Sigma-Aldrich). A partir da verificação das CIMs dos antibióticos e organosselênios, foi calculado o valor de FICI, pela seguinte fórmula:

$$FICI = \left[\frac{CIM_A \text{ combinado} + CIM_B \text{ combinado}}{CIM_A \text{ sozinho} + CIM_B \text{ sozinho}} \right] \quad (2)$$

De acordo com o valor obtido, foi possível estabelecer o efeito combinado entre a substância e o antibiótico testados: Sinergismo (< 0,5), sem interação (0,5 – 4,0) e antagonismo (> 4,0).

Resultados e Discussão

5.1 ESTUDOS *IN SILICO*

Foi realizado um amplo estudo *in silico* dos organosselênios, para investigar se possuem propriedades que atendam aos parâmetros ADMET. Primeiramente, as substâncias foram submetidas a uma avaliação de potencialidade teórica como candidatos a novos fármacos.

5.1.1 Estudo *in silico* de propriedades físico-químicas

Os resultados obtidos a partir da abordagem *in silico* indicam que esses compostos obedeceram à regra de Lipinski, o que sugerem apresentar uma boa permeabilidade na membrana celular e uma boa absorção após a administração. Para que os compostos tenham uma probabilidade de serem absorvidos, os seus valores de lipofilicidade (cLogP) não devem ser maiores que 5. Os compostos apresentaram valores entre 3,19 e 4,79, mostrando que eles podem ser absorvidos ao penetrarem em membranas biológicas. HSe-02, que possui o substituinte NO₂ na molécula, foi o composto menos lipofílico, enquanto que HSe-07 foi o organosselênio mais lipofílico e contém o substituinte isopropil.

Tabela 1. Análise *in silico* de organosselênios em estudo

Subst.	Parâmetros de Lipinski					TPSA (Å) ²	% ABS	Log S	Drug- likeness	Drug Score
	ALD	DLH	MM	cLogP	Viol.					
HSe01	3	1	318,230	3,231	0	46,169	93,07	-3,84	-4,23	0,40
HSe02	6	1	363,231	3,190	0	91,993	77,26	-4,30	-17,90	0,29
HSe03	3	1	346,288	4,145	0	46,169	93,07	-4,34	-2,69	0,30
HSe04	3	1	332,261	3,679	0	46,169	93,07	-4,34	-3,88	0,23
HSe05	3	1	397,130	4,040	0	46,169	93,07	-4,67	-4,48	0,32
HSe06	3	1	352,679	3,909	0	46,169	93,07	-4,57	-1,39	0,40
HSe07	3	1	360,315	4,743	0	46,169	93,07	-4,71	-4,84	0,19
HSe09	6	1	397,676	3,796	0	91,993	77,26	-5,03	-11,56	0,12
HSe11	4	1	397,676	3,288	0	55,403	89,88	-3,86	-3,60	0,19

Legenda:

ALD: aceptores de ligação de hidrogênio ≤ 10; DLH: doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5; MM: Massa Molar ≤ 500 g/mol; cLogP ≤ 4,15 (representa lipofilicidade); viol. ≤ 1: número de violações da Regra de Lipinski; TPSA: superfície polar topológica; %ABS: porcentagem de absorção; Log S: solubilidade aquosa

O foco da descoberta moderna de medicamentos não se baseia somente nas suas características farmacológicas, mas também busca propriedades favoráveis de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (GOODMAN, 2015). A predição da absorção intestinal humana tem sido um dado importante no processo de

descoberta, otimização e seleção de novos fármacos, principalmente com o crescente uso da química combinatória. São utilizados um grande número de candidatos a fármaco e estes necessitam ser rastreados em paralelo quanto à atividade farmacológica *in vitro* (HASHID et al., 2014). Diante disso, tem aumentado drasticamente a demanda de modelos rápidos e eficientes para estimar a absorção intestinal humana, embora os modelos de membrana celular e estudos em animais *in vivo* sejam amplamente utilizados, são consideradas técnicas onerosas e que exigem uma vasta mão-de-obra.

De acordo com a tabela 1, a %ABS mostra que todos os compostos apresentaram absorção acima de 70%. A determinação da %ABS depende da área de superfície polar molecular topológica (TPSA), que é um parâmetro relacionado com o transporte molecular passivo através das membranas e permite a predição teórica da absorção intestinal (TGI) humana e da passagem pela barreira hematoencefálica (BHE) (SHITYAKOV et al. 2013).

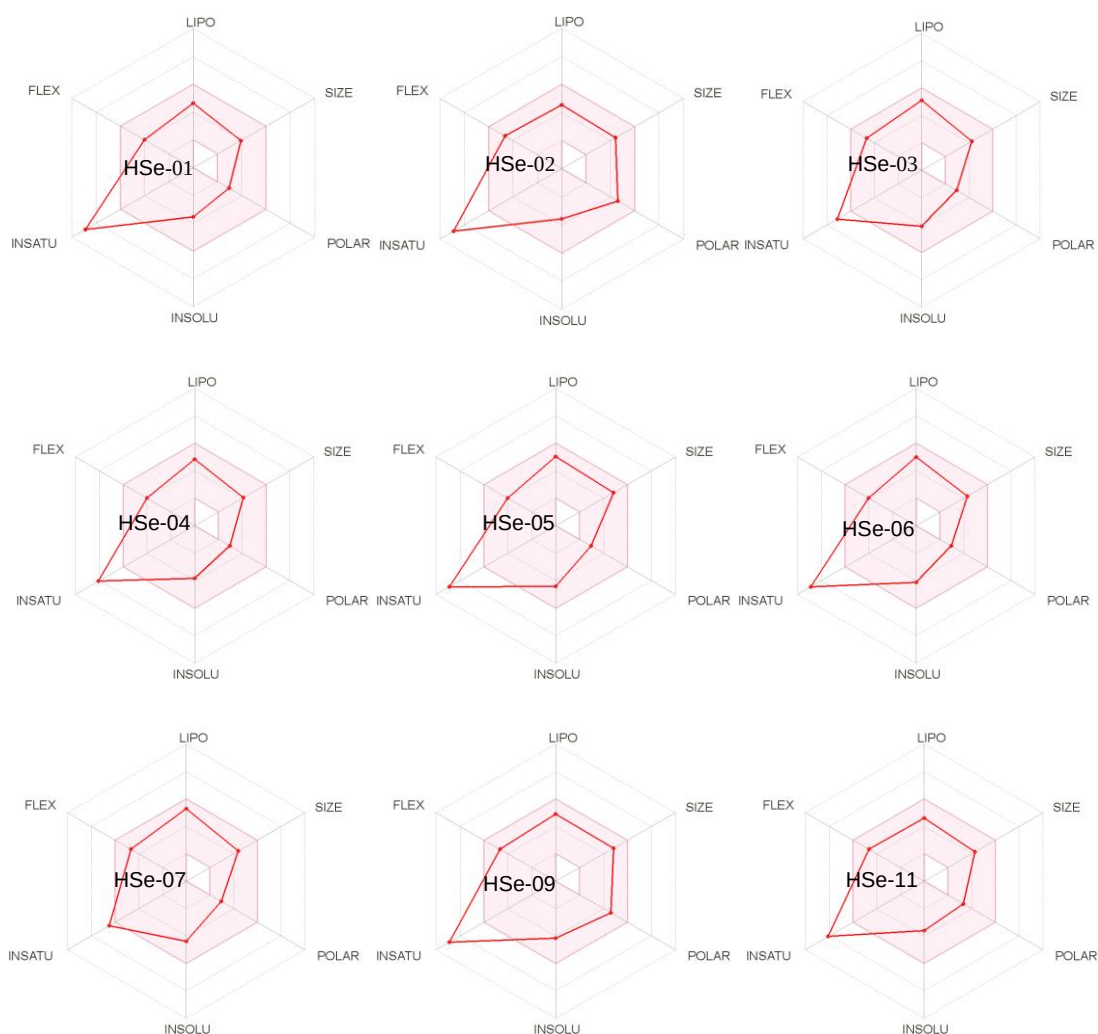
Em análise teórica, drogas que são completamente absorvidas (>90%) têm um $TPSA \leq 60 (\text{\AA})^2$, enquanto drogas que são pouco absorvidas (<10%) têm $TPSA \geq 104 (\text{\AA})^2$ (WESSEL et al, 1998). Os organosselênios em estudo obtiveram valores de TPSA entre 46,169 e 91,993 ($\text{\AA})^2$. Hse-02 e HSe-09 apresentaram os resultados menos expressivos, com $TPSA = 91,993 (\text{\AA})^2$ e ambos os compostos possuem grupo nitro (NO_2) na molécula.

A solubilidade de uma substância em água também é importante para a absorção e distribuição no organismo. Os valores de LogS representam solubilidade de acordo com a seguinte escala: insolúvel < -10 < pouco solúvel < -6 < moderado < -4 < solúvel < -2 < muito solúvel < 0 < altamente solúvel (ALI et al, 2012). Foi observado que, dos 9 compostos analisados, 7 deles apresentaram valores entre -4,30 e -5,03, que indica solubilidade moderada. Os organosselênios Hse-01 (sem substituinte) e HSe-11 (com metóxi no anel aromático) apresentaram valores de LogS igual a -3,84 e -3,86 respectivamente, mostrando ser solúvel em líquidos biológicos.

A avaliação de *drug-likeness* mostra a comparação dos compostos investigados através de fragmentos e/ou propriedades físicas parecidas com fármacos mais conhecidos, onde devem apresentar valores positivos (LIPINSKI et al, 1997). Os valores obtidos nesse estudo estão entre -17,9 a -1,39, ou seja, não

apresentam características semelhantes aos fármacos comerciais. Este é um dado importante para descoberta de novos inibidores de bomba de efluxo, pois estes não devem ter especificidade com sistemas de efluxo de células eucarióticas.

Figura 6. Radar de biodisponibilidade



Legenda (Limites da área rósea): **LIPO** (lipofilicidade) = $-0,7 < \text{XLogP3} < +5,0$; **SIZE** (tamanho da molécula) = $150 \text{ g/mol} < \text{MM} < 500 \text{ g/mol}$; **POLAR** (polaridade) = $20 \text{ \AA}^2 < \text{TPSA} < 130 \text{ \AA}^2$; **INSOLU** (insolubilidade) = $0 < \text{Log S} < 6$; **INSATU** (insaturações) = $0,25 < \text{Fração Csp3} < 1,00$; **FLEX** (flexibilidade) = $0 < \text{NLR} < 9$

O valor de *drug score* combina registros de *drug-likeness*, lipofilicidade, solubilidade, massa molecular e riscos de toxicidade em um único valor numérico que varia de 0,1 (maior potencial) a 1,0 (menor potencial) e pode ser utilizado para prever o potencial global de um dado composto como candidato a novo fármaco (DAINA et al., 2017). Os valores obtidos a partir dessa abordagem ficaram entre 0,12 e 0,41, pode-se dizer que os compostos têm potencial teórico de atuarem como

novos candidatos a fármaco, sendo que os melhores resultados foram de HSe-07, HSe-09 e HSe-11.

Os organosselênios também foram avaliados por meio do gráfico *Bioavailability Radar* (Gráfico 1) plotado pelo programa SwissADME e correlaciona tamanho da molécula, flexibilidade, solubilidade, lipofilicidade, saturação e polaridade. A área rósea do gráfico, representa condições ideais de biodisponibilidade para administração de um fármaco por via oral (DAINA et al, 2017).

De acordo com o gráfico 1, foi observado que os organosselênios apresentaram condições excelentes de biodisponibilidade oral, tendo em vista que quase todos os parâmetros físico-químicos correlacionados estão na área que representam os padrões ideais. Apenas o parâmetro insaturação ficou fora da área do radar referente a todos os compostos, pois a fração de carbono em hibridização sp^3 (Csp3) não deve ser menor do que 0,25 (DAINA et al., 2017). Os organosselênios tiveram Csp3 entre 0,07 e 0,22. Dentre os compostos, os que se mais aproximaram das condições excelentes foi o HSe-07 (fração Csp3 = 0,22), devido a presença de isopropil ligado ao anel aromático, seguido de HSe-03 (fração Csp3 = 0,18), com substituinte etila na mesma posição da molécula.

5.1.2 Estudo *in silico* das interações de organosselênios com proteínas e enzimas

Além das propriedades físico-químicas *in silico*, os organosselênios foram analisados quanto à sua interação com P-glicoproteína (P-gp) e enzimas hepáticas, principalmente as isoformas da enzima citocromo P-450 oxidase, identificadas como CYP, que são responsáveis por metabolizar xenobióticos (HOLLENBERG, 2002).

Este grupo de enzimas, quando inibida pela molécula altera as condições de biotransformação, podendo ocasionar interações medicamentosas por combinação com fragmentos de diferentes fármacos. Estas interações podem ocasionar potencialização ou inativação de um fármaco, assim como um aumento drástico da sua toxicidade (HUANG et al., 2008). É sugerido que CYP e P-gp podem metabolizar pequenas moléculas de forma sinérgica, aumentando a proteção de tecidos e órgãos (VAN WATERSCHOOT; SCHINKEL, 2011).

O quadro 1 mostra que os organosselênios em estudo interagiram com algumas isoformas da enzima citocromo P-450 oxidase, sendo que as moléculas HSe-01, HSe-02, HSe-03 e HSe-04 inibiram teoricamente somente a isoforma CYP2D6. Esta enzima é de natureza altamente polimórfica com mais de 100 variações alélicas descritas até o momento, sendo que aproximadamente 20 desses alelos têm alguma influência no metabolismo dos fármacos (BEVERAGE; SISSUNG; SION, 2007). A pouca interação com tais enzimas é de grande importância, sobretudo no que concerne o metabolismo hepático e a excreção de xenobióticos e outras que estejam em uso concomitante.

Quadro 1. Comportamento farmacocinético dos organosselênios mediante padrões de absorção, interação com P-gp (como substrato) e inibição das isoformas da enzima citocromo P-450 oxidase

Organosselênios	TGI	P-gp	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
HSe-01	Alta	Não	Não	Não	Não	Sim	Não
HSe-02	Alta	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não
HSe-03	Alta	Não	Não	Não	Não	Sim	Não
HSe-04	Alta	Não	Não	Não	Não	Sim	Não
HSe-05	Alta	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
HSe-06	Alta	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
HSe-07	Alta	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim
HSe-09	Alta	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
HSe-11	Alta	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não

Legenda:

TGI – Trato gastrointestinal (*Alta*: quando a absorção ocorre passivamente)

BHE – Barreira hematoencefálica (*Sim*: molécula capaz de atravessar a barreira)

P-gp – p-glicoproteína (*Sim*: a molécula associa-se a proteína como substrato)

CYP – Isoformas da enzima citocromo P-450 oxidase (*Sim*: inibidor da enzima / *Não*: não é inibidor da enzima)

Outro parâmetro apresentado no quadro 1 é a interação das substâncias com a P-gp, uma proteína que age como bomba de efluxo ATP-dependente que transporta fármacos e outros xenobióticos para fora das células do fígado, rins, cérebro, trato gastrointestinal e das células das barreiras hemato-teciduals (AZEREDO; UCHÔA; COSTA, 2009). A P-gp é superexpressa em alguns tipos de células tumorais e pode levar à câncer resistente à múltiplas drogas (SHAROM, 2008).

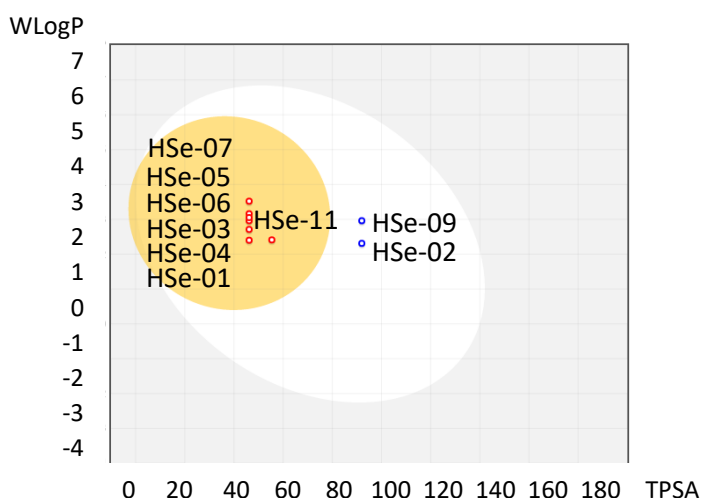
Apenas os compostos HSe-02 e Hse-09, que possuem grupo NO₂ na molécula, mostraram interação com P-gp e tal ação tem como objetivo reconhecer e transportar moléculas que sejam seus substratos, prevenindo o acúmulo destes no

organismo. Além disso, a maioria dos fármacos que se associam à P-gp possuem massa molar superior a 400g/mol e são hidrofóbicos neutros ou carregados positivamente (KERNS, 2008).

Há relação também entre a área superficial topológica polar (TPSA) e com a lipofilicidade (WLogP), na forma de *BOILED-Egg* (gráfico 2) e plotado no programa SwissADME. De acordo com o gráfico 2, as moléculas HSe-02 e Hse-09 não apresentaram capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE), são absorvidos facilmente pelo trato gastrointestinal e são considerados substratos de P-gp, teoricamente. Os demais compostos tem capacidade de atravessar BHE, porém não são substratos de P-gp e portanto não estão sujeitos ao efluxo ativo pela mesma.

É importante dizer que a capacidade de atravessar BHE só é interessante quando o alvo clínico está no sistema nervoso central (SNC), se não, o medicamento poderá ocasionar efeitos colaterais, tais como cefaleia, sonolência, tontura, perda parcial da visão, entre outros (GOODMAN, 2012). Além disso, é importante que a droga não seja substrato de proteínas como P-pg e assim mantenha-se em concentração adequada no sítio de ação para obter o efeito desejado.

Gráfico 1. Correlação entre WLogP e TPSA, na forma de *BOILED-Egg*, para os organosselênios.



Legenda: região amarela – moléculas com potencialidade para atravessar a barreira hematoencefálica; na região branca - moléculas com características possíveis de serem absorvidas passivamente pelo trato gastrointestinal; na região cinza – moléculas que apresentam condições farmacocinéticas desfavoráveis; pontos vermelhos - não-substratos de P-gp; pontos azuis - substratos de P-gp.

No caso dos agentes antimicrobianos, a passagem pela BHE se faz necessária, principalmente para o tratamento das meningites bacteriana. Na era pré-bacteriana, as taxas de mortalidade devido às meningites bacterianas eram de aproximadamente 100%. Após a introdução da penicilina, essas taxas caíram para 10-30%. No entanto, mesmo com o advento de novos antibióticos e consequente resistência bacteriana, um estudo demonstrou que, atualmente, a taxa de mortalidade dos casos de meningite bacteriana ainda é em torno de 20% (ROGERIO et al., 2011).

A área em amarelo do gráfico engloba a maioria das moléculas propostas neste trabalho. As moléculas que ficaram plotadas na área cinza apresentaram alguma dificuldade para atravessar BHE e não poderiam atingir concentrações adequadas no encéfalo para combater em infecções do SNC. A passagem de agentes antimicrobianos pela BHE ocorre predominantemente por difusão passiva e para que ocorra este mecanismo é importante considerar algumas características intrínsecas do fármaco, como alta lipossolubilidade, baixo peso molecular, baixa ligação a proteínas plasmáticas e baixa capacidade de ionização (DAINA et al, 2016).

Recentemente, várias drogas consideradas que não atuam como agentes antimicrobianos, foram relatadas como inibidores de bomba de efluxo NorA utilizando modelagem baseada em grupos farmacofóricos, por meio de uma abordagem *in silico* (ASTOLFI et al., 2017). Assim, o conhecimento sobre as características químicas da substância para o tratamento de infecções bacterianas, utilizando ferramentas e técnicas *in silico*, é de fundamental importância na descoberta de novos antibióticos mais eficazes e menos tóxicos, de modo a otimizar o tratamento de infecções locais ou sistêmicas.

5.1.3 Estudo *in silico* da toxicidade dos organosselênios

Para a avaliação do risco de toxicidade dos organosselênios e de alguns antibióticos utilizados na terapêutica, as moléculas foram analisadas *in silico* por meio do software online Osiris® Property Explorer. O programa pode apontar para a presença de fragmentos de moléculas geralmente responsáveis por efeitos irritantes, mutagênicos, tumorigênicos ou reprodutivos (tabela 2), baseado em uma coleção de

5300 fragmentos moleculares, obtidos de 3300 fármacos comerciais e 15000 compostos da coleção Fluka, fármacos não comerciais. Estas avaliações *in silico* têm como vantagem a rapidez na sua execução, o baixo custo e a capacidade de reduzir o uso de animais em ensaios de toxicidade, e desta forma, vem ganhando muito destaque nos processos de descoberta e desenvolvimento de fármacos, utilizados como complementos de análises *in vitro* e *in vivo* (BRESOLIN; CHECHINEL-FILHO,2010).

Tabela 2. Estudo de toxicidade de organosselênios

Substâncias	Risco de Toxicidade			
	Efeitos Irritantes	Mutagênico	Tumorigênico	Reprodutivo
HSe-01	1	1	1	1
HSe-02	1	2	1	1
HSe-03	1	1	2	1
HSe-04	1	3	1	1
HSe-05	1	1	1	1
HSe-06	1	1	1	1
HSe-07	3	1	1	1
HSe-09	2	3	2	1
HSe-11	1	3	2	1
Tetraciclina	1	1	1	1
Ciprofloxacino	3	1	1	2
Oxacilina	1	1	1	1
Cloranfenicol	3	3	1	3
Linezolida	3	3	1	1

1: Nenhum Risco; 2: Risco Médio; 3: Risco Alto

Entre os organosselênios em estudo, HSe-01, HSe-05 e HSe-06 não apresentaram risco tóxico teórico frente aos quatro parâmetros analisados (tabela 2). Tais compostos possuem halogênios Bromo ou Cloro na molécula, exceto HSe-01, que não possui substituinte ligado ao anel aromático.

Os compostos com alto risco tóxico teórico foram HSe-09 e HSe-11, pois apresentaram médio ou alto risco em dois ou mais parâmetros. Pode-se observar que estes compostos possuem grupos nitro e metóxi, respectivamente, podendo ser tais substituintes os responsáveis pelo aumento do risco tóxico desta série de organosselênios.

Os nitrocompostos especificamente, têm sido alvos de inúmeras discussões visando esclarecimentos sobre a toxicidade. O cloranfenicol, por exemplo, nitrocomposto amplamente utilizado como antibacteriano, destaca-se por seus efeitos tóxicos como anemia aplásica e diversas outras discrasias sanguíneas como

efeitos colaterais, a depender da dose administrada e o tempo de exposição ao fármaco (WERMUTH, 2011).

Apesar de reconhecidamente preliminar, os resultados estimulam a continuação do estudo, principalmente no que tange aos ensaios *in vivo*, onde testes com perfil mais sistêmico devem ser realizados. Análises complementares de modelagem molecular podem ajudar a sugerir modificações estruturais que possam aprimorar a atividade destes derivados, e mesmo que o estudo teórico possua limitações quanto à predição dos resultados e dos alertas de risco toxicológico, é de grande importância quando associado à análise toxicológica *in vivo* para outras avaliações farmacológicas destes derivados.

5.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS ORGANOSSELÊNIOS

Os organosselênios selecionados foram investigados utilizando cepas de *Staphylococcus aureus* IS-58, RN4220 e SA-1199B, que superexpressam as bombas de efluxo TetK, MsrA e NorA, respectivamente. HSe-01, HSe-06 e HSe-09 mostraram atividade antibacteriana relevante (CIM $\leq$ 64 $\mu\text{g/mL}$) em algumas cepas (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) de organosselênios e antibiótico em cepas de *S. aureus*

Substâncias	Cepas de <i>S. aureus</i>			
	ATCC 25923	IS-58 (TetK)	RN4220 (MsrA)	SA-1199B (NorA)
HSe-01	128	32	32	128
HSe-02	256	128	128	256
HSe-03	>256	256	256	256
HSe-04	>256	256	256	256
HSe-05	>256	256	256	256
HSe-06	>256	16	32	32
HSe-07	>256	128	256	256
HSe-09	>256	32	64	16
HSe-11	256	128	128	256
Cloranfenicol	128	64	64	64

Segundo Gibbons (2008), compostos que possuem CIM acima de 100 $\mu\text{g/mL}$ são considerados agentes antimicrobianos pouco ativos, enquanto que aqueles que apresentam CIM abaixo de 10 $\mu\text{g/mL}$ (ideal $\leq$ 2 $\mu\text{g/mL}$) são considerados de grande interesse a companhias farmacêuticas. Outros organosselênios resultaram em baixa atividade inibitória contra as mesmas cepas.

Ao comparar a série de organosselênios e seus substituintes, a ausência de substituintes em HSe-01 favoreceu a atividade antibacteriana deste composto, com CIM de 32 µg/mL frente às cepas IS-58 e RN-4220. A presença de Cloro no anel aromático (HSe-06) reduziu a CIM em IS-58 (16 µg/mL) e SA-1199B (32 µg/mL). O organosselênio HSe-09, que contém Cloro e NO₂ no anel aromático, apresentou CIM de 16 µg/mL em SA-1199B, sendo a molécula mais ativa frente à cepa que superexpressa a bomba de efluxo NorA.

O substituinte nitro (NO₂) é considerado um importante grupo farmacofórico com a capacidade de modificar propriedades de substâncias químicas, promovendo um aumento no caráter hidrofóbico da molécula, bem como tem importância na toxicidade da molécula (BARREIRO; FRAGA, 2015). Porém, de acordo com os resultados da tabela até aqui mostrados, a presença de NO₂ por si só, não garantiu nem o aumento da lipofilicidade da molécula, bem como não mostrou atividade antibacteriana, pois HSe-02, que tem NO₂ no anel aromático, não reduziu a CIM em nenhuma das cepas testadas.

Compostos orgânicos que contém selênio têm sido alvos de diversos estudos que envolvem atividade antibacteriana em cepas Gram-positivas e Gram-negativas. Observou-se que organosselênios podem se ligar covalentemente a muitos tipos de superfícies e ainda gerar radicais superóxidos. Embora esta capacidade catalítica seja conhecida desde 1947 (FEIGL; WEST, 1947), as características pró-oxidativas somente foram elucidadas em 1997, por Seko e Imura.

A inibição da formação de biofilme pelos organosselênios, por exemplo, pode ser causada pelo radical de superóxido gerado, assim, o composto não precisa deixar a superfície de ataduras de sobreposição, utilizadas sobre feridas, para fazer seu efeito e assim não causa toxicidade tecidual, como ocorre com ataduras que contêm prata (ONG et al., 2008).

Em 2010, Radhakrishna e colaboradores desenvolveram a síntese e investigaram atividade antibacteriana de compostos ácidos carboxílicos e ésteres contendo selênio e mostraram-se efetivos em bactérias como *S. aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, entre outros.

Organosselênios de cadeia aberta mostraram excelente efeito antibacteriano em *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, com zonas de inibição entre 9 a 34 mm. A presença do selênio forma ligações de hidrogênio com proteínas de parede celular

bacteriana, havendo a precipitação das mesmas, sendo o provável mecanismo de ação (NAGHAM, 2014). Outro estudo mais recente, de Kanna et al. (2015), demonstrou a atividade antibacteriana de selenodiazóis em *S. aureus*, *E. coli*, *S.typhimurium*, e teve o melhor efeito antibacteriano contra *P. aeruginosas*.

5.4 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE TETRACICLINA, ERITROMICINA, NORFLOXACINO, BERBERINA E BROMETO DE ETÍDIO COMBINADOS COM ORGANOSSELÊNIOS

O processo de descoberta de novos agentes antibacterianos inclui testes *in vitro* que avaliem não só a habilidade de inibir a bactéria, como também a capacidade destes compostos em modificar a atividade antibacteriana em cepas MDR por inibição da bomba de efluxo (GIBBONS, 2008). Diante disso, foi realizada a avaliação da susceptibilidade de antibióticos na ausência e na presença de concentração subinibitória organosselênios, frente as cepas de *S. aureus* IS-58, RN-4220 e SA-1199B, que superexpressam, respectivamente, as bombas de efluxo TetK, MsrA e NorA.

Tabela 4. Ensaio combinado entre organosselênios e berberina, brometo de etídio e norfloxacino em cepa SA-1199B (NorA)

Substâncias (¼ da CIM)	Cepa IS-58 (TetK)	Cepa RN-4220 (MsrA)	Cepa SA-1199B (NorA)		
	Tetraciclina	Eritromicina	Norfloxacino	EtBr	Berberina
HSe-01	0,50 (256)	64 (8)	32 (2)	8 (4)	256 (2)
HSe-02	0,50 (256)	4 (128)	16 (4)	4 (8)	64 (8)
HSe-03	2 (64)	512 (x)	64 (x)	8 (4)	128 (4)
HSe-04	0,25 (512)	64 (8)	32 (2)	8 (4)	128 (4)
HSe-05	0,25 (512)	16 (32)	64 (x)	8 (4)	128 (4)
HSe-06	4 (32)	256 (2)	32 (2)	8 (4)	256 (2)
HSe-07	2 (64)	64 (8)	32 (2)	4 (8)	256 (2)
HSe-09	2 (64)	128 (4)	32 (2)	4 (8)	32 (16)
HSe-11	1 (128)	512 (x)	16 (4)	8 (4)	256 (2)
CPZ	-----	-----	16 (4)	16 (4)	128 (4)

Legenda:

()* Entre parênteses, os fatores de redução da CIM

(x)* Não houve redução da CIM

EtBr: Brometo de etídio

CPZ: Clorpromazina, controle positivo para cepa SA-1199B

CIM em µg/mL: Tetraciclina (64); Eritromicina (512); Norfloxacino (64); EtBr: (32); Berberina (512)

Para o ensaio de modulação da resistência bacteriana, cada substância em teste foi incorporada ao meio de cultura na concentração subinibitória

correspondente a $\frac{1}{4}$ das respectivas CIM (Tabela 4). A partir de então, verificou-se a CIM dos antibióticos, brometo de etídio (EtBr) e berberina, que são substratos das bombas de efluxo correspondentes, na presença de organosselênios. A clorpromazina, considerada como um inibidor do sistema de efluxo MDR em *S. aureus* (KAATZ et al., 2003), foi utilizada como controle positivo para a cepa SA-1199B.

A modulação da resistência à tetraciclina ocorreu em todas as associações com os organosselênios em teste, com redução da CIM do antibiótico entre 64 e 512 vezes. As moléculas mais ativas foram HSe-01, HSe-02, HSe-05 e HSe-11, que se diferenciam pela presença dos substituintes no anel aromático: hidrogênio, NO₂, Bromo e metóxi, respectivamente, e tais moléculas podem justificar as diferentes intensidade de efeito modulador da resistência. Por outro lado, como a associação entre todos os organosselênios e tetraciclina causou redução da CIM de forma considerável, pode-se sugerir que o fragmento da molécula comum a esta série de organosselênios tenha um papel importante na atividade moduladora frente a cepa IS-58.

A associação entre organosselênios e eritromicina causou modulação da resistência ao respectivo antibiótico em algumas das combinações avaliadas, obtendo também resultados expressivos por parte de alguns organosselênios. O uso de concentração subinibitória de HSe-02 reduziu a CIM de eritromicina em 128 vezes, o melhor resultado para o antibiótico em questão. Apenas HSe-03 e HSe-11, contendo os substituintes etila e metóxi, respectivamente, não causaram modulação da resistência à eritromicina, e HSe-06, que possui Cloro no anel aromático, teve um resultado menos expressivo, com redução da CIM em até 2 vezes.

O uso combinado de organosselênios e norfloxacino obteve modulação da resistência considerada relevante somente com HSe-02 e HSe-11, com redução da CIM em 4 vezes. Abaixo deste valor, a resistência pode estar também relacionada ao fato da cepa SA-1199B, também apresentar uma substituição da subunidade GrlA da enzima girase (ou Topoisomerase IV), que confere resistência às fluoroquinolonas hidrofílicas, incluindo norfloxacino (KAATZ; SEO, 1995). Como essa linhagem possui dois mecanismos de resistência, e considerando que a resistência ao brometo de etídio está restrita a ação das proteínas de efluxo, o

brometo de etídio foi utilizado como molécula padrão para modulação desse sistema (DEMARCO et al., 2007; KUMAR et al., 2008)

A CIM do brometo de etídio em associação com organosselênios reduziu em até 8 vezes, mostrando atividade moduladora relevante em todas as combinações. Diversas bombas, além de NorA, podem ter afinidade com brometo de etídio, de acordo com a análise da sequência do genoma de *S. aureus*, foi sugerido que mais de 30 Orf's (*Open reading frames*) codificam bombas de efluxo putativas no cromossomo desta bactéria (TRUONG-BOLDUC et al., 2006; DEMARCO et al., 2007). Este fato deu respaldo para explicar o efeito significativo obtido com derivado tilirosídeo, que modulou 128 vezes na presença do brometo de etídio (FALCÃO-SILVA et al., 2009).

Ao considerar o efeito modulador dos organosselênios nos três substratos da bomba NorA em conjunto, as maiores reduções da CIM ocorreram com HSe-02 e HSe-09, ambos com ligante nitro (NO₂) na molécula. HSe-09 também apresentou atividade antibacteriana relevante na mesma cepa em estudo (tabela 3), enquanto que HSe-02 não obteve o mesmo efeito. A explicação para este evento é que atividade antibacteriana e moduladora são atividades independentes e assim, não é possível prever pela CIM se a molécula será um bom candidato a EPI. Smith e colaboradores (2007) mostraram que a atividade antibacteriana do diterpeno totarol não contribuiu para a ação moduladora da resistência, indicando uma separação bem sucedida entre os dois efeitos.

O uso combinado de organosselênios reduziu CIM de berberina em todas em todas as combinações, sendo HSe-02, HSe-03, HSe-05 e HSe-09 com modulação entre 2 e até 16 vezes. a associação de berberina com os compostos Hse-02 e HSe-09 apresentaram maior redução da CIM, em até 8 e 16 vezes, respectivamente. Sugere-se que a presença dos ligantes cloro e NO₂ nos organosselênios possa ter potencializado o efeito antibacteriano da berberina.

NorA é uma das bombas de efluxo mais estudadas em *S. aureus*, cujo gene é supressado em 43% das cepas desta espécie (PATEL et al., 2010). O uso de inibidores de bombas de efluxo poderiam representar uma abordagem válida na diminuição da CIM de antibióticos que sejam substratos de bombas, com múltiplos mecanismos de ação, como restauração da susceptibilidade dos fármacos, redução

da capacidade de resistência adicional adquirida e inibição da formação de biofilmes (KVIST; HANCOCK; KLEMM, 2008).

A maioria dos substratos de MDRs pertencentes à família *Major Facilitator*, a qual a bomba NorA é membro, tem características hidrofóbicas e catiônicas, assim como berberina, brometo de etídio, compostos de amônio quaternário e fluoroquinolonas na forma de bases protonadas, por exemplo, porém não é uma regra. Também sintetizado por plantas do gênero *Berberis*, a 5-metoxihidnocarpina (5-MHC) é um inibidor da bomba NorA e diferente da maioria dos substratos, constitui uma molécula neutra/aniônica, podendo atuar em algum sítio de ligação distinto dos substratos catiônicos (STERMITZ et al., 2000).

Estudos de Guo et al. (2015) mostraram que a berberina em conjunto com o diterpeno totarol, reduziu significativamente a produção de biofilme em MRSA de origem clínica, em comparação com o uso destas drogas de forma isolada. Este produto pode agir em outros sítios bacterianos, além de ser substrato de bombas MDR codificada cromossomicamente. No entanto, para o efeito antibacteriano ter sucesso, tem que vir combinado com algum tipo de inibidor de bomba de efluxo, induzindo ao acúmulo de berberina dentro da bactéria e desta forma o efeito antibacteriano ocorre de forma eficaz.

Em concentrações subinibitórias, berberina exibiu efeito sinérgico significativo em combinação com quatro antibióticos convencionais, ampicilina, azitromicina, cefazolina e levofloxacino. No entanto, em algumas cepas não teve efeito inibitório dentro de uma faixa de concentração de 1 a 64 µg/mL, sugerindo que mecanismos de inibição de biofilme possam estar envolvidos na ação sinérgica, além da atividade antibacteriana (CHU et al., 2016).

Cada vez mais a berberina vem ganhando atenção por suas múltiplas propriedades farmacológicas mediadas por moléculas alvo, que estão envolvidas em diversos processos biológicos, funções moleculares e caminhos de sinalização. Embora estudos defendam o uso de berberina e inibidores de bomba de efluxo para prevenir ou tratar infecções (KIM; SHAW, 2010; SHAKAR et al., 2011), há pouca informação sobre sua real aplicação na clínica relacionada a antimicrobianos. Diante disso, experimentos com animais e ensaios clínicos são necessários para validar estratégias de combinação a depender do tipo de infecção e/ou cepa relacionada à determinada infecção.

5.3 SINERGISMO ENTRE ORGANOSSELÊNIO E ANTIBIÓTICOS TETRACICLINA, ERITROMICINA E NORFLOXACINO

Os valores das CIM, FIC e FICI obtidos a partir da combinação cruzada entre antibióticos e organosselênios, pelo método de Checkerboard, estão listados nas Tabelas 4, 5 e 6. O diferencial deste método é a possibilidade de testar várias combinações com diferentes concentrações de duas substâncias para uma mesma cepa (ODDS, 2003).

Tabela 4. CIM e índice de concentração inibitória fracionada (FICI) da combinação entre tetraciclina e organosselênios frente a cepa IS-58 (TetK).

Cepa	Substâncias	CIM (µg/mL) Sozinho	CIM (µg/mL) Combinado	FIC	FICI	Efeito
IS-58 (TetK)	HSe-01	32	2	0,0625	0,070	Sinergismo
	Tetraciclina	64	0,5	0,0078		
	HSe-02	128	4	0,0312	0,035	Sinergismo
	Tetraciclina	64	0,25	0,0039		
	HSe-03	256	1	0,0039	0,054	Sinergismo
	Tetraciclina	64	1	0,0156		
	HSe-04	256	1	0,0039	0,078	Sinergismo
	Tetraciclina	64	0,25	0,0039		
	HSe-05	256	1	0,0039	0,078	Sinergismo
	Tetraciclina	64	0,25	0,0039		
	HSe-06	16	2	0,1250	0,156	Sinergismo
	Tetraciclina	64	2	0,0312		
	HSe-07	128	1	0,0078	0,023	Sinergismo
	Tetraciclina	64	1	0,0156		
	HSe-09	32	1	0,0312	0,039	Sinergismo
	Tetraciclina	64	0,5	0,0078		
	HSe-11	128	2	0,0156	0,023	Sinergismo
	Tetraciclina	64	0,5	0,0078		

De acordo com a tabela 4, todas as nove combinações de Tet/HSe foram capazes de reduzir em até 512 vezes a CIM do antibiótico tetraciclina em comparação com o uso da tetraciclina de forma isolada frente à cepa IS-58 (TetK), demonstrando atividade antibacteriana sinérgica promissora, com valores de FICI entre 0,023 e 0,318. Devido ao intenso sinergismo causado por todos os organosselênios de forma semelhante, sugere-se que o possível grupo farmacofórico envolvido na modulação da atividade antibiótica de tetraciclina seja comum a todos os organosselênios.

Tabela 5. CIM e índice de concentração inibitória fracionada (FICI) da combinação entre eritromicina e organosselênios frente a cepa RN-4220 (MsrA).

Cepa	Substâncias	CIM (µg/mL) Sozinho	CIM (µg/mL) Combinado	FIC	FICI	Efeito
RN-4220 (MsrA)	HSe-01	32	4	0,1250	0,187	Sinergismo
	Eritromicina	512	32	0,0625		
	HSe-02	128	128	1,0000	1,062	sem interação
	Eritromicina	512	512	1,0000		
	HSe-03	256	64	0,2500	0,312	Sinergismo
	Eritromicina	512	32	0,0620		
	HSe-04	256	256	1,0000	1,062	sem interação
	Eritromicina	512	512	1,0000		
	HSe-05	256	1	0,0039	0,019	Sinergismo
	Eritromicina	512	8	0,0156		
	HSe-06	32	8	0,2500	0,500	Sinergismo
	Eritromicina	512	128	0,2500		
	HSe-07	256	64	0,2500	0,500	Sinergismo
	Eritromicina	512	128	0,2500		
	HSe-09	64	8	0,1250	0,250	Sinergismo
	Eritromicina	512	64	0,1250		
	HSe-11	128	8	0,0625	0,187	Sinergismo
	Eritromicina	512	64	0,0078		

Algumas combinações Eri/HSe reduziram em até 64 vezes a CIM de eritromicina, quando comparado com o uso do respectivo antibiótico sozinho. O melhor resultado foi da combinação entre Eri/HSe-05, que possui o halogênio Bromo na molécula, o que pode ter contribuído para o intenso sinergismo, com valor de FICI igual a 0,019.

A bomba de efluxo MsrA é uma proteína da família ABC, composta de duas moléculas de ATP que funcionam de forma independente, não apresentando um arsenal clássico dos transportadores ABC. Desta forma, algum cuidado deve ser exercido ao se mencionar uma substância como moduladora da resistência por meio desta proteína, pois há relatos de que esta proteína pode não ser de fato uma proteína de efluxo (REYNOLDS et al., 2003).

Estudos de Dominguez-Álvarez (2016) relatou afinidade de selenoanidridos e selenoésteres com bombas de efluxo da família ABC em células tumorais, resultando em uma inibição da bomba de forma mais potente. Em estudo mais recente, os resultados foram confirmados também em bombas MDR relacionadas a câncer de cólon (GAJDÁCS et al., 2017).

Tabela 6. CIM e índice de concentração inibitória fracionada (FICI) da combinação entre norfloxacino e organosselênios frente a cepa SA-1199B (NorA).

Cepa	Substâncias	CIM (µg/mL) Sozinho	CIM (µg/mL) Combinado	FIC	FICI	Efeito
RN-4220 (MsrA)	HSe-01	128	64	0,500	1,000	sem interação
	Norfloxacino	64	32	0,500		
	HSe-02	256	64	0,250	0,500	Sinergismo
	Norfloxacino	64	16	0,250		
	HSe-03	256	128	0,500	1,500	sem interação
	Norfloxacino	64	64	1,000		
	HSe-04	256	64	0,250	0,750	sem interação
	Norfloxacino	64	32	0,500		
	HSe-05	256	128	0,500	1,500	sem interação
	Norfloxacino	64	64	1,000		
	HSe-06	32	32	1,000	1,500	sem interação
	Norfloxacino	64	32	0,500		
	HSe-07	256	32	0,125	0,625	sem interação
	Norfloxacino	64	32	0,500		
	HSe-09	16	64	4,000	5,000	Antagonismo
	Norfloxacino	64	64	1,000		
	HSe-11	256	64	0,250	0,750	sem interação
	Norfloxacino	64	32	0,500		

Na interação entre organosselênios e norfloxacino, apenas Nor/HSe-02 indicou efeito sinérgico com FICI de 0,500. Algumas combinações apresentaram efeito aditivo, ou seja, mesmo que a adição de organosselênio tenha reduzido moderadamente a CIM de norfloxacino, em relação ao antibiótico sozinho, não foram suficientes para considerar como efeito sinérgico. Outras interações foram consideradas inconclusivas ou indiferentes, indicando ausência de interação e a combinação Nor/Hse-09 obteve efeito antagônico, tendo em vista que o efeito antibacteriano de Hse-09 sozinho foi maior em relação a associação com norfloxacino.

A ausência de informações estruturais sobre as bombas de efluxo em estudo e sua interação molecular com EPIs e substratos tem dificultado fortemente os esforços para a descoberta baseado em estrutura. Além disso, a diversidade estrutural de EPIs que possuem afinidade com NorA, especificamente, somada a falta de informações suficientes de relação estrutura-atividade, torna difícil obter direcionamento para o desenho de novos candidatos de EPIs (ASTOLFI, 2017).

A terapia combinada de antibióticos é um exemplo importante de interação sinérgica utilizado na clínica, baseada na combinação de duas ou mais drogas no tratamento de infecções, sendo de grande relevância principalmente nos casos de alto risco de patógenos potencialmente resistentes. Mesmo drogas que, de forma

isolada, não apresentam efeito antibacteriano expressivo, ao serem combinados com outras substâncias ou antibióticos podem obter atividade antibacteriana potencializada pela interação sinérgica.

Abdel-Hafez e colaboradores (2013), relataram atividade antibacteriana de uma série de compostos derivados de ácido selenoglicólico, principalmente frente à *S. aureus* e *Bacillus cereus*, com CIM de 8 e 10 µg/mL, respectivamente. Estes derivados foram obtidos a partir da mesma via de síntese dos organosselênios deste estudo, descrito por Athayde-Filho e colaboradores (2004).

Um importante organosselênio que vem sendo amplamente estudado, Ebselen é utilizado terapeuticamente como droga anti-esclerótica, antioxidante e antiinflamatória. Também tem se tornado muito promissor contra microrganismos, principalmente em *S. aureus*, com variação de CIM de 0,125 a 0,5 mg/L. Esta substância também bloqueou lipídios, DNA e RNA em bactérias, reduziu a síntese de leucocidina Panton-Valentine e hemolisina, bem como reduziu formação de biofilme em até 60% em MRSA. Ao contrário do efeito tóxico comum em compostos que contem selênio, Ebselen não apresentou efeito tóxico até a 32 mg/L em queratinócitos humanos (Thangamani et al, 2015).

Os resultados estimulam a continuação do estudo, com ensaios que envolvam bloqueio da atividade da bomba efluxo, ensaios de acúmulo de brometo de etídio na bactéria, atividade moduladora da resistência a drogas em outros tipos de bombas de efluxo e estudos computacionais que envolvam docking por meio de modelos de homologia para bombas de efluxo que possuam estrutura conhecida e cristalizada.

Os estudos *in silico* mostraram-se de grande importância no processo de descoberta de novos EPIs ao fornecer informações complementares sobre as características das moléculas, de modo a direcionar quais ligantes e tipos de cadeias são mais favoráveis para a atividade biológica em questão. Mesmo que o ensaio teórico possua limitações quanto à predição dos resultados e alertas de risco toxicológico, ainda sim é considerado importante quando associado a estudos *in vitro* e/ou *in vivo*, sendo possível nortear compostos mais adequados para se tornarem candidatos a futuros fármacos, com otimização de tempo e investimentos.

Considerações Finais

O presente trabalho demonstrou a importância de se utilizar metodologias de avaliação *in silico* para explorar propriedades físico-químicas de compostos químicos, como: solubilidade, lipofilicidade, flexibilidade, insaturação, bem como, similaridade com fármacos comercializados, permeabilidade através de barreiras do organismo e interação com proteínas e enzimas do metabolismo de fármacos.

No cenário atual, onde os custos para a síntese de compostos e o tempo precisam ser otimizado, a análise *in silico* é uma ferramenta que direciona para aqueles compostos que podem ser melhores candidatos a fármaco. No entanto, estes ensaios computacionais não atuam sozinhos, precisam de associação com experimentos *in vitro* e/ou *in vivo* para que a avaliação dos resultados seja mais consistente.

Os organosselênios deste trabalho se apresentaram, de um modo geral, como bons candidatos a fármacos. Os que se destacaram por obter menos violações nas avaliações *in silico* foram HSe-01, HSe-02 e HSe-11, ambos contêm substituintes com características químicas diferentes e, portanto, não pode relacionar os bons resultados com alguma característica molecular específica.

A atividade antibacteriana foi considerada relevante para os compostos HSe-01, HSe-06 e HSe-09, os dois últimos com NO₂ ligado ao anel aromático, um substituinte bastante conhecido na literatura por seus efeitos biológicos e tóxicos, presente em diversos fármacos, incluindo os agentes antimicrobianos.

Ao associar organosselênios com antibióticos, estes mesmos compostos mostraram expressiva atividade moduladora da resistência a drogas. Alguns compostos que não apresentaram atividade antibacteriana, obtiveram também efeito modulador da resistência, não havendo relação intrínseca entre as atividades antibacteriana e moduladora da resistência de um determinado composto.

Os organosselênios do presente trabalho apresentaram intenso sinergismo, principalmente quando associados com tetraciclina e eritromicina, mostrando que novas drogas podem atuar como coadjuvantes de antibióticos clássicos, frente a bactérias consideradas resistentes. Um único adjuvante pode estar associado com diferentes classes de antibióticos, para tratamentos de diversos tipos de infecções causadas por uma ampla variedade de bactérias.

Estes resultados estimulam a realização de novos estudos de análises toxicológicas *in vitro* e *in vivo*, ensaios de sinergismo com cepas clínicas e em

associação com outros antibióticos, além de protocolos para mensurar bloqueio da atividade de bombas de efluxo.

Referências

ABDEL-HAFEZ, S. M.; HATHOUT, R. N. Towards better modeling of chitosan nanoparticles production: Screening different factors and comparing two experimental designs. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 64, p. 334-340, 2014.

ABDEL-HAFEZ, S. H. Selenium Containing Heterocycles: Synthesis and Pharmacological Activities of Some New Selenolo [2, 3-b] quinoline Derivatives and Related Pentacyclic Systems. **Phosph. Sulf. Silic. Real. Elem.**, v. 185, p.37-41, 2010.

ABRAHAM, E. P., CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**. v. 146, p. 837-837, 1940.

ABULROB, A. N.; SULLER, M. T.; GUMBLETON, M.; SIMONS, C.; RUSSELL, A. D. Identification and biological evaluation of grapefruit oil components as potential novel efflux pump modulators in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterial strains. **Phytochemistry**, v. 65, p. 3021-3027, 2004.

ACHARYA, K.R.; LLOYD, M. D. The advantages and limitations of protein crystal structures, **Trend. Pharmacol. Sci.**, v. 26, p. 10-14, 2005.

AGNĖ GIEDRAITIENĖ , ASTRA VITKAUSKIENĖ , RIMA NAGINIENĖ , ALVYDAS PAVILONIS. Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. **Medicina**, v. 47, p. 137-146, 2011.

AMARAL, L.; VIVEIROS, M.; MOLNAR, J. Comparison of Multidrug Resistant Efflux Pumps of Cancer and Bacterial Cells with Respect to the Same Inhibitory Agents. **In Vivo**, v.21, p. 237-244, 2007.

ANDEREGG, T.R., SADER, H.S., FRITSCH, T.R., ROSS, J., JONES. R. Trends in linezolid susceptibility patterns: report from the 2002-2003 worldwide Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) Program. **Int. J. Antimicro. Ag.**, v. 26, p. 13-21, 2005.

ARAUJO, R. S. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SCOTTI, M. T.; SCOTTI, L.; CRUZ, M. D.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; MENDONÇA-JUNIOR, F. J. Modulation of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus* with Coumarin Derivatives. **Scientifica**. v. 2016, pag. 1-6, 2016.

AZEREDO, F. J.; UCHOA, F. T.; COSTA, T. D. Papel da Glicoproteína-P na Farmacocinética e nas Interações Medicamentosas. **Rev. Bras. Farm.**, v. 90, p. 321-326, 2009.

ASAKA, T.; MANAKA, A.; SUGIYAMA, H. Recent developments in macrolide antimicrobial research. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 3, p. 961-989, 2003.

ASTOLFI, A.; FELICETTI, T.; IRACI, N.; MANFRONI, G.; MASSARI, S.; PIETRELLA, D.; TABARRINI, O.; KAATZ, G. W.; BARRECA, M. L.; SABATINI, S.; CECHETTI, V. Pharmacophore-Based Repositioning of Approved Drugs as Novel *Staphylococcus aureus* NorA Efflux Pump Inhibitors. **J. Med. Chem.** v. 60, p. 1598 -1604, 2017.

AWADY, R. E.; SALEH, E.; HASHIM, A.; SOLIMAN, N.; DALLAH, A.; ELRASHEED, A.; ELAKRAA, G. The role of eukaryotic and prokaryotic ABC transporter family in failure of chemotherapy. **Front. Pharmacol.** v. 7, p. 535, 2016.

BAGNOLI, F. *Staphylococcus aureus* toxin antibodies: Good companions of antibiotics and vaccines. **Virulence.** v. 8, p. 1037-1042, 2017.

BAMBEKE, F. V.; GLUPCZYNSKI, Y; PLÉSIAT, P.; PECHÈRE, J. C.; TULKENS, P. M. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 51, p. 1055-1065, 2003.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos, third ed., Artmed, Porto Alegre, 2014.

BARTSCH, S. M., HUANG, S. S., WONG, K. F. Impact of delays between Clinical and Laboratory Standards Institute and Food and Drug Administration revisions of interpretive criteria for carbapenem-resistant enterobacteriaceae. **J. Clin. Microbiol.**, v. 54, p. 2757-2762, 2016.

BLAIR, J. M.; PIDDOCK, L. J. V. How to measure export via bacterial multidrug resistance efflux pumps. **Mbio.**, v. 7, p. 1-6, 2016.

BOHNERT, J. A.; KERN, W. V. Selected Arylpiperazines Are Capable of Reversing Multidrug Resistance in *Escherichia coli* Overexpressing RND Efflux Pumps. **Antimicrob. Agent. Chemother.**, v. 49, p. 849-852, 2005.

BORGES, L. P.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T.; ZENI, G. Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. **Chem. Biol. Interact.**, v. 160, p. 99-107, 2006.

BRAGA, A. L., SILVEIRA, C. C., ZENI, G., SEVERO, W. A.; STEFANI, H. A. Synthesis of selenocetals from enol ethers. **J. Chem. Res.**, v. 5, p. 206-207, 1996.

BRAHAM, E.P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature.** v. 146, p. 847, 1940.

BRANDÃO, M. C. R. Síntese, caracterização e avaliação de nitratos orgânicos com potencialidades para fármacos e aditivos para combustíveis. **Tese de Doutorado.** Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 117 páginas.

BRANDIS, G., WRANDE, M., LILJAS, L., HUGHES, D. Fitness-compensatory mutations in rifampicin-resistant RNA polymerase. **Mol. Microbiol.** v. 85, p. 142-157, 2012.

BRESOLIN, T. M. B.; CHECHINEL-FILHO, V. **Fármacos e medicamentos: Uma abordagem Multidisciplinar**. Santos: São Paulo, 2010.

BRIGDES, B. A. Hypermutation in bacteria and other cellular systems. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, v. 356, p. 29-39, 2001.

BROSKEY, J.; COLEMAN, K.; GWYNN, M. N.; MCCLOSKEY, L.; TRAINI, C.; VOELKER, L.; WARREN, R. Efflux and target mutations as quinolone resistance mechanisms in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 45, p. 95-99, 2000.

BUGG, T. D. H. et al. Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*, BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. **Biochem.** v. 30, p. 1408-1415, 1991.

BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Int. J. Antimicrob. Ag.**, v. 22, p. 205-210, 2003.

CANTÓN, R.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F. Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 16, p. 315-325, 2003.

CHAGAS, P. M.; ROSA, S. G.; SARI, M. H. M.; OLIVEIRA, C. E. S.; CANTO, R. F. S.; LUZ, S. C. A.; BRAGA, A. L.; NOGUEIRA, C. W. Evaluation of the pharmacological properties of salicylic acid-derivative organoselenium: 2-Hydroxy-5-selenocyanatobenzoic acid as an anti-inflammatory and antinociceptive compound. *Pharm.Biochem.Behav.* 2014, 118, 87.

CHAN, B. C. L.; GONG, M. H.; LUI, S. L.; SEE, R. H.; OLIVANT, C.; FUNG, K. P.; LEUNG, P. C.; REINER, N. E.; LAU, C. B. Synergistic effects of diosmetin with erythromycin against ABC transporter over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) RN4220/pUL5054 and inhibition of MRSA pyruvate kinase. **Phytomedicine**. v. 20, p. 611-615, 2013.

CHAO, Y. BERGENFELZ, C.; HAKANSSON, A. P. In Vitro and In Vivo Biofilm Formation by Pathogenic Streptococci. **Bacterial Pathogen..** v. 1535, p. 285-299, 2016.

CHEN, L. F.; CHOPRA, T.; KAYE, K. S. Pathogens resistant to antibacterial agents. **Med. Clin. N. Am.**, v. 95, p. 647-676, 2011.

CHING W. H.; RODRIGUES C. W. (Coord.). **Cartilha biodiesel**. SEBRAE, 2007. 61p.

CHITSAZ, M.; BROWN, M. H. The role played by drug efflux pumps in bacterial multidrug resistance. **Essays Biochem.** vol. 61, p. 127-139, 2017.

CHOLLET, R.; CHEVALIER, J.; BRYSKIER, A.; PAGES, J. M. The AcrAB–TolC pump is involved in macrolide resistance but not in telithromycin efflux in *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 48, p. 3621-3625, 2004

CHOPRA, I. New developments in tetracycline antibiotics: glycylcyclines and tetracycline efflux pump inhibitors. **Drug Resist. Updat.** v. 5, p. 119-125, 2002.

CHU, M.; BOZHANG, M.; LIU, Y. C.; KANG, J. R.; YUNCHU, Z.; YIN, K. I.; DING, L. Y.; DING, R. Role of Berberine in the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. **Sci. rep.**, v. 6, p. 24748, 2016

COHEN, M. L. Changing patterns of infectious disease, **Nature**, v. 406, p.762-767, 2000.

COMASSETO, J. V. Vinylic Selenides. **J. Org. Chem.**, v. 253, p.131-181, 1983.

COSTA, L. M.; MACEDO, E. V.; OLIVEIRA, F. A. A.; FERREIRA, J. H. L.; GUTIERREZ, S. J. C.; PELAEZ, W. J.; LIMA, F. C. A.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; COUTINHO, H. D. M.; KAATZ, G. W.; FREITAS, R. M.; BARRETO, H. M. Inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by synthetic riparins. **J. Appl. Microbiol.** v. 121, p. 1312 - 1322, 2016.

COSTA, P. R. R. Produtos Naturais como Ponto de Partida para a Descoberta de Novas Substâncias bioativas: Candidatos a Fármacos com Ação Antiofídica, Anticâncer e Antiparasitária. **Rev. Virtual Quim.**, v. 1, p. 58-66, 2009.

DAINA, A., MICHELIN, O.; ZOETE, V. Swissadme: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Sci. Rep.**, vol. 7, p. 427-517, 2017.

DECOSTA, V. M.; WRIGHT, G. D. Biochemical Logic of Antibiotic Inactivation and Modification. **Microb. Drug Resist.** v. 1, p. 97-113, 2017.

DELEO, F. R., OTTO, M., KREISWIRTH, B. N.; CHAMBERS, H. F. *Community-associated meticillin-resistant Staphylococcus aureus*. **Lancet**, vol. 375, p. 1557-1568, 2010.

DEMARCO, C.E., CUSHING, L.A., FREMPONG-MANSO, E., SEO, S.M., JARAVAZA, T.A.A., KAATZ, G.W. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and

biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antim. Agents Chemother.**, v.51, p.3235-3239, 2007.

DINIZ, L. C. L. Identificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa de *Triatoma infestans* (Hemiptera: *Reduviidae*). Dissertação de mestrado. 2016, Biotecnologia, 28 páginas.

FALCÃO-SILVA, V.S., SILVA, D.A., SOUZA, M.F.V., e SIQUEIRA-JUNIOR, J.P., 2009. Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by a kaempferol glycoside. **Phytotherapy Research**, v.23, p.1367-1370. 2009.

FAUCI A. S.; MORENS, D. M. The perpetual challenge of the infectious diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 366, p. 454-461, 2012.

FEIGL, F.; WEST, P. W. Test for selenium based on catalytic effect. **Anal. Chem.**, v. 19, p. 351 - 353, 1947.

FERNÁNDEZ-RUBIO, C.; CAMPBELL, D.; VACAS, A.; IBAÑEZ, E.; MORENO, E.; ESPUELAS, S.; CALVO, A.; PALOP, J. A.; PLANO, D.; SANMARTIN, C.; NQUEWA, P. A. Leishmanicidal Activities of Novel Methylseleno-Imidocarbamates. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 59, p. 5705, 2015.

FERNEBRO, J. Fighting bacterial infections - Future treatment options. **Drug Resist. Update.**, v.14, p. 125-139, 2011.

FERREIRA, M. V. C.; PAES, V. R.; LICHTENSTEIN, A. Penicilina: oitenta anos. **Rev. Med.** v. 87, p. 272-276, 2008.

FIDLER, D. P. Globalization, international law, and emerging infectious diseases. **Emerg. infect. dis.**, v. 2, p. 77-84, 1996.

FRANKLIN, L.; NOBREGA, A. R.; COSTA, L. D., KLUSKENS, J. A. Revisiting phage therapy: new applications for old resources. **Trends Microbiol.** v. 23, p. 185-191, 2015.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Production of plant secondary metabolites in plant cell and tissue culture: the example of *Tabernaemontana* and *Aspidosperma* genera. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 18, p. 627-641, 2008.

GEBHARDT, K.; SCHIMANA, J.; MÜLLER, J.; FIEDLER, H.-P.; KALLENBORN, H. G.; HOLZENKÄMPFER, M.; KRASTEL, P.; ZEECK, A.; VATER, J.; HÖLTZEL, A.; SCHMID, D. G.; RHEINHEIMER, J.; DETTNER, K. Screening for biologically active metabolites with endosymbiotic bacilli isolated from arthropods. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 217, p. 199, 2002.

GIBBONS, S. Phytochemicals for Bacterial Resistance – Strengths, Weaknesses and Opportunities. **Planta. Med.**, v. 74, p. 594-602, 2008.

GIBBONS, S.; UDO, E.E. The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux, on the in vitro activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the *tet(K)* determinant. **Phytother. R.**, v.14, p. 139-140, 2000.

GOLD, H. S.; MOELLERING, R.C. Antimicrobial-drug resistance, **N. Engl. J. Med.** v. 335, p. 1445–1453, 1996.

GOLDSTEIN, E. J. C.; CITRON, D. M. Resistance Trends in Antimicrobial Susceptibility of Anaerobic Bacteria, Part II. **Clin. Microbiol. Newsl.**, v. 33, p. 9-15, 2011.

GONZALES, R.D., SCHRECKENBERGER, P.C., GRAHAM, M.B., KELKAR, S., DENBESTEN, K. QUINN, J. P. Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. **Lancet.**, v. 357, p. 1179, 2001.

GOODMAN, L.S. *The pharmacological Basis of Therapeutics*, 12th edition. New York: McGraw Hill, 2112 páginas, 2012.

GUO, N.; ZHAO, X.; LI, W.; SHI, C.; MENG, R.; LIU, Z.; YU, L. The synergy of berberine chloride and totarol against *Staphylococcus aureus* grown in planktonic and biofilm cultures. **J. Med. Microbiol.**, v. 64, p. 891-900, 2015.

GUPTA, D.; SINGH, A.; KHAN, A. U. Nanoparticles as Efflux Pump and Biofilm Inhibitor to Rejuvenate Bactericidal Effect of Conventional Antibiotics. **Nanoscale Res. Lett.**, v. 12, p. 454, 2017.

HANSCH, C.; LEO, A.; MEKAPATI, S.B.; KURUP, A. QSAR and ADME. **Bioorg. Med. Chem.** v. 12, p. 391-400, 2004.

HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 54, p. 237-271, 1985

HUGHES, V. M.; DATTA, N. Conjugative plasmids in bacteria of the “pre-antibiotic” era. **Nature**, v. 302, p. 725-731, 1983.

HUH, A. J.; KWON, Y. J. “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **J. Control. Release**, v. 156, p. 128-145, 2011.

HUMPHRIES, R.; HINDLER, J. Emerging resistance, new antimicrobial agents...but no tests! The challenge of antimicrobial susceptibility testing in the current US regulatory landscape. **Clin. Infect. Dis.** v. 63, p. 83-88, 2016.

IMANSHAHIDI, M.; HOSSEINZADEH, H. Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent. **Phytother. Res.**, v. 22, p. 999-1012, 2008.

IVORY, K; PIETRO, E.; SPINKS, C.; ARMAH, C. N.; GOLDSOON, A. J.; DAINTY, J. R.; NICOLETTI, C. Selenium supplementation has beneficial and detrimental effects on immunity to influenza vaccine in older adults. **Clin Nutr.** v. 36, p. 407-415, 2017

JAIN, V. K.; PRIYADARSINI, K. I. Organoselenium Compounds in Biology and Medicine: Synthesis, Biological and Therapeutic Treatments. **RSC Adv.**, 457 páginas, 2017.

KAATZ, G. W.; MOUDGAL, V. V.; SEO, S. M.; KRISTIANSEN, J. E. Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, p. 719-726. 2003.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, p.2650-2655, 1995.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M.; O'BRIEN, L. WAHIDUZZAMAN, M.; FOSTER, T. Evidence for the Existence of a Multidrug Efflux Transporter Distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 1404-1406, 2000.

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

KALIA, N. P. Efflux-Mediated Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. Drug Resistance in Bacteria, Fungi, Malaria, and Cancer (Livro). p. 307-323, 2017.

KAPP, E.; MALAN, S. F.; SAMPSON, S. Small Molecule Efflux Pump Inhibitors in *Mycobacterium tuberculosis*: a Rational Drug Design Perspective. **Mini. Rev. Med. Chem.** p. 101, 2017

KATZ, S., HERSHBERG, R. Elevated mutagenesis does not explain the increased frequency of antibiotic resistant mutants in starved aging colonies. **PLoS Genet.** v. 9, e1003968, 2013.

KENNEDY, M. A brief history of disease, science and medicine: from the ice age to the genome project. **Asklepiad Press**, v. p. 2004.

KIM, M. B. & SHAW, J. T. Synthesis of antimicrobial natural products targeting FtsZ: (+)-totarol and related totarane diterpenes. **Org Lett.** v. 12, p. 3324–3327, 2010.

KNÖPPEL, A.; NÄSVALL, J.; ANDERSSON, D. I. Evolution of Antibiotic Resistance without Antibiotic Exposure. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 61, p. 1-5, 2017.

KONG, H.; KANG, O. H.; SEO, Y. S.; MUN, S. H.; ZHOU, T.; SHIN, D.W.; KWON, D. Y. The inhibition effect of Chlorpromazine against the β -lactam resistance of MRSA. **Asian Pac J Trop Dis.** v. 9, p. 542 - 546, 2016.

KUMAR, B.S.; TIWARI, S.K.; SAIKANT, R.; MANOJ, G.; KUNWAR, A.; SIVARAM, G.; ABID, Z.; AHMAD, A.; PRIYADARSINI, K.I.; KHAN, A.A. Antibacterial and ulcer healing effects of organoselenium compounds in naproxen induced and *Helicobacter pylori* infected Wistar rat model. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v. 24, p. 263-270, 2010.

KVIST, M.; HANCOCK, V.; KLEMM, P. Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 74, p. 7376-7382, 2008.

LEEKHA, S., TERRELL, C.L., EDSON, R.S. General principles of antimicrobial therapy. **Mayo Clin. Proc.** v. 86, pag. 156-167, 2011.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 23, p. 3-25, 1997.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 46, p.3-26, 2001.

LISTER, J. On a new method of treating compound fracture, abcess, etc., with observations on the condition of suppuration. **Lancet.** v. 1867; p. 326-329, 1939.

LIVERMORE, D.M.; MUSHTAG, S.; JAMES, D.; POTZ, N.; WALKER, R.A.; CHARLETT, A.; WARBURTON, F.; JOHNSON, A.P.; WARNER, M.; HENWOOD C.J. In vitro activity of piperacillin/tazobactam and other broad-spectrum antibiotics against bacteria from hospitalised patients in the British Isles. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 22, p. 14-27, 2003.

LOMOVSKAYA, O., BOSTIAN, K.A. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic – a vision for applied use. **Biochem. Pharmacol.**, v. 71, p. 910-918. 2006.

LOMOVSKAYA, O.; LEE, A.; HOSHINO, K.; ISHIDA, H.; MISTRY, A.; WARREN, M. S.; BOYER, E. CHAMBERLAND, S.; LEE, V. J. Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43. p. 1340-1346, 1999.

LORETO, E. S.; ALVES, S. H.; SANTURIO, J.M.; NOGUEIRA, C. W; ZENI, G. Diphenyl diselenide in vitro and in vivo activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. **Vet. Microbiol.**, v. 156, p. 222-226, 2012.

LORETO, E. S.; MARIO, D. A.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. In vitro antifungal evaluation and structure–activity relationship of diphenyl diselenide and synthetic analogues. **Mycoses**. v. 54, p. 572-576, 2011.

MADEIRO, S. A. L.; BORGES, H. P. B.; SOUTO, A. L.; FIGUEIREDO, P. T. R.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; TAVARES, J. F. Modulation of the antibiotic activity against multidrug resistant strains of coumarins isolated from Rutaceae species. **Microb. Pathog.** v. 104, p. 151-154, 2017.

MAHLAPUU, M.; HAKANSSON, J.; RINGSTAD, L.; BJORN, C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** v. 6, p. 194, 2016.

MAKUMDAR, K.; DUTTA, N. K.; DASTIDAR, S. G.; MOTOHASHI, N.; SHIRATAKI, Y. Diclofenac in the Management of E. coli Urinary Tract Infections. **In Vivo**. v. 20, p. 613-619, 2006.

MARQUEZ, B., NEUVILLE, L., MOREAU, N.J., GENET, J., SANTOS, A.F., ANDRADE, M.C.C., SANT'ANA, A.E.G. Multidrug resistance reversal agent from *Jatropha elliptica*. **Phytochem.**, v. 66, p. 1804-1811. 2005.

MCMURRY, L.; PETRUCCI RE, J. R.; LEVY, S. B.; Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 77, p. 3974-3977, 1980.

MEEK, P.J.; LIU, Z.; TIAN, L.; WANG, C.Y.; WELSH, W.J.; ZAUHAR, R.J. Shape Signatures: speeding up computer-aided drug discovery, **Drug Disc. Today**. v. 11, p. 895-904, 2006.

MORAR, M.; PENGELLY, K.; KOTEVA, K.; WRIGHT, G.D. Mechanism and diversity of the erythromycin esterase family of enzymes. **Biochem.** v. 51, p. 1740-1751, 2012.

MUKERJI, S.; O'DEA, M.; KIRKIWOOD, R.; LEE, T.; ABRAHAM, S. Development and transmission of antimicrobial resistance among Gram-negative bacteria in animals and their public health impact. **Essays Biochem.**, v. 61, p. 23-35, 2017.

NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chem. Rev.**, v. 104, p. 6255-6285, 2004.

ODDS, F. C.. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 1, p. 52,2003.

OLIVEIRA, C. S.; LIRA, B. F.; FALCAO-SILVA, V. F.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F. Synthesis, Molecular Properties Prediction, and Anti-staphylococcal Activity of N-Acylhydrazones and New 1,3,4-Oxadiazole Derivatives. **Molecules**. v. 17, p. 5095-5107, 2012.

OLIVEIRA, C.S.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; HARDING, D.P.; LIRA, B.F.; LORENZO, J.G.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; ATHAYDE-FILHO, P.F. Drug resistance modulation in *Staphylococcus aureus*, a new biological activity for mesoionic hydrochloride compounds. **Molecules**. v. 16, p. 2023-2031, 2011.

ONDEYKA, G. J.; SMITH, S. K.; ZINK, D. L.; VICENTE, F.; BASILIO, A.; BILLS, G. F.; POLISHOOK, D.; GARLISI, C.; MCGUINNESS, D.; SMITH, E.; QIU, H.; GILL, C. J.; DONALD, R. G. K.; PHILLIPS, J. W.; GOETZ, M. A.; SINGH, S. B. Isolation, structure elucidation and antibacterial activity of a new tetramic acid, ascosetin. **J. Antib.** v. 6, p. 527-531, 2014.

ONG, S. Y.; WU, J.; MOOCHHALA, S. M.; TAN, M. H. LU, J. Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. **Biomaterials**. v. 29, p. 4323-4332, 2008.

OO T Z., COLE N., GARTHWAITE L., WILLCOX M D., ZHU H. Evaluation of synergistic activity of obvine lactoferricin with antibiotics in corneal infection. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 65, p. 1243-1251, 2010.

PAULANDER, W., MAISNIER-PATIN, S., ANDERSSON, D. I. The fitness cost of streptomycin resistance depends on rpsL mutation, carbon source and RpoS (σ S). **Genetics**. v. 183, p. 539-546, 2009.

PATEL, D.; KOSMIDIS, C.; SEO, S. M.; KAATZ, G. W. Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 54, p. 5070-5073, 2010.

PESARICO, A. P.; SARTORI, G.; SANTOS, C. F. A; NETO, J. S. S.; BORTOLOTTTO, V.; SANTOS, R. C. V.; NOGUEIRA, C. W.; PRIGOL, M. 2,2-Dithienyl diselenide pro-oxidant activity accounts for antibacterial and antifungal activities. **Microbiol. Research** v. 168, p. 563-568, 2013.

POOLE M. D.; Portugal L. G. Treatment of rhinosinusitis in the outpatient setting. **Am. J. Med**, v. 118, p. 45-50, 2005

POWERS J. P., HANCOCK R. E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24, 1681–1691, 2003.

RAMPIONI, G.; VISCA, P.; LEONI, L.; IMPERI, F. Drug repurposing for antivirulence therapy against opportunistic bacterial pathogens. **Emerg Top Life Sci.** 2017.

RANJAN, K. P.; RANJAN, N.; GANDHI, S. Surgical site infections with special reference to methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: experience from a tertiary care referral hospital in North India. **Int. J.Res. Med. Sci.**, v. 3, p. 108-111, 2013.

RASHAD, A. E.; MOHAMED, I. H.; ABDEL-MEGEID, R.; MICKY, J. A.; ABDEL-MEGEID, F. M. E. Synthesis and antiviral evaluation of some new pyrazole and fused pyrazolopyrimidine derivatives. **Bioorgan. Med. Chem.** v. 16, p.7102-7106, 2008.

RAWAT, D.; NAIR, D. Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. **J Glob Infect Dis.** v. 2, p. 263-274, 2010.

REFAT, M. S.; ABDEL-HAFEZ, S. H. Synthesis and spectroscopic studies of the new Ag(I) organoselenium complex. **Rus. J. Gen. Chem.**, v. 86, p. 1151, 2016.

REYDOLDS, E.; ROSS, J. I.; COVE, J. H. Msr(A) and related macrolide / streptogramin resistance determinants: incomplete transporters? **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 22, p. 228-236, 2003.

RISHTON, G. M. Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Leads: Past Successes and Present Day Issues. **Am. J. Cardiol.** v. 101, pag. 43, 2008.

RODRÍGUEZ-VERDUGO, A., GAUT, B. S., TENAILLON, O. Evolution of *Escherichia coli* rifampicin resistance in an antibiotic-free environment during thermal stress. **BMC Evol. Biol.** v. 13, p. 50, 2013.

ROSS, J. I., FARRELLI, A. M., EADY, E. A., COVE, J. H., CUNLIFFE, W. J. Characterization and molecular cloning of the novel macrolide-streptogramin B resistance determinant from *Staphylococcus epidermidis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 24, p. 851-862, 1989.

SAHU, P. K.; UMME, T.; YU, J.; NAYAK, A.; KIM, G.; NOH, M.; JAE-YOUNG, L.; KIM, D. D.; JEONG, L. S. Selenoacyclovir and selenoganciclovir: Discovery of a new template for antiviral agents. **J. Med. Chem.**, v. 58, p. 8734, 2015.

SARKAR, A. K., APPIDI, S. & RANGANATH, A. S. Evaluation of berberine chloride as a new antibacterial agent against Gram positive bacteria for medical textiles. **Fibres Textiles East. Eur.** v. 19, pag. 131-134, 2011.

SHAROM, F. J. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. **Pharmacogenomics.** v. 9, p. 105-127, 2008.

SHORTRIDGE, V.D.; ZHONG, P.; CAO, Z.; BEYER, J.M.; ALMER, L.S.; RAMER, N.C. Comparison of in vitro activities of ABT-773 and telithromycin against macrolide-susceptible and -resistant streptococci and staphylococci. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 46 p.783-786, 2002

SMEKALOVA, M.; ARAGON, V.; PANACEK, A.; PRUCEK, R.; ZBORIL, R.; KVITEK, L. Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens. **Vet J**. v. 209, p. 174-179, 2016.

SMITH, E. C. J.; KAATZ, G. W.; SEO, S. M.; WAREHAM, N.; WILLIAMSON E. M.; GIBBONS, S. the phenolic diterpene totarol inhibits multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother**., v. 51, p. 4480-4483, 2007.

STEFANI, S.; VARALDO, P. E. Epidemiology of methicillin-resistant *staphylococci* in Europe. **Clin. Microbiol. Infec.**, v. 9, p. 1179-1186, 2003.

STERMITZ F.R., LORENZ P., TAWARA J.N., ZENEWICZ L.A., LEWIS K. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor **Proc. Natl. Acad. Sci**. v. 97, p. 1433-1437, 2000.

STRYJEWSKI, M.; COREY, G. R. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Evolving Pathogen. **Clin. Infect. Dis**. v. 58, p. 10 -19, 2014.

SUBRAMANI, R., NARAYANASAMY, M.; FEUSSNER, K.D. Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens. **3 Biotech**. v. 7, p.172, 2017.

TINTINO, S. R.; TINTINO, C. D. M.; CAMPINA, F. F.; PEREIRA, R. L.; COSTA, M. S.; BRAGA, M. F. B. M.; LIMAVERDE, P. W.; ANDRADE, J. C.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; COUTINHO, H. D. M.; BALBINO, V. Q.; BALBINO, T. C. L.; RIBEIRO-FILHO, J.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Action of cholecalciferol and alpha-tocopherol on *Staphylococcus aureus* efflux pumps. **Excli J**. v 15, p. 315-322, 2016.

TOTHA, N.; REDDY, M. V.; KUMAR, A.; KHAN, I.A.; SANGWAN, P. L.; KALIA, N. P.; KOUL, J. L.; KOUL, S. Substituted dihydronaphthalenes as efflux pump inhibitors of *Staphylococcus aureus*. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, p. 3607-3616, 2010.

TRABULSI, L.R.; ALTHERTUM, F. Microbiologia. São Paulo: Atheneu, 2005

TROULLIER, P.; OLLIARO, P.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public health policy failure. **Lancet**, v.359, p. 2188-2194, 2002.

TRUONG-BOLDUC, Q.C.; STRAHILEVITZ, J.; HOOPER, D.C. NorC, a new efflux pump regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, p. 1104-1107. 2006.

VAN WATERSCHOOT R. A. B.; SCHINKEL A. H. A critical analysis of the interplay between cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: recent insights from knockout and transgenic mice. **Pharmacol. Rev.**, v. 63, p. 390-410, 2011.

VARELA, M. F; ANDERSEN, J. L.; RANJANA, K.C; KUMAR, S.; SANFORD, L. M.; HERNANDEZ, A. J. Bacterial resistance mechanisms and inhibitors of Multidrug Efflux Pump belonging to de Major Facilitator Superfamily of solute transport systems. **Anti-Infective Drug Discovery**, v. 5, p. 109-131, 2017.

VARGIU, A. V.; POS, K. M.; POOLE, K.; NIKAIDO, HIROSHI. Editorial: Bad Bugs in the XX1st Century: Resistance Mediated by Multi-Drug Efflux Pumps in Gram-Negative Bacteria. **Front. Microbiol.** v. 7, p. 833, 2016.

VICTORIA, F.N.; RADATZ, C.S.; SACHINI, M.; JACOB, R.G.; ALVES, D.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; MOTTA, A.S.; SILVA, W.P.; LERNARDÃO, E.J. Further analysis of the antimicrobial activity of a-phenylseleno citronellal and a-phenylseleno citronellol. **Food Control** v. 23, p. 95-99, 2012.

WALDMAN, E. A; SATO, A. P. S. Trajetória das doenças infecciosas no Brasil nos últimos 50 anos: um contínuo desafio. **Rev. Saúde Pública**, p. 50-68, 2016.

WALSH, C.; FISHER, S. L.; PARK, I. S.; PRAHALAD, M.; WU, Z. Bacterial resistance to vancomycin: five genes and one missing hydrogen bond tell the story. **Chem. Biol** .v. 3, p. 21-28, 1996

WATERBREEMD, H. V.; GRIFFORD, E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? **Nat. Rev. Drug. Discov.** v. 2, p. 192-204, 2003.

WERMUTH, C. G. The Practice of Medicinal Chemistry. Third ed. **Academic. Press**, San Diego, 2011.

WILCOX, M. H.; DMITRIEVA, N.; GALES, A. C.; PETUKHOVA, I.; AL-OBEID, S.; ROSSI, F.; BLONDEAU, J. M. Susceptibility testing and reporting of new antibiotics with a focus on tedizolid: an international working group report. **Future Microbiol.** v. 6, p. 1523-1532, 2017

WILDMAN, S. A.; CRIPPEN, G. M. Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, v. 39, p. 868-873, 1999.

WILLERS, C.; WENZEL, J. F.; PLESSIS, L. H. D.; GOUWS, C.; HAMMAN, H. Efflux as a mechanism of antimicrobial drug resistance in clinical relevant microorganisms: the role of efflux inhibitors. **Exp. Op. Ther. Targets** v. 21, 2017

WOJTYCZKA, R. D., DZIEDZIC, A., KEPA, M. Berberine enhances the antibacterial activity of selected antibiotics against coagulase-negative Staphylococcus strains in vitro. **Molecules**, v. 19, p. 6583-6596, 2014.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 57, p.1451-1470, 2005.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, p. 175-186, 2007.

ZHANEL, G. G.; HISANAGA, T.; NICHOL, K.; WIERZBOWSKI, A.; HOBAN, D. J. Ketolides: an emerging treatment for macrolide-resistant respiratory infections, focusing on *S. pneumoniae*. **Expert. Opin. Emerg. Drugs**, v. 8, p. 297-321, 2003.

ZLOH, M., KAATZ, G. W., GIBBONS, S. Inhibitors of multidrug resistance (MDR) have affinity for MDR substrates. **Bioorg.Medicinal Chem. Lett.**, v. 14, p. 881-885. 2004.

ZHOU, S. F. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. **Xenobiotica**, v. 38, p. 802-832, 2008.

Apêndice

APÊNDICE A

Synergistic effect of organoselenium compounds and antimicrobial drugs against *Staphylococcus aureus*

Nathalie H. P. B. Borges^a*, Helivaldo D. S. Souza^b, José M. Barbosa Filho^c, Bruno F. Lira^b, Sara A. L. Madeiro^d, Petrônio F. Athayde Filho^b, José P. Siqueira Junior^a

^a Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brazil

^c Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brazil

^d Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil

* Corresponding author: +55 83 3223 2721, nathalie@ltf.ufpb.br

ABSTRACT

Several chemical compounds, synthetic and natural, have been reported as efflux pump inhibitors, acting as important additional tools in the development of drugs co-formulated with appropriate antibiotics. In this work, we evaluated nine organoselenium compounds, synthesized according to procedures reported in the literature, three synthetic stages. These organoselenium compounds were tested for synergistic activity, and all Tet/HSe combinations reduced tetracycline MIC by up to 256-fold, resulting in a synergistic effect in all combinations. Eri/HSe combinations also showed promising synergistic activity, where erythromycin MIC was reduced by up to 16-fold. Nor/HSe combinations did not show a synergistic effect, with emphasis on Nor/HSe-09, which exerted an antagonistic effect. The results presented here showed that selenoglycolic acid derivatives can be used to potentiate

the effect of antimicrobial agent, making it possible to reintroduce currently ineffective antibiotics for the clinical treatment of multidrug-resistant infections.

1. Introduction

Bacterial resistance is closely associated with the use of antimicrobial agents in clinical practice. Prolonged therapy with antibiotics can lead to the development of resistance in a microorganism that was initially sensitive to antibiotics and then gradually adapted to the antibiotics. An important cause of the spread of antimicrobial resistance is a failure to apply infection control measures in a hospital and elsewhere [1,2]. Efflux pumps, for example, contribute to the intrinsic and acquired resistance of bacteria for most, if not all, of the available antimicrobial drugs. Proteins TetK and MsrA are specific transporters that export tetracyclines and macrolides, respectively, where NorA is the most extensively studied and was the first described multidrug resistance and toxin extrusion protein in *S. aureus* [3,4], which confers resistance to a wide range of compounds, including biocides, dyes, hydrophilic fluoroquinolones and others [5]. A concerted effort has been made to identify compounds capable of inhibiting the efflux pumps of *S. aureus*, and several natural and synthetic compounds have been reported as efflux pump inhibitors, acting as important additional tools in the development of drugs co-formulated with appropriate antibiotics [6,7,8]. Selenium-containing compounds are an important class of bioactive compounds, where they have been found to have antioxidant [9], immunomodulatory and antitumor [10], and antimicrobial [11,12] activities, among others. Selenium-rich probiotics have been shown to be intense inhibitors of *Escherichia coli* *in vivo* and *in vitro* [13]. Other studies have reported the antibacterial effect of organoselenium compounds against various bacteria, especially *S. aureus* [14,15]. This study evaluated a series of organoselenium compounds for their effect on drug resistance and synergistic effect with antibiotics against *S. aureus*.

2. Materials and Methods

2.1 Chemistry

The new organoselenium compounds, 3a–i, were synthesized according to procedures reported in the literature [16], and the three synthetic stages outlined in Scheme 1. In step 1, sodium hydrogen selenide (NaHSe) was produced by reacting powdered grey selenium (1) with sodium borohydride in distilled water. In step 2, sodium benzoselenoate (2) was

obtained *in situ* by reacting benzoyl chloride with sodium hydrogen selenide. The last step involved the formation of organoselenium compounds 3a-i by treatment of this intermediate with 2-chloro-N-arylacetamides [17], in yields of 70-80%.

The purity of the compounds was determined by examining their melting point ranges. The structures of the final products were fully confirmed by elemental analysis and IR, ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectroscopic techniques. Thus, in the ^1H -NMR spectra of compounds 3a-i, two typical signals were observed, one assigned to the methylene protons $\text{CH}_2\text{-Se}$ observed in the range of 3.77-4.01 ppm and another assigned to protons of N-H were observed in the range of 8.24-10.91 ppm. In the ^{13}C -NMR spectra, signals characteristic of C=O were observed in the range of 193.09-197.59 ppm, corresponding to selenol ester (Se-CO), and signals characteristic of C=O were observed in the range of 167.90-168.35 ppm, corresponding to the amide CONH , while signals characteristic of methylene carbon $\text{CH}_2\text{-Se}$ were observed in the range of 28.02-29.02 ppm. In the infrared spectrum, all the compounds 3a-i showed amide C=O absorption bands around $1651\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$, selenol ester C=O absorption bands around $1670\text{-}1674\text{ cm}^{-1}$ and N-H absorption stretches around $3261\text{-}3278\text{ cm}^{-1}$.

All reagents and solvents used were purchased from commercial sources (Sigma-Aldrich, Brazil) and used without further purification. The progress of the reactions was monitored by thin layer chromatography (TLC) on silica gel plates. The purification of the compounds was performed by re-crystallization in ethanol and confirmed by determining the melting range on a MQAPF-3 hotplate. The structures of the new compounds 7a-j were confirmed by elemental analysis on a Carlo Erba EA1110 elemental analyzer. The spectra (IR) were obtained on a Shimadzu model IRPrestige-21 FTIR spectrometer, using KBr pellets. ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra were obtained on two different instruments: a Varian 200 NMR (200 MHz for ^1H and 50 MHz for ^{13}C) and Varian 500 NMR (500 MHz for ^1H and 126 MHz for ^{13}C). **Deuterated chloroform (CDCl_3) and Deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-d_6) was used as the solvent**, and tetramethylsilane (TMS) was used for the internal standard. Chemical shifts (δ) were measured in parts per million (ppm), and the coupling constants (J) in hertz (Hz).

2.1.1 General procedure for the preparation *Se*-(2-oxo-2-(arylamino)ethyl)benzoselenoate

Sodium borohydride (0.0139 mol) was dissolved in 6 ml of water and added, slowly, under a selenium suspension (0.0063 mol) in 6 ml of water, contained in a 50-ml flask. The reaction

was exothermic and hydrogen gas was released. Next (*in situ*), aroyl chloride (0.0063 mol) was added, slowly, at a temperature of 30 °C. After 60 min of stirring, at room temperature, the 2-chloro-N-arylacetamide (0.0063 mol) was added, in small portions [17]. Within a few minutes, a solid precipitate formed. The mixture was stirred for another 2 hours at room temperature. The reaction mixture was then extracted with dichloromethane (3 x 25 ml). The organic phase was filtered on a porcelain Buchneer funnel containing silica gel and then concentrated under reduced pressure, providing the final product which was recrystallized in ethanol.

Se-(2-oxo-2-(phenylamino)ethyl) benzoselenoate (3a)

Yield: 75 %. White solid with m.p. 132-133 °C. Anal. Calcd for C₁₅H₁₃NO₂Se, C, 56.61; H, 4.12; N, 4.40; Found: C, 55.30; H, 3.90; N, 4.84. NMR ¹H – (200 MHz, CDCl₃, δ): 8.36 (s, 1H, NH); 7.92 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar-H); 7.65 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, Ar-H); 7.0 (m, 4H, Ar-H); 7.30 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, Ar-H); 7.08 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, Ar-H); 3.78 (s, 2H, CH₂). NMR ¹³C – (50 MHz, CDCl₃, δ): 196.74, 168.25, 138.06, 137.94, 134.73, 129.09, 127.58, 124.44, 119.91, 28.27. IV (KBr, cm⁻¹): 3292 (N-H); 3053 (=C-H, Ar); 1654 (-N-CO); 1674 (-Se-CO); 1596 and 1444 (C=C, Ar).

Se-(2-((4-nitrophenyl)amino)-2-oxoethyl) benzoselenoate (3b)

Yield: 70 %. White solid with m.p. 192-193 °C. Anal. Calcd for C₁₅H₁₂N₂O₄Se, C, 49.60; H, 3.33; N, 7.71; Found: C, 48.68; H, 3.19; N, 7.99. NMR ¹H – (200 MHz, CDCl₃, δ): 8.82 (s, 1H, NH); 8.19 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, Ar-H); 7.94 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, Ar-H); 7.68 (m, 3H, Ar-H); 7.52 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H); 3.80 (s, H-6, 2H). NMR ¹³C – (50 MHz, CDCl₃, δ): 197.59, 168.83, 143.91, 143.66, 137.66, 135.16, 129.38, 127.70, 125.20, 119.22, 28.02. IV (KBr, cm⁻¹): 3261 (N-H); 3207 to 3067 (=C-H, Ar); 1670 (-Se-CO and -N-CO sobrepostos); 1564 and 1404 (C=C, Ar); 1510 and 1342 (NO₂); 852 (=C-H, Ar).

Se-(2-((4-ethylphenyl)amino)-2-oxoethyl) benzoselenoate (3c)

Yield: 72%. White solid with m.p. 124-125 °C. Anal. Calcd for C₁₇H₁₇NO₂Se, C, 58.96; H, 4.95; N, 4.04; Found: C, 59.78; H, 4.95; N, 4.90. NMR ¹H – (200 MHz, CDCl₃, δ): 8.30 (s, 1H, NH); 7.91 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar-H); 7.63 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar-H); 7.47 (m, 4H, Ar-H); 7.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar-H); 3.78 (s, 2H, CH₂); 2.59 (q, 2H, CH₂CH₃); 1.19 (t, 3H, CH₂CH₃). NMR ¹³C – (50 MHz, CDCl₃, δ): 196.62, 168.11, 140.58, 137.98, 135.67, 134.69, 129.21, 128.37, 127.55, 120.04, 28.43, 28.27, 15.83. IV (KBr, cm⁻¹): 3284 (N-H); 3068 (=C-H, Ar); 1674 (-Se-CO); 1651 (-N-CO); 1593 and 1413 (C=C, Ar); 883 (=C-H, Ar); 767 (N-H).

Se-(2-oxo-2-(p-tolylamino)ethyl) benzoselenoate (3d)

Yield: 77 %. White solid with m.p. 132-134 °C. Anal. Calcd for C₁₆H₁₅NO₂Se, C, 57.84; H, 4.55; N, 4.22; Found: C, 58.37; H, 4.52; N, 5.01. NMR ¹H – (200 MHz, CDCl₃, δ): 8.28 (s,

1H, NH); 7.92 (d, J = 7.6 Hz, 2H, Ar-H); 7.65 (t, J = 7.4 Hz, 1H, Ar-H); 7.49 (t, J = 7.4 Hz, 2H, Ar-H), 7.40 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ar-H); 7.10 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ar-H); 3.77 (s, 2H, CH₂); 2.29 (s, 3H, CH₃). NMR ¹³C – (50 MHz, CDCl₃, δ): 196.64, 168.10, 137.99, 135.49, 134.70, 134.09, 129.54, 129.22, 127.56, 119.95, 28.27, 20.99. IV (KBr, cm⁻¹): 3269,34 (N-H); 3037,89 (=C-H, Ar); 1674 (-Se-CO); 1651 (-N-CO); 1595 and 1402 (C=C, Ar); 889 (=C-H, Ar).

Se-(2-((4-bromophenyl)amino)-2-oxoethyl) benzoselenoate (3e)

Yield: 73%. White solid with m.p. 165-167 °C. Anal. Calcd for C₁₅H₁₂BrNO₂Se, C, 45.37; H, 3.05; N, 3.53; Found: C, 46.08; H, 3.03; N, 4.05. NMR ¹H – (200 MHz, CDCl₃, δ): 8.40 (s, 1H, NH); 7.92 (d, J = 7.6 Hz, 2H, Ar-H); 7.67 (t, J = 6.9 Hz, 1H, Ar-H); 7.50 (t, J = 7.5 Hz, 2H, Ar-H), 7.42 (s, 4H, Ar-H); 3.77 (s, 2H, CH₂). NMR ¹³C – (50 MHz, CDCl₃, δ): 197.03, 168.35, 137.83, 137.15, 134.90, 132.02, 129.28, 127.62, 121.41, 117.00, 28.14. IV (KBr, cm⁻¹): 3263 (N-H); 3182 à 3059 (=C-H, Ar); 1672 (-Se-CO); 1651 (-N-CO); 1537 and 1487 (C=C, Ar); 815 (=C-H, Ar).

Se-(2-((4-chlorophenyl)amino)-2-oxoethyl) benzoselenoate (3f)

Yield: 68 %. White solid with m.p. 152-154 °C. Anal. Calcd for C₁₅H₁₂ClNO₂Se, C, 51.08; H, 3.48; N, 3.97; Found: C, 51.98; H, 3.43; N, 4.10. NMR ¹H – (200 MHz, CDCl₃, δ): 8.38 (s, 1H, NH); 7.92 (d, J = 7.9 Hz, 2H, Ar-H); 7.66 (t, J = 7.4 Hz, 1H, Ar-H); 7.49 (m, 4H, Ar-H); 7.26 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ar-H); 3.77 (s, 2H, CH₂). NMR ¹³C – (126 MHz, CDCl₃, δ): 196.92, 168.28, 137.93, 136.70, 134.86, 129.42, 129.29, 129.08, 127.62, 121.12, 28.15. IV (KBr, cm⁻¹): 3278 (N-H); 3122 to 3068 (=C-H, Ar); 1674 (-Se-CO); 1654 (-N-CO); 1544 and 1400 (C=C, Ar); 833 (=C-H, Ar).

Se-(2-((4-isopropylphenyl)amino)-2-oxoethyl) benzoselenoate (3g)

Yield: 70%. White solid with m.p. 108 - 110 °C. Anal. Calcd for C₁₈H₁₉NO₂Se, C, 60.00; H, 5.32; N, 3.98; Found: C, 60.76; H, 5.48; N, 4.55. NMR ¹H – (500 MHz, CDCl₃, δ): 8.25 (s, 1H, NH); 7.92 (d, J = 7.5 Hz, 2H, Ar-H); 7.64 (t, J = 7.4 Hz, 1H, Ar-H); 7.49 (t, J = 7.8 Hz, 2H, Ar-H); 7.43 (d, J = 8.4 Hz, 2H, A-H); 7.16 (d, J = 8.4 Hz 2H, Ar-H); 3.77 (s, 2H, CH₂); 2.86 (sep, 1H, CH); 1.21 (d, 6H, CH₃). NMR ¹³C – (126 MHz, CDCl₃, δ): 196.63, 168.10, 145.26, 138.07, 135.78, 134.70, 129.23, 127.58, 126.96, 120.10, 33.74, 28.29, 24.14. IV (KBr, cm⁻¹): 3282 (N-H); 3124-3061 (=C-H, Ar); 1674 (-Se-CO); 1656 (-N-CO); 1600-1446 (C=C, Ar); 889 (=C-H, Ar); 767 (N-H).

Se-(2-((4-methoxyphenyl)amino)-2-oxoethyl) benzoselenoate (3h)

Yield: 75%. Gray solid with m.p. 139-140 °C. Anal. Calcd for C₁₆H₁₅NO₃Se, C, 55.18; H, 4.34; N, 4.02; Found: C, 54.33; H, 4.25; N, 4.44. NMR ¹H – (200 MHz, CDCl₃, δ): 8.24 (s, 1H, NH); 7.92 (d, J = 7.1 Hz, 2H, Ar-H); 7.65 (t, J = 7.1 Hz, 1H, Ar-H); 7.47 (m, 4H, Ar-H); 6.84 (d, J = 9.0 Hz, 2H, Ar-H); 3.77 (s, 5H, CH₂ and OCH₃). NMR ¹³C – (50 MHz, CDCl₃, δ): 196.37, 168.00, 156.58, 138.03, 134.63, 131.19, 129.19, 127.53, 121.74, 114.22, 55.57, 28.22. IV (KBr, cm⁻¹): 3282 (N-H); 3124-3061 (=C-H, Ar); 1678 (-Se-CO); 1639 (-N-CO); 1541 (C=C, Ar); 1029 (C-O-C); 883 (=C-H, Ar); 767 (N-H).

Se-(2-((4-chloro-3-nitrophenyl)amino)-2-oxoethyl) benzoselenoate (3i)

Yield: 72%. White solid with m.p. 132-134 °C. Anal. Calcd for C₁₅H₁₁ClN₂O₄Se, C, 45.30; H, 2.79; N, 7.04; Found: C, 45.80; H, 2.79; N, 7.47. NMR ¹H – (200 MHz, CDCl₃, δ): 10.93 (s, 1H, NH); 8.40 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar-H); 7.9 (*J* = 7.1 Hz, 2H, Ar-H); 7.74 (m, 3H, Ar-H); 7.58 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H); 4.01 (s, 2H, H-6). NMR ¹³C – (50 MHz, CDCl₃, δ): 193.09, 167.90, 147.26, 138.77, 137.58, 134.59, 132.10, 129.46, 126.92, 123.97, 118.71, 115.43, 29.02. IR (KBr, cm⁻¹): 3238 (N-H); 3101 to 3059 (=C-H, Ar); 1674 (-Se-CO); 1654 (-N-CO); 1595 and 1408 (C=C, Ar); 1529 and 1361 (NO₂); 1047 (C-Cl) 835 (=C-H, Ar); 765 (N-H).

2.2 Bacterial strains and media

Three strains of *S. aureus* were used: SA-1199B, which carries the gene encoding the NorA fluoroquinolone efflux protein [4]; RN-4220, which has the pUL5054 plasmid carrying the gene encoding the protein MsrA for macrolide efflux [18]; and IS-58, which has the efflux protein for tetracycline (TetK) [19]. All these strains were cultured on Blood Agar Base (BAB; (Laboratórios Difco Ltda., Brazil). Before being used, cells were grown in Brain Heart Infusion broth (BHI; Laboratórios Difco Ltda., Brazil) for 18-24 h at 37 °C. All strains were kindly provided by Professor Simon Gibbons (University of London).

2.3 Antibiotics and organoselenium compounds

Tetracycline, erythromycin and norfloxacin were obtained from Sigma Chemical Co., USA and were prepared according to CLSI guidelines [20]. The stock solutions of organoselenium compounds were prepared in DMSO and distilled water, which at their highest final concentration after dilution (4%) caused no inhibition of bacterial growth.

2.4 Minimum inhibitory concentration (MIC) and checkerboard assay

The minimum inhibitory concentration (MIC) of the antibiotics and organoselenium compounds were determined by microdilution assay using a suspension of ca. 10⁵ CFU/ml, with a drug concentration range of 4 to 512 µg/mL. MIC was defined as the lowest concentration at which no growth was observed. The checkerboard assay was conducted to measure the interaction between organoselenium compounds and antibiotics in the tested strains. The concentrations used of all compounds were 0.15 to 128 µg/ml. MIC values obtained for a given combination of organoselenium compounds and antibiotics were used to evaluate the effects of the combination of the two substances by calculating the fractional inhibitory concentration index (FICI) using the fractional inhibitory concentration (FIC) according to the following formulae: FIC of organoselenium = MIC organoselenium in combination divided by MIC of organoselenium alone (same mode for antibiotic); FICI = FIC of organoselenium + FIC of antibiotics. Synergism was defined when FIC index was less than

or equal to 0.5; “no interaction” was when the FIC index was greater than 0.5 and less than 4.0, and antagonistic effect when the FIC index was greater than 4.0 [21,22].

3. Result and Discussion

Table 1. MIC and fractional inhibitory concentration index (FICI) of the combination of antibiotics and organoselenium compounds against *S. aureus* strains.

Strain (Efflux pump)	Organoselenium Compounds	MIC (µg/ml)		FIC	FICI	Effect
		Alone	Combination			
IS-58 (TetK)	HSe-01	32	2	0.0625	0.070	Synergistic
	Tetracycline	64	0.5	0.0078		
	HSe-02	128	4	0.0312	0.035	Synergistic
	Tetracycline	64	0.25	0.0039		
	HSe-03	256	1	0.0039	0.054	Synergistic
	Tetracycline	64	1	0.0156		
	HSe-04	256	1	0.0039	0.078	Synergistic
	Tetracycline	64	0.25	0.0039		
	HSe-05	256	1	0.0039	0.078	Synergistic
	Tetracycline	64	0.25	0.0039		
	HSe-06	16	2	0.1250	0.156	Synergistic
	Tetracycline	64	2	0.0312		
	HSe-07	128	1	0.0078	0.023	Synergistic
	Tetracycline	64	1	0.0156		
	HSe-09	32	1	0.0312	0.039	Synergistic
	Tetracycline	64	0.5	0.0078		
RN4220 (MsrA)	HSe-11	128	2	0.0156	0.023	Synergistic
	Tetracycline	64	0.5	0.0078		
	HSe-01	32	4	0.125	0.187	Synergistic
	Erythromycin	512	32	0.062		
	HSe-02	128	128	1.000	1.062	No interaction
	Erythromycin	512	512	1.000		
	HSe-03	256	64	0.250	0.312	Synergistic
	Erythromycin	512	32	0.062		
	HSe-04	256	256	1.000	1.062	No interaction
	Erythromycin	512	512	1.000		
	HSe-05	256	1	0.0039	0.019	Synergistic
	Erythromycin	512	8	0.0156		
	HSe-06	32	8	0.250	0.500	Synergistic
	Erythromycin	512	128	0.250		
	HSe-07	256	64	0.250	0.500	Synergistic
	Erythromycin	512	128	0.250		
SA-1199B (NorA)	HSe-09	64	8	0.125	0.250	Synergistic
	Erythromycin	512	64	0.125		
	HSe-11	128	8	0.062	0.187	Synergistic
	Erythromycin	512	64	0.125		
	HSe-01	128	64	0.500	1.000	No interaction
	Norfloxacin	64	32	0.500		
	HSe-02	256	64	0.250	0.500	Synergistic
	Norfloxacin	64	16	0.250		
	HSe-03	256	128	0.500	1.500	No interaction
	Norfloxacin	64	64	1.000		
	HSe-04	256	64	0.250	0.750	No interaction
	Norfloxacin	64	32	0.500		
	HSe-05	256	128	0.500	1.500	No interaction
	Norfloxacin	64	64	1.000		
	HSe-06	32	32	1.000	1.500	No interaction
	Norfloxacin	64	32	0.500		

HSe-07	256	32	0.125	0.625	No interaction
Norfloxacin	64	32	0.500		
HSe-09	16	64	4.000	5.000	Antagonistic
Norfloxacin	64	64	1.000		
HSe-11	256	64	0.250	0.750	No interaction
Norfloxacin	64	32	0.500		

Among the nine organoselenium compounds evaluated (Table 1), HSe-01, HSe-06 and HSe-09 showed moderate antibacterial activity against *S. aureus* strains IS-58 (TetK), RN4220 (MsrA) and SA-1199B (NorA), with MIC values equal to or greater than 64 µg/ml. According to Gibbons [23], compounds that have MIC above 100 µg/ml are considered as low-active antimicrobial agents, whereas those with MIC below 10 µg/ml (ideal ≤ 2 µg/ml) are considered of great interest to pharmaceutical companies. All nine combinations of Tet/HSe were able to reduce the MIC of tetracycline up to 256-fold compared to the use of tetracycline alone against the IS-58 (TetK) strain, demonstrating promising synergistic antibacterial activity, with values of FICI between 0.023 and 0.318.

The active efflux of tetracyclines by transporter proteins, such as TetK, is one of the important resistance mechanisms of the genus *Staphylococcus* [24], so that the marked synergistic effect obtained with organoselenium compounds may be considered of great importance in the possible use of tetracycline in currently resistant strains. Some Eri/HSe combinations reduced erythromycin MIC by up to 64-fold when compared to the use of the respective antibiotic alone in RN4220 strains, which overexpress the MsrA efflux pump, a transmembrane protein with two bound ATP molecules that function independently [18,25].

The combination of Eri/HSe-09 exhibited very substantial antibacterial effect, with an FICI value of 0.019, which means intense synergism and of great importance for future studies on the reversal of bacterial resistance. On the other hand, only the Nor/HSe02 interaction indicated a synergistic effect with an FICI of 0.500. Some combinations showed no interaction, even if the addition of organoselenium moderately reduced the MIC of norfloxacin, which was not sufficient to be considered a synergistic effect. Other interactions were considered inconclusive or indifferent, indicating no interaction, and the Nor/Hse-09 combination resulted in an antagonistic effect, considering that the antibacterial effect of Hse-09 alone was greater than when combined with norfloxacin.

Combined antibiotic therapy is an important example of synergistic interaction used in clinical practice, based on the combination of two or more drugs in the treatment of infections, and is of great importance especially in cases of high risk of potentially resistant pathogens. Even drugs that alone have no marked antibacterial effect, can show antibacterial

activity potentiated by synergistic interaction when combined with other substances or antibiotics.

Selenium was chosen for the study because it is an essential and intriguing trace element in plants, animals and humans as an integral part of seleno-enzymes and due to its antioxidant effect [9]. On the other hand, excessive absorption of selenium can be toxic in living organisms, probably because of its prooxidant effect [26].

Relevant antibacterial activity has been reported for selenium analogues of glutathione peroxidase against *Helicobacter pylori* in *in vitro* and *in vivo* models, along with low toxicity [27]. In the present study, significant growth inhibitory activity was observed against *S. aureus* and *Salmonella typhimurium* [28].

Ebselen is an important organoselenium compound, which is used therapeutically as an anti-sclerotic drug, antioxidant and antiinflammatory. It has also become very promising against microorganisms, especially *S. aureus*, with a MIC of 0.125 to 0.5 µg/ml. The same study revealed that Ebselen blocked the synthesis of lipids, DNA and RNA in bacteria, reduced the synthesis of Panton-Valentine leukocidin and hemolysin, and also decreased biofilm formation by up to 60% in MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*). Unlike the common toxic effect in compounds containing selenium, Ebselen showed no toxic effect up to 32 µg/ml in human keratinocytes [29].

4. Conclusions

Organoselenium compounds HSe-01 and HSe-09 showed moderate antibacterial activity against strains of *S. aureus* that overexpress efflux pumps. All compounds had a potent synergistic effect, modulating resistance in strain IS-58, which overexpresses the TetK efflux pump, with reduction of tetracycline MIC by 32- to 256-fold, and the most impressive results were obtained with HSe-02, HSe-09 and HSe-11. Some compounds also had a substantial synergistic effect in RN4220 strains, which overexpress MsrA efflux proteins, where the combination of organoselenium compounds and erythromycin caused a reduction in the antibiotic MIC up to 64-fold. Only Nor/HSe-02 combination showed a synergistic effect and, on the other hand, Nor/HSe-09 interaction was considered antagonistic, even though there was a small decrease in antibiotic MIC. Therefore, our findings encourage further studies on the toxicity and use of the combination of organoselenium compounds and antibiotics to reverse bacterial resistance, especially when resistance is mediated by efflux pumps.

Conflict of interest

The authors declare to have no conflict of interest regarding the contents of this article.

Acknowledgement

The authors acknowledge the support of the Brazilian research agencies CAPES and CNPq. Dr. A. Leyva (USA) helped with English editing of the manuscript.

References

- [1] S. Džidi, J. Šušković, B. Kos, Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects, *Food Technol. Biotechnol.* 46 (2008) 11-21.
- [2] A. Giedraitienė, A. Vitkauskienė, R. Naginienė, A. Pavilonis. Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. *Medicina (Kaunas)*. 46 (2011)137-146.
- [3] S. Gibbons, E. Moser, G.W. Kaatz . Catechin gallates inhibit multidrug resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus*, *Plant Letter* 70 (2004) 1-3.
- [4] G.W. Kaatz, S.M. Seo. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 39(1995) 2650-2655.
- [5] K.A. Hassan, R.A. Skurray, M.H. Brown. Active Export Proteins Mediating Drug Resistance in *Staphylococci*, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 12 (2007) 180-196.
- [6] A.C. Abreu, S.C. Serra, A. Borges, M.J. Saavedra, A.J. Salgado, M. Simões. Evaluation of the best method to assess antibiotic potentiation by phytochemicals against *Staphylococcus aureus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 79 (2014) 125 -134.
- [7] J.M. Pagès, L. Amaral. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria, *Biochim. Biophys. Acta.* 1794 (2008) 826-833.
- [8] N. Totha, M.V. Reddy, A. Kumar, I.A. Khan, P.L. Sangwan, N.P. Kalia, J.P. Koul, S. Koul. Substituted dihydronaphthalenes as efflux pump inhibitors of *Staphylococcus aureus*, *Eur J Med Chem* 2010; 45: 3607-3616.
- [9] I. Zwolak, H. Zaporowska. Preliminary studies on the effect of zinc and selenium on vanadium-induced cytotoxicity *in vitro*. *Acta Biol. Hung.* 60 (2009) 55-67
- [10] M.P. Rayman. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc Nutr Soc.* 64 (2005) 527-542.
- [11] E.E. Alberto, L.L. Rosato, S.H. Alves, D. Alves, A.L. Braga. Imidazolium ionic liquids containing selenium: synthesis and anti-microbial activity. *Biomol. Chem.* 9 (2011) 1001-1003.

- [12] H.C. Braga, H.A. Stefani, M.W. Paixao, F.W. Santos, D.S. Lüdtkke. Synthesis of 5-selenoxylofuranosides. *Tetrahedron*, 66 (2010) 3441-3446.
- [13] J. Yang, K. Huang, S. Qin, X. Wu, Z. Zhao, F. Chen. Antibacterial action of selenium-enriched probiotics against pathogenic *Escherichia coli*. *Dig Dis Sci*. 54 (2009) 46-254
- [14] E.V. Ratushnaya, Y.I. Kirova, M.A. Suchkov, B.I. Drevko, V.B. Borodulin. Synthesis and antibacterial activity of organoselenium compounds. *Pharm Chem J*. 36 (2002) 652-653
- [15] M. Pietka-Ottlik, H. Wójtowicz-Młochowska, K. Kołodziejczyk, E. Piasecki, J. Młochowski. New organoselenium compounds active against pathogenic bacteria, fungi and viruses. *Chem. Pharm. Bull*. 56(2008) 1423-1427.
- [16] P.F. Athayde-Filho, A.G. Souza, S.A. Morais, J.R. Botelho, J.M. Barbosa-Filho, J. Miller, B.F. Lira. Synthesis and characterization of three new organo-selenium compounds. A convenient synthesis of aroylselenoglycolic acids. *Arkivoc*. 6 (2004) 22-26
- [17] L. Ma, S. Li, H. Zheng, J. Chen, L. Lin, X. Ye, Z. Chen, Q. Xu, T. Chen, J. Yang, N. Qiu, G. Wang, A. Peng, Y. Ding, Y. Wei, L. Chen. Synthesis and biological activity of novel barbituric and thiobarbituric acid derivatives against non-alcoholic fatty liver disease. *Eur. J. Med. Chem*. 46 (2011) 2003-2010.
- [18] J.I. Ross, A.M. Farrell, E.A. Eady, J.H. Cove, W.J. Cunliffe. Characterization and molecular cloning of the novel macrolide-streptogramin B resistance determinant from *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother*. 24 (1989) 851-862.
- [19] S. Gibbons, E.E. Udo. The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux, on the in vitro activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the Tet(K) determinant. *Phytother*. 14 (2000) 139-140.
- [20] M.B. Coyle, *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*, Library of Congress Cataloging in Publication Data, 2006.
- [21] T.Z. Oo, N. Cole, L. Garthwaite, M.D. Willcox, H. Zhu. Evaluation of synergistic activity of bovine lactoferricin with antibiotics in corneal infection. *J. Antimicrob. Chemother*. 65 (2010) 1243-1251.
- [22] F.C. Odds. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob. Chemother*. 52 (2003) 1-10.
- [23] S. Gibbons. Phytochemicals for Bacterial Resistance - Strengths, Weaknesses and Opportunities. *Planta. Med*. 74 (2008) 594-602.
- [24] K. Trzcinski, B.S. Cooper, W. Hryniewicz, C.G. Dowson. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother*. 45 (2000) 763-770.
- [25] R. Leclercq. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis*. 34 (2002) 482-492.

- [26] M. Mezes, K. Balogh. Prooxidant mechanism of selenium toxicity: A review. *Acta Biol. Szeged.* 53 (2009) 15-18.
- [27] B.S. Kumar, S.K. Tiwari, R. Saikant, G. Manoj, A. Kunwar, G. Sivaram, Z. Abid, A. Ahmad, K.I. Priyadarsini, A.A. Khan. Antibacterial and ulcer healing effects of organoselenium compounds in naproxen induced and *Helicobacter pylori* infected Wistar rat model. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 24 (2010) 263-270.
- [28] F.N. Victoria, C.S. Radatz, M. Sachini, R.G. Jacob, D. Alves, L. Savegnago, G. Perin, A.S. Motta, W.P. Silva, E.J. Lerner. Further analysis of the antimicrobial activity of α -phenylseleno citronellal and α -phenylseleno citronellol. *Food Control.* 23 (2012) 95-99.
- [29] S. Thangamani, W. Younis, M.N. Seleem. Repurposing ebselen for treatment of multidrug-resistant staphylococcal infections. *Sci. Rep.* 5 (2015) 1-13.

APENDICE B



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do
Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **BR 10 2013 034050-2 A2**

(22) **Data de Depósito:** 19/12/2013

(43) **Data de Publicação:** 20/10/2015
(RPI 2337)



* B R 1 0 2 0 1 3 0 3 4 0 5 0 A 2 *

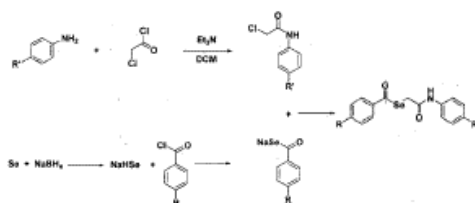
(54) **Título:** COMPOSTO DERIVADO DO ÁCIDO SELENOGLICÓLICO COM AÇÃO ANTIBACTERIANA E COADJUVANTE DE ANTIBIÓTICO

(51) **Int. Cl.:** C07C391/00; A61 K31/095; A61P31/04

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

(72) **Inventor(es):** BRUNO FREITAS LIRA, HELIVALDO DIOGENES DA SILVA SOUZA, JOSE MARIA BARBOSA FILHO BRASILEIRO, JOSE PINTO DE SIQUEIRA JUNIOR, NATHALIE HELEN PAES BARRETO BORGES, PETRONIO FILGUEIRAS DE ATHAYDE FILHO, ROXANA PEREIRA FERNANDES DE SOUSA

(57) **Resumo:** COMPOSTO DERIVADO DO ÁCIDO SELENOGLICÓLICO COM AÇÃO ANTIBACTERIANA E COADJUVANTE DE ANTIBIÓTICO. Que bloqueia a bomba de efluxo de bactérias, sendo apropriado no tratamento de doenças causadas por bactérias resistentes a antibióticos consagrados, O qual em concentrações subinibitórias (1/4 da CIM) é um potente coadjuvante de antibióticos, potencializando frente às bactérias de linhagens IS-58 (TetK), RN4220 (MsrA) e SA-11998 (NorA) da superfamília de Staphylococcus aureus resistentes a agéo da tetraciclina(256x), Eritromicina(128x) e Norfloxacin(4x).





Petronia Silgueiras de Athayde Filho, Melinalda Diógenes da Silva Souza, Rosana Pereira Fernandes de Sousa, Bruna Freitas Lima, Nathalie Helen Paes Barreto Borges, José Pinto de Siqueira-Júnior, José Maria Barbosa-Filho

Participou do “**9º Encontro Nacional de Inovação em Fármacos e Medicamentos**”, realizado nos dias 18 e 19 de agosto de 2015, com carga horária de 20 horas, no Centro de Convenções Rebouças, São Paulo, SP, tendo obtido o **6º lugar na Premiação Reconhecimento Técnico**.




Roberto Nicolajsky
Diretor-geral da Protec

