

NATALINA DANTAS

**DERIVADOS GUANILHIDRAZÔNICOS COMO  
ANTIBACTERIANOS E MODULADORES DA RESISTÊNCIA A  
DROGAS EM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR**

**João Pessoa –PB**

**2015**

NATALINA DANTAS

**DERIVADOS GUANILHIDRAZÔNICOS COMO  
ANTIBACTERIANOS E MODULADORES DA RESISTÊNCIA A  
DROGAS EM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos necessário para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

**Orientador:** Dr. José Pinto de Siqueira Junior

**João Pessoa-PB**

**2015**

D192d Dantas, Natalina.

Derivados guanilhidrazônicos como antibacterianos e moduladores da resistência a drogas em *Staphylococcus aureus* / Natalina Dantas.- João Pessoa, 2015.

87f. : il.

Orientador: José Pinto de Siqueira Junior

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN

1. Biologia celular e molecular. 2. *Staphylococcus aureus*.  
3. Resistência bacteriana. 4. Bomba de efluxo - inibidor.  
5. Guanilhidrazonas. 6. Guanidina.

UFPB/BC

CDU: 576+577.2(043)

## **NATALINA DANTAS**

Dissertação de Mestrado avaliada em 30 / 04 / 2015

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Junior

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal  
da

Paraíba

Orientador – UFPB

---

Prof. Dr. Sávio Torres de Farias

Departamento de Biologia Molecular – Universidade Federal da Paraíba

Examinador interno - UFPB

---

Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior

Departamento de Ciências biológicas – Universidade Estadual da Paraíba

Examinador externo- UEPB

---

Profa. Dra. Krystyna Gorlach Lira

Departamento de Biologia Molecular – Universidade Federal da Paraíba

Examinador suplente interno- UFPB

---

Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura

Departamento de Biologia Molecular – Universidade Estadual da Paraíba

Examinador suplente externo- UFPB

*Dedico este trabalho a todos que possibilitaram a mim a conclusão de mais um projeto de vida e a Minha família.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a **Deus** pela força que me deste durante esta difícil trajetória, para persistir apesar dos desafios e adversidades, enfrentando-os sem esmorecer, alcançando vitoriosa esta etapa de minha vida.

Há momentos em nossas vidas, que a única coisa de que precisamos, é poder olhar a nossa volta e ver alguém que realmente se importa conosco e que simplesmente nos diga "estou tão orgulhoso de você... e não importa o que aconteça, sempre estarei ao seu lado te apoiando." E por isso, agradeço à minha família.

Em especial a minha irmã **Rosa Dantas** que apesar de todos os conflitos a amo e ela é como uma mãe que cuida e se preocupa até demais. Ela é a minha fortaleza e refúgio, dedico e agradeço de todo o meu coração esta conquista tão importante em minha vida. Obrigada pelo amor que me ajudou a trilhar este caminho, compartilhando ideias e ideais por mais distantes e inatingíveis que pareça, lutando comigo e me incentivando a prosseguir, fossem quais fossem os obstáculos, acreditando e confiando na minha capacidade, sacrificando-se muitas vezes em favor da família.

Ao **Dr. José Pinto de Siqueira Junior** expressei todo meu carinho e sincero agradecimento pelo seu voto de confiança, principalmente por ter acreditado em mim, no meu trabalho e potencial. A Seu Bosco que sempre esteve junto apoiando e sem deixar faltar nada para cada passo na concretização de minha pesquisa. Agradecimentos sinceros a Isis e a Rildene colegas de laboratório por terem me ensinado com toda paciência a técnica de trabalho, para que eu pudesse desenvolver minha pesquisa.

Um sincero agradecimento aos professores **Dr. Thiago Mendonça de Aquino** por ter me fornecido as moléculas para que eu desenvolvesse minha pesquisa e a **Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior** que apesar de qualquer problema, nunca me deixou sozinha nesta trajetória acadêmica, e espero que possamos manter esta nossa parceria em muitos trabalhos futuros.

Ao longo deste caminho, encontrei pessoas muito importantes que percorreram ao meu lado, vivendo a mesma luta, e que de alguma forma, compartilharam dos prazeres e dificuldades ao longo destes 2 anos. Em especial a Roberta e Thalles, pelas conversas, pelas trocas de conhecimentos, pela ajuda e apoio.

Ao suporte financeiro da CAPES e CNPq dada através da concessão da bolsa durante todo o mestrado e financiamento do projeto do laboratório LGM. Enfim à todos que estiveram ao meu lado compartilhando comigo momentos únicos, que deixarão saudades. “**Meu Muito Obrigada**”.

## RESUMO

A ineficácia mútua para diversos antibióticos chamada de resistência múltipla as drogas (MDR), tem minado o valor terapêutico dos antibacterianos existentes. Com a identificação e caracterização de sistemas de efluxo que conferem resistência clínica aos antimicrobianos, tem surgido interesse no desenvolvimento de uma nova classe de agentes potenciadores da ação antibiótica que atuem como inibidores de bombas de efluxo, estes também são chamados de modificadores de atividade antibiótica ou adjuvantes de antibióticos. No presente trabalho, foram avaliados derivados sintéticos guanilhidrazônicos como antibacterianos e agentes moduladores da resistência à drogas em linhagens de *Staphylococcus aureus*. As linhagens bacterianas utilizadas expressam o gene *norA*, *msrA* ou *tetK* codificadores das proteínas de efluxo para norfloxacin e brometo de etídeo (NorA), eritromicina (MsrA) e tetraciclina (TetK), respectivamente. Foram determinadas por meio da técnica de microdiluição em caldo nutritivo os valores das concentrações inibitória mínima (CIM) dos antibióticos e dos derivados sintéticos, e para avaliar a atividade moduladora, as CIM dos antibióticos e do brometo de etídeo foram determinadas na ausência e na presença de concentrações subinibitórias dos compostos sintéticos. Os compostos ensaiados não mostraram atividade antibacteriana efetiva para a maioria dos compostos nas concentrações testadas, exibindo CIM variando entre (16 à >256 µg/mL). Quando combinados com os antibióticos tetraciclina e eritromicina alguns reduziram suas CIM em 2 e 4 vezes respectivamente. Entretanto quando combinado com norfloxacin, exceto apenas um composto, todos os derivados guanilhidrazônicos em diferentes proporções e graus de sensibilidade, foram capazes de potencializar o efeito deste antibiótico, apresentando três compostos que reduziram sua CIM até 16 vezes, 32 vezes para brometo de etídeo e 8 vezes para berberina usados como controles positivos para bomba NorA. Os estudos de docking molecular mostrou que tanto a norfloxacin quanto o composto 13 reconhecem o mesmo sítio de ligação na bomba NorA, sugerindo um mecanismo competitivo para atividade moduladora a drogas. Estes resultados aqui apresentados relatam pela primeira vez, o potencial de derivados guanilhidrazônicos em ser putativos inibidores dos sistemas de efluxo bacterianos, em especial para estirpes de *Staphylococcus aureus*.

**Palavras-chaves:** *Staphylococcus aureus*, resistência bacteriana, inibidor de bomba de efluxo, Guanilhidrazonas, Guanidina.

## ABSTRACT

The mutual ineffective for many antibiotics called multidrug resistance (MDR), has undermined the therapeutic value of existing antibacterial. With the identification and characterization of efflux systems that confer clinical resistance to antimicrobial, has emerged interest in developing a new class of agents enhancers the antibiotic action that act as inhibitors of efflux pumps, this are also called antibiotic activity modifiers or antibiotics adjuvantes. In this study, were evaluated synthetic guanylhydrazones derivatives as antibacterial and agents modulators of drug resistance in strains of *Staphylococcus aureus*. The bacterial strains used express the genes NorA, MrsA or TetK encoding proteins efflux for norfloxacin and ethidium bromide (NorA), erythromycin (MsrA) and tetracycline(TetK), respectively. The minimum inhibitory concentrations (MIC) values of the antibiotics and synthetic derivatives were determined in nutrient broth by the microdilution assay, and to evaluate the modulator activity, the MIC of antibiotics and ethidium bromide were determined in the absence and presence of subinibitory concentrations of guanylhydrazones. The compounds tested did not display relevant antibacterial activity for majority compounds at the concentrations tested, showing MIC ranging from (16 to > 256 µg/mL). When combined with the antibiotics tetracycline and erythromycin some compounds reduced their MIC 2-fold and 4-fold respectively. However, when combined with norfloxacin, except only one compound, all guanylhydrazones derivatives in different ratios and degrees of sensitivity, were able to potentiate the effect of this antibiotic, with three compounds which reduced its MIC 16-fold to norfloxacin, 32-fold to ethidium bromide and 8-fold for berberine used as positive controls for NorA pump. The molecular docking studies showed that both norfloxacin and compound **13** are recognized by the same binding site on the NorA pump, suggesting a competitive mechanism. The results presented here reported for the first time its great potential of guanylhydrazones derivatives to be putative inhibitors of bacterial efflux systems, especially for strains *Staphylococcus aureus*.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, resistance bacterial, efflux pump inhibitor, Guanylhydrazones, Guanidine.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Alvos celulares bacterianos de antibióticos .....	<b>5</b>
<b>Figura 2.</b> Principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos .....	<b>7</b>
<b>Figura 3.</b> Ilustração esquemática mostrando as 5 famílias do sistema de efluxo bacteriano.....	<b>9</b>
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática da bomba de efluxo NorA (A) e com seus respectivos motivos conservados (B).....	<b>10</b>
<b>Figura 5.</b> Modelo esquemático para os transportadores ABC e respectivos motivos conservados .....	<b>11</b>
<b>Figura 6.</b> Estrutura da guanidina .....	<b>15</b>
<b>Figura 7.</b> Estrutura de fármacos guanilhidrazônicos de usados na terapêutica .....	<b>16</b>
<b>Figura 8.</b> Guanilhidrazonas com atividade antibacteriana e antifúngica .....	<b>16</b>
<b>Figura 9.</b> Guanilhidrazonas como antagonista do receptor CCR5 do vírus HIV.....	<b>17</b>
<b>Figura 10.</b> Estrutura nifimicin, mostrando a porção guanidina requerida para atividade antibiótica .....	<b>28</b>
<b>Figura 11a.</b> Análogo de piperina como potente inibidor de NorA.....	<b>30</b>
<b>Figura 11b.</b> Derivado Pirrolo (1,2-a) quinoxalina como inibidor NorA .....	<b>30</b>
<b>Figura 11c.</b> Análogo de piperidina como inibidor NorA.....	<b>30</b>
<b>Figura 12.</b> Inibidores de bomba de efluxo NorA com anel quinolina .....	<b>31</b>
<b>Figura 13.</b> Apresentação tridimensional da estrutura cristalográfica NorA.....	<b>35</b>
<b>Figura 14.</b> Representação da interação entre 3wdo_nora e norfloxacin .....	<b>36</b>
<b>Figura 15.</b> Representação da interação entre 3wdo_nora e o composto 13.....	<b>37</b>

**Figura 16.** Representação da competição pelo mesmo sítio entre a norfloxacinina e compostos guanilhidrazônicos na bomba NorA ..... **38**

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1.** Antibióticos implantados ou atualmente em desenvolvimento do século XXI na terapia microbiana ..... 7
- Tabela 2.** Inibidores de bomba de efluxo com seus respectivos substratos e bactérias 13
- Tabela 3.** Concentração inibitória mínima (CIM) das guanilhidrazonas e antibióticos ( $\mu\text{g/ mL}$ ) em linhagem de *s. aureus* ..... 26
- Tabela 4.** CIM dos antibióticos na presença e ausência dos derivados guanilhidrazônicos nas linhagens de *s. aureus*..... 29

**LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1.</b> As estruturas químicas das guanilhidrazonas testadas .....	19
---	----

## LISTA DE ABREVIACÕES

ABC - ATP binding cassette  
BrEt – Brometo de etídeo  
BHI – Brain Heart Infusion  
CIM – Concentração Inibitória Mínima  
DNA – Ácido ribonucleíco  
DMSO - Dimetilsulfóxido  
EPI - Inibidores de bombas de efluxo  
LogP – Lipofilicidade  
MATE – Multidrug and toxic compound Extrusion  
MDR - Resistência múltipla as drogas  
MRSA - Staphylococcus aureus resistente a meticilina  
MSF - Major Facilitator Superfamily  
MSSA - Staphylococcus aureus sensível a meticilina  
MsrA – Proteína de efluxo para macrolídeos (eritromicina)  
NCCLS – “National Committee for Clinical Laboratory Standards”  
NorA – Proteína de efluxo para fluoroquinolonas e outras substâncias  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
PBP- Proteína ligadora de penicilina  
PM – Peso molecular  
RNAm - Ácido dextrorribonucleíco mensageiro  
RNAr - Ácido dextrorribonucleíco ribossômico  
RNA<sub>t</sub> – Ácido dextrorribonucleíco transportador  
RND - Resistance Nodulation Division  
SMR - Small Multidrug Resistance  
Tet – Tetraciclina  
TetK – Proteína de efluxo para tetraciclina em *S. aureus*  
TetL - Proteína de efluxo para tetraciclina em *S.aureus*  
TetM – Gene da resistência para tetraciclina por proteção ribossomal  
TetO - Gene da resistência para tetraciclina por proteção ribossomal  
TetR – Gene repressor para tetraciclina  
UFAL - Universidade Federal de Alagoas  
USA – Estados Unidos da América

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	3
2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> e sua evolução aos antimicrobianos .....	3
2.2. Antibióticos e Resistência aos Antibióticos.....	4
2.2.1. Antibióticos .....	4
2.2.2. Resistência aos Antibióticos.....	6
2.3. Bombas de Efluxo.....	8
2.3.1. Bomba NorA .....	9
2.3.2. Bomba TetK .....	10
2.3.3. Bomba MrsA .....	11
2.4. Inibidores de Bombas de Efluxo.....	12
2.5. Potencial Biológico das Guanilhidrazonas.....	15
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	18
3.1. Objetivo geral.....	18
3.2. Objetivo específico.....	18
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	19
4.1. Linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
4. 2. Antibióticos e brometo de etídeo .....	19
4. 3. Substâncias utilizadas: Guanilhidrazonas .....	19
4. 4. Avaliação da atividade antibacteriana .....	23
4.5. Avaliação da atividade moduladora da resistência a drogas .....	23
4. 6. Modelagem da proteína NorA .....	23
4.7. Métodos para estudo de Dockings Moleculares .....	24

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	26
5.1. Atividade antibacteriana .....	26
5.2. Atividade Moduladora .....	28
5.3. Modelagem da proteína de resistência à quinolona (NorA) .....	34
5. 4. Dockings Moleculares .....	36
5.5. Docking Molecular com ligante norfloxacina .....	36
5. 6. Docking Molecular com composto.....	37
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	40
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	41
<b>8. APÊNDICE A - PATENTE - DERIVADOS GUANILHIDRAZÔNICOS COMO POTENCIALIZADORES DA AÇÃO ANTIBIÓTICA POR AÇÃO MODULADORA DE BOMBAS DE EFLUXO (BR 102014033128-0)</b> .....	55
<b>8.1. APÊNDICE B – ARTIGO - EVALUATION OF GUANYLHYDRAZONES AS INHIBITORS OF NORA EFFLUX PUMP IN <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i></b> .....	57

## 1. INTRODUÇÃO

A terapia antimicrobiana encontra-se sob uma constante pressão de seus agentes etiológicos, provinda da contínua queda da eficácia dos agentes antimicrobianos. Atualmente a ineficácia mútua para diversos antibióticos chamada de resistência múltipla as drogas (MDR), é observada em cepas patogênicas, originando um problema de grande relevância médica, altamente presente em infecções hospitalares, especialmente estafilocócicas (TRABULSI et al., 2002).

Algumas estimativas dos efeitos econômicos da resistência aos antibióticos foram relatados no último relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS). Por exemplo o custo anual para sistema de saúde dos Estados Unidos, foram estimados em 21 bilhões de dólares, acompanhado com mais de 23 mil mortes anualmente (WHO, 2014).

Algumas espécies bacterianas tem importância particular no que se refere à resistência adquirida, entre elas destaca-se o gênero *Staphylococcus* (GOODMAN et al., 2000; WHO, 2014). *Staphylococcus aureus* é um dos principais patógenos causadores de doenças infecciosas em seres humanos. O sucesso desta bactéria como um sério patógeno tem sido atribuído a sua habilidade de desenvolver resistência a grande variedade de compostos antimicrobianos tal como a todos os  $\beta$ -lactâmicos, macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, rifampicina, quinolonas e até mesmo a vancomicina (HIRAMATSU et al., 2002).

São vários os mecanismos através dos quais os microorganismos se tornam resistentes às drogas. Um exemplo é a produção do sistema de efluxo que consiste de proteínas transmembranas, também conhecidas como bombas de efluxo, as quais são responsáveis por eliminar as drogas para o meio extracelular diminuindo assim a concentração intracelular do antimicrobiano, e portanto, permitindo a sobrevivência das bactérias (PIDDOCK, 2006a).

Estratégias para combater a resistência mediada por efluxo são baseadas na procura por novos antibióticos ou por inibidores de bombas de efluxo (EPIs). Esta última opção é muito mais atrativa, pois quando usados na terapia adjuvante podem (i) diminuir a resistência intrínseca, (ii) reverter a resistência adquirida e (iii) reduzir a emergência de mutantes altamente resistentes a uma série de antibióticos, aumentando assim a utilidade clínica dos antibióticos disponíveis (VIDAILLAC et al., 2007a).

Vários ensaios para identificar EPIs tem sido desenvolvido nos últimos 15 anos, e tem resultado na identificações de diversas substâncias utilizados na terapêutica como adjuvantes de antibióticos, tal como os inibidores naturais reserpina (NEYFAKH et al., 1993; BARANOVA; NEYFAKH,1997), clorpromazina (MOLNAR

et al.,1997), totarol (SMITH et al., 2007a) e semi-sintéticos como os análogos de piperina (KUMAR et al., 2008), estimulando mais pesquisas com esse objetivo.

Atualmente o número de moléculas sintéticas utilizadas como EPIs tem sido validados em combinação com antibióticos *in vitro* (KOURTESI, et al., 2013). Dentre estes compostos estão os derivados guanilhidrazônicos. As guanilhidrazonas representam um grupo de compostos que compreende diferentes classes químicas, contendo grupos amidina (guanil/guanidina) ligados a hidrazona (MITCHELL et al., 1998).

Estas duas classes de substâncias apresentam compostos de considerável interesse científico, devido as suas importantes propriedades químicas e biológicas tais como: inibição da síntese de DNA, (RACZYNSKA et al., 2003), são indutores de apoptose (ZHANG et al., 2009), antimaláricos, antileishmania, antifúngicas, anti-HIV e antibacteriana (BORGES, 2001; OLIVEIRA et al., 2012; AHMED et al., 2013;), anti-hipertensivos (HOFFMAN, 2003), antidiabéticos (LARSEN et al., 2001), antineoplásicos (ANDREANI et al., 2000; BRZozowski et al., 2007) dentre outras.

Atualmente a presença destes grupamentos químicos em novos compostos sintéticos, pode apresentar-se como novos candidatos para o desenvolvimento de alternativas para os antibióticos no combate da resistência bacteriana.

Como os dados da biologia estrutural de bombas de efluxo de *S. aureus* tal como NorA, ainda não foram determinadas (NEYFAKH, 2002), muitos estudos estão se voltando para a bioinformática, através de análises de docking molecular para pesquisar EPIs e determinar seus possíveis mecanismos de ação.

Diante do exposto, o presente trabalho apresenta-se importante ao realizar estudos na busca de novas moléculas derivadas de guanilhidrazonas com potencial antibacteriano e como possíveis inibidores de bomba de efluxo em linhagens de *Staphylococcus aureus* e realizar estudos de docking molecular, visto que estas são bactérias de relevância clínica por possuir alto grau de resistência aos antimicrobianos, muitas vezes, como resultado da atuação de mecanismos de efluxo a múltiplas drogas.

## 2.1 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.2 2.1. *Staphylococcus aureus* e sua evolução aos antimicrobianos

*Staphylococcus aureus* são cocos Gram-positivos pertencentes à família Micrococcaceae, são anaeróbicas facultativas que estão dispostas sozinhas, em pares ou formando grupos irregulares com aspecto de cacho de uva (LINDSAY; HOLDEN, 2004).

Frequentemente citado como patógeno em infecções hospitalares, *Staphylococcus aureus* é um dos mais importantes agentes etiológicos de infecções humanas no século XXI. Isso se deve a sua virulência intrínseca, sua capacidade de causar infecções diversificadas como (endocardites, pneumonia, meningites bacterianas e infecções purulentas) e a facilidade de adaptação às diferentes condições ambientais (LOWY, 2003; GIBBONS, 2004). São bactérias distribuídas na natureza como microbiota normal da pele e mucosa de indivíduos saudáveis, que com aparecimento de lesões penetram no organismo (COUTINHO et al., 2009; MATIAS et al., 2010). Seu arsenal de fatores de virulência, como cápsula polissacarídica, peptidoglicano, ácido teicóico, proteína A e toxinas, permite contornar as defesas do hospedeiro e se estabelecer no organismo humano causando infecções graves (TANG; STRATTON, 2010).

A importância clínica de *S. aureus* entretanto não se deve somente aos fatores de virulência e patogenicidade que apresenta, mas também a fácil habilidade de adquirir resistência a praticamente todos os antibióticos utilizados atualmente, sendo, portanto, um motivo de considerável preocupação (GIBBONS, 2004a; CHAMBERS; De LEO, 2009).

Antes da descoberta dos antibióticos, a mortalidade de pacientes com infecções causadas por *S. aureus* ultrapassava 80% (LOWY, 2003). Atualmente com o fenômeno da multirresistência a drogas (MDR), este alto índice de mortalidade voltará a ser uma realidade, se novas alternativas para controle de cepas resistentes não forem desenvolvidas.

Quando a penicilina foi introduzida pela primeira vez ocorreu uma rápida eficácia no tratamento das infecções, reduzindo a mortalidade. Mas pouco tempo depois *S. aureus* já tinha desenvolvido resistência durante a década de 1940. Esta resistência foi mediada pela produção de uma enzima beta-lactamase que inativavam os antibióticos ampicilina e amoxicilina através da hidrólise do anel beta-lactâmico da estrutura química do antibiótico, (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; SILVA, 2009; WHO, 2014). As penicilinas semi-sintéticas (metecilina e a oxacilina) foram então introduzidas na tentativa de solucionar o problema. Mas, pouco tempo depois surgiram os primeiros isolados de *S. aureus* metecilina resistentes (MRSA), (REMONATTO et al., 2007; ANDRADE, 2008).

A resistência à meticilina está relacionada à produção de uma proteína da parede celular, chamada PBP (proteína ligadora de penicilina). As cepas MRSA produzem uma PBP modificada, denominada PBP2a, codificada pelo gene *mec A*, funcional para a célula bacteriana, porém com baixa afinidade pelo antimicrobiano permitindo a sobrevivência do estafilococo à exposição a altas concentrações desses agentes (SOUSA et al, 2005; REMONATTO et al, 2007).

Cepas MRSA são resistentes a todos os antibióticos beta-lactâmicos o que inclui as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos e representa um grande desafio no estabelecimento do tratamento. Atualmente o tratamento hospitalar de cepas MRSA geralmente é procedido com antibióticos potentes como vancomicina, linezulida e teicoplanida. No entanto, como alguns hospitais já apresentam casos de MRSA resistente também à vancomicina, a linezulida passa a ser a principal opção terapêutica (GIBBONS, 2005; SILVEIRA et al., 2006; MAHBOUBI; BIDGOLI, 2009).

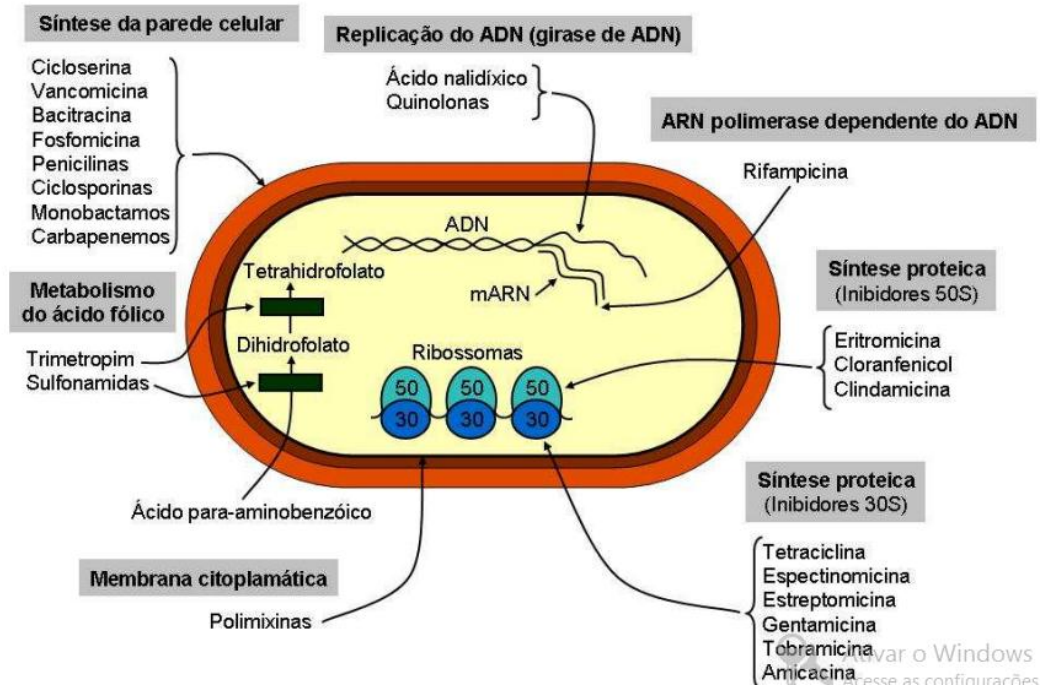
Dados atuais de acordo com último relatório OMS (2014), as cepas MRSA apresentaram uma proporção de resistência superior a 80%. Esta alta proporção implica no aumento do risco ao paciente e uma necessidade de uma linha de antibióticos mais tóxico para uso no tratamento contra MRSA. No entanto isto acarreta no aumento dos custos, efeitos colaterais e pode dirigir a uma nova resistência em *staphylococci* ou em outras espécies (WHO, 2014).

## **2.2. Antibióticos e Resistência aos antibióticos**

### **2.2.1. Antibióticos**

Antibióticos são drogas de origem natural ou sintética, capazes de provocar a morte celular (ação bactericida) ou inibir o crescimento bacteriano (ação bacteriostática), produzindo o mínimo de danos possíveis ao hospedeiro (toxicidade seletiva) (LEEKHA et al., 2011).

Os agentes antimicrobianos podem exercer a sua ação sobre a célula bacteriana de diferentes modos. Estes mecanismos envolvem a inibição de processos fundamentais ao desenvolvimento bacteriano, são atualmente agrupados em cinco categorias (**Figura 1**): (i) inibição da síntese da parede celular, (ii) inibição da síntese proteica, (iii) inibição da síntese de ácidos nucleicos, (iv) inibição competitiva de metabólitos essenciais, e (v) ação sobre a integridade da membrana citoplasmática. (CHAN et al., 1999; WALSH, 2000; PRESCOTT et al., 2002; MACHADO-SEQUEIRA, 2004).



**Figura 1.** Alvos celulares bacterianos de antibióticos.

**Fonte:** Modificado, MACHADO-SEQUEIRA, (2004).

Os inibidores da síntese da parede celular bacteriana bloqueiam a capacidade dos microrganismos em sintetizar peptidoglicano, através da inibição de enzimas que integram a sua via biossintética, como transglicosilases e transpeptidases (CHOPRA; GREENWOOD, 2001).

As quinolonas uma das maiores classes de antibióticos inibem seletivamente a DNA girase e a topoisomerase IV bacteriana, através da formação de complexos quinolona-DNA-topoisomerase, inibindo o processo de replicação, (CHOPRA; GREENWOOD, 2001; PRESCOTT et al., 2002).

Para os inibidores da síntese protéica tais como as bem estudadas classes de tetraciclina e macrolídeos, tem como principal alvo o ribossomo. Este é composto de duas subunidades a 30S onde está localizado o sítio para RNAm e 50S contém o centro da peptidil transferase (BERINGER; RODNINA, 2007).

As tetraciclina são inibidores da fase de alongação da síntese protéica, evitando a acomodação do aminoacil-tRNA no sítio A e interagindo principalmente com a porção açucar dos aminoácidos do RNAr, o que pode explicar sua ampla especificidade por este alvo (CONNELL et al., 2003).

Macrolídeos, lincosamidas e streptogramina B, embora não estejam relacionadas estruturalmente, todas inibem a síntese protéica por ligação na subunidade ribossomal 50S (CHAMPNEY; TOBER, 2000). Todos estes antibióticos se associam no sítio de ligação do RNAr 23S, bloqueando o centro de ligação da peptidil transferase (DOUTHWAITE; CHAMPNEY, 2001), inibindo a tradução. O mecanismo

de resistência para estes antibióticos é a metilação ou dimetilação do RNAr por enzimas metiltransferase (POKKUNURI; CHAMPNEY,2007).

### **2.2.2. Resistência aos antibióticos**

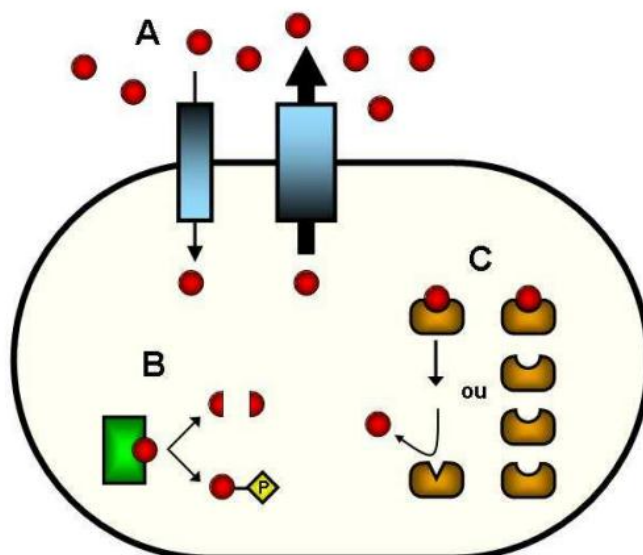
Inicialmente o fenômeno da resistência não parecia ser um problema preocupante, pois era temporariamente resolvido com a introdução de novos agentes. Com o aumento do arsenal de antibióticos e antifúngicos, associados a sua utilização indiscriminada (COHEN; TARTASKY, 1997) e com a capacidade microbiana de adquirir e disseminar resistência, tem selecionado cepas microbianas cada vez mais resistentes (MATIAS et al., 2010), tornando-se um problema de difícil resolução, visto que não é fácil colocar novos antibióticos na indústria farmacêutica em um curto espaço de tempo. Esse fato tem levado mais rapidamente pacientes hospitalizados a óbito, além de aumentar significativamente os custos com relação ao tratamento da infecção (COUTINHO et al., 2009; MATIAS et al, 2010).

A aquisição da resistência a agentes antimicrobianos envolve alterações genéticas (TRABULSI et al., 2008), podendo ser originária de uma mutação ou da transferência horizontal de material genético.

A mutação normalmente envolve deleção, substituição ou adição de um ou mais pares de bases, levando a alterações na composição de aminoácidos de determinados peptídeos. Já a resistência transferível ocorre quando um dado microorganismo recebe material genético de outro, passando a expressar a característica contida no gene recentemente adquirido (TAVARES, 2000).

Existem três mecanismos pelos quais é possível ser realizada a transferência gênica horizontal: transdução, conjugação e principalmente transformação (BAUMAN, 2009; TORTORA et al., 2012). A transformação é o processo pelo qual a bactéria é capaz de realizar recombinação genética por meio da absorção ativa de DNA extracelular proveniente de diversas fontes como cromossomos, plasmídeos e fagos, dispersos no ambiente. Para tanto é necessário que a captação do DNA doador (BRIGULLA; WACKERNAGEL, 2010). Assim, se o DNA livre for composto por genes de resistência a antibióticos, a célula receptora provavelmente adquire a resistência correspondente, caso a integração ao material genético seja eficiente (FOLEY; LYNNE, 2008). Estes genes que conferem ao patógeno vantagem seletiva em relação ao hospedeiro, têm o potencial de serem rapidamente espalhados dentro da população bacteriana (THOMAS; NIELSEN, 2005).

Os mecanismos por meio dos quais as bactérias se tornam resistentes são bastante versáteis (KOHLENER et al., 1999; POOLE, 2002). Esses mecanismos podem ser resumidos na **figura 2**.



**Figura 2.** Principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos.

**A** - Prevenção da acumulação de antimicrobianos através da redução da permeabilidade celular ou por bomba efluxo; **B** – Inativação ou modificação da droga por hidrólise; **C** - Modificação do alvo, que ocorre devido a mutações no gene da molécula-alvo do antibiótico.  
**Fonte:** Modificado YONEYAMA; KATSUMATA, (2006).

Levando em conta todos estes mecanismos de resistência, o desenvolvimento de novas gerações de antibióticos se tornou insuficiente. No aspecto global, 80 diferentes antibióticos, agrupados em diferentes classes, foram desenvolvidas até então. Até a década de 1970 houve um fluxo constante de novos fármacos, alguns com novos mecanismos de ação para contornar a resistência bacteriana (PASBERG-GAUHL, 2014). Entretanto mesmo com os avanços das mais variadas tecnologias do século XXI, houve uma queda brusca na introdução efetiva de novas opções terapêuticas para a resistência aos antibióticos, porém como pode ser observado na **tabela 1** existe uma corrida para implantação de novos antibióticos em especial para linhagem MRSA.

**Tabela 1.** Antibióticos implantados ou atualmente em desenvolvimento do século XXI na terapia antimicrobiana.

<b>Classe de antibiótico introduzido</b>	<b>Implantação e status de desenvolvimento USA</b>	<b>Aplicação</b>
<i>Linezolid</i> (Oxazolidinona)	2000	<i>Micumbactéria</i> (tuberculose)
<i>Daptomicin e Caspofungin</i> (Lipopeptídeo)	2003	Infecções microbianas em geral
<i>Ceftarolin</i> (Cefalosporina)	2012	Bactérias gram-positiva e MRSA

<i>Fidaxomicina (Nova classe Macrocíclico)</i>	2013	<i>Enterococcus</i> resistente a vancomicina e <i>Clostridium difficile</i>
<i>Ceftobeprol (Cefalosporina)</i>	Processo de aprovação	Bactérias Gram + e MRSA
<i>Dalbavancina (Lipoglicopeptídeo)</i>	Fase clínica (III)	Bactérias Gram + e MRSA
<i>Oritavancina (Lipoglicopeptídeo)</i>	Fase clínica (III)	Bactérias Gram + e MRSA
<i>Tedizolidi (Oxazolidinona)</i>	Fase clínica (III)	Bactérias Gram + e MRSA
<i>Nemonoxacina (Quinolonas não fluoradas)</i>	Fase clínica (III)	Bactérias Gram + e MRSA
<i>Finafloxacina (Fluorquinolona)</i>	Fase clínica (III)	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Surotomicina (Lipopeptídeo)</i>	Fase clínica (III)	<i>Clostridium difficile</i>
<i>HT-61 (Novas classe quinolonas)</i>	Fase clínica (III)	Bactérias Gram + e MRSA
<i>Ceftazidim + avabactam Cefalosporina + inibidores de <math>\beta</math>-lactamase)</i>	Fase clínica (III)	<i>Pseudomonas</i> e Gram-negativa

**Fonte:** Adaptado do relatório da organização mundial de saúde (WHO, 2014).

### 2.3. Bombas de Efluxo

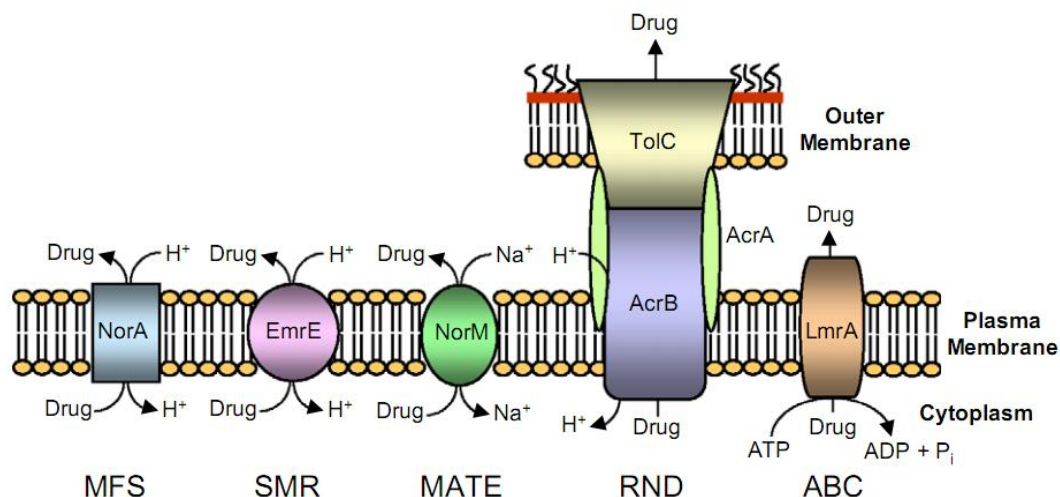
Efluxo ativo foi descrito pela primeira vez em 1980, como um mecanismo causador da resistência a tetraciclina (MCMURRY et al., 1980). Posteriormente foi considerado um mecanismo generalizado de que confere a ambos os organismos Gram-positivos e Gram-negativos a capacidade de expelir antibióticos de todas as principais classes estruturais (KUMAR; SCHWEIZER, 2005; Poole, 2007).

Estudos mais recentes, no entanto, sugerem que os antibióticos são substratos oportunistas destes transportadores, com bombas de efluxo desempenhando um papel importante na extrusão de moléculas endógenas mau difusíveis (NISHINO et al., 2009) e executando também a proteção das bactérias contra substâncias exógenas potencialmente prejudiciais (MARTINEZ et al., 2009).

Neste contexto, os antibióticos têm provavelmente exercido uma pressão necessária para que bomba de efluxo realize a superexpressão como um mecanismo não específico de resistência (GRKOVIC et al., 2002).

Funcionalmente as bombas de efluxo bacteriana de Antibióticos, pertencem a 5 grandes famílias: SMR (small multidrug resistance) (CHANG et al., 2004); RND

(Resistance nodulation division); MFS (major facilitator); e MATE (multidrug and toxic compound extrusion) estas famílias utilizam o transporte antiporte de prótons ( $\text{Na}^+ / \text{H}^+$ ) como força motriz. A família ABC (ATP binding cassette) diferentemente das outras utilizam a hidrólise de ATP para o efluxo como mostra a **figura 3**, (KOURTESI et al., 2013).



**Figura 3.** Ilustração esquemática mostrando as 5 famílias do sistema de efluxo bacteriano.

**Fonte: Modificado,** KUMAR; SCHWEIZER (2005).

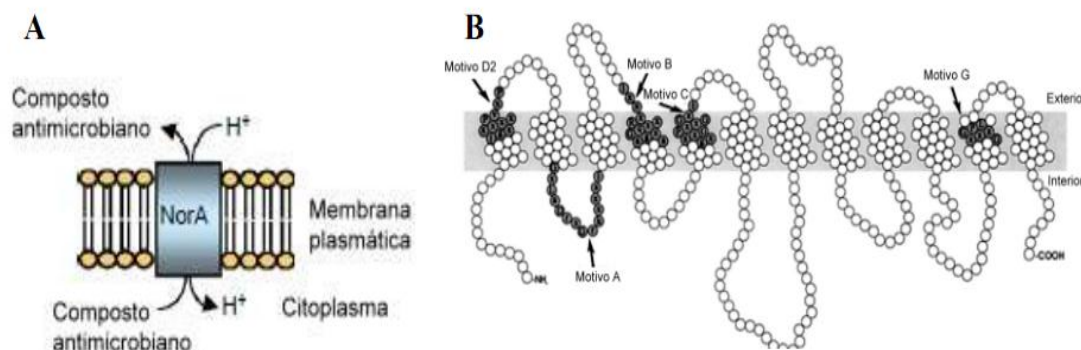
Os sistemas de efluxo em *S. aureus* são constituídos pelas famílias MFS e ABC, com predomínio da MFS que possui 12 ou 14 domínios transmembranais, podendo ser representada pelas bombas de efluxo NorA e TetK. A família ABC tem como principal bomba bacteriana a MsrA (SAIER; PAULSEN, 2001; VANBAMBEKE, 2010).

### 2.3.1. Bomba NorA

A NorA é a bomba de efluxo mais estudada e encontrada tanto em linhagens MSSA como MRSA (GIBBONS et al., 2004b; PIDDOCK, 2006b). Esta proteína promove o efluxo ativo de fluorquinolonas hidrofílicas (norfloxacina e ciprofloxacina), mas não a fluorquinolonas lipofílicas (esparfloxacina e perfloxacina), (KAATZ; SEO, 1995). O sistema NorA também desenvolveu a capacidade de efluxar outras classes de compostos orgânicos tais como clorafenicol, brometo de etídio, radaminas e outros (NEYFAKH et al., 1993; SMITH et al., 2007b). Portanto, NorA tem diferentes substratos (MDR).

Dados da biologia estrutural de NorA ainda não foram determinados, entretanto através de estudos da homologia de sequências e o compartilhamento dos vários substratos com outras bombas MDR, tem levado a hipótese que NorA possa ter um grande sítio de ligação hidrofóbico. Esta peculiaridade poderia explicar a ampla especificidade por substratos hidrofílicos de bombas MDR (NEYFAKH, 2002).

Segundo a caracterização tridimensional *in silico* da estrutura Nor (figura 4), este é um transportador transmembranar de 12 segmentos helicoidais, intercalados com ciclos hidrofílicos de tamanhos variados, apresentam dois locais de ligação putativos constituídos por uma bolsa hidrofóbica central e um bolso periplasmático, sendo estes os pontos de ligação preferencial para as interações, NorA-inibidores da bomba e NorA-substratos (NARGOTRA et al., 2007).



**Figura 4.** Representação esquemática da bomba de efluxo NorA (A); Esquema de estudo *in silico* de NorA com seus respectivos motivos conservados (B).

**Fonte:** Modificado de PUTMAN et al., 2000; KUMAR; SCHWEIZER, (2005).

A superexpressão desta bomba de efluxo, está relacionada com mutações encontrado no promotor do gene que codifica NorA, esta modificação é baseado na substituição da timidina por uma guanina (G → T) apresentando assim uma resistência cromossomal (SPELLBERG et al., 2008; HUET et al., 2008). Estas mutações são a causa de uma transcrição e/ou tradução aumentada (FOURNIER et al., 2001).

### 2.3.2. Bombas TetK

São proteínas de efluxo específicas que expulsa o antibiótico tetraciclina (LEVY, 1998). A bomba TetK está presente principalmente no gênero *Staphylococcus* especialmente em *Staphylococcus aureus*. Os genes que codificam estas bombas estão presentes em plasmídeos de tamanho variável e pode transportar outros genes de resistência tal como TetL. A expressão dessas Bombas é controlada pela transcrição do repressor tetR que é induzida pela presença da tetraciclina (BUTAYE et al., 2003).

Em *Staphylococcus aureus*, TetK é responsável por uma resistência a tetraciclina mas não a minociclina (CATTOIR, 2004).

Tem sido determinado outro tipo de resistência para tetraciclina conhecido como proteção ribossomal (TetM e TetO) mediado por *transposons* localizado no cromossomo (TRZCINSK et al., 2000). A presença de ambos mecanismos de

resistência Tetk e proteção ribossomal em *S. aureus* gera implicações no desenvolvimento e uso de inibidores de bombas Tetk, pois é difícil observar como os inibidores de bomba de efluxo sozinhos podem beneficiar o tratamento para as infecções causadas tanto por efluxo, quanto proteção ribossomal, tornando assim, difícil o estudo para bomba Tetk (CHOPRA, 2002).

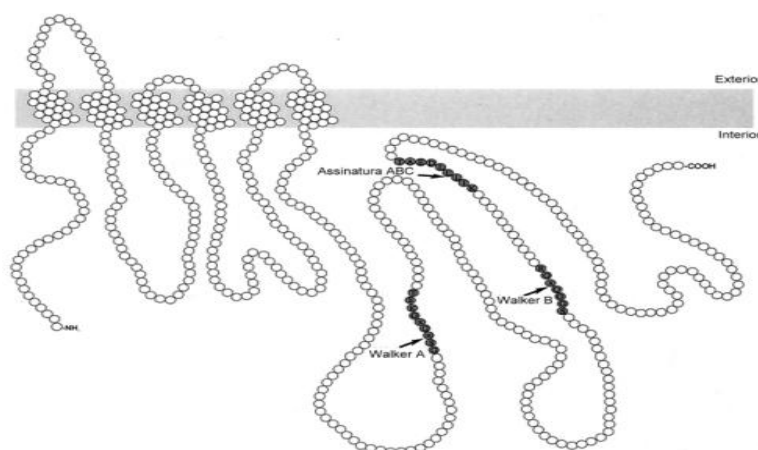
### 2.3.3. Bomba MsrA

A MsrA é uma proteína de efluxo com 488 aminoácidos responsável pela resistência aos antibióticos da classe macrolídeos e streptogramina B streptococci e staphylococci, mas susceptível a clindamicina que não é afetada por este sistema (LIXZ NIKAIDO, 2004; CATTOIR, 2004). A MsrA é um transportador ABC do tipo ubiquinona envolvida principalmente no transporte específico de drogas (MÉNDEZ; SALAS, 2004)

A resistência aos macrolídeos em estafilococos está geralmente relacionado a uma mudança no alvo do ribossomo 50S (devido gene erm - ribossomas eritromicina methylase) ou a bomba de efluxo de múltiplos fármacos codificada pelo gene MsrA plasmídial (REYNOLDS et al., 2003).

A MsrA possui dois domínios transmembranares, altamente hidrofóbicos, compreendendo geralmente seis hélices  $\alpha$  que formam a via através da qual o substrato atravessa a membrana, e dois domínios hidrofílicos de ligação a sequências nucleotídicas, localizados na periferia da face citoplasmática da membrana e responsáveis pela ligação e

hidrólise do ATP para a translocação do substrato **figura 5** (PUTMAN et al., 2000; DE ROSSI et al., 2006)



**Figura 5.** Esquema estrutural para os transportadores ABC (MrsA) e respectivos motivos conservados .

**Fonte:** PUTMAN *et al.*, 2000.

## 2.4. Inibidores de bombas de efluxo

Com a identificação e caracterização de sistemas de efluxo que conferem resistência clínica aos antimicrobianos, tem surgido interesse no desenvolvimento de uma nova classe de agentes potenciadores da ação antibiótica que atuem como inibidores de bombas de efluxo (IBEs) (LAWRENCE; BARRETT, 1998; LYNCH, 2006). Os inibidores de resistência, também chamados modificadores de atividade antibiótica ou adjuvantes de antibióticos, são considerados como a alternativa mais apropriada das novas terapias antibacterianas (VAN BAMBEKE et al., 2006; LYNCH, 2006).

Estes agentes seriam co-formulados ou co-administrados com os antibióticos apropriados, numa abordagem terapêutica adjuvante como na combinação dos antibióticos amoxicilina (um beta-lactâmico) com ácido clavulânico (um inibidor microbiano de beta-lactamases). A eficácia da ação antibacteriana é aumentada, pois o inibidor estabiliza a amoxicilina, impedindo a sua degradação pelas enzimas beta-lactamases produzidas pela bactéria como um mecanismo de defesa e sobrevivência do microorganismo (GIBBONS, 2004a; SANGWAN et al, 2008).

Existem atualmente diversas estratégias de bloquear o efluxo de compostos antimicrobianos, sendo umas delas, a utilização de moléculas com uma estrutura análoga aos antibióticos, tornando-os menos susceptíveis de serem bombeados. Os estudos mais promissores vão no sentido de inibir a extrusão através de substâncias inibidoras das bombas de efluxo ao interferirem com a energia para o transporte ativo (LOMOVSKAYA et al., 2001; VAN BAMBEKE et al., 2006).

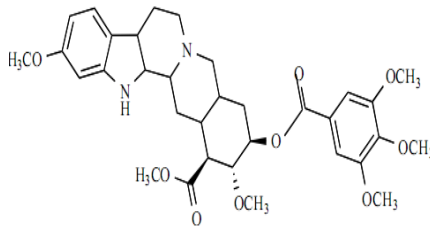
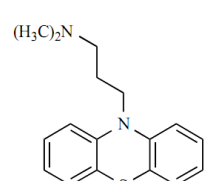
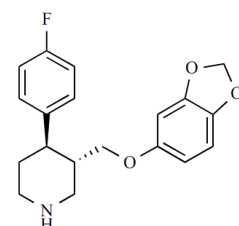
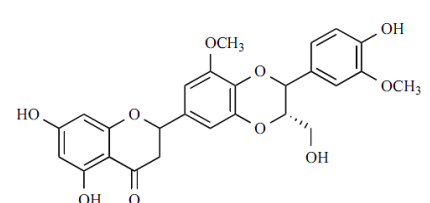
Os mecanismos pelos quais os inibidores de bomba de efluxo podem atuar não estão claramente compreendidos, mas têm sido propostas algumas formas de ação (ZLOH et al., 2004), como:

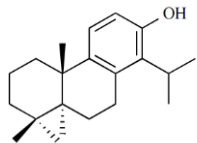
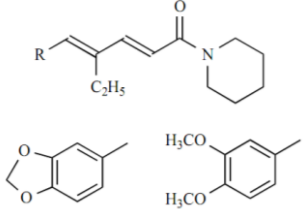
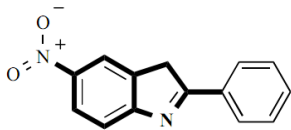
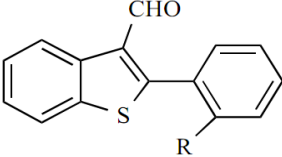
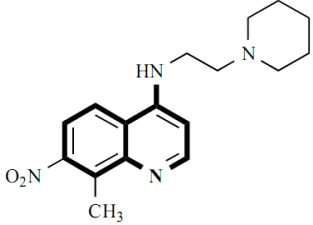
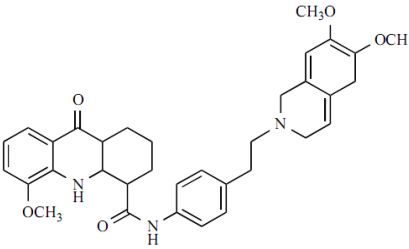
- I- Ligar-se diretamente a um ou mais sítios de ligação na proteína de efluxo, de maneira competitiva ou não-competitiva; apresentar afinidade pelo substrato transportado pela bomba, formando um complexo que poderá não ser mais reconhecido pela bomba de efluxo;
- II- Interferir no gradiente de próton;
- III- Interagir com a membrana plasmática modificando a conformação da proteína de efluxo
- IV- Inibir a expressão do gene de efluxo.

Assim, a aplicação desses inibidores em associação com antibióticos convencionais poderá aumentar a concentração intracelular desses antibióticos, restaurando sua eficiência, além de reduzir o emergente desenvolvimento da

resistência bacteriana (MARKHAM et al., 1999; LOMOVSKAYA; BOSTIAN, 2006; POOLE; LOMOVSKAYA, 2006). Diversos IBEs já foram identificados **tabela 2**.

**Tabela 2.** Inibidores de bomba de efluxo com seus respectivos substratos e bactérias.

Classe dos IBEs	Estrutura inibidor	Substratos	Demonstração da atividade	Referências
Alcalóide	<p><b>Reserpina</b></p> 	Fluoroquinolonas	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>S. aureus</i>	Baranova; Neyfakh, 1997; Gibbons; Udo, 2000.
Fenotiazinas	<p><b>Clorpromazina</b></p> 	Tetraciclinas	<i>E. coli</i>	Molnar et al., 1997.
Fenil piperidina	<p><b>Paroxitina</b></p> 	Norfloxacina BrEt Tetraciclina	<i>S. aureus</i>	Kaatz et al., 2003 <sup>a</sup>
Flavonolignanas	<p><b>5' metoxihidnocarpina (5-MHC)</b></p> 	Nordloxacina BrEt	<i>S. aureus</i>	Stermitz et al., 2000.

Diterpenos fenólicos	<p><b>Totarol</b></p> 	Eritromicina Norfloxacin Tetraciclina BrEt	<i>S. aureus</i>	Smith et al., 2007a.
Análogos de piperina	 <p><b>SK20</b>                      <b>SK56</b></p>	Ciprofloxacina	<i>S. aureus</i>	Kumar et al., 2008.
Indol	<p><b>IFN55</b></p> 	Ciprofloxacina BrEt	<i>S. aureus</i> <i>S. pneumoniae</i>	Markham et al., 1999.
Benzotiofenos	 <p>R=H; specific to NorA; R=Cl; non specific</p>	Fluorquinolonas Macrolídeos	<i>S. aureus</i>	Fournier et al., 2007.
Alquilaminoquinolina		Clorafenicol Norfloxacin Tetraciclina	<i>Enterococcus aerogenes</i>	Mallea et al., 2003.
Acridina Carboxamidas		Fluorquinolonas Tetraciclina	<i>S. aureus</i>	Gibbons et al., 2003a.

No entanto vale ressaltar que a atividade potenciadora da ação antibiótica demonstrada pela maioria destes compostos IBEs principalmente de origem natural (plantas) apenas ocorre com concentrações significativamente superiores às clinicamente utilizadas nos outros âmbitos terapêuticos (LYNCH, 2006), impossibilitando seu uso na terapia antimicrobiana.

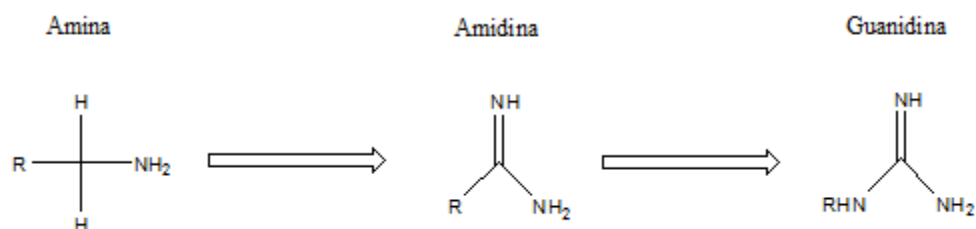
A escassez de inibidores de efluxo efetivos na prática clínica leva a constante procura pela identificação e desenvolvimento de novos inibidores, tanto contra os sistemas de efluxo em microrganismos, como em células tumorais resistentes a múltiplas drogas (DICKSON et al., 2006; KAATZ et al., 2003b). Atualmente a procura por novos agentes tem focado nos produtos sintéticos como moduladores da atividade antibiótica por bomba de efluxo, devido a uma obtenção mais fácil e produção em larga escala.

## 2.5. Potencial biológico das guanilhidrazonas

As guanilhidrazonas são moléculas amplamente estudadas, biológica e quimicamente. Na química, são utilizadas como intermediários na construção de compostos heterocíclicos polifuncionais contendo átomos de nitrogênio (GOSSNITZER et al., 2002).

A função guanidina presente nestas moléculas, com sua forte basicidade, é parte integrante de vários compostos biologicamente ativos e está intimamente relacionada a diversas dessas atividades (ORNER; HAMILTON, 2001).

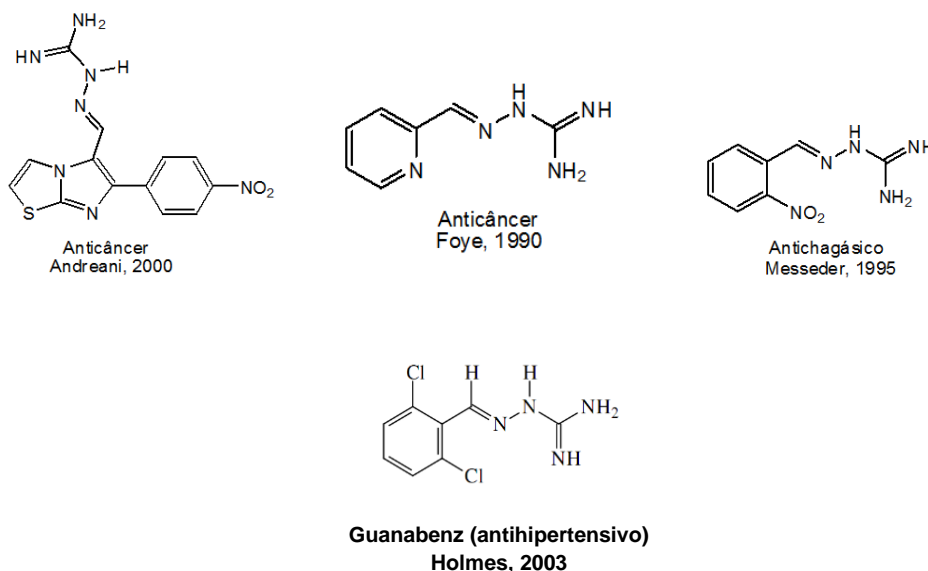
No campo da química orgânica, uma base é geralmente definida como um composto capaz de se ligar a um próton para dar uma espécie catiônica. A introdução de uma imina (=NH) sobre o carbono  $\alpha$  de uma amina constitui uma amidina, outra espécie de amina ainda mais básica. A guanidina, uma 2-aminoamidina apresenta três funções nitrogenadas (**figura 6**) e mostra a forte basicidade de acordo com Brønsted (HAFELINGER et al., 1991).



**Figura 6:** Estrutura guanidina

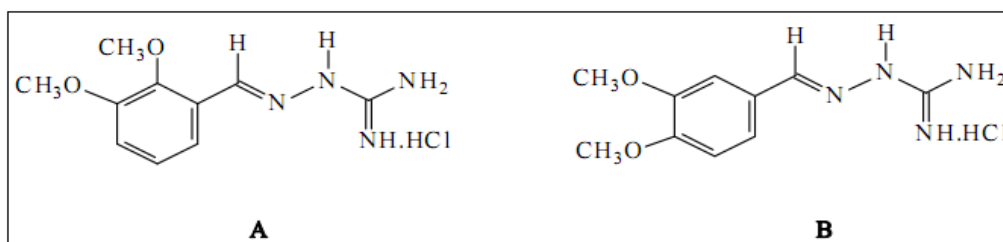
Entre o potencial biológico dessas moléculas se destacam as atividades microbiológicas e farmacológicas tais como: antihipertensivos (FOYE, 1990; HOFFMAN, 2003), antidiabéticos (LARSEN, 2001), antineoplásicos (ANDREANI, 2000; BRZOWSKI, 2007), antitubercular (BAIRWA et al., 2010), antimaláricos, antileishmania, antifúngicas, anti-HIV e antibacteriana (BORGES, 2001; OLIVEIRA et al., 2012; AHMED et al., 2013).

A **figura 7** abaixo mostra algumas estruturas de fármacos guanilhidrazônicos de uso consagrado na terapêutica, evidenciando assim o reconhecido potencial biológico destas moléculas para indústria farmacêutica.



**Figura 7:** Estruturas de fármacos guanilhidrazônicos usados na terapêutica.

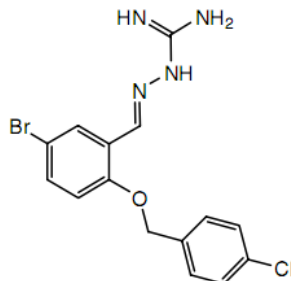
Considerando o espectro de atividade bacteriana das guanilhidrazonas, MARTINS, (2004), sintetizou uma serie de derivados guanilhidrazônicos, dentre eles o cloridrato de (*E*)-2-[(2,3-dimetoxifenil)-metileno]- hidrazinocarboxi-midamida (**A**) e cloridrato de (*E*)-2-[(3,4-dimetoxifenil)-metileno]- hidrazinocarboxi-midamida (**B**) com efeitos antibacterianos em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e também com efeitos antifúngicos em *Candida albicans*. A diferença entre dois compostos é a presença do grupo metoxila na posição 2 ou 4 no anel aromático (**figura 8**). GADAD et al., (2000) também relataram atividade bacteriana de algumas guanilhidrazonas contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e moderada atividade frente *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figura 8:** Guanilhidrazonas com atividade antibacteriana e antifúngica

**Fonte:** Martins (2004).

Como anti-HIV WEI et al., 2007 através de estudos de relação estrutura atividade apresentou guanilhidrazonas 2-benziloxibenzaldeído (**figura 9**) como potente antagonista do receptor CCR5, este tem papel fundamental como co-receptor para entrada do vírus na célula.



**Figura 9.** Guanilhidrazonas como antagonista do receptor CCR5 do vírus HIV.

Fonte: WEI et al., 2007.

Estudos anti-tripanosossoma usando compostos guanilhidrazônicos também tem sido relatados na literatura (MESSEDER, 1995; PEDROSA et al., 2001). Foi verificado que as moléculas mais ativas para *T. Cruzi* foram aquelas em que a cadeia lateral amino guanidina possuía uma rotação livre. Por falta de impedimentos estéricos causados por outros ligantes na molécula, esta liberdade rotacional favoreceu a ligação da porção guanidina com DNA de *T. Cruzi* realizando sua atividade contra este organismo.

Através de métodos de modelagem molecular (Docking), SANTOS-FILHO (1997) estudou a interação de guanilhidrazonas com a fenda menor do DNA. Em seus estudos, utilizando um fragmento de DNA de dupla fita com a seqüência de pares de base d(CGCGAATTCGCG)2, foi verificada a interação preferencial do terminal guanidínico catiônico com os pares de bases A-T (Adenina-Timina), sugerindo que o mecanismo de ação dessas drogas seja através de sua interação com o DNA do parasita. BRANDS et al., 2002, também relata que derivados guanidínicos inibem eficazmente o processo de tradução bacteriana em cepas *Staphylococcus aureus*.

As drogas contendo o grupo guanidina também têm sido alvo de intensa avaliação clínica e pré-clínica para tratamento de tumores (ANDREANI et al., 2004; 2006). Por exemplo o metilglioxal-bis (guanilhidrazona) é um composto protótipo dessa classe de agentes com ação antitumoral (EKELUND et al., 2001). Acreditada-se que em relação à estrutura-atividade, o grupo guanidino é essencial para ação citotóxica em células leucêmicas (SMETS et al., 1988).

Então diante do exposto em termos de derivados guanilhidrazônicos a investigação é especialmente interessante, pois além do amplo espectro de atividades biológicas mostrados acima, esses compostos apresentam custos acessíveis, e

sua síntese é relativamente fácil, tornando-se apropriados para o uso em países mais pobres e que apresentam grandes problemas no sistema de saúde. Isto justifica a necessidade de maior conhecimento das potencialidades desses fármacos.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

Tendo em vista o alarmante problema da resistência microbiana aos antibióticos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial biológico de novos produtos sintéticos bioativos frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* que superexpressam genes codificadores de bombas de efluxo.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Avaliar os derivados de guanilhidrazônicos com relação:

- ✓ À atividade antibacteriana em linhagens de *S. aureus*;
- ✓ À atividade moduladora da ação antibiótica em linhagens de *S. aureus*;
- ✓ Analisar a contribuição dos radicais destes compostos na atividade antimicrobiana e moduladora da resistência à drogas;
- ✓ Criar modelo teórico para proteína NorA através de modelagem molecular;

Realizar estudos de docking molecular com o composto 13 que mostrou melhor atividade moduladora da resistência à drogas para bomba NorA.

## 4. Metodologia

### 4.1. Linhagens de *Staphylococcus aureus*

Foram utilizadas 3 linhagens de *Staphylococcus aureus* fornecidas pelo Dr. Simon Gibbons (University of London) sendo elas:

- ✓ IS-58, que possui o gene que codifica a proteína TetK para efluxo de tetraciclina (GIBBONS; UDO, 2000).
- ✓ RN-4220 que possui o plasmídeo pUL5054, o qual, carrega o gene que codifica a proteína para efluxo de macrolídeos (MrsA) (ROSS et al., 1989)
- ✓ SA-1199B, que superexpressa o gene norA que codifica a proteína de efluxo NorA, responsável pelo efluxo de várias substâncias (KAATZ et al., 1993; KAATZ; SEO, 1995)

Estas linhagens são mantidas em meio de cultura Agar a base sangue (Blood ágar base – Difco) inclinado. Antes de serem utilizadas, as células crescem em caldo nutritivo de *infusão* (*Brain heart infusion - BHI*, Difco) por 18-24hs a 37°C.

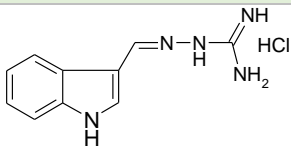
### 4.2. Antibióticos e brometo de etídio

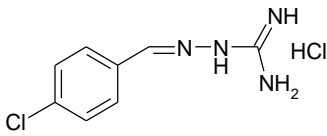
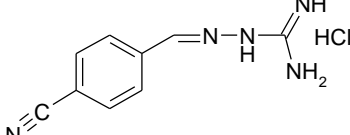
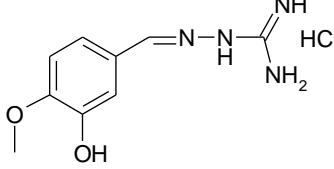
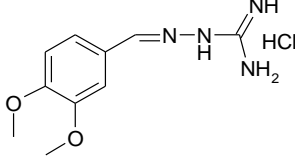
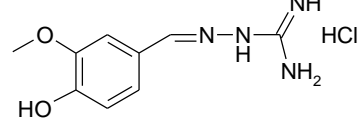
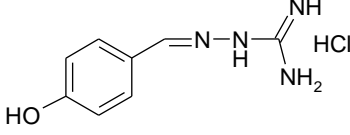
A solução estoque dos diversos antibióticos, norfloxacin, pefloxacin, tetraciclina, eritromicina, reserpina e berberina foram preparados de acordo com o NCCLS (2005). A solução brometo de etídio (BrEt) foi preparada em água destilada. Todas as drogas foram obtidas da Sigma Chemical Co.USA.

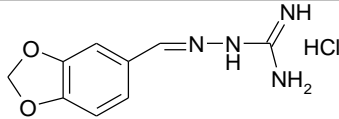
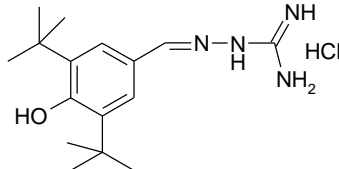
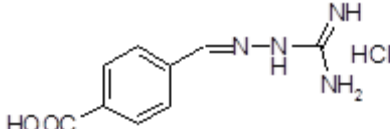
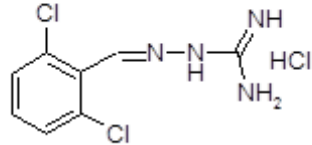
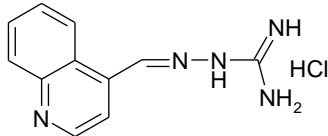
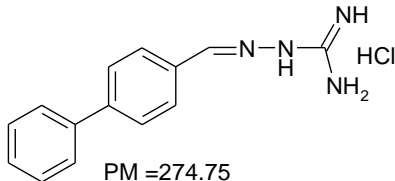
### 4.3. Substâncias utilizadas: Guanilhidrazonas

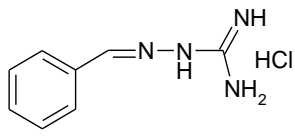
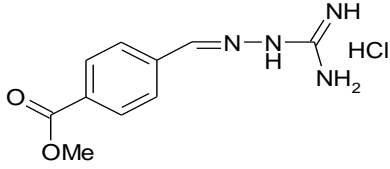
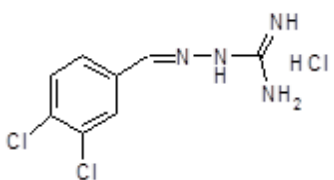
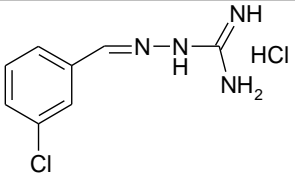
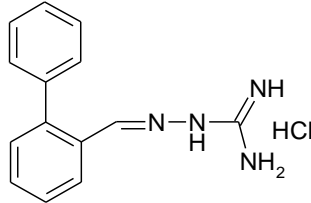
Foram fornecidos pelo Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino do Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais no Instituto de Química e Biotecnologia, UFAL.

A solução estoque dos derivados guanilhidrazônicos foi preparada dissolvendo os compostos em DMSO, e depois diluindo com água destilada até atingir uma concentração final de DMSO 4%, a qual não interfere no crescimento bacteriano. As estruturas químicas das guanilhidrazonas testados estão apresentados no **Quadro 1** abaixo.

Código	Nomenclatura	Estrutura
1	Cloridrato de 2-((1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno) hidrazina carboximidamida	 <p>PM =237,69 FM =C10H11N5 . HCl</p>

Código	Nomenclatura	Estrutura
2	Cloridrato de 2-(4 clorobenzilideno) hidrazina carboximidamida	 <p>PM =233,10 FM =C8H9ClN4 . HCl</p>
3	Cloridrato de 2-(4-cianobenzilideno) hidrazina carboximidamida	 <p>PM =223,67 MF =C9H9N5 . HCl</p>
4	Cloridrato de 2-(3-hidroxi-4-metoxibenzilideno) hidrazina carboximidamida	 <p>PM =244,68 FM =C9H12N4O2 . HCl</p>
5	Cloridrato de 2-(3,4-dimetoxibenzilideno) hidrazina carboximidamida	 <p>PM =258,71 FM =C10H14N4O2 . HCl</p>
6	Cloridrato de 2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno) hidrazina carboximidamida	 <p>PM =244,68 FM =C9H12N4O2 . HCl</p>
7	Cloridrato de 2-(4-hidroxibenzilideno) hidrazina carboximidamida	 <p>PM =214,66 FM =C8H10N4O . HCl</p>

Código	Nomenclatura	Estrutura
9	Cloridrato de 2-(benzo[d][1,3] dioxol-5-ilmetileno) hidrazina carboximidamida	 <p>PM = 242,67 FM = C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> · HCl</p>
10	Cloridrato de 2-(3,5-di- <i>tert</i> -butil-4-hidroxibenzilideno) hidrazina carboximidamida	 <p>PM = 326,87 FM = C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O · HCl</p>
11	Cloridrato de ácido 4-((2-carbamimidoilidrazono) metil) benzoico	 <p>PM = 326,87 FM = C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> · HCl</p>
12	Cloridrato de 2-(2,6-diclorobenzilideno) hidrazina carboximidamida	 <p>PM = 267,55 FM = C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub> · HCl</p>
13	Cloridrato de 2-(quinolin-4-ilmetileno) hidrazina carboximidamida	 <p>PM = 249,70 FM = C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub> · HCl</p>
14	Cloridrato de 2-(bifenil-4-ilmetileno) hidrazina carboximidamida	 <p>PM = 274,75 FM = C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub> · HCl</p>

Código	Nomenclatura	Estrutura
15	Cloridrato de 2-benzilideno hidrazina carboximidamida	 <p>PM =198.66 FM =C8H10N4 . HCl</p>
16	Cloridrato de 4-((2-metil) carbamimidoilidrazono) benzoato de metila	 <p>PM =256.69 FM =C10H12N4O2 . HCl</p>
17	Cloridrato de 2-(3,4-diclorobenzilideno) hidrazina carboximidamida	 <p>PM =267.55 FM = C8H9N4Cl2 . HCl</p>
18	Cloridrato de 2-(3-diclorobenzilideno) hidrazina carboximidamida	 <p>PM =233,10 FM =C8H9ClN4 . HCl</p>
19	Cloridrato de 2-(bifenil-2-ilmetileno) hidrazina carboximidamida	 <p>PM =274,75 FM =C14H14N4 . HCl</p>

Para calcular o LogP das guanilhidrazonas foi utilizado o software Hyper Chem™ Release 8.0.8. Windows.

#### 4.4. Avaliação da atividade antibacteriana

As concentrações inibitórias mínima (CIMs) dos compostos sintéticos, dos antibióticos e do BrEt, foram determinadas em caldo nutritivo através da técnica de microdiluição, usando uma suspensão de *c.a.*  $10^5$  ufc/mL. As CIM dos compostos sintéticos, antibióticos, BrEt foram determinadas com concentrações variando de 256µg/mL a 0,25µg/mL em (diluições seriadas  $\frac{1}{2}$ ). A CIM foi definida como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento bacteriano (SMITH et al., 2005). Para a melhor visualização do crescimento bacteriano após 24hs na estufa à 37°C, foi feito uso do corante resazurina (0,01%), adquirido na (Sigma-Aldrich).

#### 4.5. Avaliação da atividade moduladora da resistência à drogas

Para a avaliação dos compostos sintéticos como agentes modificadores da atividade antibiótica (inibidores putativos de bomba de efluxo), a metodologia básica consiste na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos, na presença e na ausência do produto sintético (GIBBONS et al., 2003b). A concentração do produto é aquela correspondente a 1/4 da sua CIM (concentração sub-inibitória) (STAVRI et al., 2007). Para a melhor visualização do crescimento bacteriano após 24hs, foi feito uso do corante resazurina (0,01%).

O brometo de etídio (BrEt), assim como a berberina foram utilizadas como controles positivos contra a linhagem SA-1199B, pois a resistência a estes inibidores está restrita ao sistema de efluxo, (KUMAR *et al.*, 2008; STERMITZ, et al., 2000). A reserpina foi usado como controle positivo para bomba TetK.

A perfloxacin por se tratar de uma quinolona hidrofóbica foi usada como controle negativo, por tratar de um fraco substrato para bomba NorA (MARQUEZ et al., 2005).

#### 4.6. Modelagem da Proteína de Resistência à Quinolona (NorA)

Uma vez que a estrutura cristalográfica real da proteína NorA de *S. aureus* não foi desvendada, foi então produzido um modelo teórico baseado em similaridade da estrutura primária da NorA frente a outras estruturas cristalográficas de proteínas conhecidas. Assim, foi escolhida a seguinte sequência primária da proteína NorA de *S. aureus*, depositada no NCBI ReferenceSequence:NP\_373905.1):MNKQIFVLYFNIFLIFLGIGLVIPVLPVYLKDLGLTGS  
 SDLGLLVAAFALSQMIISPFGGTLADKLGKLIICIGLILFSVSEFMFAVGHNFVLMLSR  
 VIGGMSAGMVMPGVTGLIADISPSHQKAKNFGYMSAIINSGFILGPGIGGFMAEVSHR  
 MPFYFAGALGILAFIMSIVLIHDPKKSTTSGFQKLEPQLLTKINWKVFITPVILTLVLSFGL

SAFETLYSLYTADKVNYSPPKDISIAITGGGIFGALFQIYFFDKFMKYFSELTFIAWSLLYS  
VVVLILLVFANGYWSIMLISFVVFIFGDMIRPAITNYFSNIAGERQGFAGGLNSTFTSMG  
NFIGPLIAGALFDVHIEAPIYMAIGVSLAGVVIVLIEKQHRACLKEQNM AKLKEQNM. Tal  
sequência foi então utilizada para produzir o modelo teórico da proteína NorA  
utilizando o software online SWISS-MODEL (BIASINI et al., 2014).

O SWISS-MODEL busca por modelos estruturais através de testes de alinhamento realizados pelas ferramentas Basic Local Alignment Search Tool (Blast) (ALTSCHUL et al., 1997) ou HMM-HMM-based lightning-fast iterative sequence search (HHblits) (REMMERT et al., 2012), que utilizam o banco de dados do SWISS-MODEL (SMTL) frente à sequência selecionada. Após alinhamento, as estruturas de maior similaridade foram escolhidas para a construção do modelo da proteína NorA através do alinhamento alvo-modelo via software ProMod-II (GUEx; PEITSCH, 1997). Este método consiste em copiar as coordenadas dos resíduos conservados no modelo em construção, depois as cadeias laterais são reconstruídas e então a geometria do modelo em construção é regularizada através do campo de força de cada resíduo. A escolha do melhor modelo é baseada em diferentes variáveis, sendo a mais notável o score QMEAN (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011).

#### 4.7. Métodos para estudo de Dockings Moleculares

O modelo selecionado nos resultados do modelamento feito no WISS-MODEL foi dockado frente as moléculas ligantes da proteína NorA, sendo eles o antibiótico norfloxacino e a guanilhidrazona 13 que apresentou um dos melhores resultados nos testes *in vitro*.

Para realização dos testes de docking molecular, foi utilizado o software AUTODOCK 4.2 (MORRIS *et al.*, 2009), onde foram tratados o receptor (NorA) e os ligantes (norfloxacina, composto 13,), ambos no formato de arquivo '.pdb'.

- a) **Receptor:** em todos os testes, o receptor foi 3wdo\_nora.pdb (modelo teórico).
- b) **Ligante:** após carregado o ligante específico para cada teste, automaticamente foram identificadas as ligações rotáveis, carbonos aromáticos e adicionado cargas de Gasteiger; então a molécula foi salva na extensão .pdbqt. Esta extensão contém, além das coordenadas atômicas da molécula, sua carga parcial (q) e identificação 'autodock type' para cada átomo (t).
- c) **Parâmetros da Grid Box:** após a molécula 3wdo\_nora.pdb ter sido identificada como a macromolécula do teste, automaticamente foram adicionadas cargas de Gasteister e identificação de átomos não-ligados à molécula, então foi salva na extensão .pdbqt. Após isto, as dimensões para a

grade (Grid Dimension) escolhidas como padforam o número de pontos em 40 para os três eixos, espaçando de 0.603 angstrom e centro da caixa de grade de -29.984, 55.831 e 73.869 para os eixos X, Y e Z, respectivamente. Para o docking entre 3WDO e a norfloxacin a os parâmetros escolhidos foram: Grid Dimension 40 para os eixos X, Y e Z, espaçando de 0.569 e centro da caixa de grade de -33.013, 56.749 e 70.798 para os eixos X, Y e Z. Então, o ligante estudado foi selecionado para os parâmetros da grade, onde esta foi salva na extensão .gpf.

- d) Autogrid:** para realizar os cálculos do Autogrid, foi necessário utilizar o arquivo .gpf. Esse procedimento calcula mapas para os átomos do ligante estudado, mapa de dessolvatação e mapa eletrostático.
- e) Autodock:** para realizar o procedimento de docking propriamente dito foi necessário identificar o receptor como a macromolécula rígida e o ligante específico estudado. No parâmetro de busca Genetic Algorithm (GA), todas as opções foram deixadas no padrão, exceto no número de voltas e no número máximo de indivíduos sobreviventes, alterados para 20 e 2, respectivamente. Feito isso, todos esses parâmetros foram salvos no tipo GA Lamarkiano em extensão .dpf. Por fim, o Autodock foi executado utilizando o arquivo recém criado.
- f) Análise:** na análise dos resultados, as soluções geradas foram classificadas por melhor energia e estudadas por agrupamentos (clustering). Os complexos com melhores energias e conformações espaciais notáveis foram salvos em .pdbqt e então convertidos em .pdb. Para estudar/visualizar as interações moleculares de cada complexo gerado nos testes de docking moleculares, foram utilizados os softwares Pymol (DELANO, 2002) e Coot (EMSLEY et al., 2010).

## 5.RESULTADOS

### 5.1. Atividade antibacteriana

Neste estudo, uma nova série de guanilhidrazônicos foi testada frente a três cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) para determinar seu potencial como antimicrobiano e como possíveis inibidores de bomba de efluxo (EPs) bacteriana.

Os novos compostos guanilhidrazônicos exibiram CIM variando entre (16 à >256 µg/mL) **tabela 3**. Com os compostos **10**, **14** e **17** (CIM = 16, 16, 32 µg/mL respectivamente) apresentando melhor atividade antibacteriana, sendo mais efetivas que os antibióticos padrão tetraciclina, eritromicina, norfloxacina (CIM = 64, >256, 128 µg/mL respectivamente) para três linhagens testadas IS-58, RN4220 e AS-1199B.

**Tabela 3.** Concentração inibitória mínima (CIM) das Guanilhidrazonas e antibióticos (µg mL) em linhagens de *S.aureus*.

LogP		IS-58 (TetK)	RN4220 (MsrA)	SA1199B (NorA)
- 1.07	1	256	256	256
0.54	2	128	128	128
0.49	3	>256	>256	>256
-1.25	4	>256	>256	>256
-1.22	5	>256	>256	>256
-1.25	6	>256	>256	>256
-0.26	7	>256	>256	>256
0.82	8	128	128	128
-1.03	9	>256	>256	>256
<b>2.37</b>	<b>10</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
0.15	11	>256	>256	>256
0.32	12	256	256	256
-0.42	13	>256	>256	>256
<b>1.37</b>	<b>14</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
0.77	15	>256	>256	>256
0.18	16	>256	>256	>256

<b>0.32</b>	<b>17</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>
0.54	18	256	256	256
1.37	19	64	64	64
-	Tetraciclina	64	-	-
-	Eritromicina	-	>256	-
-	Norfloxacina	-	-	128

O composto **19** (CIM = 64 µg/mL) mostrou atividade melhor apenas que eritromicina e norfloxacina e equipotente a tetraciclina. Estes resultados obtidos indicam que as estruturas moleculares mais lipofílicas apresentaram melhor atividade antimicrobiana. Os dois grupamentos alifáticos di-*tert*-butila presentes em (**10**) fornecem características de lipossolubilidade mais elevada a este protótipo com LogP = 2,37 (**tabela 3**). As fenilas presentes em (**14**) e (**19**) são grupos volumosos e que também fornecem características de lipofilicidade a estes isômeros constitucionais, apresentado LogP 1,37. Pode-se observar que em (**19**) há predominância do confômero *anti* em função do efeito *orto-orto* causado pelo grupo fenila, o que não ocorre em (**14**), isso pode ter favorecido a atividade inferior da molécula **19**.

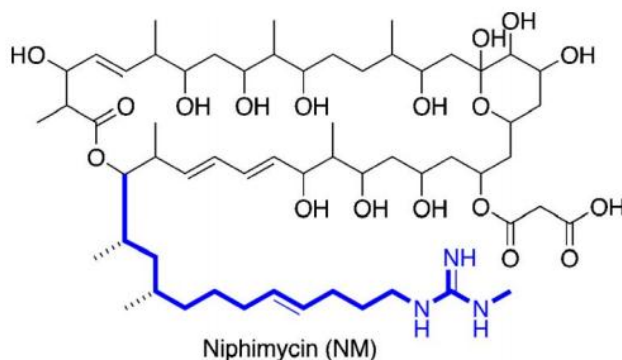
A atividade antibacteriana também foi favorecida com a di-substituição observada em **17** (3,4-dicloro), quando comparado com os compostos monosubstituídos (**2, 3, 7, 8, 18**). As substâncias detentoras de grupamentos polares como metoxila (**4, 5, 6, 16**), grupamentos hidroxila e ácido carboxílico (**4, 6, 7, 11**), ou heteroátomos mais eletronegativos como oxigênio e nitrogênio (**1, 3, 9, 13**), demonstraram-se pouco promissores, haja vista terem apresentado nenhuma atividade. Isto pode está relacionado a alta hidrofília destes compostos, mostrado pelo seus baixos valores de LogP.

Nos estudos de OLIVEIRA et al., (2012), foi evidenciado que atividade anti-estafilocócica de *N*-acilhidrazônicos estava relacionado com a lipofilicidade dos compostos, de forma que a diminuição da lipofilicidade era seguida da diminuição da atividade antibacteriana.

COUQUEIRO et al., (2014), apontam que o tamanho da cadeia lateral e as substituições no núcleo guanidínico parece ter um papel chave para a atividade antibacteriana. Isso pode ser atribuído ao fato que o aumento do tamanho da cadeia lateral diminui a habilidade do nitrogênio (imino da guanidina) como doador de elétron. O tamanho da cadeia lateral também serve como moduladores da afinidade lipídica, e portanto para a biodisponibilidade celular, então o aumento do tamanho ou número da cadeias lateral melhora a permeabilidade da membrana, mas também pode diminuir a

solubilidade aquosa ao ponto do composto se tornar insolúvel e portanto perca a atividade (APPENDINO et al., 2008).

USUKI et al., (2006), relatam que o Nifimicim (Guanidilpoliol) (**figura 10**) é um antibiótico que realiza sua atividade antifúngica, via interação direta com fosfolípidos da membrana plasmática através do grupamento alquila ligado a porção guanidina da cadeia lateral, indicando que tanto a hidrofobicidade do grupo alquila quanto a guanidina são requeridas para a atividade antibiótica. Este também é um antimicrobiano contra bactérias gram-positivas.



**Figura 10.** Estrutura Nifimicim, mostrando a porção guanidina requerida para atividade antibiótica. **Fonte:** USUKI et al., 2006

## 5.2. Atividade Moduladora da resistência à drogas

As pesquisas por novos agentes antibacteriano envolvendo ensaios *in vitro* que tenha não apenas habilidade de inibir o crescimento bacteriano, mas também possua a capacidade destes compostos modificar a resistência a drogas em linhagens com bombas de efluxo (APPENDINO et al., 2008), tem se tornado uma nova alternativa no combate da resistência bacteriana.

A modificação da resistência bacteriana foi avaliada em todas as cepas de *S.aureus* na presença e ausência dos compostos guanilhidrazônicos (**1-19**), quando foram adicionados no meio de crescimento na concentração subinibitória ( $\frac{1}{4}$  CIM).

Conforme está apresentado na **tabela 4**, exceto o composto **11** todos os derivados guanilhidrazônicos, em diferentes proporções e graus de sensibilidade, foram capazes de potencializar a ação dos antibióticos-padrão, tornando-os novamente efetivos para o combate a *S.aureus*.

**Tabela 4.** CIM dos antibióticos na presença e ausência das guanilhidrazonas em *S. aureus*.

Compos tos	CIM (µg/mL)					
	IS-58 Tetraci Clina	RN- 4220 Eritromi Cina	Norflox a cina	SA-1199B Brometo de etídio	Berbe rina	Perflo xa cina
Sozinho	64	>256	128	32	>256	16
+1	64	> 256	32 (4x)	8 (4x)	128 (4x)	16
+2	64	> 256	<b>16 (8x)</b>	<b>4 (8x)</b>	128 (4x)	16
+3	32 (x2)	> 256	<b>8 (16x)</b>	<b>1 (32x)</b>	128 (4x)	16
+4	64	> 256	64 (x2)	16(x2)	128 (x4)	16
+5	64	> 256	64 (x2)	16(x2)	256 (x2)	16
+6	64	> 256	64 (x2)	16(x2)	256 (x2)	16
+7	128	> 256	64 (x2)	16(x2)	256 (x2)	16
+8	64	> 256	<b>16 (x8)</b>	<b>4(x8)</b>	128 (x4)	16
+9	64	256(2x)	<b>16 (x8)</b>	<b>4 (x8)</b>	128 (x4)	16
+10	64	> 256	64 (x2)	32 (nm)	>256(nm)	16
+11	128	> 256	128(nm)	32 (nm)	>256(nm)	16
+12	64	> 256	<b>16 (x8)</b>	<b>4(x8)</b>	128 (x4)	16
+13	64	> 256	<b>8 (x16)</b>	<b>1(x32)</b>	<b>64 (x8)</b>	16
+14	64	> 256	32 (x4)	8(x4)	256 (x2)	16
+15	64	> 256	32 (x4)	8(x4)	256 (x2)	16
+16	32 (2x)	128 (4x)	<b>16 (x8)</b>	<b>2(x16)</b>	128 (x4)	16
+17	64	> 256	<b>8 (x16)</b>	<b>4 (x8)</b>	256 (x2)	16
+18	64	> 256	<b>16 (x8)</b>	<b>2(x16)</b>	128 (x4)	16
+19	32 (2x)	128 (x4)	<b>16 (x8)</b>	<b>4 (x8)</b>	256 (x2)	16
+ reserpina	64	-	-	-	-	-

ão da CIM (-) nao foi realizado teste

Como pode ser observado os antibióticos-padrão (tabela 4, linha 1), na ausência dos derivados guanilhidrazônicos não foram capazes de inibir o crescimento das cepas nas maiores concentrações avaliadas (CIM= >256, 128 e 64 µg/mL, respectivamente para cepas RN-4220, SA-1199B e IS-58), uma vez que as cepas avaliadas possuem genes que superexpressam os genes codificadores das respectivas proteínas de efluxo (MrsA, NorA e TetK), portanto, expulsando os antibióticos do interior celular, tornando-os completamente inefetivos.

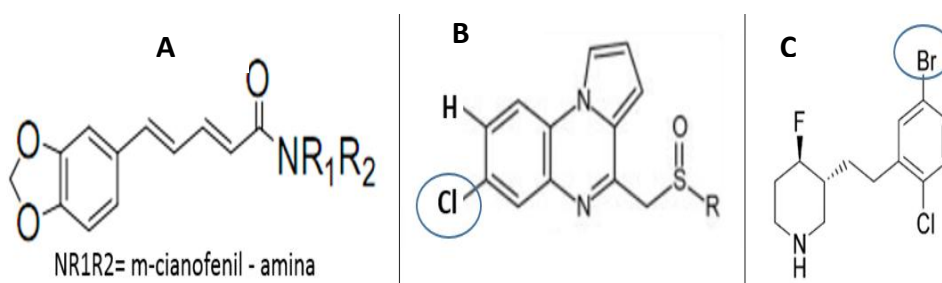
NorA é uma proteína que exporta uma série de drogas estruturalmente diferentes (GIBBONS et al., 2003). O sistema NorA em *S. aureus* tem sido mostrado

como o alvo para a maioria das descobertas, tendo uma série de sintéticos identificados como EPIs com as mais variadas estruturas (KOURTESI et al., 2013). A identificação de inibidores efetivos de NorA e outras bombas de efluxo poderia restaurar a utilidade clínica dos substratos de bombas.

Todos os derivados guanilhidrazônicos com exceção do composto 11 foram capazes de potencializar a ação do antibiótico norfloxacin para linhagem SA-1199B, levando a uma redução da CIM de até 16 vezes para norfloxacin na presença dos compostos **3**, **13** e **17** (CIM= 8 µg/ mL), 8 vezes para **2**, **8**, **9**, **12**, **16**, **18** e **19** (CIM= 16 µg/ mL ), 4 vezes **1**, **14**, **15** (CIM= 32 µg/mL) e de apenas 2 vezes para **4**, **5**, **6**, **7** e **10** (CIM= 64 µg/mL) portanto apresentando para a maioria dos compostos como um possível EPI para NorA.

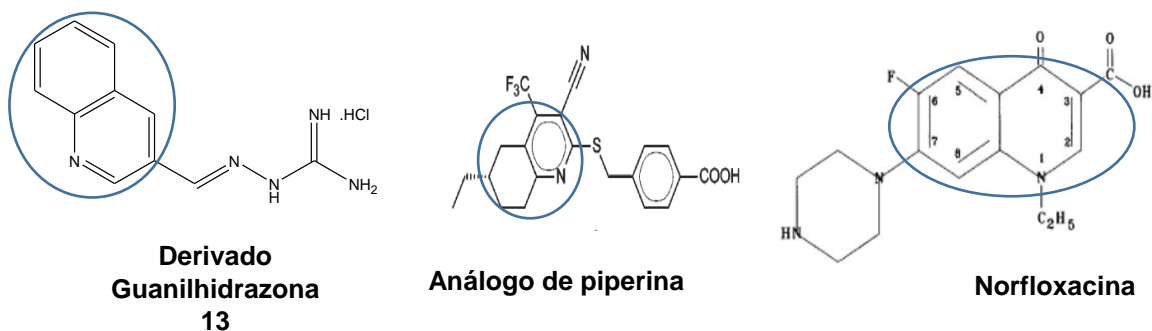
De acordo com estes resultados ao contrário do que ocorreu com atividade antibacteriana, na modulação da resistência à drogas, a lipofilicidade dos compostos guanilhidrazônicos testados, não apresentou grande importância para sua atividade, visto que as moléculas com melhor fator de modulação de 16 e 8 vezes para linhagem SA-1199B continham em suas estruturas, grupos com características mais eletronegativas (grupos retiradores de elétrons) tais como nitrogênio (nitrila), oxigênio como heteroátomo, cloro e bromo.

SANGWAN et al., (2008), estudando análogos de piperina como potentes inibidores de NorA, verificou que com a introdução de substituintes retiradores de elétrons tal como a nitrila ligada a porção anilínica da molécula, potencializou a atividade moduladora tanto para ciprofloxacina quanto para o estudo do efluxo de BrEt (**figura 11a**). VIDAILLAC et al., (2007b), também verificam a importância do substituinte cloro nos derivados de pirrolo(1,2-a) quinoxalina, o qual aumentou a atividade moduladora de norfloxacin no sistema de efluxo NorA (**figura 11b**), assim também como o substituinte bromo presente no inibidor INF277, um análogo de piperidina (GERMAN et al., 2008), **figura 11c**.



**Figura 11a.** Análogo de piperina; **11b.** Derivado Pirrolo (1,2-a) quinoxalina; **11c.** Análogo de Piperidina

Os estudos de BRINCAT et al., (2011), também corroboram com nossos resultados quando o mesmo relata o potencial do composto 4-((3-ciano-6-etil-4-(tri-fluorometil)-5,6,7,8-tetrahydroquinolina-2-il]tio)metil)-ácido benzóico, na qual em sua estrutura está presente o aromático quinolina o qual é apontado como um potente inibidor de NorA, responsável por reduzir até 16 vezes a CIM de ciprofloxacina, assim como a guanil hidrazona **13**. Vale ressaltar também que o antibiótico norfloxacina também apresenta em sua estrutura o anel quinolona, evidenciando desta forma a importância deste aromático (**figura 14**).



**Figura 12.** Inibidores de bomba de efluxo NorA como anel aromático quinolina

A exceção do que foi comentado acima, o composto **19** com caráter um pouco mais lipofílico apresentando o radical 2-fenil em posição *orto*, potencializou efeito da norfloxacina em 8 vezes. O composto **14** com radical *para*-fenil obteve um fator de modulação menor de apenas 4 vezes, podendo ser assim um indicativo que posição *para* não é favorável para atividade deste composto em relação a posição *orto*. SEBATINI et al., (2008), mostrou a importância do radical fenil para o composto 3-fenil-1,4-benzotiazina na atividade inibidora da proteína de efluxo NorA.

Os grupos que menos contribuíram para atividade modificadora de antibióticos das guanil hidrazonas foram as metoxilas, hidroxilas, ácido carboxílico e di-*tert*-butila.

O di-*tert*-butil presente no composto 10, sendo este o composto mais lipofílico da série avaliada neste estudo, mostrou uma redução de apenas duas vezes, indo portanto na contra-mão do que é relato na literatura, que descreve que um aumento da lipofilia incrementa a atividade modulatória. O mesmo pode ser observado com os compostos metoxilados. Para exemplificar, podemos citar flavonóides metoxilados que mostram atividade como inibidores do sistema de efluxo em *S. aureus* já descritos na literatura, onde a atividade pode estar relacionada a lipofilicidade das metoxilas (STERMITZ et al., 2002; SILVA. et al., 2009; MAIA et al., 2011).

A lipofilicidade, portanto é uma característica comum de vários inibidores putativos de bomba de efluxo, e esta qualidade apontada por GIBBONS, (2004a), é provavelmente importante para facilitar sua solubilidade na membrana plasmática

bacteriana e na ligação às proteínas de efluxo, ou mesmo sua ligação a substratos da bomba (ZLOH et al., 2004), inibindo a remoção da droga.

Como no presente estudo a lipofilicidade não está presente nos compostos mais ativos, a atividade modificadora antibiótica pode também está sendo favorecida pela porção guanidina das moléculas. Segundo SANTOS-FILHO, (1997), a principal característica estrutural, mostrada pelas guanilhidrazonas, é o terminal catiônico da guanidina, essa parte da estrutura pode ter grande importância nas propriedades microbianas apresentadas por esses compostos.

Muitos antimicrobianos peptídicos policatiônicos ricos em argininas indica a importância da porção catiônica da guanidina para suas mais variadas atividades (LIU; WILSON, 2010) isso porque através das interações da guanidina com grupos fosfatos presentes em fosfolípidos, ácidos nucleicos e proteínas fosforiladas (WOODS; FERRE, 2005; MANDELL et al., 2007) são mais estável, adquirindo uma organização espacial definida no meio biológico.

A função guanidina é de fundamental importância no processo de reconhecimento molecular de proteínas e enzimas, onde por meio desta função se efetuam interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio. (HANNON et al., 1993), sendo estas de extrema importância para ocorrer ligações entre fármacos e sítios ativos das proteínas, no caso as bombas de efluxo.

Inibidores como acridinas, rodaminas, berberina e broeto de etídio têm sido extensivamente usados para reportar a atividade de bombas de efluxo em uma variedade de organismos incluindo bactérias e fungos (TEGOS et al., 2011). Sendo assim, a redução da CIM para BrEt e berberina, indicam que a modulação está associada à inibição do sistema de efluxo (STERMITZ, et al., 2000; KUMAR *et al.*, 2008) e foram então usados como controles positivos na linhagem SA-1199B (NorA).

A redução da CIM para o BrEt e berberina (MIC= 32, >256 µg/mL respectivamente) (**tabela 4**) na linhagem SA-1199B (NorA), mostram que a atividade adjuvante do antibiótico norfloxacin pelos derivados guanilhidrazônicos se dá através da inibição dos sistemas de efluxo NorA. Os compostos **3** e **13** levaram a uma redução da CIM de até 32 e 8 vezes para BrEt e berberina (CIM= 1 µg/mL e 64 µg/mL respectivamente). Apenas a guanilhidrazona **10** não modulou BrEt e berberina, levando a crer que a sua redução da CIM de duas vezes para norfloxacin ocorra por outro mecanismo, como inibição da topoisomerase IV.

A linhagem SA-1199B (NorA) além de superexpressar a proteína de efluxo NorA, também apresenta uma mutação no gene *grlA* (topoisomerase IV subunidade A), conferindo um resistência por modificação do alvo, ao impedir a inibição da replicação do DNA pelas fluoroquinolonas (KAATZ; SEO, 1997; PRICE et al., 2002; BRINCAT et al., 2011), ou seja esta linhagem apresenta dois mecanismo de

resistência, por bomba de efluxo e inibição da topoisomerase. Segundo os autores WALZER et al., (1994); EKELUND et al., (2001); CARUSO et al., (2014) a presença da porção catiônica do grupo guanidina, melhora a intercalação no DNA e a atividade inibidora de topoisomerase.

A falta de modulação no controle negativo com perfloxacina também contribuiu para validar ainda mais os resultados destas guanilhidrazonas como inibidores de bomba de efluxo NorA.

As guanilhidrazonas também mostraram redução da CIM para eritromicina de 4 vezes na linhagem RN-4220 (MsrA) e de 2 vezes para tetraciclina na linhagem IS-58 (TetK) (**tabela 4**). Em relação a estas linhagens que codificam as proteínas de efluxo específicas, TetK (IS-58) e MsrA (RN-4220), são poucos os inibidores apresentados para as mesmas.

Uma ampla diversidade estrutural dos inibidores para bombas MDR, sugere que os transportadores inibidos, tem uma baixa especificidade estrutural pelo reconhecimento substrato/inibidor (VANBAMVEKE et al.,2010), entretanto para bombas específicas como Tetk e MrsA isso não ocorre, apresentando desta forma uma maior dificuldade em encontrar potentes inibidores.

A reserpina conhecida por potencializar a atividade da tetraciclina na linha linhagem IS-58 (Tetk) (GIBBONS; UDO, 2000), foi utilizado como controle positivo para Tetk. O resultado (**tabela 4**) mostrou que a reserpina não reduziu a CIM da tetraciclina, levando a considerar que exista um outro mecanismo atuante nesta linhagem.

São conhecidos dois mecanismo de resistência para tetraciclina em Staphylococci: Efluxo mediado por bomba Tetk e proteção ribossomal, ambos genótipos podem ocorrer juntos em cepas MRSA (TRZCINSKI et al.,2000; ARDIC et al., 2005).

Para a linhagem RN-4220 (MrsA) o efeito modulador de 4 vezes pode ser considerado importante, porque são poucos os moduladores que tem sido reportados para esta bomba. Existe uma discussão na literatura que a proteína MsrA provavelmente não seja uma bomba de efluxo (REYNOLDS et al., 2003). Este fato torna difícil discutir seus resultados.

LINA et al., (1999), relatam que a importância da bomba MrsA entre *Staphylococcus aureus* resistente aos macrolídeos parece limitado, uma vez que durante o seu estudo, a presença do gene MsrA foi detectado por apenas 2,1% do isolados de *S. aureus* resistentes a macrolídeos, lincosaminas, e/ou em ambas as estirpes (estreptogramina meticilina resistente e suscetível). Mesmo tendo passado tanto tempo da realização deste trabalho, isso pode ainda ser uma realidade, visto aos pouquíssimos trabalhos que relatam da resistência por esta bomba em *S. aureus*.

Diante destes resultados expostos no referente trabalho, foi identificado pela primeira vez, o potencial destes novos derivados guanilhidrazônicos com relevante atividade moduladora da resistência a drogas em *S. aureus*. Tendo em vista a emergente resistência bacteriana e a constante necessidade de novas drogas capazes de minimizá-la, esses compostos se tornam possíveis candidatos na busca por inibidores de efluxo, em particular o sistema NorA.

### 5.3. Modelagem da Proteína de Resistência à Quinolona (NorA)

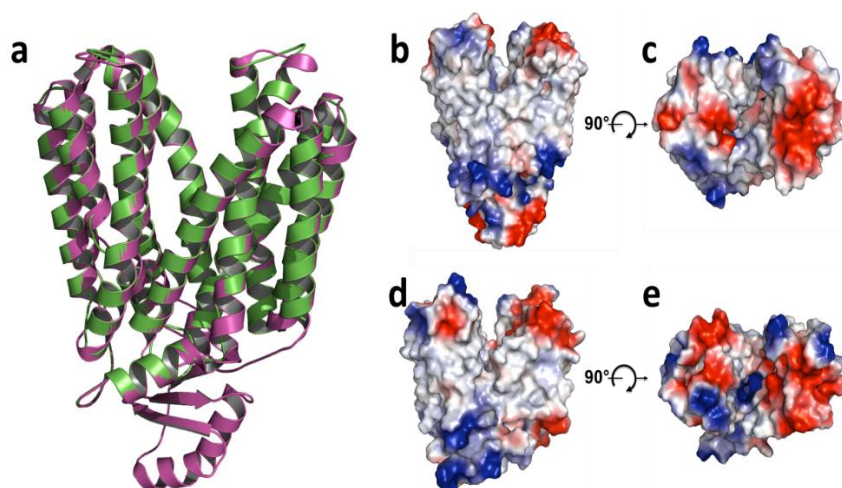
Para compreender melhor o potencial das guanilhidrazonas como inibidor da bomba de efluxo NorA, foi realizado estudos de modelagem e docking molecular da norfloxacin e do composto 13, sendo esta uma das moléculas de novos derivados guanilhidrazônicos de melhor atividade adjuvante do antibiótico norfloxacin.

Então sabendo que a bomba NorA não teve sua estrutura revelada até então, a proposição de modelos teóricos se mostra como a boa alternativa para discutir sobre interações e identificação de sítios de diferentes moléculas. E o docking molecular é uma boa ferramenta para se construir modelos teóricos e podendo dar um bom suporte aos resultados dos testes *in vitro* apresentados aqui.

A busca pelo modelo da proteína NorA através do SWISS-MODEL resultou no modelo YajR, da Major Transporter Superfamily (MFS), de *E. coli* (PDB: 3WDO) (JIANG *et al.*, 2013). Os resultados para QMEAN4, GMQE, Identidade de Sequência, Similaridade de Sequência e Cobertura/Coverage foram -11, 0.51, 16.03, 0.29 e 0.95, respectivamente.

O modelo gerado a partir da estrutura 3WDO apresentou conformação muito similar à estrutura original de *E. coli*, onde a estrutura secundária foi preservada variando apenas os resíduos de aminoácidos constituintes da proteína NorA. Superficialmente, como esperado, a porção externa central de ambas as estruturas apresentaram grande densidade de resíduos hidrofóbicos, sugerindo sua localização transmembrana enquanto que suas extremidades apresentaram boa densidade de cargas: a porção periplasmática do modelo gerado apresentou maior densidade iônica. Já a porção citoplasmática, dado menor número de resíduos de aminoácidos, não apresentou o domínio C-terminal (**figura 13**).

Além dos melhores valores observados para o modelo 3WDO, é importante destacar o transportador YajR corresponde à mesma família da proteína NorA: 'Major Facilitator Superfamily' (MFS) (JIANG *et al.*, 2013). Esses dados deram maior suporte para que este modelo fosse o escolhido para os testes de docking moleculares, o qual foi intitulado de 3wdo\_nora.



**Figura 13.** Apresentação tridimensional da estrutura cristalográfica 3WDO (roxo) sobreposta ao modelo 3wdo\_nora (verde). Representação da estrutura secundária (a); e superfície eletrostática de 3WDO (b, c) e 3wdo\_nora (d, e). Resíduos catiônicos (azul), aniônicos (vermelho) e hidrofóbicos (branco).

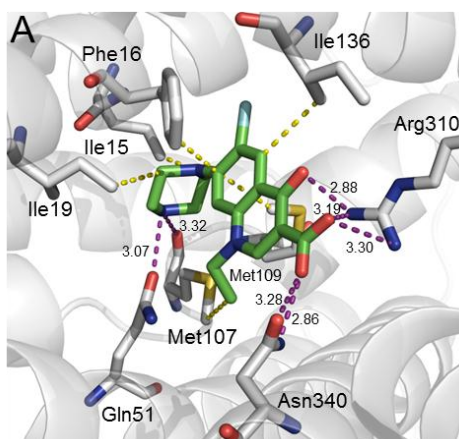
Como observado na **figura 13**, apesar da mesma construção da conformação terciária, diferenças superficiais notáveis foram encontradas entre a estrutura cristalográfica 3WDO (JIANG *et al.*, 2013) e o modelo gerado a partir dela, o 3wdo\_nora. Isso foi dado pelas diferenças entre os resíduos componentes da estrutura primária de cada proteína. Considerando a funcionalidade de ambas as proteínas, substituições na região do canal intramolecular constituem importantes diferenças para os tipos de moléculas transportadas. Sendo assim, substituições dos resíduos de aminoácidos Phe21, Met25, Met28, Met121, His225, Phe144, Met340 e Gln347 da estrutura 3WDO pelos resíduos Ile12, Phe16, Ile19, Thr113, Ser215, Ile136, Gly329 e Thr336 no modelo 3wdo\_nora, respectivamente, fizeram com que este último apresentasse maior volume espacial no canal intramolecular.

Vale destacar a exposição da cadeia lateral do resíduo Ile15 (3wdo\_nora), substituído por Arg24 (3WDO), que, além de permitir o aumento do volume do canal, permite ainda possíveis interações com porções alongadas de determinadas moléculas. Quanto à polaridade dos canais, ambos apresentaram majoritariamente resíduos hidrofóbicos, salve os resíduos Glu222, Asp307 e Arg310 em 3wdo\_nora e His215, Glu318 e Gln347 em 3WDO. Segundo Nargotra *et al.*, (2007), a caracterização tridimensional *in silico* da estrutura Nora este é um transportador transmembranar de 12 segmentos helicoidais, intercalados com ciclos hidrofílicos de tamanhos variados, apresentam dois locais de ligação putativos constituídos por uma bolsa hidrofóbica central e um bolso periplasmático, sendo estes os pontos de ligação preferencial para as interações, NorA-inibidores da bomba e NorA-substratos.

## 5.4. Dockings Moleculares

### 5.4.1. Docking da norfloxacina com bomba NorA

Os testes de docking moleculares realizados entre o modelo da bomba de efluxo NorA resultaram em 5 agrupamentos. O agrupamento de melhor energia de ligação apresentou seis soluções com energias -6,99 à -6,89. Ao analisar as estruturas, foi possível observar que a norfloxacina interagiu com os lobos N e C-terminal da NorA, através da piperazina e carboxila, respectivamente. A solução de melhor resultado apresentou estabilizações hidrofóbicas da quinolona e piperazina através das cadeias laterais dos resíduos Ile15, Phe16, Ile19, Met109 e Ile136. As interações polares foram observadas na estabilização do anel de piperazina entre o 4-nitrogênio da piperazina e a cadeia lateral do resíduo Gln51 numa distância de 3,07Å e oxigênio da cadeia lateral do resíduo Met107 a 3,32Å. Já o radical cetona, foi estabilizado pela cadeia lateral do resíduo de Arg310 por uma ponte de hidrogênio de 2,88Å, enquanto que a carboxina da norfloxacina foi estabilizada também pela Arg310 por duas pontes de hidrogênio de 3,19Å e 3,30Å, além de mais duas pontes formadas pela cadeia lateral do resíduo de Asn340 a 2,86 e 3,28Å de distância (**figura 14**).



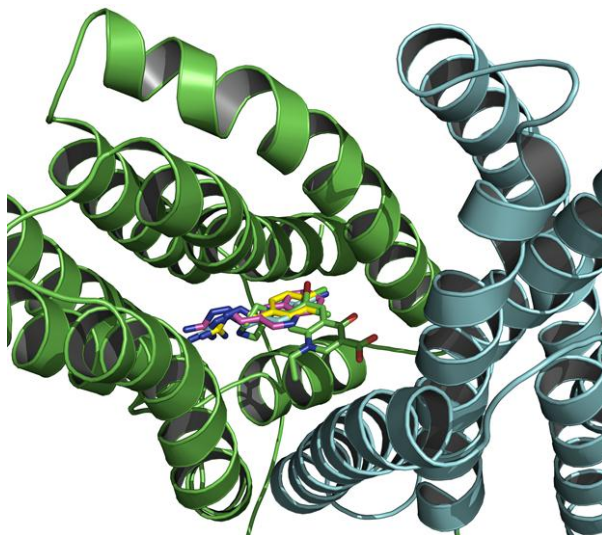
**Figura 14.** Representação da interação entre 3wdo\_nora e norfloxacina para as melhores soluções do primeiro agrupamento (A). Resíduos da proteína e estrutura da norfloxacina representados em branco e verde, respectivamente. Átomos de oxigênio, nitrogênio e flúor apresentados em vermelho, azul e ciano, respectivamente. Pontes de hidrogênio apresentadas em roxo e interações hidrofóbicas, em amarelo.

Apesar de não apresentar uma ponte de hidrogênio para o átomo de flúor, a interação observada nessas soluções apresentou certa semelhança com a solução cristalográfica da bomba de efluxo de *P. furiosus*, da família MATE. Nesta, o sítio da norfloxacina apresenta também pontes de hidrogênio que estabilizam seu radical ácido através dos resíduos Tyr37, Asn180 e Thr202, seu radical cetona e átomo de flúor são estabilizados pela Gln34 e seu nitrogênio-para do anel de piperazina pelo oxigênio principal do resíduo Asn53 (TANAKA *et al.*, 2013).



A acomodação da guanidina desses compostos na projeção do canal presente no lobo N-terminal se mostrou como essencial para garantir o bloqueio da bomba NorA. Esse bloqueio se deu graças a oxigênios das cadeias principais de alguns resíduos da proteína, como Ile15 e Met107 ambos compartilhados com o sítio da norfloxacina mais o oxigênio da cadeia principal do Gly101. Este resíduo foi considerado como o decisivo para fortalecer a competição do composto 13 contra a norfloxacina, pois ele garante não só maior estabilidade para a guanidina comparada à norfloxacina, mas também minimiza a hidrofobicidade do referido canal. Dessa forma, a guanidina se mostrou como uma porção essencial para o efeito modulador do antibiótico norfloxacina em *S. aureus*, como mencionado anteriormente.

Os docking moleculares entre a NorA e os seus ligantes norfloxacina e o composto 13 apresentaram informações interessantes. Uma essencial informação foi a de uma provável competição pelo mesmo sítio ativo da bomba NorA (**figura 16**). Estes resultados podem ser fundamentais para explicar os testes biológicos realizados, que mostraram o aumento da atividade da norfloxacina frente *S. aureus*. A competição pelo mesmo sítio da bomba NorA favorece a permanência do antibiótico dentro da célula, o que aumenta seu poder deletério para as bactérias. Esta competição pode ser justificada também pelo compartilhamento dos resíduos Ile15, Phe16, Ile19, Gln51, Ile136 e Met107.



**Figura 16.** Representação da competição pelo mesmo sítio entre a norfloxacina e compostos guanilhidrazônicos na bomba NorA. Estrutura da norfloxacina (verde), 13 (roxo). NorA representada por suas estruturas secundárias e lobos N (verde) e C-terminal (ciano).

Já foram detectados outros inibidores de bomba de efluxo que atuam por mecanismo competitivo, como por exemplo o dipeptídeo de amida (PA $\beta$ N) na superfamília RND. O Pa $\beta$ N pode reconhecer e ligar-se ao sítio do substrato ou alternativamente através de impedimento estérico, pode prejudicar a ligação do

antibiótico ao seu sítio de afinidade. O PAβN foi avaliado contra as cepas de AcrAB-TolC em bactérias gram-negativas (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. typhimurium*, e *E. aerogenes*) (KOURTESI et al., 2013).

Diante destes resultados, os estudos de docking moleculares realizados entre a proteína NorA e a guanilhidrazona 13 se mostraram essenciais para entender melhor, como possivelmente se deu a inibição desta bomba de efluxo pelas as referidas moléculas obtidos nos testes realizados *in vitro*.

## 6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho pode-se concluir que:

- ✓ Apenas os compostos **10,14** e **17** apresentaram atividade superior aos antibióticos padrão norfloxacina, eritromicina, tetraciclina (CIM = 64, >256, 128 µg/mL respectivamente) para três linhagens testadas IS-58, RN4220 e AS-1199B de *S.aureus*;
- ✓ Foi verificado que a lipofilicidade é um fator importante para a atividade antibacteriana deste compostos, e que os compostos mais lipofílicos apresentam melhor perfilantibacteriano;

A modificação da resistência bacteriana avaliada com os derivados guanilhidrazônicos mostrou:

- ✓ Todos os derivados guanilhidrazônicos com exceção do composto **11**, foram capazes de potencializar a ação do antibiótico norfloxacina para linhagem SA-1199B (NorA), apresentando os compostos **3, 13** e **17** (CIM= 8 µg/ mL) uma redução de até 16 vezes;
- ✓ A presença dos grupos: nitrila, quinolina, cloro e fenila nas moléculas candidatas a inibidora de bomba de efluxo se mostrou importante para atividade moduladora no sistema de efluxo, em particular para a cepa AS-1199B que superexpressa a bomba de efluxoNorA;
- ✓ A lipofilicidade não se mostrou um fator primordial para atividade moduladora. Provavelmente a porção básica da guanidina presente nas moléculas é a porção responsável pela atividade modulatória;
- ✓ Para a linhagem IS-58 (TetK) apenas os compostos **3, 16** e **19** foram capazes de potencializar a ação do antibiótico tetraciclina em 2 vezes. Entretanto o mecanismo de ação para esta linhagem não está totalmente resolvido;
- ✓ Para a linhagem RN-4220 (MrsA) apenas os compostos **9, 16** e **19** foram capazes de potencializar a ação do antibiótico eritromicina em 4 vezes. Esses resultados também são relevantes visto que raras são as substâncias capazes de inibir a bomba MrsA;
- ✓ Com os estudos de docking foi possível observar que o provável mecanismo de ação atuante na atividade moduladora pelas guanilhidrazonas testadas, como mostrada pelo composto 13, é competitivo ou seja tanto o antibiótico norfloxacino quanto composto 13 apresentam o mesmo sítio de ligação para bomba de fluxo NorA.

Estes resultados demonstraram que derivados guanilhidrazônicos apresentam grande potencial em ser putativos inibidores dos sistemas de efluxo bacterianos, em especial para estirpes de *S. aureus*.

## 7. REFERÊNCIAS

- AHMED, N.; BRAHMBHATT, K. G.; KHAN, S.I.; JACOB, M.; TEKWANI, B.L.; SABDE, S.; MITRA, B.; SINGH, I.P.; KHAN, A. I.; BHUTANI, K. K. Synthesis and Biological Evaluation of Tricyclic Guanidine Analogues of Batzelladine K for Antimalarial, Antileishmanial, Antibacterial, Antifungal, and Anti-HIV Activities. **Chem. Biol. Drug Des**, v.81, p.491–498, 2013.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**., v.25, p. 3389-3402, 1997.
- ANDRADE, M. A. Tipagem molecular e investigação dos genes toxigênicos em *Staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas. **Dissertação** (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife. 2008.
- ANDREANI, A.; LEONI, A.; LOCATELLI, A.; MORIGI, R.; RAMBALDI, M.; RECANATINI, M.; GARALIENE, V. Potential antitumor agents. Part 29: Synthesis and potential coanthracyclinic activity of imidazo [2,1-*b*] thiazole guanylhydrazones. **Bioorg. Med. Chemistry**, v.8, p.2359–2366, 2000.
- ANDREANI, A.; GRANAIOLO, M.; LEONI, A.; LOCATELLI, A.; MORIGI, R.; RAMBALDI, M.; GIORGI, G.; GARALIENE, V. Potential antitumor agentes. 34.(1) Synthesis and antitumor activity of guanylhydrazones from imidazo [2,1- *b* ] thiazoles and from diimidazo [1,2- *a*:1,2-*c*] pyrimidine. **Anticancer Research**, v.24, p. 203-212, 2004.
- ANDREANI, A.; BURNELLI, S.; GRANAIOLO, M.; LEONI, A.; LOCATELLI, A.; MORIGI, R.; RAMBALDI, M.; VAROLI, L.; FARRUGGI, G.; STEFANELLI, C.; MASOTTI, L.; KUNKEL, M.W. Synthesis and antitumor activity of guanylhydrazones from 6-(2,4-dichloro-5-nitrophenyl) imidazo [2,1-*b*]thiazoles and 6-Pyridylimidazo [2,1-*b*] thiazoles. **J. Med. Chemistry**, v.49, p. 7897-7901, 2006.
- APPENDINO, G.; GIBBONS, S.; GIANA, A.; PAGANI, A.G.; GRASSI, G.; STAVRI, M. E.; SMITH, E.; RAHMAN, M.M. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure activity study, **J. Nat. Prod**, v.71, p. 1427-1430, 2008.
- ARDIC, N.; OZYURT, M.; SAREYYUPOGLU, B.; HAZNEDAROGLU, T. Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin-resistant staphylococci. **Inter. J. of Antimicrobial Agents**, v.26, p. 213–218, 2005.
- BAIRWA, R.; KAKWANI, M.; TAWARI, N R.; LALCHANDANI, J.; RAY, M K.; RAJAN, M G R.; DEGANI, M. S. Novel molecular hybrids of cinnamic acids and guanylhydrazones as potential antitubercular agentes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.20, p.1623–1625, 2010.

BARANOVA, N. N.; NEYFAKH A.A. Apparent involvement of a multidrug transporter in the fluoroquinolone resistance of *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.41, p.1396-1398, 1997.

BAUMAN, R. W. Microbial Genetics. In: Microbiology. 2th ed. San Francisco: Pearson, cap 7, p. 197-328, 2009.

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v.27, p. 343-350, 2011.

BERINGER, M.; RODNINA, M.V. The ribosomal peptidyl transferase. **Molecular Cell**, v.26, p.311321, 2007. Disponível: <http://www.sciencedirect.com/scihub.org/science/article>.

BIASINI, M.; BIENERT, B.; WATERHOUSE, A.; ARNOLD, K.; STUDER, G.; SCHMIDT, T.; KIEFER, F.; CASSARINO, T. G.; BERTONI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, v.42 (W1), p. W252-W258, 2014.

BORGES, M. N.; FIGUEROA-VILLAR, J.D. NMR interaction studies of aromatic guanyl hydrazones with micelles: model for mechanism of action of cationic antibiotics. **Biopolymers**, v.62, p. 9–14, 2001.

BRANDS, M.; ENDERMANN, R.; GAHLMANN, R.; KRUGER, J.; RADDATZ, S.; STOLTEFUÛ, J.; BELOV, V.N.; NIZAMOV, S.; SOKOLOV, V.V.; MEIJERE, A. Novel Antibiotics for the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. **J. Med. Chemistry**, v. 45, p. 4246-4253, 2002.

BRIGULLA, M.; WACKERNAGEL, W. Molecular aspects of gene transfer and foreign DNA acquisition in prokaryotes with regard to safety issues. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 86, p. 1027-1041, 2010

BRINCAT, J.P.; CAROSATI, E.; SABATINI, S.; MANFRONI, G.; FRAVOLINI, A.; RAYGADA, J. L.; PATEL, D.; KAATZ, G.W.; CRUCIANI, G. Discovery of Novel Inhibitors of the NorA Multidrug Transporter of *Staphylococcus aureus*. **J. Med Chemistry**, v. 54, p.354-365, 2011.

BRZOZOWSKI, Z.; SACZEWSKI, F.; SLAWINSKI, J. Synthesis of novel 3-amino-2-(4-chloro-2-mercaptobenzenesulfonyl)-guanidine derivatives as potential antitumor agents. **Eur. J. of Med. Chem**, v.42, p.1218-1225, 2007.

BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.22, p. 205-10, 2003.

CARUSO, A.; SINICROPI, M.S.; LANCELOT, J.C.; EL-KASHE, F. K.; SATURNINO, C.; AUBERT, G.; BALLANDONNE, C.; LESNARD, A.; CRESTEIL, T.; DALLEMAGNE, P.; RAULT,

S. Synthesis and evaluation of cytotoxic activities of new guanidines derived from carbazoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.24, p.467–472, 2014.

CATTOIR, V. Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria. **Pathol. Biology** (Paris), v.52, p. 607-16, 2004.

CHAMBERS, H.F.; DELEO, F.R. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, p.629-641, 2009.

CHAMPNEY, W.; TOBER, C. Specific inhibition of 50S ribosomal subunit formation in Staphylococcus aureus cells by 16-membered macrolide, lincosamide, and streptogramin B antibiotics. **Curr. Microbiol**, v. 41, p.126–135, 2000.

CHAN, J. X. D.; FAN, S.W.; HUNTER, P. J.; BRENNAN, B. R. BLOOM. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of Mycobacterium tuberculosis within macrophages. **Infect. Immun**, v. 59, p.1755–1761, 1991.

CHANG, A.B.; LIN, R.; KEITH, S.W.; TRAN, C.V.; SAIER, J.M.H. Phylogeny as a guide to structure and function of membrane transport proteins. **Molecular Membrane Biology**, v. 21, p. 171-181, 2004. Disponivel. <http://libgen.org/scimag>.

CHOPRA, I.; GREENWOOD, D. Antibacterial agents: basis of action. In **Encyclopedia of Life Sciences**. John Wiley & Sons, Inc., Chicester. 2001. Disponivel: <http://www.els.net/>.

CHOPRA I. New developments in tetracycline antibiotics: glycylicyclines and tetracycline efflux pump inhibitors. **Drug Resistance Updates**, v. 5, p.119–125, 2002.

COHEN, F. L.; TARTASKY, D. Microbial resistance to drug therapy: a review. **American J. of Infection Control**, v. 25, p. 51-64, 1997.

CONNELL, S.R.; TRACZ, D.M.; NIERHAUS, K.H.; TAYLOR, D.E. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.47, p.3675–3681, 2003.

COQUEIRO, A.; REGASINI, L.O.; STAPLETON, P.; BOLZANI, V.S.; GIBBONS, S. In Vitro Antibacterial Activity of Prenylated Guanidine Alkaloids from Pterogyne nitens and Synthetic Analogues. **J. Nat. Prod**, v. 77, p.1972–1975, 2014.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; SILVA, V. S.; SIQUEIRA JUNIOR, J. P. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus by Turnera ulmifolia L.. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 09, p. 24-27, 2009.

DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. **DeLano Scientific**, San Carlos, CA, USA, 2002.

DE ROSSI, E.; AÍNSA, J. A.; Riccardi, G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. **FEMS Microbiol Review**, v. 30, p.36-52, 2006.

DICKSON, R. A.; HOUGHTON, P. J.; HYLANDS, P. J.; GIBBONS, S. Antimicrobial, resistance-modifying effects, antioxidant and free radical scavenging activities of *Mezoneuron benthamianum* Baill., *Securinega virosa* Roxb. & Willd. And *Microglossa pyrifolia* Lam. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 41-45, 2006.

DOUTHWAITE, S.; CHAMPNEY, W.S. Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site. **J. Antimicrob Chemother**, v.48, p.1–8, 2001.

EKELUND, S.; SJOHOLMB, A.; NYGREN, P.; BINDERUP, L.; LARSSON, R. Cellular pharmacodynamics of the cytotoxic guanidine-containing drug CHS 828. Comparison with methylglyoxal-bis(guanyldrazone). **Eur.Joun of Pharm**, v.418, p.39-45, 2001.

EMSLEY, P.; LOHKAMP, B.; SCOTT, W.; COWTAN, K. Features and Development of Coot. **Acta Crystallographica Section D**, v. 66(4), p. 486-501, 2010.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M. Food animal-associated Salmonella challenges, pathogenicity and antimicrobial resistance. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 173–187, 2008.

FOURNIER, B.; TRUONG-BOLDUC, Q.C.; ZHANG, X.; HOOPER, D.C. A mutation in the 5' untranslated region increases stability of NorA mRNA, encoding a multidrug resistance transporter of *Staphylococcus aureus*. **Journal Bacteriol**, v.183, p. 2367-71, 2001.

FOURNIER, DIT.C.J.; MARQUEZ, B.; NEVILLE L.; JOUCLA, L.; BROUSSOUS,S.; BOUHOURS, P.; DAVID, E.; PELLET-ROSTAIN, S.; MARQUET, B.; MOREAU, N.; LEMAIRE, M. Synthesis and evaluation of new arylbenzo[b]thiophene and diarylthiophene derivatives as inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, p. 4482-4497, 2007. Disponivel: <http://libgen.org/scimag/>.

FOYE, W.O.; ALMASSIAN, B.; EISENBERG, M.S.; MAHER, T.J. Synthesis and biological activity of guanyldrazones of 2-pyridine and 4-pyridine and 4-quinoline carboxaldehydes. **J. Pharm. Sci**, v.79, p.527–530, 1990.

GADAD, A.K.; MAHAJANSHETTI, C.S.; NIMBALKAR, S.; RAICHURKAR, A. Synthesis and antibacterial activity of some 5-guanyldrazone/thiocyanato-6-arylimidazo[2,1-b]-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide derivatives. **Eur. J. Med. Chemistry**, v. 35, p. 853–857, 2000.

GERMAN, N.; KAATZ, G.W.; KERNS, R.J. Synthesis and evaluation of PSSRI-based inhibitors of *Staphylococcus aureus* multidrug efflux pumps. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.18, p.1368–1373, 2008.

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

GIBBONS, S.; OLUWATUYI, M.; KAATZ, G.W. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemotherapy*, v.51, p. 13-17, 2003a.

GIBBONS, S.; OLUWATUYI, M.; VEITCH, N.C.; GRAY, A.I. Bacterial resistance modifying agents from *Lycopus europaeus*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 83–87, 2003b.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**, v. 21, p.263-277, 2004a.

GIBBONS, S.; MOSER, E.; KAATZ, G. W. Catechin gallates inhibit multidrug resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus*. **Planta Letter**, v. 70, p.1-3, 2004b.

GIBBONS, S. Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. **Phytochemistry Reviews**, v. 04, p. 63–78, 2005.

GOODMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. **The pharmacological basis of therapeutics**. 11 th ed. McGraw- Hill, 2000.

GOSSNITZER, E.; FEILER, G.; WAGNER, U.; Synthesis structure investigations, and antimicrobial activity of selected S-trans-6-aryl-4-isopropyl-2-[( E )-1-phenylalkylidene]-( E ) – hydrazine]- 1,4-dihydropyrimidine hydrochlorides. **Eur. J. Pharm. Sci.** v.15, p.49-61, 2002.

GRKOVIC, S.; BROWN, M.H.; SKURRAY, R.A. Regulation of bacterial drug export systems. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**, v.66, p.671-701, 2002.

GUEx, N.; PEITSCH, M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v.18, p. 2714-2723, 1997.

HAFELINGER, G.; KUSKE, F.K.H. General and Theoretical Aspects of Amidines and Related Compounds. In: *The Chemistry of Amidines and Imidates*. **Springer**, v. 2. p. 1-100, 1991.

HANNON, C. L.; ANSLYN, E. V. The Guanidinium Group: Its Biological Role and Synthetic Analogs. In: **Bioorganic Chemistry Frontiers**, v. 3. p.193-255, 1993.

HIRAMATSU, K.; KATAYAMA, Y; YUZAMA, H; ITO, I. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Med. Microbiol**, Stuttgart. v.292, p. 67-74 (8), 2002.

HOFFMAN, B. B. Catecolaminas, fármacos simpático miméticos e antagonistas dos receptores adrenérgicos. In: GILMAN, A.G; HARDMAN, J.G; LIMBIRD, L.E. Goodman & Gilman: *As bases farmacológicas da terapêutica*. **10 th ed**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; Pág. 163-203. 2003.

HUET A.A.; RAYGADA, J.L.; MENDIRATTA ,K.; SEO, S.M.; KAATZ, G.W. Multidrug efflux pump overexpression in *Staphylococcus aureus* after single and multiple in vitro exposures to biocides and dyes. **Microbiology**, v.154, p.3144–3153, 2008.

JIANG, D.; ZHAO, Y.; WANG, X.; FAN, J.; HENG, J.; LIU, X.; FENG, W.; KANG, X.; HUANG, B.; LIU, J.; ZHANG, X.C. Structure of the YajR transporter suggests a transport mechanism based on the conserved motif A. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.110(36), p. 14664-9, 2013.

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.

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

KAATZ, G.W.; SEO, S.M. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.41, p. 2733-2737, 1997

KAATZ, G.W.; MOUDGAL, V.V.; SEO, S.M.; HANSEN, J.B.; KRISTIANSEN, J.E. Phenylpiperidine selective serotonin reuptake inhibitors interfere with multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. **Int J. Antimicrob Agents**, v.22, p.254-261, 2003a.

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 Chemotherapy**, v.47, p. 719–726, 2003b

KÖHLER, T.; PECHÈRE, J. C.; PLÉSIAT, P. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, p. 771-778, 1999.

KOURTESI, C.; BALL, A. R.; HUANG, Y.Y.; JACHAK, S.M.; VERA, D.M.A.; KHONDKAR, P.; GIBBONS, S.; HAMBLIN, M.R.; TEGOS, G.P. Microbial Efflux Systems and Inhibitors: Approaches to Drug Discovery and the Challenge of Clinical Implementation . **The Open Microbiology Journal**, v.7 (Suppl 1-M3) , p.34-52, 2013.

KUMAR, A.; SCHWEIZER, H.P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. **Adv. Drug Deliv. Review** ,v. 57, p. 1486-1513, 2005.

KUMAR, A.; KHAN. I.A.; KOUL, S.; KOUL, J.L.; TANEJA, S.C.; ALI, I.; ALI, F.; SHARMA, S.; MIRZA, Z.M.; KUMAR, M.; SANGWAN, P.L.; GUPTA, P.; THOTA, N.; QAZI, G.N. Novel structural analogues of piperine as inhibitors of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **J. Antimicrob. Chemotherapy**, v.61, p.1270-1276, 2008.

LARSEN, S. D.; CONNELL, A.M.; CUDAHY, M.M.; EVANS, B.R.; MAY, P.D.; MEGLOSSON, M.D.; O'SULLIVAN, T.J.; SCHOSTAREZ, H.J.; SIH, J.C.; STEVENS, F.C.; TANIS, S.P.; TEGLEY, C.M.; TUCKER, J.A.; VAILLANCOURT, V.A.; VIDMAR, T.J.; WATT, W.; YU, J.H. Synthesis and Biological Activity of Analogues of the Antidiabetic/Antiobesity Agent 3-Guanidinopropionic Acid: Discovery of a Novel Aminoguanidinoacetic Acid Antidiabetic Agent. **J. Med. Chem**, v.44, p.1217–1230, 2001.

LAWRENCE, L. E.; BARRETT J. F. Efflux pumps in bacteria: overview, clinical relevance, and potential pharmaceutical target. **Expert Opin Investig Drugs**, v.7, p.199-217, 1998.

LEEKHA, S.; TERRELL, C. L.; RANDALL, S.E. General principles of antimicrobial therapy. **Mayo Clin Proc**, v.86, p.156–167, 2011.

LEVY, S. B. The challenge of antibiotic resistance. **Scientific American**, v. 278, p. 46-53, 1998.

LINA. G.; QUAGLIA, A.; REVERDY, ME.; LECLERCQ, R.; VANDENESCH, F.; ETIEN-NE, J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.43, p. 1062-1066, 1999.

LINDSAY, J. A.; HOLDEN, M. T. G. Staphylococcus aureus: superbug, super genome? **Trends in Microbiology**, v. 12, p. 378-385, 2004.

LIU, E. WILSON. The antimicrobial activity of CCL28 is dependent on C-terminal positively charged amino acids, **Eur. J. Immunol**, v.40, p.186–196, 2010.

LIXZ NIKAIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. **Drugs**, v.64, p. 159–204, 2004.

LOMOVSKAYA, O.; WARREN, M. S.; LEE, A.; GALAZZO, J.; FRONKO, R.; LEE, M.; BLAIS, J.; CHO, D.; CHAMBERLAND, S.; RENAU, T.; LEGER, R.; HECKER, S.; WATKINS, W.; HOSHINO, K.; ISHIDA, H.; LEE, V. J. Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in Pseudomonas aeruginosa: Novel Agents for Combination Therapy. **Antimicrob. Agents. Chemotherapy**. v.45, p.105-116, 2001.

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

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. **J. of Clinical Investigation**, v. 111 (9), p. 1256-1273, 2003.

LYNCH, A.S. Efflux systems in bacterial pathogens: An opportunity for therapeutic intervention? An industry view. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p.949-956, 2006.

MACHADO SEQUEIRA, C. M. Resistência aos antibióticos: O uso inadequado dos antibióticos na prática clínica. **Org. Farm. Ibero-Latino Americano**, v.14, p.45-68, 2004.

MAHBOUBI, M.; BIDGOLI, F. G. Anti-staphylococcal activity of Zataria multiflora essential oil and its synergy with vancomycin. **Phytomedicine**, v. 11, p. 04-06, 2009.

MAIA, G.L.A.; FALCÃO-SILVA, V.S.; AQUINO, P.G.V.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; TAVARES, J. F.; SILVA, M.S.; RODRIGUES, L.C.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; BARBOSA-FILHO, J.M. Flavonoids from Praxelis clematidea R.M. King and Robinson Modulate Bacterial Drug Resistance. **Molecules**, v.16, p.4828-4835, 2011.

MALLEA, M.; MAHAMOUD, A.; CHEVALIER, J.; ALIBERT-FRANCO, S.; BROUANT, P.; BARBE, J.; PÀGES, J.M. Alkylaminoquinolines inhibit the bacterial antibiotic efflux pump in multidrug-resistant clinical isolates. **Biochemistry Journal**, v. 376, p. 801-805, 2003.

MANDELL, D.J.; CHORNY, I.; GROBAN, E.S.; WONG, S.E.; LEVINE, E.; RAPP, C.S.; JACOBSON, M.P. Strengths of hydrogen bonds involving phosphorylated amino acid side chains, **J. AM. Chem.Soc.**, v.129, p.820–827, 2007.

MARKHAM, P.N. Inhibition of the emergence of ciprofloxacin resistance in Streptococcus pneumoniae by the multidrug efflux inhibitor reserpine. **Antimicrob. Agents Chemotherapy**, v. 43, p. 988-989. 1999.

MARKHAM, P.N.; WESTHAUS, E.; KLYACHKO, K.; JOHNSON, M.E.; NEYFAKH, A.A. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of Staphylococcus aureus. **Antimicrob. Agents Chemotherapy**, v.43, p.2404-2408, 1999.

MARQUEZ, B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. **Biochimie**, v.87, p.1137-1147. 2005.

MARTINS, T.L.C. Síntese de guanilhidrazonas, atividade antibiótica e estudos de interação com DNA por RMN. **Tese de doutorado**, Instituto Militar de Engenharia- Rio de Janeiro, 2004.

MARTINEZ, J.L.; SÁNCHEZ, M.B.; MARTINEZ-SOLANO, L. HERNANDEZ, A.; GARMENDIA, L.; FAJARDO, A.; ALVAREZ-ORTEGA, C. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, v.33, p. 430-449, 2009.

MATIAS, E. F. F.; SANTOS, K. K. A.; ALMEIDA T. S.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Phytochemical screening and modulation of antibiotic activity by Ocimum gratissimum L. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 09, p. 13-16, 2010.

MCMURRY L.; PETRUCCI R.E, J.R.; LEVY, S.B. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in Escherichia coli. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 77, p.3974-3977, 1980.

MÉNDEZ, C.; SALAS, J.A. The role of ABC transporter in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms. **Res. Microbiology**, v. 152, p.341–350, 2001.

MESSEDER, J.C.; TINOCO, L.W.; FIGUEROA-VILLAR, J.D.; SOUZA, E.M.; SANTA RITA, R.; DE CASTRO, S.L. Aromatic guanyl hydrazones: Synthesis, structural studies and in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.5, p. 3079–3084, 1995.

MITCHELL, B. A.; BROWN, M. H.; SKURRAY, R. A. QacA multidrug efflux pump from *Staphylococcus aureus*: comparative analysis of resistance to diamidines, biguanidines, and guanylhidrazones. **Antimicrob. Agents and Chemotherapy**, v.42, p.475–477, 1998.

MOLNAR, J.; HEVÉR A.; FAKLA I.; FISCHER, J.; OCSOVSKI, I.; ASZALÓS, A. Inhibition of the transport function of membrane proteins by some substituted phenothiazines in *E. coli* and multidrug resistant tumor cells. **Anticancer Research**, v.17, p. 481-486, 1997.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSSELL, D. S.; OLSON, A. J. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. **J. Computational Chemistry**, v.16, p. 2785-2791, 2009.

NARGOTRA, A.; SHARMA, S.; DATT, M.; KOUL, S.; SINGH, B.; QAZI, G.N. Structural characterization of NorA, multidrug resistant efflux pump, of *Staphylococcus aureus* using in silico approaches. **International Conference on Bioinformatics**, Hong Kong, 2007. Disponível: [www.apbionet.org/ocs/viewabstract.php](http://www.apbionet.org/ocs/viewabstract.php).

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. 2005.

NEYFAKH, A.A.; BORSCH C.M.; KAATZ GW. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. **Antimicrob. Agents Chemotherapy** v.37, p.128-129, 1993.

NEYFAKH, A. A. Mystery of multidrug transporters: the answer can be simple. **Mol. Microbiology**, v.44, p.1123–1130, 2002.

NISHINO, K.; NIKAIDO, E.; YAMAGUCHI, A. Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1794, p. 834-843, 2009.

OLIVEIRA C.S.; LIRA B.F.; FALCÃO-SILVA V.S.; 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.

ORNER, B. P.; HAMILTON, A. D. The Guanidinium Group in Molecular Recognition: Design and Synthetic Approaches. **Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry**, v. 41, p. 141–147, 2001. Kluwer Academic Publishers.

PASBERG-GAUHL, C. A need for new generation antibiotics against MRSA resistant bacteria. **Drug Discovery Today: Technologies Drug resistance**, v.11, p.109-116, 2014.

PEDROSA, R.C.; DEBEM, A.F.; LOCATELLI, C.; GEREMIAS, R.; WILHELM-FILHO, D. Time-dependent, oxidative stress caused by benzimidazole. **Redox Rep**, v.6(4), p. 265-270. 2001.

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

PIDDOCK, L.J.V. Multidrug-resistance efflux pump—not just for resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 629-636, 2006b.

POKKUNURI, I.; CHAMPNEY, W.S. Characteristics of a 50S ribosomal subunit precursor particle as a substrate for ermE methyltransferase activity and erythromycin binding in *Staphylococcus aureus*. **RNA Biology**, v.4, p.147–153, 2007.

POOLE, K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. **Journ. of Applied Microbiology**, Symposium Supplement, v. 92, p. 55-64, 2002.

POOLE, K.; LOMOVSKAYA, O. Can efflux inhibitors really counter resistance? **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 3, p. 145-152, 2006.

POOLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. **Annals of Medicine**, v.39, p. 162-176, 2007.

PRESCOTT, L. M.; J. HARLEY, D. KLEIN. **Microbiology**. 5 th ed., McGraw Hill, Columbus, Ohio. 2002.

PRICE, C.T.D.; KAATZ, G.W.; GUSTAFSON, J. E. The multidrug efflux pump NorA is not required for salicylate-induced reduction in drug accumulation by *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.20, p.206–213, 2002.

PUTMAN, M.; VAN VEEN, H. W.; KONINGS, W. N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. **Microbiol. Mol. Biol. Review**, v. 64, p.672-693, 2000.

RACZYNSKA, E.D.; CYRANSKI, M.K.; GUTOWSKI, M.; RAK, J.; GAL, J.F.; MARIA, P.C.; DORONSKA, M.; DUCZMAL, K. Consequences of proton transfer in guanidine. **J. Phys. Org. Chem**, v.16, p.91-106. 2003.

REMMERT, M.; BIEGERT, A.; HAUSER, A.; SODING, J. "HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment". **Nat Methods**, v.9, p.173-175, 2012.

REMONATTO, G.; CARDOSO, C. M.; MARQUES, C. G.; SILVA, A. E. B.; GELATTI, L. C.; LEITE, C. F. M. CA-MRSA: um patógeno emergente. **News Lab**, v. 80, p.92-96, 2007.

REYNOLDS, E.; ROSS, J.I.; COVE, J.H. Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: incomplete transporters? **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.22, p. 228-36, 2003.

ROSS, J. I.; FARRELL, 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. of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 24, p. 851-862, 1989.

SAIER, M. H.; PAULSEN, I. P. Phylogeny of multidrug transporters. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 12, p. 205-213, 2001.

SANGWAN, P. L.; KOUL, J. L.; KOUL, S.; REDDY, M. V.; THOTA, N.; KHAN, I. A.; KUMAR, A.; KALIA, N. P.; QAZI, G. N. Piperine analogs as potent *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors. **Bioorganic & Med. Chemistry**, v. 16, p. 9847-9857, 2008.

SANTOS-FILHO, O.A.; FIGUEROA-VILLAR, J.D.; ARAÚJO, M.T. Molecular modeling of the interaction of trypanocide guanylhydrazones with B-DNA. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.7 (13), p. 1797-1802, 1997.

SEBATINI, S., KATTZ, G. W., ROSSOLINI, G.M., BRANDINI, D., FRAVOLINI, A. From Phenothiazine to 3-Phenyl-1,4-benzothiazine Derivatives as Inhibitors of the *Staphylococcus aureus* NorA Multidrug Efflux Pump. **J. of Medical Chemistry**, v., 51, p., 4321–4330. 2008.

SILVA, L. V. S. Epidemiologia clínica e molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina carreadores de cassete cromossômico estafilocócico mec tipo IV de pacientes atendidos em Hospital Universitário de Porto Alegre. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2009.

SILVA, T.M.S.; CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonóides de *Solanum jabrense* Agra & Nee e *S. paludosum* Moric. **Química Nova**, v. 32, p. 1119-1128, 2009.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, p. 844-855, 2006.

SMETS, L.A.; BOUT, B.; WISSE, J. Cytotoxic and antitumor effects of the norepinephrine analogue meta-iodo-benzylguanidine (MIBG). **Cancer Chemother Pharmacology**, v.21, p. 9-13, 1988.

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*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, p.4480-4483, 2007a.

SMITH, E. C.J; WILLIAMSON, E.M.; WAREHAM, N.; KAATZ, G. W., GIBBONS, S. Antibacterials and modulators of bacterial resistance from the immature cones of *Chamaecyparis lawsoniana*. **Phytochemistry**, v. 68, p. 210-217, 2007b.

SOUSA, M. A.; CONCEIÇÃO, T.; SIMAS, C.; LENCASTRE, H. Comparison of Genetic Backgrounds of Methicilin-Resistant and Susceptible *Staphylococcus aureus* Isolates from Portuguese Hospitals and the Community. **J. of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5150-5157, 2005.

SPELLBERG, B.; GUIDOS, R.; GILBERT, D.; BRADLEY, J.; BOUCHER, H. W.; SCHELD, W.M.; BARTLETT, J. G.; EDWARDS, J., Jr. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Disease**, v. 46, p. 155–164, 2008.

STAVRI, M.; PIDDOCK, L.J.V.; GIBBONS, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. **J. Antimicrob Chemotherapy**, v.59, p.1247–1260, 2007.

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'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v. 97, p. 1433-1437, 2000.

STERMITZ, F.R.; SCRIVEN, L.N.; TEGOS, G.; LEWIS, K. Two flavonols from *Artemisa annuawhich* potentiate the activity of berberine and against a norfloxacinresistant strain of *Staphylococcus aureus*. **Planta Medica**, v. 68, p.1140-1141, 2002.

TANAKA, Y.; HIPOLITO, C.J.; MATURANA, A.D.; ITO, K.; KURODA, T.; HIGUCHI, T.; KATO, T.; KATO, H.E.; HATTORI, M.; KUMAZAKI, K.; TSUKAZAKI, T.; ISHITANI, R.; SUGA, H.; NUREKI, O. Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. **Nature**, 496(7444):247-51, 2013.

TANG, Y. W.; STRATTON, C. W. *Staphylococcus aureus*: An Old Pathogen with New Weapons. **Clin. Lab. Med**, v.30, p.179–208, 2010.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 33, p. 281-301, 2000.

TEGOS, G.P.; HAYNES. M.; STROUSE, J.J.; KHAN, M. M D.T.; BOLOGA, C.G.; TUDOR I. OPREA, T.I.; SKLAR, L.A. Microbial Efflux Inhibition; tactics & strategies. **Curr Pharm Des**, v.17 (13), p. 1291-1302, 2011.

THOMAS, C. M.; NIELSEN, K. M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 3, p. 711–721, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. In: *Microbiologia*. 10th ed. Porto Alegre, Ed.Artmed, 2012.

TRABULSI, LUIZ RACHID; ALTERTHUM, F.; GOMPERT, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3 th ed. São Paulo, Ed. Atheneu, 2002.

TRABULSI, LUIZ RACHID.; ALTERTHUM FLAVIO. *Staphylococcus aureus*. In: TEIXEIRA L. M; SANTOS K. R. N; BUERIS V; TRABULSI L. R. **Microbiologia**. 5 th ed. São Paulo, Ed. Atheneu, p.175-182. 2008.

TRZCINSKI, K.; COOPER, B.S.; HRYNIEWICZ, W.; DOWSON, C.G. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Antimicrob. Chemotherapy**, v.45, p.763–70, 2000.

USUKI, Y.; MATSUMOTO, K.; INOUE, T.; YOSHIOKA, K.; IIOA, H.; TANAKAB, T. Structure–activity relationship studies on niphimycin, a guanidylpolyol macrolide antibiotic. Part 1: The role of the N-methyl-N00-alkylguanidinium moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p.1553–1556, 2006.

VAN BAMBEKE, F.; PAGÈS, J.; LEE, V. J. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 1, p. 157-175. 2006.

VAN BAMBEKE, F.; PAGES, J. M.; LEE, V.J. Inhibitors of Bacterial Efflux Pumps as Adjuvants in Antibacterial Therapy and Diagnostic Tools for Detection of Resistance by Efflux. **Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery**, v. 1, p. 138-175, 2010

VIDAILLAC C.; GUILLON J.; MOREAU S.; ARPIN C; LAGARDÈRE A; LARROUTURE S; DALLEMAGNE P; CAIGNARD DH; QUENTIN C; JARRY C. Synthesis of new 4-[2 (alkylamino)ethylthio]pyrrolo[1,2-a]quinoxaline and 5-[2 (alkylamino)ethylthio]pyrrolo[1,2-a]thieno[3,2-e]pyrazine derivatives, as potential bacterial multidrug resistance pump inhibitors. **J. of Enzyme Inhibition and Med.Chemistry**, v. 22(5), p. 620–631, 2007a.

VIDAILLAC, C.; GUILLON, J.; ARPIN, C.; FORFAR-BARES, I.; BA, B.B.; GRELLET, J.; MOREAU, S.; CAIGNARD, D.H.; JARRY, C.; QUENTIN, C. Synthesis of Omeprazole Analogues and Evaluation of These as Potential Inhibitors of the Multidrug Efflux Pump NorA of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 831-838, 2007b.

WALSH C.T. Molecular mechanisms that confer drug resistance. **Nature**, v.406, p.775–81, 2000.

WALZER, P.P.; FOY, J.; RUNCK, J.; STEELE, P.; WHITE, M.; KLEIN, R.S.; OTTER, B.A.; SUNDBERG, R.J. Guanylhydrazones in therapy of pneumocystis carinii pneumonie in immunosuppressed rats. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, p.2572-2576, 1994.

WEI, R.G.; ARNAIZ, D.O.; CHOU, Y.L.; DAVEY, D.; DUNNING, L.; LEE, W.; LU, S.F.; ONFFER, J.; YE, B.; PHILLIPS, G. CCR5 receptor antagonists: Discovery and SAR study of guanylhydrazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p.231–234, 2007.

WOODS, A.S.; FERRE, S. Amazing stability of the arginine-phosphate electrostatic interaction, **J. Proteome Res**, v.4, p.1397–1402, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance: Global Report on surveillance. 2014. ([www.who.int/about/licensing/copyright\\_form/en/index.html](http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html))

YONEYAMA, H.; R. KATSUMATA. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v.70, p.1060-1075, 2006.

ZHANG, H.Z.; CROGAN-GRUNDY, C.; MAY C.; DREWE, J.; TSENG, B.; CAI, S.X. Discovery and structure-activity relationships of (2-(arylthio)benzylideneamino)guanidines as a novel series of potent apoptosis inducers. **Bioorganic & Med.chemistry**, v.17, p.2852–8, 2009.

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

## APÊNDICE A - PATENTE

**TÍTULO:** “DERIVADOS GUANILHIDRAZÔNICOS COMO POTENCIALIZADORES DA AÇÃO ANTIBIÓTICA POR AÇÃO MODULADORA DE BOMBAS DE EFLUXO”

**DIA DE DEPÓSITO: 19 DE DEZEMBRO**

**Nº DEPÓSITO: BR 102014033128-0**

### **Resumo**

A presente invenção apresenta o uso de derivados Guanilhidrazônicos como potencializadores da ação antibiótica por ação moduladora de bombas de efluxo. Todos os derivados foram capazes de potencializar a ação para o antibiótico norfloxacin, (cepa SA-1199B), provocando redução da CIM de até 16 vezes, ate 4 vezes para eritromicina na cepa RN-4220 e duas vezes para tetraciclina na cepa IS-58. Estes resultados demonstram pela primeira vez o potencial que esses compostos têm em ser putativos inibidores dos sistemas de efluxo bacterianos, sendo esses portanto, uma possível fonte de adjuvantes de antibióticos.

### **Inventores**

1. José Pinto de Siqueira Júnior (**E-mail: [jpsiq@pq.cnpq.br](mailto:jpsiq@pq.cnpq.br)**)
2. Natalina Dantas (**E-mail: [dantasnat@hotmail.com](mailto:dantasnat@hotmail.com)**)
3. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Jr. (**E-mail: [franciscojaime@ccbsa.UFPB.edu.br](mailto:franciscojaime@ccbsa.UFPB.edu.br)**)
4. Thiago Mendonça de Aquino (**E-mail: [thiago.aquino@iqb.ufal.br](mailto:thiago.aquino@iqb.ufal.br)**)
5. João Xavier de Araújo Júnior (**E-mail: [jotaaraujo2004@gmail.com](mailto:jotaaraujo2004@gmail.com)**)
6. Maria Lysete de Assis Bastos (**E-mail: [lysetebastos@gmail.com](mailto:lysetebastos@gmail.com)**)
7. Regina Célia Sales Santos (**E-mail: [salesregina@hotmail.com](mailto:salesregina@hotmail.com)**)
8. Thaís Honório Lins Bernardo (**E-mail: [honoriothais@gmail.com](mailto:honoriothais@gmail.com)**)
9. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro (**E-mail: [euricanogueira@gmail.com](mailto:euricanogueira@gmail.com)**)
10. Edeildo Ferreira da Silva Júnior (**E-mail: [edeildojr@hotmail.com](mailto:edeildojr@hotmail.com)**)

11. Paulo Henrique Barcellos França (E-mail: [pauloh.barcellos@gmail.com](mailto:pauloh.barcellos@gmail.com))
12. Magna Suzana Alexandre Moreira (E-mail: [suzana.magna@gmail.com](mailto:suzana.magna@gmail.com))
13. Mariana da Silva Santos (E-mail: [nananiquel@yahoo.com.br](mailto:nananiquel@yahoo.com.br))

**Evaluation of Guanylhydrazones as inhibitors of the NorA efflux pump in  
*Staphylococcus aureus***

Natalina Dantas<sup>1</sup>; Thiago Mendonça de Aquino<sup>2</sup>; João Xavier Araújo Júnior<sup>2</sup>; Antoniel Augustos Severo Gomes<sup>3</sup>; # Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior<sup>4</sup>; José Pinto Siqueira-Júnior.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratório de genética de microorganismo, Departamento de Biologia Celular e Molecular/CCEN/ Universidade Federal da Paraíba-UFPB, 58051-970, João Pessoa-PB, Brazil;*

<sup>2</sup> *Laboratório de Química Medicinal, Escola de Enfermagem e Farmácia, Universidade Federal de Alagoas/UFAL, 57072-970, Macéio/AL, Brazil<sup>2</sup>;*

<sup>3</sup> *Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, 18618-000, Botucatu-SP, Brazil;*

<sup>4</sup> *Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos, Departamento de Ciências Biológicas/CCBSA, Universidade Estadual da Paraíba-UEPB, 58070-450, João Pessoa/PB, Brazil.*

**# Author for correspondence:** Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior

Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas, Sociais e Aplicada/ CCBSA, Departamento de Ciências Biológicas, Campus V, 58070-450, João Pessoa/PB, Brazil

E-mail: [franciscojbmendonca@yahoo.com.br](mailto:franciscojbmendonca@yahoo.com.br).

Telephone number: +55 83 3223-1128

Fax number: +55 83 3223-1128

## Abstract

**Objectives:** The goal of this study was to evaluate new guanylhydrazone derivatives as NorA efflux pump inhibitors, using *Staphylococcus aureus* SA-1199B, in docking molecular studies.

**Methods:** The minimum inhibitory concentrations (MICs) of the antibiotic, and ethidium bromide were determined by microdilution assay in both the absence and presence of sub-inhibitory concentrations of various guanylhydrazones. The bio-informatic software Swiss-Model and Autodock 4.2 were respectively used to perform the modeling and docking studies. **Results:** All

of the guanylhydrazone derivatives tested were able to potentiate the antibiotic action of norfloxacin, and cause 16-fold and 32-fold MIC reductions for ethidium bromide. The molecular docking studies showed that both norfloxacin and compound **13** are recognized by the same binding site on the NorA pump, suggesting a competitive mechanism. **Conclusions:** The present work demonstrated for the first time that guanylhydrazone compounds show the potential to be NorA efflux pump inhibitors, as shown by both molecular docking and *in vitro* studies, and thus a potential tool for antibacterial drug development.

**Keywords:** Bacterial resistance, efflux pump inhibitor, Guanylhydrazones, Guanidine.

## 1. Introduction

The emergence of drug resistance in different species of bacteria is a growing cause of concern <sup>1</sup>. These bacteria include strains of *Staphylococcus aureus* that are resistant to vancomycin <sup>2</sup>, and also to the recently discovered linezolid <sup>3</sup>, which is often considered “the last line of defense” against multidrug resistance (MDR) *S. aureus* strains.

Among the MDR efflux pumps present in this species, NorA, which belongs to the Major Facilitator Superfamily (MFS) is considered representative, and the most efficient of the MDR systems in Gram-positive bacteria. In particular, the NorA protein confers resistance to a wide range of structurally unrelated antibiotics and antiseptics such as acridines, ethidium bromide, pentamidine, or more importantly, the hydrophilic fluoroquinolones, an important class of broad-spectrum antimicrobials with potent activity <sup>4, 5, 6</sup>.

The structural biology data of NorA are still undetermined. However, through sequence homology studies and the sharing of various substrates with other MDR pumps, the hypothesis that NorA may have a large hydrophobic binding site <sup>7</sup> has gained acceptance. This peculiarity could explain MDR pumps' broad specificity for substrates.

Even though new methods of treatment have been developed, or are about to be made available, the restoration of clinical antibacterial efficacy (against which resistance has developed), remains an important goal. One of the promising fields for improving the effectiveness of antimicrobial agents is combining them with efflux pump inhibitors (EPIs). This expands the usefulness of existing antibiotics, and reduces the emergence of resistant mutant strains <sup>8</sup>.

Efforts are underway to generate new antibacterial agents capable of circumventing drug efflux by synthesizing compounds that are poor pump substrates, or to identify compounds that reduce or block efflux pump activity <sup>9</sup>.

Among these compounds, as a class, the guanyldrazones may well become a source for new candidates to develop alternatives to antibiotics, and to combat bacterial resistance. Guanyldrazones represent a class of compounds containing an amidine group (guanyl), connected to a hydrazone moiety <sup>10</sup>. Along with the biological potency of these molecules come; antihypertensive <sup>11, 12</sup>, antidiabetic <sup>13</sup>, antineoplastic <sup>14, 15</sup>, antitubercular <sup>16</sup>, antimalarial, anti-Leishmania, antifungal, antibacterial, and anti-HIV activities <sup>17, 18, 19</sup>.

The goal of this research was to evaluate a new array of guanyldrazones as NorA efflux pump inhibitors in *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin (MRSA), and to conduct molecular docking studies.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemistry

The guanyldrazone derivatives (**1-19**) involved in this study were previously synthesized by reaction of the appropriate aldehyde with aminoguanidine hydrochloride in refluxing 95% ethanol. The guanyldrazones were isolated after cooling to room temperature, being washed, or recrystallized using an appropriate solvent. Structural characterization of the products is described elsewhere<sup>20,21</sup>.

The stock solutions of the compounds were prepared in DMSO solutions where, at its highest final concentration after dilution in broth (4%), no bacterial growth inhibition occurred<sup>22</sup>. LogP was calculated in the HyperChem™ software Release 8.0.8 Windows.

### 2.2. Biological assays

#### 2.2.1. Bacterial strains

The *S. aureus* strain used, SA-1199B, over expresses the NorA gene encoding the NorA efflux protein, which extrudes hydrophilic fluoroquinolones and other drugs such as DNA-intercalating dyes. The strain, kindly provided by Professor Simon Gibbons (University of London), was maintained on blood agar base slants (Laboratory Difco Ltda., Brazil). Prior to use, the cells were grown overnight at 37 °C in brain heart infusion broth (BHI–Laboratory Difco Ltda., Brazil).

#### 2.2.2 Antibiotics and nucleic-acid binding (NAB) compounds

All antibiotics were prepared according to NCCLS guidelines<sup>23</sup>. The stock solution of ethidium bromide was prepared in distilled water. All compounds were obtained from Sigma-Aldrich.

#### 2.2.3. Susceptibility tests

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of the antibiotics, ethidium bromide, and guanyldrazone derivatives were determined by microdilution assay using a suspension of ca. 10<sup>5</sup> cfu/mL and drug concentrations in the range of 256 – 0,25 µg/mL (two-fold serial dilutions). MIC is defined as the lowest concentration at which no growth is observed. Guanyldrazone compounds were evaluated as NorA efflux pump inhibitors based on their effects on MICs of the antibiotic and ethidium bromide, in the presence and absence of guanyldrazones at subinhibitory concentrations and corresponding to ¼ of their own MICs<sup>24</sup>.

All experiments were carried out at least twice with consistent results.

## 2.3. Molecular Studies

### 2.3.1. NorA Modeling

In order to find the structural determinants of the norfloxacin site, we used the *S. aureus* NorA pump primary sequence, taken from the Reference Sequence NP\_373905.1 to produce its hypothetical three-dimensional structure on SWISS-MODEL software<sup>25</sup>. Monomer A, of the crystal structure of the *E. coli* (PDB 3WDO) YajR transporter<sup>26</sup>, was selected as the template for molecular docking, according to the HMM-HMM-based lightning-fast iterative sequence search (HHBlits) tool (QMEAN4: -11; GMQE: 0.51; seq. identity: 16.03; seq. similarity: 0.29; coverage: 0.95). The NorA model was constructed by the program ProMod v.3.7<sup>27</sup>.

To perform the molecular docking; compound **13** (having better antibiotic modifying activity in the SA-1199B strain), was chosen for use as a binder, in order to find the degree of affinity of the compound towards the receptor NorA efflux pump.

### 2.3.2. Molecular Docking

In order to find structural insights, best modifying activity antibiotic in SA-1199B strains compound **13** and norfloxacin were used to perform Molecular Dockings on NorA efflux pump using Autodock 4.2<sup>28</sup>. Receptor preparation was carried out using model generated by SWISS-MODEL software where was add hydrogen atoms and Gasteiger charge to entire molecule. Autogrid was carried out for the preparation of the grid map, where a grid box was 40-40-40 Å npts, spacing was 0.603Å and grid center was -29.984, 55.831 e 73.869 to x, y and z-axis. Ligand preparation was set out with flexible bonds at maximum to both compounds. Further, Autodock (protein-rigid and ligand-flexible) were performed using Genetic Algorithm (GA) in standard configuration, with number of GA runs and maximum number of individuals survive at 20 and 2, respectively. Best pose of each docking calculation was selected and analyzed using PyMol.

### 3.. Results

#### 3.1 Antibiotic susceptibility test

The guanylhydrazones derivatives **1-19** did not display relevant antibacterial activity for most of the compounds at the tested concentrations, showing MICs ranging from 16 to >256 µg/ml. Only compounds **10**, **14** and **17** (MIC = 16, 16, 32 mg/L, respectively) showed greater bacteriostatic effect than the standard antibiotic norfloxacin. Concerning modulatory activity, (compounds **1-19** were added to the growth medium at sub-inhibitory concentrations), we observed that the corresponding MIC was reduced by at least two-fold, (and up to 16-fold and 32-fold for norfloxacin and ethidium bromide, respectively) (**Table 1**). As shown below, only compound **11** presented no modifying activity.

**Please insert here table 1.**

**Table 1.** Chemical structures and LogP of guanylhydrazones and Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of antibiotics, and ethidium bromide (BrEt) against *S. aureus* strain SA-1199B, in the presence and absence of guanylhydrazones derivatives.

#### 2 Modeling Studies

The NorA efflux pump model presented a conformation quite similar to the original YjaR structure, preserving the secondary structure but varying for amino acid constitutions, and positions. Excluding the conserved transmembrane domain present in both, the NorA model presented higher ionic amino acid residue in the periplasmatic domain, and no intracellular C-terminal domain (**Figure 1**).

**Please insert here figure 1.**

**Figure 1.** Three-dimensional presentation of the crystal structure 3WDO (purple) superimposed the generated model NorA (green). Representation of the secondary structure (a); the electrostatic surface 3WDO (b, c); the electrostatic surface the generated model NorA (d, e) cationic residues (blue), anionic (red), and hydrophobic (white).

#### 3.3 Molecular Docking Studies

In molecular docking studies both norfloxacin and compound **13** were localized in the same site: center position in the N-lobe (**Figure 2a**). Norfloxacin docking presented a binding energy of -6.99 kcal/mol with hydrophobic interactions of quinolone, and piperazine on the side chains of the residues I15, P16, I19, M109 and I136, and polar interactions on Q51 (3.07 Å), M107 (3.32 Å), R310 (2.88, 3.19 and 3.30 Å), and on the N340 (2.86 and 3.28 Å) residue of the NorA pump (**Figure 2b**).

On the other hand, the best docking pose, compound **13** presented a binding energy of -6.62 kcal/mol, and was stabilized by hydrophobic interactions between the quinoline moiety and residue side chains I12, I15, P16, I19 and M109. For polar contacts, we observed interactions with residues I15 (3.10 and 3.20 Å), G101 (2.85 Å), and M107 (2.72 Å). It is important to note that there was a proximity of the side chain of residue Q51 (3, 74 Å) with the guanidine portion of compound **13** (**Figure 2c**). Although the binding energy of the NorA/norfloxacin complex was somewhat better, the inhibition constant of compound **13** was 1.87 times stronger than norfloxacin.

**Please insert here figure 2a, 2b and 2c.**

**Figure 2.** Presentation of NorA /norfloxacin and NorA/**13** dockings. (a) Ribbon representation of both poses shows competition for the same site (**a**) and the characterization of both norfloxacin (**b**), and compound **13** (**c**) sites. Polar contacts presented in purple dotted dashes. Image generated by PyMol.

#### 4. Discussion

Using *in vitro* assays when searching for new antibacterial agents (that have the ability not only to inhibit bacterial growth but also to modify drug resistance in strains with efflux pumps<sup>29</sup>, has become a new alternative in combating bacterial resistance.

The antibacterial results for the SA-1199B strain, obtained by compounds **10** and **14** can be explained by increased lipophilicity, due to lipophilic substitutions such as di-*tert*-butyl for compound **10** and phenyl for compound **14**. Accordingly, both presented higher respective LogP values: 2.37 and 1.37. Although compound **17** presented a lower value; the di-chloride-substitution (3, 4-di-chloro) favored its activity. The size of the side chains, as well as substitutions on the guanidine nucleus both seem to play key roles in antibacterial activity<sup>30</sup>, probably acting as membrane lipid affinity modulators<sup>29</sup>.

Unlike their antibacterial activity, the guanylhydrazone compounds showed a potent efflux pump inhibitory activity. Compounds **3**, **13**, and **17** provided the best MIC's, (reducing norfloxacin's MIC by 16-fold), (table 1). This potent activity can be explained by the presence of electron withdrawing groups such as nitrile, quinoline, and chlorine. These groups have already been noted in the literature as playing a key role in other structures with potent NorA inhibitory activity<sup>31, 32, 33</sup>. It is likely that the guanidine moiety of the compounds also plays a vital role in their antibiotic adjuvant activity. The guanidine terminal of the guanylhydrazones may be an important feature of the antimicrobial properties expressed by these compounds<sup>34, 35</sup>. In accordance with this, the molecular dockings demonstrated that the guanidine group of compound **13** projects to the N-Lobe of NorA; allowing a hydrogen bond with the main chain oxygen of residue G101 (Figure 2c). This is an important factor for inhibitory activity.

Less active guanyldrazone contributing group substitutions were identified as carboxylic acid (compound **11**), di-*tert*-butyl (compound **10**), hydroxyl and methoxyl (compounds **4**, **5**, **6** and **7**) which promoted no (or low) MIC reductions for norfloxacin (2-fold) (table 1). These substitutions may also present unfavorable interactions due the hydrophobicity of NorA's site formed by lateral chains I15, P16, M109, and I136 (Figure 2b and 2c).

The NorA efflux protein is documented as a specific substrate for ethidium bromide (DNA-intercalating dye) and is also the only known resistance mechanism against it<sup>36, 37</sup>. Therefore, we tested ethidium bromide against the SA-1199B strain to demonstrate that the evaluated guanyldrazone derivatives modulate norfloxacin resistance by means of NorA inhibition. On the other hand, perfloxacin, a hydrophobic quinolone, is a poor substrate of the NorA efflux pump so it was used as a negative control<sup>38, 39</sup>. Thus, the reductions in MIC for ethidium bromide (and not for perfloxacin) (Table 1) reinforce the idea that guanyldrazones are putative inhibitors of the NorA efflux system.

In accordance with our molecular docking studies, both the substrate norfloxacin and compound **13** recognize the same binding site of the protein NorA, thus implying inhibition, by a competitive mechanism. Previous docking studies of NorA and reserpine show a similar site to that observed in present study; sharing P16, Q51 and R310 residues of the NorA pump<sup>40</sup>, and the NorA/norfloxacin complex (presented here), was quite similar to the crystallographic structure of the MATE multidrug efflux pump<sup>41</sup>.

Once guanyldrazones bind to NorA's active site, they prevent antibiotic extrusion, increasing its concentration inside the cell, and consequently its deleterious effects. This was observed 16-fold for norfloxacin and 32-fold for ethidium bromide in the *in vitro* assays (Table 1). It has been detected with other efflux pump inhibitors that act by competitive mechanism. Such has been proposed; that dipeptide amide (PA $\beta$ N) is itself an RND superfamily competitive substrate. It seems that PA $\beta$ N may recognize and bind to the substrate pocket specific to the potentiated antibiotics. Alternatively, due to a proximal binding site, the EPI may also generate steric hindrance, impairing the antibiotic binding at its affinity site. PA $\beta$ N has been validated against the AcrAB-TolC in a variety of Gram-negative pathogens (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. typhimurium*, and *E. aerogenes*)<sup>42</sup>.

These results demonstrate for the first time that these compounds have the potential to be putative inhibitors of the NorA efflux pump. The molecular docking studies provided support for the *in vitro* data presented here, being a good tool to elucidate the interactions between guanyldrazone compounds and the NorA protein.

## 5. Conclusion

The guanylhydrazone derivatives showed no effective antibacterial activity, except for the compounds **10**, **14** and **17** (with norfloxacin activity being better). For bacterial resistance modification, evaluated in the SA-1199B strain, all of the guanylhydrazone derivatives except compound **11** inhibited the NorA efflux pump; making the antibiotic norfloxacin once again effective to combat *Staphylococcus aureus*. The molecular modeling involving NorA inhibition showed that guanylhydrazone inhibitors all act on the same norfloxacin binding site; and that the guanidine molecular groupings affect NorA pump inhibition. The results are important towards developing focused adjuvants for antibiotic drug therapies against bacterial multidrug resistance.

## 6. Acknowledgements

We acknowledge all the authors for their dedication and contribution to the development of this research, and the financial support provided by CNPq, and the Cell and Molecular Biology/UFPB post-graduate program.

## 7. Reference

1. Spellberg B, Guidos R, Gilbert D *et al.* The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008; **46**:155–164.
2. Finks J, Wells E, Dyke TL *et al.* Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, Michigan, USA, 2007. *Emerg Infect Dis* 2009; **15**:943–945.
3. Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G *et al.* Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2001; **358**:207–208.
4. Kaatz GW, Seo SM. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**:2650–2655
5. Smith E, Williamson E, Wareham N *et al.* Antibacterial and modulators of bacterial resistance from the immature cones of *Chamaecyparis lawsoniana*. *Phytochemistry* 2007; **68**:210-217.
6. Neyfakh AA, Borsch CM, Kaatz GW. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**:128–129.
7. Neyfakh AA. Mystery of multidrug transporters: the answer can be simple. *Mol. Microbiol* 2002; **44**:1123–1130.
8. Lynch AS. Efflux systems in bacterial pathogens: an opportunity for therapeutic intervention? An industry view. *Biochem Pharmacol* 2006; **71**: 949-956.
9. Totha N, Reddy MV, Kumar A *et al.* Substituted dihydronaphthalenes as efflux pump inhibitors of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Med Chem* 2010; **45**:3607-3616.
10. Mitchell BA, Brown MH, Skurray RA. QacA multidrug efflux pump from *Staphylococcus aureus*: comparative analysis of resistance to diamidines, biguanidines, and guanylhydrazones. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**:475–477.
11. Foye WO, Almassian B, Eisenberg MS *et al.* Synthesis and biological activity of guanylhydrazones of 2-pyridine and 4-pyridine and 4-quinoline carboxaldehydes. *J. Pharm Sci* 1990; **79**:527–530.
12. Hoffman BB. Catecolaminas, fármacos simpático miméticos e antagonistas dos receptores adrenérgicos, 2003; p 163-203. In: Gilman AG, Hardman JG,

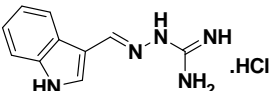
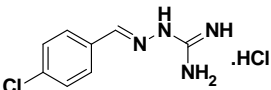
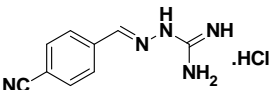
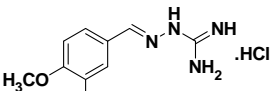
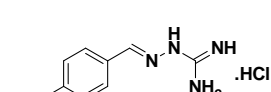
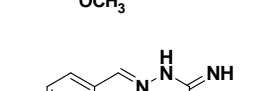
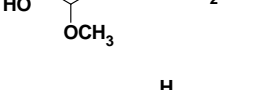
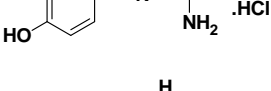
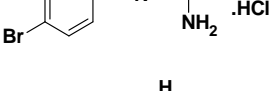
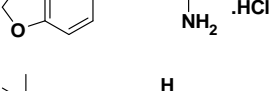
Limbird LE. Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 10ed, Rio de Janeiro, RJ.

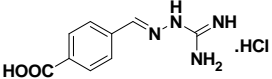
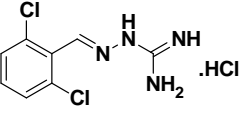
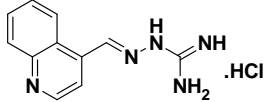
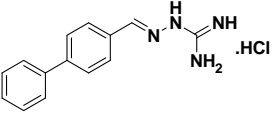
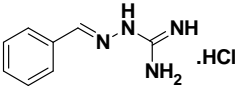
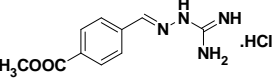
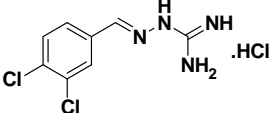
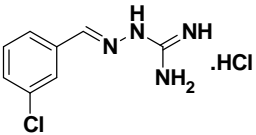
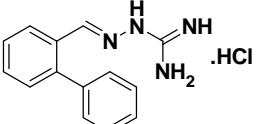
13. Larsen SD, Connell AM, Cudahy MM *et al.* 2001. Synthesis and Biological Activity of Analogues of the Antidiabetic /Antiobesity Agent 3-Guanidinopropionic Acid: Discovery of a Novel Aminoguanidino acetic Acid Antidiabetic Agent. *J. Med Chem* 2001; **44**:1217–1230.
14. Andreani A, Leoni A, Locatelli A *et al.* Potential antitumor agents. Part 29: Synthesis and potential coanthracyclinic activity of imidazo [2, 1-b] thiazole guanylhydrazones. *Bioorgan Med Chem* 2000; **8**:2359–2366.
15. Brzozowski Z, Saczewski F, Slawinski J. Synthesis of novel 3-amino-2-(4-chloro-2-mercaptobenzenesulfonyl)-guanidine derivatives as potential antitumor agents. *Eur. J. Med Chem* 2007; **42**:1218-1225.
16. Bairwa R, Kakwani M, Tawari NR *et al.* Novel molecular hybrids of cinnamic acids and guanylhydrazones as potential antitubercular agentes. *Bioorg Med Chem Lett* 2010; **20**:1623–1625.
17. Borges MN, Figueroa-villar JD. 2001. NMR interaction studies of aromatic guanylhydrazones with micelles: model for mechanism of action of cationic antibiotics. *Biopolymers* 2001; **62**: 9–14.
18. Oliveira CS, Lira BF, Falcão-Silva VS *et al.* Synthesis, Molecular Properties Prediction, and Anti-*staphylococcal* Activity of N-Acylhydrazones and New 1, 3, 4-Oxadiazole Derivatives. *Molecules* 2012; **17**: 5095-5107.
19. Ahmed N, Brahmabhatt KG, Khan SI *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of Tricyclic Guanidine Analogues of Batzelladine K for Antimalarial, Antileishmanial, Antibacterial, Antifungal, and Anti-HIV Activities. *Chem Biol Drug Des* 2013; **81**:491–498.
20. Messeder JC, Tinoco LW, Figueroa-Villar JD. Aromatic Guanylhydrazones: Synthesis, Structural Studies and *in vitro* Activity Against *Trypanossoma cruzi*. *Bioorg Med Chem Lett* 1995; **24**:3079-3084.
21. Ringa JR, Zhenga F, Haubner AJ *et al.* Improving the inhibitory activity of arylidenaminoguanidine compounds at the N-methyl-D-aspartate receptor complex from a recursive computational-experimental structure–activity relationship study. *Bioorgan Med Chem* 2013; **21**:1764-1774

22. Falcão-Silva VS, Silva DA, Souza MSV *et al.* Modulation of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus* by a Kaempferol Glycoside from *Herissantia tiubae* (Malvaceae). *Phytother Res* 2009; **23**:1367–1370.
23. NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2005.
24. Stavri M, Piddock LJV, Gibbons S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J. Antimicrob Chemother* 2007; **59**:1247–1260.
25. Biasini M, Bienert B, Waterhouse A *et al.* SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* 2014; **42** (W1): W252-W258.
26. Jiang D, Zhao Y, Wang X *et al.* Structure of the YajR transporter suggests a transport mechanism based on the conserved motif A. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**(36):14664-9.
27. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997; **18**:2714-2723.
28. Morris GM, Huey R, Lindstrom W *et al.* Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput Chem* 2009; **16**:2785-91.
29. Appendino G, Gibbons S, Giana A *et al.* Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure activity study. *J. Nat Prod* 2008; **71**:1427-1430.
30. Coqueiro A, Regasini LO, Stapleton P *et al.* In Vitro Antibacterial Activity of Prenylated Guanidine Alkaloids from *Pterogyne nitens* and Synthetic Analogues. *J. Nat Prod* 2014; **77**:1972–1975.
31. Sangwan PL, Koul JL, Koul S *et al.* Piperine analogs as potent *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors. *Bioorgan Med Chem* 2008; **16**:9847–9857.
32. Vidailac C, Guillon J, Arpin C *et al.* Synthesis of Omeprazole Analogues and Evaluation of These as Potential Inhibitors of the Multidrug Efflux Pump NorA of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**:831-838.

33. Brincat JP, Carosati E, Sabatini S *et al.* Discovery of Novel Inhibitors of the NorA Multidrug Transporter of *Staphylococcus aureus*. *J. Med Chem* 2011; **54**:354-365.
34. Santos-filho AO, Figueroa-Villar JD, ARAÚJO MT. Molecular modeling of the interaction of trypanocide guanylhydrazones with B-DNA. *Bioorg Med Chem Lett* 1997; **7**(13):1797-1802.
35. Liu B, Wilson E. The antimicrobial activity of CCL28 is dependent on C-terminal positively charged amino acids. *Eur J. Immunol* 2010; **40**:186–196.
36. Guz NR, Stermitz FR, Johnson JB *et al.* Flavono lignan and flavone inhibitors of a *Staphylococcus aureus* multidrug resistance pump: Structure-activity relationships. *J. Med Chem* 2001; **44**: 261-268.
37. Tegos GP, Haynes M, Strouse JJ *et al.* Microbial Efflux Inhibition; tactics & strategies. *Curr Pharm Des* 2011; **17**: 1291-1302.
38. Stermitz FR, Scriven LN, Tegos G *et al.* Two flavonols from *Artemisa annua*, which potentiate the activity of berberine and against a norfloxacin resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Planta Med* 2002; **68**(12):1140-1141.
39. Marquez B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie* 2005; **87**:1137-1147.
40. Kalia NP, Mahajan P, Mehra-Nargotra A *et al.* Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 2401–2408.
41. Tanaka Y, Hipolito CJ, Maturana AD *et al.* Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. *Nature* 2013; **496**(7444):247-51.
42. Kourtesi C, Ball AR, Huang YY *et al.* Microbial Efflux Systems and Inhibitors: Approaches to Drug Discovery and the Challenge of Clinical Implementation. *The Open Microbiol J* 2013; **7**(Suppl 1-M3) :34-52.

**Table 1.** Chemical structures and LogP of guanylhydrazones and Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of antibiotics, and ethidium bromide (BrEt) against *S. aureus* strain SA-1199B, in the presence and absence of guanylhydrazones derivatives.

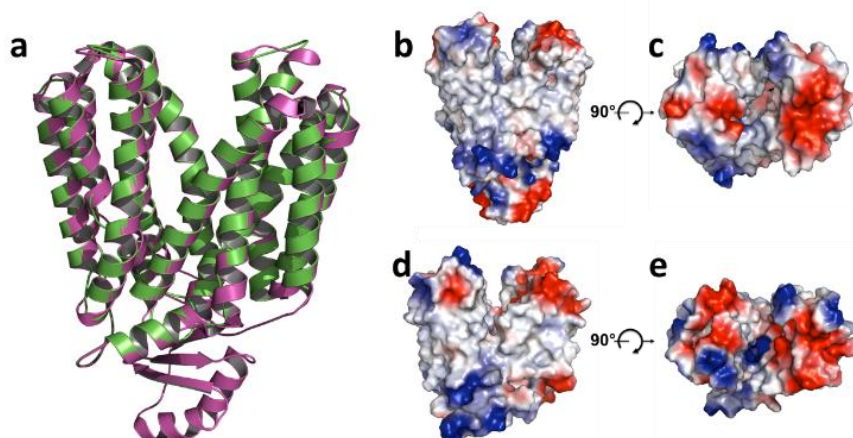
MIC (mg/L)					
Compounds	Structures of guanylhydrazones	LogP	Norfloxacin	BrEt	Perfloxacin
<b>Alone</b>	–	–	<b>128</b>	<b>32</b>	<b>16</b>
+1		-1.07	32 (4x) <sup>a</sup>	8 (4x)	16
+2		0.54	16 (8x)	4 (8x)	16
+3		0.49	8 (16x)	1 (32x)	16
+4		-1.25	64 (2x)	16 (2x)	16
+5		-1.22	64 (2x)	16 (2x)	16
+6		-1.25	64 (2x)	16 (2x)	16
+7		-0.26	64 (2x)	16 (2x)	16
+8		0.82	16 (8x)	4 (8x)	16
+9		-1.03	16 (8x)	4 (8x)	16
+10		2.37	64 (2x)	32	16

+11		0.15	128	32	16
+12		0.32	16 (8x)	4 (8x)	16
+13		-0.42	8 (16x)	1 (32x)	16
+14		1.37	32 (4x)	8 (4x)	16
+15		0.77	32 (4x)	8 (4x)	16
+16		0.18	16 (8x)	2 (16x)	16
+17		0.32	8 (16x)	4 (8x)	16
+18		0.54	16 (8x)	2 (16x)	16
+19		1.37	16 (8x)	4 (8x)	16

---

<sup>a</sup> Reduction in MIC

**Figure 1.** Three-dimensional presentation of the crystal structure 3WDO (purple) superimposed the generated model NorA (green). Representation of the secondary structure (a); the electrostatic surface 3WDO (b, c); the electrostatic surface the generated model NorA (d, e) cationic residues (blue), anionic (red), and hydrophobic (white).



**Figure 2.** Presentation of NorA /norfloxacin and NorA/13 dockings. (a) Ribbon representation of both poses shows competition for the same site (a) and the characterization of both norfloxacin (b), and compound 13 (c) sites. Polar contacts presented in purple dotted dashes. Image generated by PyMol.

