



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

PEDRO SILVINO PEREIRA

**EFEITO ANTICANCERÍGENO, ANTIBACTERIANO E TOXICOLÓGICO DE
DERIVADOS DO TIAZOL E TIAZOLIDINEDIONA**

Recife

2020

PEDRO SILVINO PEREIRA

**EFEITO ANTICANCERÍGENO, ANTIBACTERIANO E TOXICOLÓGICO DE
DERIVADOS DO TIAZOL E TIAZOLIDINEDIONA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Recursos Naturais.

Orientadora: Prof.^a Dra. Teresinha Gonçalves da Silva
Coorientadora: Dra. Maria do Desterro Rodrigues

Recife

2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Pereira, Pedro Silvino

Efeito anticancerígeno, antibacteriano e toxicológico de derivados do tiazol e tiazolidinediona / Pedro Silvino Pereira- 2020.

100 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva

Coorientadora: Maria do Desterro Rodrigues

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Recife, 2020.

Inclui referências e apêndice.

1. Citotoxicidade 2. Atividade anticâncer 3. *Staphylococcus aureus*

I. Silva, Teresinha Gonçalves da (Orientadora) II. Rodrigues, Maria do Desterro (Coorientadora) III. Título

615.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-089

PEDRO SILVINO PEREIRA

**EFEITO ANTICANCERÍGENO, ANTIBACTERIANO E TOXICOLÓGICO DE
DERIVADOS DO TIAZOL E TIAZOLIDINEDIONA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de doutor em Biotecnologia.

Aprovada em: 28/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Teresinha Gonçalves da Silva (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho (Examinador Interno)
Universidade Regional do Cariri

Prof. Dr. Saulo Relison Tintino (Examinador Externo)
Universidade Regional do Cariri

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes (Examinador Interno)
Universidade Regional do Cariri

Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha (Examinador Externo)
Universidade Regional do Cariri

À Deus, por me dar forças e coragem nos momentos mais difíceis. A Ele toda honra e toda a glória.

Ao meu filho, Pedro Matheus, pela carinhosa e alegre presença em minha vida.

Aos meus pais Balbina Silvino Pereira e José Pereira da Silva, (*in memoriam*),

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Teresinha Gonçalves da Silva, com admiração, carinho e respeito, por aceitar me orientar, pela confiança que sempre depositou em mim, pelos ensinamentos e por proporcionar oportunidade de aprendizado;

À minha coorientadora, Dra. Maria do Desterro Rodrigues, pelos seus conselhos, ensinamentos e por ter gentilmente cedido horas de seu tempo para minha formação pessoal e profissional;

À professora Dra. Maria do Carmo Alves de Lima por ter fornecido as moléculas deste trabalho sem as quais não seria possível a sua execução;

Aos professores Henrique Douglas Coutinho, Saulo Relison, Irwin Rose e a Cícera Datiane Morais (doutoranda) pelas contribuições dadas na realização dos testes de CIMrobiologia;

À Andréia Matos, pelos conselhos e por me motivar nos momentos difíceis e ao meu filho Pedro Matheus, a minha alegria em tempos de tensão;

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, e a todo o colegiado no nome da Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes, pela disponibilidade de sempre tirar dúvidas a respeito do PPGB – RENORBIO;

Aos membros da banca examinadora pelas suas valorosas contribuições;

Aos colegas da Pós-Graduação, turma 2016.1, por termos juntos vencidos tantas disciplinas, apresentações de artigos, relatórios e avaliações com um saldo maravilhoso;

Aos amigos do Laboratório de Prospecção Farmacotológica de Produtos Bioativos (BIOFARMATOX) pela ajuda direta e indireta nos experimentos, pelos momentos de alegria e descontração, em especial a Maria do Desterro, Elizabeth Borba e Dayane Gomes com quem eu sempre pude contar;

A Universidade Federal do Pernambuco, pela disponibilidade de seus espaços físicos utilizados ao longo do Curso;

À Secretária de Educação do Estado do Ceará (SEDUC), por ter concedido a liberação para os estudos de Pós-Graduação do doutorado;

A FACEPE pelo auxílio financeiro, o que me permitiu dedicação exclusiva durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

A todos, minha gratidão!

Vocês perguntam: “Qual é a nossa meta? Posso responder numa única palavra: vitória! Vitória a todo custo, vitória apesar de todo o terror, vitória por mais longo e difícil que o caminho possa ser, pois sem vitória não há sobrevivência.”

(CHURCHILL, 2018)

RESUMO

A busca por novos compostos bioativos é motivada pela necessidade de se obter resultados terapêuticos mais eficazes que atuem de forma seletiva no tratamento de doenças. Neste cenário, os derivados dos tiazóis e das tiazolidinedionas têm sido bastante explorados devido a sua vasta gama de atividades biológicas descritas na literatura. O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito citotóxico e antibacteriano de novos derivados de tiazolidinedionas (série ST e NW) e tiazol (série NJ). Para isso, 19 compostos foram testados, sendo 14 usados para a atividade antibacteriana e 19 para a atividade anticâncer. Para os testes de concentração inibitória mínima (CIM) e de inibição de bomba de efluxo por redução do CIM do antibiótico foram usadas as cepas de *Staphylococcus aureus*, 1199 (selvagem) e 1199B (mutante). Os derivados testados apresentaram ausência da atividade antibacteriana relevante, pois o CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$. Os compostos NJ16, NJ17 e NJ18, quando associados à norfloxacin, reduziram em três vezes a CIM desta droga, indicando uma possível inibição da bomba NorA. No estudo de *docking* molecular, o NJ16 e NJ17 apresentam interações importantes que justificam a inibição da NorA. O *docking* associado ao resultado da redução da concentração inibitória com as cepas portadoras NorA, sugere uma possível inibição da bomba de efluxo pelos compostos tiazólicos e tiazolidínicos. A atividade antitumoral foi avaliada frente a diversas linhagens de células cancerígenas humanas HL-60 (Leucemia promielocítica aguda), K562 (Leucemia mielocítica crônica), NCI-H292 (Carcinoma mucoepidermoide de pulmão), HCT116 (Câncer de cólon), HT-29 (Adenocarcinoma de cólon), MCF-7 (Adenocarcinoma de mama), P815 (Mastocitoma) e célula normal, L929 (fibroblasto) e PBMC (células nucleares do sangue periférico humano). Os derivados NJ20 e NW05 foram os que apresentaram maior potencial de citotoxicidade. A NJ17 foi mais citotóxica para a linhagem P815 e a NJ20 se destacou por apresentar seletividade frente a cinco das oito linhagens testadas, sendo mais ativas nas linhagens HL-60, K562, NCI-H292, HT29 e MCF7. Entre as tiazolidinedionas, a ST04 foi mais citotóxica para a linhagem HL-60, enquanto a NW05 apresentou potencial inibitório para as linhagens K562, NCI-H292, HCT116 e HT29. Em relação a atividade citotóxica em PBMCs dos derivados dos tiazóis e das tiazolidinedionas neste trabalho demonstraram-se baixa toxicidade para as células normais. A atividade hemolítica em eritrócitos humanos dos tiazóis (NJ) e das

tiazolidinedionas (ST e SW) exibiram uma $CE_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$, não apresentando efeito hemolítico. Estes resultados sugerem que os compostos em estudo têm potencial antiproliferativo, no entanto, é necessário a continuidade dos estudos na investigação do modo de ação das moléculas mais promissoras.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Atividade anticâncer. *Staphylococcus aureus*. Bomba de efluxo NorA. Resistência bacteriana.

ABSTRACT

The search for new bioactive compounds is motivated by the need to obtain more effective therapeutic results that act selectively in the treatment of diseases. In this scenario, the derivatives of thiazoles and thiazolidinediones have been extensively explored due to their wide range of biological activities described in the literature. The objective of this work was to determine the cytotoxic and antibacterial effect of new derivatives of thiazolidinediones (series ST and NW) and thiazole (series NJ). For this, 19 compounds were tested, 14 used for antibacterial activity and 19 for anticancer activity. Strains of *Staphylococcus aureus*, 1199 (wild) and 1199B (mutant) were used for the tests of minimal inhibitory concentration (MIC) and efflux pump inhibition by reducing the antibiotic MIC. The tested derivatives showed absence of relevant antibacterial activity, as the MIC $\geq 1024 \mu\text{g} / \text{mL}$. The compounds NJ16, NJ17 and NJ18, when associated with norfloxacin, reduced the MIC of this drug three times, indicating a possible inhibition of the NorA pump. In the molecular docking study, NJ16 and NJ17 present important interactions that justify NorA inhibition. The docking associated with the result of the reduction of the inhibitory concentration with the NorA carrier strains, suggests a possible inhibition of the efflux pump by the thiazolic and thiazolidine compounds. Antitumor activity was evaluated against several human cancer cell lines HL-60 (Acute Promyelocytic Leukemia), K562 (Chronic Myelocytic Leukemia), NCI-H292 (Mucoepidermoid Carcinoma of the Lung), HCT116 (Colon Cancer), HT-29 (Colon adenocarcinoma), MCF-7 (Breast adenocarcinoma), P815 (Mastocytoma) and normal cell, L929 (fibroblast) and PBMC (human peripheral blood nuclear cells). The NJ20 and NW05 derivatives showed the greatest potential for cytotoxicity. NJ17 was more cytotoxic for the P815 strain and NJ20 stood out for its selectivity in relation to five of the eight tested strains, being more active in the HL-60, K562, NCI-H292, HT29 and MCF7 strains. Among the thiazolidinediones, ST04 was more cytotoxic for the HL-60 strain, while NW05 showed inhibitory potential for the K562, NCI-H292, HCT116 and HT29 strains. Regarding the cytotoxic activity in PBMCs derived from thiazoles and thiazolidinediones in this work, low toxicity to normal cells was demonstrated. Hemolytic activity in human erythrocytes from thiazoles (NJ) and thiazolidinediones (ST and SW) exhibited an $\text{EC}_{50} > 200 \mu\text{g} / \text{mL}$, with no hemolytic effect. These results suggest that the compounds under study have antiproliferative potential, however, it

is necessary to continue studies in the investigation of the mode of action of the most promising molecules.

Keywords: Cytotoxicity. Anticancer activity. *Staphylococcus aureus*. NorA efflux pump. Bacterial resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 –	Núcleo Tiazolidina (A) e derivados Tiazolidina-2,4-diona (B).....	20
Figura 02 –	Estrutura do tiazol.....	22
Figura 03 –	Mecanismos de resistência a antibióticos.....	25
Figura 04 –	Sistemas de efluxo.....	30
Figura 05 –	Bomba de efluxo NorA, família MFS.....	30
Figura 06 –	A capacidade de substâncias da série NJ em inibir bombas de efluxo NorA em estirpes multirresistentes SA 1199B, em associação com norfloxacin, comparativamente com a estirpe SA1199 de tipo selvagem, desprovida da bomba.....	49
Figura 07 –	Capacidade de substâncias NW associadas à norfloxacin para inibir a bomba de efluxo NorA em estirpes multirresistentes SA 1199B, em comparação com a estirpe SA1199 de tipo selvagem desprovida da bomba.....	50
Figura 08 –	Ancoragem demonstrando todas as posições possíveis para a interação entre a bomba de efluxo NorA e os compostos NJ16 (A) e NJ17 (C) com os Ligplots mostrando os resíduos envolvidos nas interações entre a bomba de efluxo NorA com a NJ16 (B) e NJ17 compostos (D) (modelo em bastão) (B).....	54
Figura 09 –	Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos derivados Tiazóis e Tiazolidinedionas, na concentração de 50 µg/mL pelo método do MTT, em linhagens tumorais HL60, K562, NCI-H292, HCT116, HT29, MCF7 e P815	57
Figura 10 –	Concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI ₅₀) expresso em LogCI ₅₀ , dos derivados de Tiazóis e Tiazolidinedionas, em linhagens tumorais HL60, K562, NCI-H292, HCT116, HT29, MCF7 e P815 testadas pelo método do MTT.....	61
Figura 11 –	Atividade citotóxica em células mononucleares do sangue	

	periférico (PBMC), expressa em LogCI50, dos derivados de Tiazóis e Tiazolidinedionas que inibiram anteriormente o crescimento celular (IC%) em linhagens tumorais.....	65
Figura 12 –	Valores do índice de seletividade entre derivados Tiazóis e Tiazolidinedionas, frente à linhagem HL60.....	67
Figura 13 –	Índice de seletividade representado em escala logarítmica, entre derivados Tiazóis e Tiazolidinedionas, frente à linhagem HL60.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estruturas químicas dos derivados pertencentes às classes dos tiazóis (série NJ) e tiazolidinedionas (séries ST e SW).....	37
Tabela 2 – Linhagens celulares utilizadas nos experimentos de citotoxicidade <i>in vitro</i>	43
Tabela 3 – A ΔG energia de ligação com a NorA.....	53
Tabela 4 – Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos derivados Tiazóis (NJ) e Tiazolidinedionas (ST e NW), em linhagens tumorais na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ pelo método do MTT após 72 h de incubação.....	56
Tabela 5 – Valores da concentração que inibe 50 % do crescimento celular (CI_{50}) e o intervalo de confiança (IC 95 %) das fases em linhagens tumorais testadas pelo método do MTT após 72 h de incubação.....	60
Tabela 6 – Atividade citotóxica e hemolítica dos derivados tiazólicos e tiazolidinediônicos em células mononucleares do sangue periférico humano.....	64
Tabela 7 – IC_{50} dos derivados tiazólicos e tiazolidinediônicos em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) com as linhagens celulares no ensaio de viabilidade celular e seus respectivos índices de seletividade (IS).....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CI₅₀	Concentração que inibe 50 % do crescimento celular
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DL₅₀	Dose letal mediana responsável por matar 50 % de uma população em teste
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
HL-60	Linhagem celular de leucemia promielocítica humana
HT-29	Linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
K562	Linhagem Celular de Leucemia Mieloide Crônica
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H- tetrazólio
NCI-H292	Linhagem celular de carcinoma de pulmão humano
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	Solução tampão fosfato
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RR	Ribonucleotido-Redutase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVOS	19
1.1.1	OBJETIVO GERAL.....	19
1.1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	TIAZOLIDINEDIONAS.....	20
2.2	TIAZÓIS.....	22
2.3	RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	23
2.3.1	Mecanismo de resistência a antibióticos	24
2.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	26
2.5	SISTEMAS DE EFLUXO.....	28
2.5.1	Bombas de efluxo NorA	30
2.6	CÂNCER: CONCEITO E CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	31
2.7	MECANISMO RESISTÊNCIA EM CÉLULAS CANCERÍGENAS.....	33
2.8	RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS EM CÉLULAS CANCERÍGENAS MEDIADA POR TRANSPORTADOR ABC.....	34
3	MÉTODO	37
3.1	OBTENÇÃO DOS DERIVADOS.....	37
3.2	ATIVIDADE BIOLÓGICA BACTERIANA.....	41
3.2.1	Linhagens bacterianas utilizadas	41
3.2.2	Substâncias utilizadas	41
3.2.3	Antibiótico	41
3.2.4	Teste concentração inibitória mínima (CIM)	41
3.2.5	Ensaio de inibição de bomba de efluxo por redução da CIM do antibiótico	42
3.3	ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR.....	43
3.3.1	Procedimento de modelagem e ancoragem da NorA (<i>docking</i>)	43
3.4	ATIVIDADE BIOLÓGICA TUMORAL <i>IN VITRO</i>	43

3.4.1	Linhagens celulares	43
3.4.2	Célula mononuclear do sangue periférico humano (PBMC)	44
3.4.3	Índice de seletividade	44
3.4.4	Manutenção das linhagens celulares	45
3.4.5	Atividade citotóxica	45
3.4.5.1	Avaliação da citotoxicidade em células tumorais – MTT.....	45
3.4.5.2	Ensaio de seletividade para as células mononucleares de sangue periférico (PBMC).....	46
3.4.5.3	Atividade hemolítica.....	46
3.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	47
4	RESULTADOS	48
4.1	ATIVIDADE BIOLÓGICA BACTERIANA	48
4.1.1	Atividade antibacteriana	48
4.1.2	Atividade inibitória dos compostos frente a bomba NorA contra a cepa SA 1199B multirresistente	48
4.2	MODELAGEM MOLECULAR E ESTUDOS DE ANCORAGEM (DOCKING)	51
4.3	ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS TUMORAIS	54
4.3.1	Percentual de inibição do crescimento celular (IC%)	54
4.3.2	Determinação das CI_{50} dos derivados do tiazol e da tiazolidinedionas	58
4.3.3	Atividade citotóxica em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs)	63
4.3.4	Atividade hemolítica	68
5	CONCLUSÃO	69
	PERSPECTIVAS	71
	REFERÊNCIAS	72
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY	93

1 INTRODUÇÃO

Observa-se que as doenças infecciosas deixaram de ser a principal causa de mortes no mundo e no Brasil, tendo esse lugar preenchido pelas neoplasias, cardiopatias e doenças do aparelho circulatório (WHO, 2019).

O câncer é uma patologia multifatorial que resulta de uma série de eventos moleculares, na qual alteram, fundamentalmente, as propriedades normais das células. Nas células cancerígenas, os sistemas de controle normais que impedem o crescimento excessivo de células e a invasão de outros tecidos estão desabilitados. De acordo com estimativas, o aumento da incidência e mortalidade por câncer, tem tornado esta doença a segunda maior causa de morte no mundo, responsável por 9,6 milhões de óbitos em 2018 (BRAY et al., 2018; WHO, 2019).

O tratamento dessa doença é feito através de cirurgia, radioterapia e quimioterapia, sendo a quimioterapia, a mais utilizada. A resistência aos quimioterápicos clássicos e/ou novos medicamentos direcionados continua a ser um grande problema nas terapias contra o câncer. A resistência aos medicamentos, existente antes do tratamento ou gerada após a terapia, é responsável pela maioria das recidivas de câncer, uma das principais causas de morte da doença (WANG; ZHANG; CHEN, 2019).

Por outro lado, tem havido um aumento significativo de casos de resistência bacteriana, sobretudo em pacientes imunodeprimidos, causando um problema sério em pacientes imunocomprometidos, incluindo pacientes com câncer. Estudos tem apontado a relação entre a incidência de doença cancerígena e resistência bacteriana, como o câncer de colón, leucemia, neoplasia ginecológica, entre outros (CORNEJO-JUÁREZ et al., 2007; DELEBARRE et al., 2019).

Mundialmente ocorre uma maior incidência de linhagens bacterianas resistentes a múltiplas drogas, principalmente em meio hospitalar, que aumentam a mortalidade e os custos inerentes às prestações dos cuidados de saúde, bem como as taxas de mortalidade por infecções (AWASTHI; PANT; DAHAL, 2015; NEUPANE et al., 2016). O uso de antibacterianos está relacionado a utilização desnecessária ou erro na escolha do tipo, dose, via de administração e duração do tratamento (CARNEIRO, 2006).

Diante do exposto, pesquisadores tem se empenhado na busca de novos fármacos contra o câncer e no combate a infecções bacterianas, para se chegar a tratamentos mais eficazes e que provocam menos efeitos colaterais.

Entre os fármacos que merecem atenção estão os derivados da tiazolidinediona e dos tiazóis. Os compostos derivados das tiazolidinedionas são conhecidas por apresentar diversas atividades biológicas, entre elas: atividade antimicrobiana, antituberculose, antihiperlipidêmica e antitumoral (FRÖHLICH; WAHL, 2015; KHAN; PATEL; PATEL, 2018; NAIM et al., 2017; WANG et al., 2018).

Os tiazóis também apresentam atividades biológicas, tais como: antitumoral, antibacteriana, antidepressiva, leishmanicida e anti-inflamatória (ALIANÇA et al., 2017; LEFRANC et al., 2013; LU et al., 2012; SHAFI et al., 2012).

Desse modo, o conjunto dos resultados que foram obtidos neste trabalho, poderão auxiliar na elucidação da ação biológica de novas moléculas derivadas das tiazolidinedionas e dos tiazóis que apresentem atividades inibitórias contra as linhagens de células tumorais humanas e linhagens bacterianas resistentes.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

- ❑ Determinar o efeito citotóxico e antibacteriano de novos derivados de tiazolidinediona e tiazol.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❑ Determinar o efeito citotóxico de derivados da tiazolidinediona e tiazol em linhagens celulares tumorais e linfócitos humanos;
- ❑ Investigar a atividade hemolítica das substâncias em eritrócitos humanos;
- ❑ Determinar o efeito citotóxico em cepas bacterianas sensíveis e resistentes a fármacos;
- ❑ Mostrar a interação dos componentes isolados de tiazolidinedionas e tiazóis com a norfloxacina, como possíveis inibidores da bomba de efluxo, a partir do ensaio de inibição de bomba de efluxo por redução da CIM do antibiótico;
- ❑ Realizar o ensaio de interação *in silico* dos compostos mais ativos com a proteína de efluxo NorA.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Com o aumento da resistência bacteriana ao tratamento com antibióticos e também o aumento da incidência e mortalidade por câncer, a atenção tem sido voltada para o desenvolvimento de novos fármacos com ação antibacteriana e antitumoral. Os antibióticos são substâncias produzidas sinteticamente, com a função de suprimir o crescimento de microrganismos. Já os quimioterápicos por sua vez, utilizados para o tratamento de diversos tipos de neoplasias, têm como objetivo destruir a célula tumoral.

Pesquisas por novos compostos que sejam eficazes no tratamento e na cura de doenças infecciosas e tumorais têm resultado na produção de novos fármacos com largo espectro de atividades biológicas (GLICKMAN; SAWYERS, 2012). Neste contexto, derivados tiazolidínicos e tiazólicos, têm se destacado por apresentarem essas propriedades.

2.1 TIAZOLIDINEDIONAS

As tiazolidina-2,4-dionas (Figura 1) são uma classe de compostos derivados da tiazolidina. Os mesmos são constituídos de um anel de 5 membros, contendo um átomo de enxofre e um átomo de nitrogênio nas posições 1 e 3, respectivamente, uma carbonila na posição 4, bem como podendo apresentar diversos substituintes nas posições 2, 3 e 5 (PANICO; POWELL; RICHER, 1995; SINGH et al., 1981).

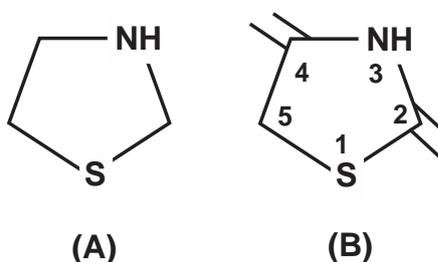


Figura 1 – Núcleo Tiazolidina (A) e derivados Tiazolidina-2,4-diona (B).

A tiazolidina-2,4-diona é um sistema de anel heterocíclico com múltiplas aplicações. Seu núcleo tem sido relatado por ser responsável pela maior parte das suas ações farmacológicas. Os seus derivados representam uma classe bem conhecida de medicamentos e substâncias patenteados em diferentes fases da

pesquisa. A importância tiazolidinedionas (TZDS) se dá pela viabilidade de sua síntese, podendo ser preparados em poucas etapas sintéticas, com produtos acessíveis, metodologia eficaz e economicamente viável obtendo-se produtos com bons rendimentos. Seu uso em síntese orgânica tem se tornado cada vez mais importante (OLIVEIRA, 2018).

Os compostos derivados das tiazolidinedionas são conhecidos por influenciar a regulação de diferentes cascatas moleculares e apresentar diversas atividades biológicas, tais como: atividade antimicrobiana (GOUVEIA et al., 2009; KHAN; PATEL; PATEL, 2018), antituberculose (SINGHAL et al., 2014), antiviral (MOUSAVI et al., 2019), antiartrítica (JAIN; VORA; RAMAA, 2013), doenças metabólicas (KRAAKMAN et al., 2018; WANG et al., 2018), neurodegenerativas (PÉREZ; QUINTANILLA, 2015), hipoglicemiantes (ARAÚJO et al., 2012), antitumoral (FRÖHLICH; WAHL, 2015; SHU et al., 2016), antioxidante (MISHRA; SACHAN; CHAWLA, 2015; WANG et al., 2017), antichagásica (MOREIRA et al., 2013), anti-inflamatória (MATHEWS; KOTHARI; GALDO, 2016), entre outras.

Estudo realizado por Patil et al. (2010), foi avaliado a atividade antiploriferativa sintetizaram dos derivados 5-benzilideno-2,4-tiazolidinadiona e observaram que o derivado 2-[4-[(2,4-dioxotiazolidin-5-il-ideno) metil] fenoxi]-N-[3-(trifluorometil)-fenil] acetamida mostrou-se o mais promissor no teste preliminar de atividade antiproliferativa, apresentando citotoxicidade frente a cinco linhagens testadas: MCF7 (câncer de mama), PC3 (câncer de próstata), KB (câncer nasofaríngeo), GURAV (câncer oral) e K562 (leucemia).

Em estudos realizados por Rodrigues et al. (2018) em derivados de tiazolidinediona, foi verificado que alguns derivados apresentaram citotoxicidade frente a linhagem de células de câncer de pulmão NCI-H292, com valor de CI50 de 1,26 µg/mL.

Trotsko et al. (2018), ao avaliarem a atividade antibacteriana de 2,4-dioxotiazolidin-5-il-ilideno, derivados do ácido acético com a tiazolidina-2,4-diona, mostraram que estes derivados apresentavam atividade antibacteriana geralmente contra bactérias Gram-positivas, entre elas a *Staphylococcus aureus*, com CIM = 3,91 mg/mL. Sindhu et al. (2015), ao avaliarem um derivado da tiazolidinedionas, (Z)-5-(arilideno)-3-((1-aril-1H-1,2,3-triazol-4-il) metil) tiazolidina-2,4-dionas, observaram que esses compostos químicos testados apresentavam uma boa atividade antibacteriana (CIM de 32 mg/mL).

2.2 TIAZÓIS

O tiazol é um composto heterocíclico, possuindo heteroátomos de nitrogênio e enxofre como parte do anel aromático de cinco membros, conhecido como 1,3-azóis (Figura 2), descoberto por Hantzsch e Waber em 1887 (HANTZSCH; WEBER, 2007), enquanto sua estrutura foi confirmada em 1889 (KASHYAP et al., 2012; SIDDIQUI et al., 2011; YADAV; DEVPRAKASH; SENTHILKUMAR, 2011).

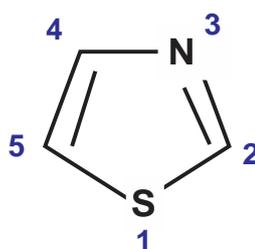


Figura 2 – Estrutura do tiazol.

De acordo com Rouf e Tanyeli (2015) e Chhabria et al. (2016), os tiazóis são encontrados em uma ampla variedade de moléculas bioativas e produtos naturais. O tiazol é utilizado como intermediário para fabricação de fármacos sintéticos, fungicidas e corantes e também é encontrado naturalmente na vitamina B1 (tiamina) (KASHYAP et al., 2012; PASQUALOTTO; THIELE; GOLDANI, 2010).

O tiazol e seus derivados são importantes devido aos seus efeitos terapêuticos em várias doenças e têm sido de grande interesse e exploração científica, pois são acompanhados de quase todas as atividades biológicas e farmacológicas, como antimicrobiana (DALLOUL et al., 2018; TAKATE et al., 2019), antifúngica (DESAI et al., 2013; SADEK; AL-TABAKHA; FAHELELBOM, 2011), anticancerígena (AURELIO et al., 2016; TADESSE et al., 2017), anti-alzheimer (AGARWAL et al., 2018; RAHIM et al., 2015), anticonvulsiantes (PARTAP et al., 2018; SIDDIQUI et al., 2017), antidiabética (CHARAYA et al., 2018), tratamento de alergias (PUTTA et al., 2017), antiviral (CONTI et al., 2019), anti-hipertensiva (FARGHALY et al., 2019), anti-inflamatória (SINHA; DOBLE; MANJU, 2018), infecções anti-HIV (KASRALIKAR et al., 2019) e muitas outras.

Mohammadi-Farani et al. (2014) sintetizaram uma série de derivados do feniltiazol com atividade anticancerígena *in vitro* contra o neuroblastoma (SKNMC), células de câncer de hepatocarcinoma humano (Hep-G2) e de mama (MCF-7)

usando o ensaio MTT e nenhum dos compostos sintetizados apresentaram atividade superior à doxorrubicina, mas os compostos N- (2-Nitrofenil) -2-p-toliltiazol-4-carboxamida com para-nitro ($CI_{50} = 10,8 \mu M$) e N- (3-Nitrofenil) -2-p-toliltiazole-4-carboxamida com metades de meta-cloro ($CI_{50} = 11,6 \mu M$) exibiram efeitos citotóxicos mais elevados em relação às linhagens celulares SKNMC e Hep-G2.

Prasanna et al. (2010), sintetizaram derivados de 2,6-diamino-4,5,6,7-tetra-hidrobenzo(d)tiazole como agente anti-leucêCIMO contra duas linhas celulares de leucemia humana, K562 ($17,88 \mu M$) e CEM ($13,78 \mu M$). Chang et al. (2012), através da série de carboxamidas tiazólicas 2-substituídas identificaram inibidores potentes da Akt com crescimento celular inibidores do câncer de próstata humano, nas linhagens LnCap ($CI_{50} = 0,18 \mu M$), PC3 ($CI_{50} = 1,30 \mu M$) e Du145 ($CI_{50} = 0,17 \mu M$).

Com relação a atividade antimicrobiana, Mohil, Kumar e Mor (2014), sintetizaram alguns derivados tiazólicos, Indeno-[1,2-c]-pirazoles-1,3-dissubstituídos com potente atividade antimicrobiana contra *S. aureus*. Karale et al. (2014), observaram que o derivado 2-(4-fluorofenil)-4-metil-1,3-tiazole-5-carbo-hidrazida apresentou atividade contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Echerichia Coli* ($CI_{50} = 20-50\mu M$).

2.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA

Desde a descoberta dos antibióticos, fenômenos de resistência foram descritos e cepas resistentes foram identificadas, como o surgimento de *S. aureus* resistente à penicilina devido à sua capacidade de degradar este antibiótico (RODRÍGUEZ-NORIEGA; SEAS, 2010). Com o surgimento de novos antibióticos como macrolídeos, glicopeptídeos e aminoglicosídeos imaginava-se que o problema seria resolvido, no entanto, as bactérias também apresentaram novos mecanismos de resistência e de difícil controle, tornando-as assim multirresistente (LIVERMORE, 2012; STEEL et al., 2012; TONG et al., 2015)

A resistência bacteriana tem tido impactos significativos na saúde da população (O'NEILL, 2016), no desenvolvimento global (JASOVSKÝ et al., 2016), e até mesmo na economia mundial (WBG, 2017). Na União Europeia são estimadas 25.000 mortes anuais (O'NEILL, 2016). No Brasil, dados epidemiológicos sobre casos de infecções por bactérias resistentes são mal documentados, não se tendo a certeza do número certo de casos e mortes, embora se acredite que sejam milhares

de mortes por ano (GUIMARÃES, 2017). De acordo com o relatório do Grupo do Banco Mundial (WBG, 2017) sobre infecções resistentes a medicamentos, o não controle da resistência bacteriana representará um problema econômico para futuro, devido aos altos valores dos antibióticos, o que provocará um aumento das taxas de pobreza.

A resistência bacteriana pode estar presente em indivíduos livres de antibióticos ou em ambiente que apresente concentração de antibióticos (AYDIN; INCE; INCE, 2015; BOSS; OVERESCH; BAUMGARTNER, 2016; LENSKI, 2017). De acordo com Rodríguez-Rojas et al., (2013), a resistência bacteriana é regulada por vários mecanismos de resposta que são ativados por espécies reativas de oxigênio, falhas na replicação ou pela presença de antibióticos.

A resistência surge de estímulos naturais ou de modificações genéticas. A resistência natural ou intrínseca é um caráter constante de cepas da mesma espécie bacteriana e é um mecanismo permanente, determinado geneticamente e sem correlação com a dose de antibiótico (COX; WRIGHT, 2013). De acordo com Yarnell (2005), um exemplo que pode ser citado é a resistência de *Proteus mirabilis* às tetraciclinas por um processo natural de remoção do antibiótico; e a colistina, devido à presença de lipopolissacarídeos que diminui a afinidade dos antibióticos polipeptídicos ao seu local alvo.

A capacidade do microrganismo de se adaptar a ambientes diferentes é em grande parte devido à aquisição de genes, capazes de fornecerem defesa contra uma ampla variedade de antibióticos (AYDIN; INCE; INCE, 2015; DI PIERRO, 2015). Como exemplo, a resistência à quinolona, modificando a girase de DNA em enterobactérias, ou mutases em genes que codificam a porina, resultando no bloqueio da entrada do antibiótico no microrganismo (PÉREZ; ROBLES, 2013). De acordo com Van Hoek et al. (2011), a aquisição de genes de resistência de uma cepa pertencente a uma espécie idêntica ou diferente, é dada por plasmídeos.

2.3.1 Mecanismo de resistência a antibióticos

As bactérias apresentam os seguintes mecanismos de resistência (Figura 3): a diminuição da permeabilidade da membrana, a alteração do sítio alvo, mecanismo enzimático e bomba de efluxo, entre outros (NAQUIN et al., 2015; XU et al., 2011).

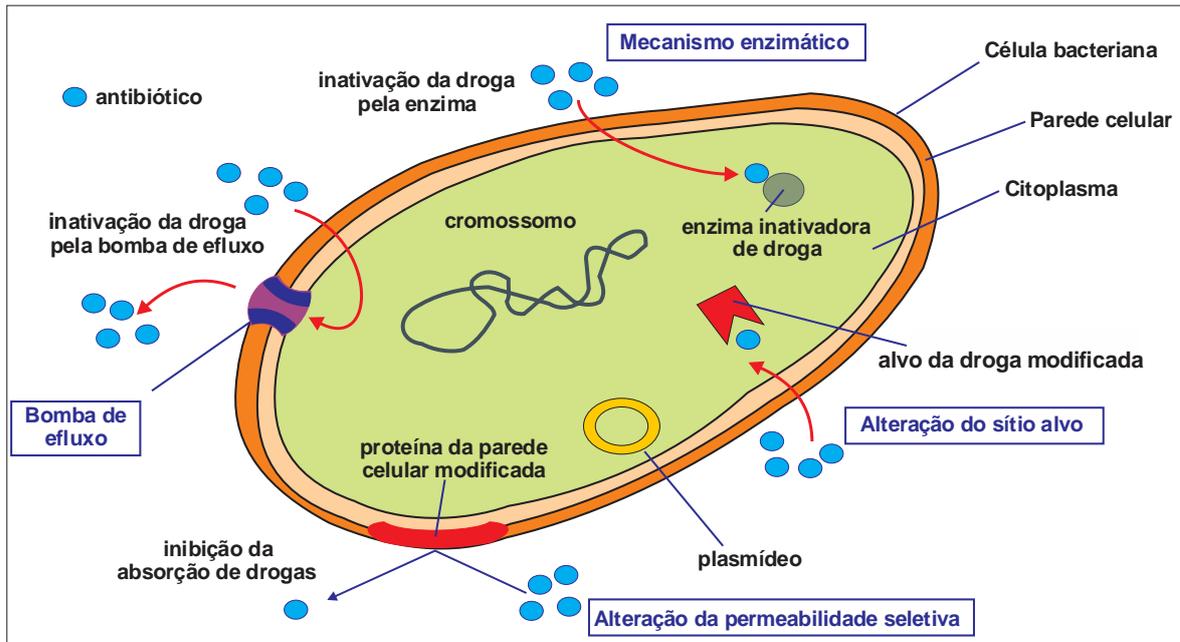


Figura 3 - Mecanismos de resistência a antibióticos.

Fonte: Adaptado de Khameneh et al. (2016).

Alteração do sítio de ação - a maioria dos antibióticos liga-se especificamente a um ou mais alvos na célula bacteriana. Alterações na estrutura do alvo do antibiótico impedem a eficiente ligação ou diminuem a afinidade dessa interação, desse modo o antibiótico não reconhece mais o alvo na célula bacteriana (MOSQUITO et al., 2011). Geralmente, alterações do sítio alvo têm origem em mutações em genes da própria bactéria. Essas alterações impedem a ligação dos antimicrobianos, mas não interferem na função do alvo, a proteína. Assim, a bactéria mantém suas funções e foge da ação dos antibióticos. É um importante mecanismo de resistência das Gram-positivas e Gram-negativas, sendo bastante relevante para antibióticos como as quinolonas (altera as topoisomerasas), penicilinas (altera PBP, Penicillin-Binding Proteins e resulta na resistência à oxacilina) e vancomicina (altera sítio de ligação da vancomicina na resistência dos Enterococcus) (ATEF et al., 2019; KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017).

Alteração da permeabilidade - esta resistência encontra-se associada a bactérias Gram-negativa que tem uma membrana exterior com 40 % de lipopolissacarídeos, a qual proporciona uma barreira eficaz contra a penetração de antibióticos, dependendo da sua composição química (GAO; VAN BELKUM; STILES, 1999; MALDONADO; SÁ-CORREIA; VALVANO, 2016).

Para atingir o alvo e agir no meio intracelular (periplasma ou citoplasma), os antibióticos devem ultrapassar a membrana externa ou toda a parede celular. Antibióticos hidrofílicos (geralmente moléculas pequenas) devem atravessar a membrana externa por difusão passiva através de proteínas de membrana externa denominadas porinas ou Omps (*Outer membrane proteins*). A redução da permeabilidade da membrana externa pode ocorrer por alterações na estrutura das porinas ou mesmo pela perda da porina, respectivamente, resultando em permeabilidade mais seletiva ou até mesmo impermeabilidade aos antibióticos. Este mecanismo pode afetar principalmente a entrada de antibióticos beta-lactâmicos e de fluoroquinolonas (TAFUR; TORRES; VILLEGAS, 2008; XU et al., 2006).

Mecanismo enzimático - São enzimas que modificam antibióticos por transferência de grupo(s) químico(s) (acil, fosfato, nucleotidil ou ribitoil) para a molécula da droga, inativando aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina), fenicóis (cloranfenicol) e macrolídeos (eritromicina, azitromicina e claritromicina) (CHUNG, 2016; GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016; GIEDRAITIENĖ et al., 2011).

Bombas de efluxo - As bombas de efluxo são proteínas presentes na membrana celular que promovem o efluxo do antibiótico do meio intracelular para o extracelular (DZIDIC; SUSKOVIC; BLAZENKA, 2008). É um processo que exige gasto energético (JANGANAN et al., 2013; POS, 2009). Este mecanismo confere resistência, como por exemplo, às tetraciclinas, quinolonas, clorafenicol e os β -lactâmicos (GIEDRAITIENĖ et al., 2011).

2.4 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* são cocos Gram positivos e produtores da enzima catalase com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não esporulados e geralmente não encapsulados. É um microrganismo comensal e patógeno humano colonizador da pele e das membranas das mucosas de neonatos, crianças e adultos (TONG et al., 2015). Esta colonização predispõe à disseminação e subsequente

infecção endógena pela *S. aureus* (PALING et al., 2017). Entre os locais onde se pode encontrar o *S. aureus* estão o vestíbulo nasal (KASPAR et al., 2016), a mucosa da orofaringe (PETERSEN et al., 2013), na pele e no períneo, a mucosa do trato gastrointestinal (ACTON et al., 2009), vagina (BOURGEOIS-NICOLAOS et al., 2010) e axilas (KIM; SON, 2018).

Aproximadamente 30 % da população humana é colonizada pela *S. aureus* e sua transmissão ocorre por contato direto entre as pessoas ou com objetos contaminados. A maioria dos portadores é assintomática e o processo de infecção normalmente está associado a algum fator que diminui a resposta imunológica do indivíduo como doenças, terapias agressivas ou procedimentos médicos invasivos que abrem uma via de acesso para os microrganismos (GORDON; LOWY, 2008; KURODA et al., 2001). A *S. aureus* é responsável por diversas infecções, como bacteremia e endocardite infecciosa (EI), osteoarticular, tecidos moles e infecções (VERHOEVEN et al., 2014; WERTHEIM et al., 2005). Uma vez que as barreiras naturais ficam comprometidas por trauma ou cirurgia, a *S. aureus* pode se alojar no tecido e provocar lesão local, caracterizando o processo infeccioso (WILLIAMS; NAKATSUJI; GALLO, 2017; ZHANG et al., 2015). Esta bactéria também traz riscos infecciosos para pacientes que fazem diálise (POPOVICH et al., 2018), para os queimados (CHEN et al., 2018), diabéticos (REVELES et al., 2016), HIV-soropositivos (REID et al., 2017) e câncer (ROLSTON et al., 2017). As infecções cutâneas, por exemplo, podem apresentar foliculite simples (LAUREANO; SCHWARTZ; COHEN, 2014) e impetigo (COLE; GAZEWOOD, 2007), assim como furúnculos e carbúnculos, que afetam o tecido subcutâneo e produzem efeitos sistêmicos (CHEN et al., 2018).

A *S. aureus* tem a habilidade de adquirir resistência a praticamente todos os antibióticos, penicilina, metacilina/oxalina, vancomicina, entre outros (FOSTER, 2017). Essa capacidade de adaptação e de adquirir resistência é motivo de preocupação tanto com relação ao tratamento de infecções hospitalares, quanto nas adquiridas na comunidade. Essa resistência bacteriana, geralmente, ocorre por mutação, que resulta em uma alteração no sítio de ação do antibiótico e também pode ocorrer por aquisição de genes frequentemente envolvidos na expressão de proteínas que levam à inativação ou à destruição do antibiótico (FRIERI; KUMAR; BOUTIN, 2017). A *S. aureus* apresenta os seguintes mecanismos de resistências: redução das concentrações de antibióticos dentro da bactéria; modificação no alvo

do antibiótico por mutação genética ou modificação pós-transducional do alvo; e proteção do alvo do antibiótico por inativação do antibiótico por hidrólise ou modificações que o tornam não funcional (BLAIR et al., 2015).

Diekema et al. (2019), observaram a existência de 191.460 isolados de *S. aureus* (45 países de 1997 a 2016), dos quais 77.146 (40,3 %) eram MRSA (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), e que variavam geograficamente entre 26,8% de MRSA na Europa (47.293), 47,0 % na América do Norte (102.197), 38,7 % de MRSA na América Latina (17.474) e 40,3 % de MRSA na Ásia e Oceania (24.496). As MRSA são resistentes à meticilina (e normalmente a outros antibióticos frequentemente utilizados para tratar infecções provocadas pela *S. aureus*).

2.5 SISTEMAS DE EFLUXO

Uma das modificações moleculares para evitar que o antibiótico atinja ao seu sítio alvo, são os sistemas de efluxo ou bomba de efluxo (BAYLAY; PIDDOCK; WEBBER, 2019). De acordo com Du et al. (2018), é um mecanismo responsável pela resistência bacteriana a determinados antimicrobianos, que ocorre pelo bombeamento ativo de antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular. A especificidade ao antibiótico pode variar em função do tipo de bomba de efluxo (NIKAIDO; PAGÈS, 2012). De acordo com Bhardwaj e Mohanty (2012) e Poole (2007), as bombas de efluxo podem direcionar sua energia da quebra de ATP para o transporte de substâncias, que por sua vez podem ser inibidas por agentes que inibem ATPases e também por íons, como sódio ou hidrogênio, que devem ser transportados para o interior da bactéria, em troca da retirada de antibióticos do ambiente intracelular.

Segundo Hernando-Amado et al. (2016) e Nikaido e Li (2009), bombas de efluxo de múltiplas drogas constituem um grupo de portadores encontrados em organismos, e que contribuem para a resistência a compostos utilizados no tratamento de diferentes doenças, incluindo resistência a drogas anticâncer, antibióticos ou compostos antifúngicos. As bombas de efluxo bacteriano são classificadas em famílias de acordo com sua estrutura e sua demanda energética (Figura 4): superfamília ABC (*ATP-binding cassettes*), MATE (*Multidrug and Toxic compound efflux*), RND (*resistance-nodulation cell division*), SMR (*small multidrug resistance family*) e a superfamília MFS (*Major facilitator*) (KOURTESI, 2013; SUN;

DENG; YAN, 2014). As Bombas MFS prevalecem entre as *S. aureus* e incluem bombas de efluxo resistente a múltiplas drogas (MDR) LmrS, NorA, NorB, NorC, MdeA, SdrM e QacA/B e os transportadores específicos de tetraciclina Tet38 e TetK (LI; NIKAIDO, 2009).

O padrão crescente de resistência a drogas entre diferentes patógenos levou ao desenvolvimento de vários inibidores de bomba de efluxo (IBE) que foram usados em combinação com os medicamentos existentes para a ressensibilização. Diferentes classes de IBE's bacterianos foram sintetizadas até agora, entre elas, espécies borônicas (derivadas do ácido piridina-3-borônico substituídos em 6), que potencializou a atividade da ciprofloxacina em um aumento de 4 vezes em comparação com o composto original, além de promover a acumulação de brometo de etídio (EtBr) na SA1199B, corroborando seu modo de ação potencial como inibidores da NorA (FONTAINE et al., 2015). A fenotiazina (derivados 3-fenil-1,4-benzotiazina), apresentou atividade em combinação com ciprofloxacina contra *S. aureus* ATCC 25923, sendo capaz de restaurar completamente a atividade da ciprofloxacina em uma cepa com superexpressão de norA (SA-K2378) e exibiram boa atividade contra SA-1199B, uma cepa que também superexpressa norA, em um ensaio de inibição de efluxo de brometo de etídio (EtBr) (SABATINI et al., 2008). Em relação aos derivados de fluoroquinolona contra *S. aureus* como substratos competitivos para a bomba de efluxo NorA, foi identificado um IBE baseado em nofloxacina que é um potente inibidor das bombas de efluxo MFS (NorA) e MATE (MepA) (SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013). A coadministração de um inibidor da bomba de efluxo (IBE) com antibióticos é, portanto, uma estratégia promissora contra as cepas clínicas resistentes (GILL; FRANCO; HANCOCK, 2015; ZHANG; MA, 2010).

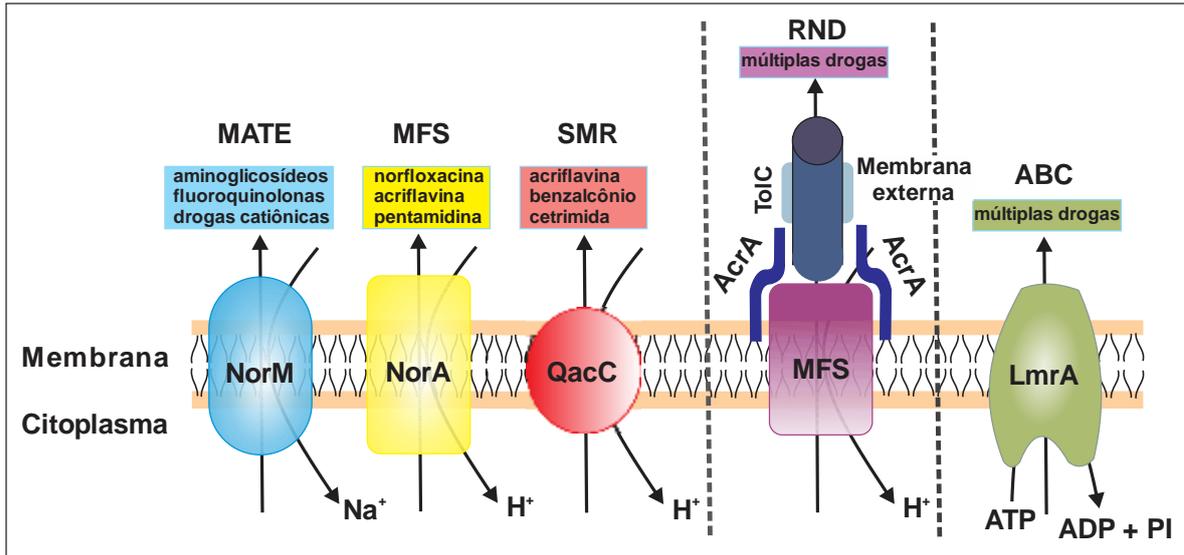


Figura 4 – Sistemas de efluxo.
Fonte: Adaptado de Piddock (2006).

2.5.1 Bombas de efluxo NorA

A bomba de efluxo NorA (Figura 5), presente em *S. aureus*, é sintetizada pela expressão do gene *norA*, membro da grande superfamília facilitadora (MFS) que transporta ativamente vários antibióticos de resistência a fluoroquinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina), cuja função é reduzir a sua concentração no interior do patógeno alvo, além de contribuir para o fenótipo MDR nestas bactérias (KUMAR; MUKHERJEE; VARELA, 2013).

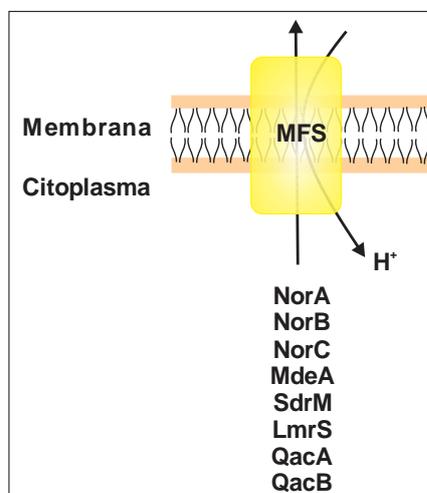


Figura 5 – Bomba de efluxo NorA, família MFS.
Fonte: Adaptado de Piddock (2006).

A NorA é uma bomba de efluxo bem caracterizada pela presença de 12 segmentos transmembranas (PAULSEN; BROWN; SKURRAY, 1996) e está relacionada com a Bmr, uma bomba de efluxo de *Bacillus subtilis* (CHAMI et al., 2002; STEINFELS et al., 2004). Têm 388 aminoácidos e uma massa molecular de 42.385 KDa (YU; GRINIUS; HOOPER, 2002).

A NorA protege a célula bacteriana contra compostos lipófilos e monocatiônicos como brometo de etídio, ceftrimida, cloreto de benzalcônio, brometo tetrafenilfosfônio, acriflavina e derivados de fluoroquinolona contra *S. aureus* (KAATZ; SEO, 1995). A função fisiológica da NorA como transportador de múltiplas drogas já foi demonstrada com vesículas de membrana citoplasmática constituída de proteolipossomos. A regulação da expressão gênica da NorA ainda não é bem conhecida (YU; GRINIUS; HOOPER, 2002). Esse tipo de bomba já foi identificado em cepas de *S. aureus*: SA-1199B, SA-1199-3, SA-K1904, SA-K2361 e SA-K3092 (SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013). Existem várias outras bombas de efluxo que são homólogas da NorA, tais como NorB e NorC, que foram descobertas em *S. aureus*, e todas são negativamente reguladas pela MgrA (anteriormente NorR) (SUN; DENG; YAN, 2014; TRUONG-BOLDUC; HOOPER, 2010).

Segundo Thota et al. (2010), estudos estão sendo realizados para desenvolver novos agentes antibacterianos com NorA, capazes de prevenir a extrusão de drogas como metilicina, vancomicina e doxiciclina e identificar compostos que reduzam ou bloqueiem a atividade da bomba de efluxo. Entre esses compostos, os derivados da tiazolidinedionas e dos tiazóis podem se tornar uma nova classe para o desenvolvimento de drogas antibacterianas (KHILLARE et al., 2017).

2.6 CÂNCER: CONCEITO E CONSIDERAÇÕES GERAIS

Durante muito tempo, pouco se sabia sobre o câncer, e era nula a capacidade dos médicos em evitar o sofrimento e as mortes que causava. O câncer passava despercebido na sociedade, e se constituía como parte de uma grande lista de doenças que impunha sofrimento e morte (DAVID; ZIMMERMAN, 2010)

Historicamente, David e Zimmerman (2010), relataram que os egípcios já se referiam ao câncer como extensos inchaços no século 30 a.C. Ainda, conforme David e Zimmerman (2010), Hipócrates (410 a 360 a.C.), usou as palavras carcinos

(caranguejo) e carcinoma para descrever uma variedade de tumores e inchaços e por apresentar uma “aparência de caranguejo” de alguns tipos de câncer que deu origem à associação desses nomes com a doença.

O câncer é considerado uma doença genética complexa, caracterizada pelo crescimento desordenado de suas células (INCA, 2017; SHEN; LAIRD, 2013). De acordo com Hanahan (2014), as mutações nos oncogenes (superexpressão) e nos genes supressores de tumor (silenciamento), favorecem a reativação ou modificação de programas celulares que controlam os processos de multiplicação, migração, diferenciação e apoptose (OUYANG et al., 2012; SUN; WANG, 2010). Dessa forma, as células malignas tornam-se diferentes das células normais por mostrarem capacidade de multiplicação ilimitada, autossuficiência quanto aos fatores de crescimento, manutenção da angiogênese, evasão da apoptose e potencial de invasão e migração para diferentes tecidos do organismo (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

O processo de carcinogênese ocorre de forma lenta, podendo levar anos para células cancerosas se proliferarem e originarem um tumor visível (INCA, 2017). A carcinogênese é um processo complexo que ocorre em estágios múltiplos, envolvendo geralmente mais de uma alteração genética nos oncogêneses e nos genes supressores de tumor. Quando ocorrerem falhas nos sistemas de reparo e nos mecanismos de morte celular por apoptose, as células cancerígenas passam a proliferar de forma descontrolada, gerando os tumores (LABI; ERLACHER, 2015).

O desenvolvimento do câncer está relacionado à exposição a fatores carcinógenos exógenos e endógenos (ADAMI et al., 2018). Os fatores carcinógenos exógenos correspondem a aproximadamente 80 % dos casos e inclui os hábitos alimentares (dietas inadequadas), estilo de vida (consumo excessivo de bebidas alcoólicas, sedentarismo, tabagismos e uso de drogas), agentes físicos (radiação ionizante e não ionizante), agentes químicos (produtos químicos) e agentes biológicos (*Helicobacter pylori*, vírus *Epstein Barr*, vírus do papiloma humano - HPV, vírus da hepatite B, parasitas como *Schistosoma haematobium* e *Clonorchis sinensis*); enquanto que os fatores carcinógenos endógenos compreendem a constituição genética do indivíduo, idade, equilíbrio do sistema endócrino, danos ao sistema imunológico, condição fisiológica e inflamações de origem desconhecida, tais como, colite ulcerosa e pancreatite (BRAY et al., 2018; INCA, 2017).

2.7 MECANISMO RESISTÊNCIA EM CÉLULAS CANCERÍGENAS

A resistência das células cancerígenas a classes estruturais e mecanicamente diferentes de drogas anticâncer é conhecida como resistência a múltiplas drogas (MDR) (GOTTESMAN et al., 2002). As células cancerígenas assim como células bacterianas, também apresentam tais mecanismos de resistência a medicamentos, representando um desafio na descoberta de novos agentes que possam reverter ou inibir tais mecanismos. Como exemplo pode-se citar transportadores membros da família ABC, como será detalhado mais adiantes, são conhecidos pela comunidade científica, dos oncologistas e pesquisadores do câncer por sua capacidade efluir compostos terapêuticos, o que leva a resistência aos medicamentos utilizados em tratamento. Estudos recentes sugerem que proteínas pertencentes à família ABC podem atuar com outras funções na biologia do tumor, porém, até o presente momento está comprovada sua correlação com as características do câncer e ao efluxo de substratos em células tumorais (FLETCHER et al., 2010).

Silva et al. (2018) em seu estudo, correlacionou a ocorrência de resistência a quimioterápicos com seis mecanismos distintos todos ligados à acidez extracelular: transportadores de drogas por meio de efluxo, bomba de prótons, indução da via de Resposta às proteínas mal enoveladas (UPR) e autofagia.

As células podem desenvolver um mecanismo de quimiorresistência ao expulsar a droga, por meio de um mecanismo de efluxo. Para isso, é necessária a ativação de glicoproteínas de membrana. As proteínas pertencentes à família dos transportadores de cassetes de ligação de ATP (ABC) é a principal família de transportadores de efluxo de drogas estando presentes nas membranas plasmáticas e nos compartimentos intracelulares (FAN et al., 2013; VISIOLI et al., 2014). Essas proteínas usam a energia da hidrólise de ATP para desempenhar importantes papéis fisiológicos no transporte de compostos hidrofóbicos contra seus gradientes de concentração, a partir de uma ampla variedade de substratos, incluindo peptídeos, lipídios e agentes quimioterapêuticos (GILLET et al., 2007; UEDA, 2011; YU 201).

As bombas de prótons como V-ATPases são proteínas ativadas por ATP responsáveis pelo transporte de prótons contra seu gradiente de concentração. Transportam o soluto para o interior celular, mantêm a composição iônica intracelular e o equilíbrio osmótico entre os compartimentos intra e extracelular. A V-ATPase é

uma enzima presente na membrana de algumas organelas e na membrana plasmática das células, sendo importantes no transporte de prótons do citosol para o lúmen de vesículas intracelulares ácidas, bem como do citosol para o ambiente extracelular (LAM et al., 2001; LI et al., 2016).

Nas células cancerígenas, a quantidade de V-ATPases é aumentado e ocorre o fenômeno do gradiente do pH inverso: as células tumorais exportam prótons tornando o pH extracelular muito ácido e pH intracelular neutro (FEDERICI et al., 2014). Esse gradiente invertido do pH pode diminuir a absorção e retenção do fármaco no compartimento intracelular, tendo vista que a absorção dos fármacos depende do pH (PONTE-SUCRE et al., 2007; KRISHNAMURTHY et al., 2013).

É importante compreender que absorção de agentes quimioterápicos em células cancerígenas depende do pH intra e extracelular, ou seja, drogas consideradas bases fracas requerem um pH intracelular ácido e um pH extracelular básico, para que sejam absorvidas. Sendo que quanto mais ácido o meio induzido pelo tumor, menor a absorção e ação de drogas fracamente básicos e maior é a absorção de medicamentos fracamente ácidos (RAGHUNAND; GILLIES, 2000). Isso ocorre porque as drogas que são ácido fracos têm afinidade com ambientes alcalinos e drogas fracamente básicas são absorvidos mais ativamente em microambientes ácidos. Ao tornar o microambiente ácido, o metabolismo tumoral induz o aprisionamento de íons, interferindo na distribuição do medicamento, gerando por exemplo maior acúmulo de quimioterápicos básicos nas áreas de baixo pH em tumores ácidos, em sua região extracelular, o que dificulta a absorção do medicamento (RAGHUNAND; GILLIES, 2000; RAGHUNAND et al., 2003).

Foi destacado por Silva et al. (2018), que a Resposta às proteínas mal enoveladas (UPR) e autofagia também parecem desempenhar influência na quimiorresistência causada pela acidez do microambiente. Como resposta hipóxia, privação de nutrientes e pH ácido, ocorre stress no retículo endoplasmático ativando a via UPR, ou seja, enquanto as bombas de prótons e os moduladores de efluxo de medicamentos causam resistência ao impedir que o medicamento entre na célula, os efeitos da ativação da UPR e da autofagia estão associados ao aumento da resistência à morte celular, em geral.

2.8 RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS EM CÉLULAS CANCERÍGENAS MEDIADA POR TRANSPORTADOR ABC

Os transportadores ABC são um grupo de proteínas transportadoras ativas que estão presentes tanto em procariontes, quanto em eucariontes (SHUKLA et al., 2008; WU et al., 2011). Foram isoladas 49 proteínas dessa família. Ela ainda é dividida em sete subfamílias que vai de ABCA a ABCG. Estruturalmente, as proteínas ABC têm dois domínios de ligação a nucleotídeos (NBDs) e dois domínios de ligação transmembranar (TMDs) (TIWARI et al., 2011; WU et al., 2011).

Foi comprovada até o momento a existência de aproximadamente 15 proteínas ABC específicas, envolvidas na resistência a múltiplas drogas (MDR), dentre elas a Pgp, MRP1, MRP7 e BCRP (LI et al., 2016). Diversos estudos estão avaliando as funções secundárias dos transportadores ABC, além do efluxo de drogas, determinando se o aumento da expressão do transportador ABC contribui ou não para a progressão do câncer independentemente do efluxo da droga, utilizando para tais estudos, linhas de células tumorais ou pequenos cortes de tumores e verificando sua expressão de transportadores ABC (SZAKÁCS et al., 2004; STEINBACH et al., 2006; HEIMERL et al., 2007; GROUW et al., 2006; PARK et al., 2006).

Essas proteínas podem ser classificadas topologicamente com base na sequência dos domínios de ligação aos nucleotídeos, NBDs, também conhecidos como domínios ABC (DEAN; ALLIKMETS, 1995; DEAN et al., 2001; DEELEY et al., 2006). No NDB esses domínios ABC são conservados evolutivamente, sendo responsáveis pela ligação e extrusão de substratos endógenos e xenobióticos para fora da célula (ASSARAF et al., 1994; ASSARAF, 2007). A região do NBD é responsável pela hidrólise do ATP via ATPase, sendo indispensável para conferir a resistência a múltiplas drogas (AMBUDKAR et al., 2006; DEAN, 2009; GOTTESMAN et al., 2002).

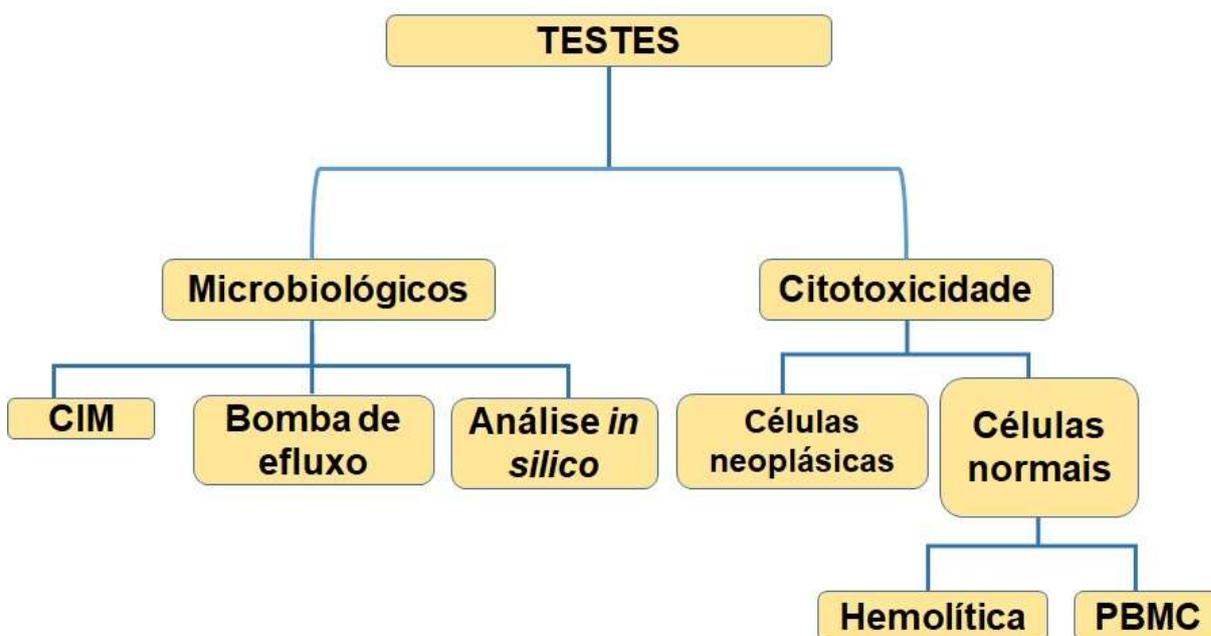
Os quatro principais mediadores ABC do efluxo de drogas anticâncer das células, são: ABCB1 (ou MDR1/P-gp), ABCC1 (ou MRP1), ABCC10 (ou MRP7) e ABCG2 (ou BCRP/MXR). O ABCB1 foi o primeiro transportador ABC identificado (JULIANO; LING, 1976; UEDA et al., 1986). Foi possível comprovar uma correlação negativa entre a expressão ABCB1 com o perfil de sensibilidade do medicamento paclitaxel, um inibidor mitótico, sugerindo que a superexpressão dessa bomba de efluxo leva à resistência ao paclitaxel (ALVAREZ et al., 1995). A glicoproteína P (P-gp) é um produto do gene ABCB1 (ou MDR1), está presente na superfície da membrana celular, sendo importante para a eliminação de toxinas do corpo (LAM et

al., 2001). É amplamente estudada e reconhecida por induzir resistência a múltiplas drogas em células cancerígenas, agindo como uma bomba de efluxo e transportando o quimioterápico para fora da célula (PONTE-SUCRE et al., 2007).

A bomba de efluxo ABCC1 ou MRP1, foi encontrada pela primeira vez nas linhas celulares resistentes à antraciclina, como a H69AR e HL60 onde pose conferir resistência a tais medicamentos (BAKOS et al., 1998; COLE et al., 1992; KRUH; BELINSKY, 2003). Já a proteína ABCC10 contém três domínios presentes na membrana plasmática MSD1, MSD2 e MSD3 e dois domínios de nucleotídeo (DENG et al., 2013; KRUH et al., 2007). É uma proteína que se expressa em altos níveis no câncer de pulmão de células não pequenas e leucemia mielóide aguda após quimioterapia, responsável pela resistência adquirida (HU et al., 2011). A superexpressão da proteína ABCG2 está correlacionada com a resistência clínica aos quimioterápicos na leucemia mielóide (TANG et al., 2012; VAN DEN HEUVEL-EIBRINKET al., 2002). Sua superexpressão também foi observada em subpopulações de células-tronco e outros tumores, incluindo neuroblastomas, sarcomas de Ewing, câncer de mama, câncer de pulmão e glioblastomas contribuindo assim para a recaída (HIRSCHMANN-JAX et al., 2004).

A exemplo de agonistas que possuem efeito inibidor de efluxo comprovado pode-se citar um derivado de fenil-aminotiazol, o masitinibe, que foi relatado como um inibidor de c-Kit, um receptor de membrana tipo tirosina-quinase, e PDGFR alfa e beta, um receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (DUBREUIL et al., 2009; LE CESNE et al., 2010) e como inibidor da bomba de fluxo ABCC10 e ABCG2 (KATHAWALA et al., 2014a, 2014b). Este medicamento também parece aumentar o efeito citotóxico e quimioterápicos em células que expressam ABCG2 (KATHAWALA et al., 2014a). Logo o estudo e desenvolvimento de compostos bioativos que possam agir na inibição de efluxo em células tumorais, são de extrema importância no combate a resistência na terapia do câncer.

3 MATERIAIS E MÉTODOS



3.1 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS

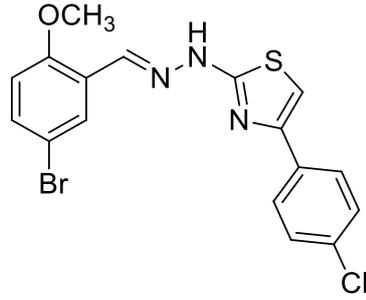
Os derivados pertencentes as classes do tiazol (série NJ) e tiazolidinedionas (séries ST e SW) foram fornecidos pelo Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), coordenado pela Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima. A síntese de derivados da série NW avaliados neste estudo foi obtida, conforme descrito por Silva et al. (2018).

Um total de 19 amostras foram fornecidas, sendo seis tiazóis e treze tiazolidinedionas. A Tabela 1 apresenta os derivados das classes acima citados.

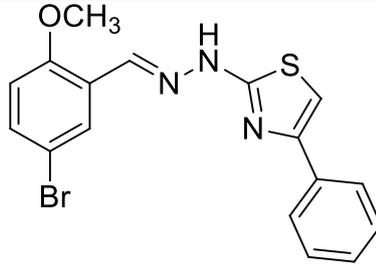
Tabela 1 – Estruturas químicas dos derivados pertencentes as classes do tiazol (série NJ) e tiazolidinediona (séries ST e SW).

Códigos	Estruturas químicas
	Derivados tiazólicos

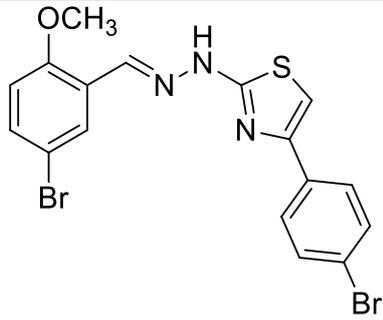
NJ16



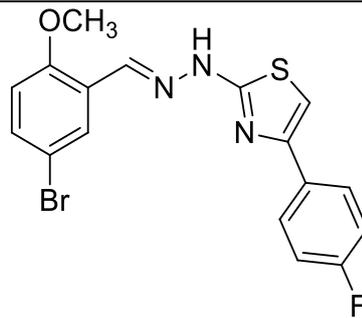
NJ17



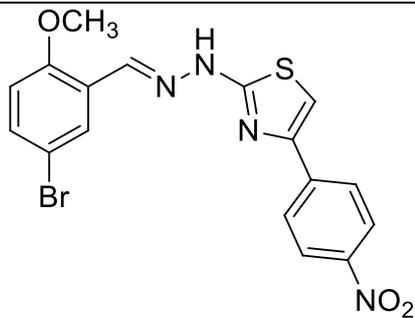
NJ18



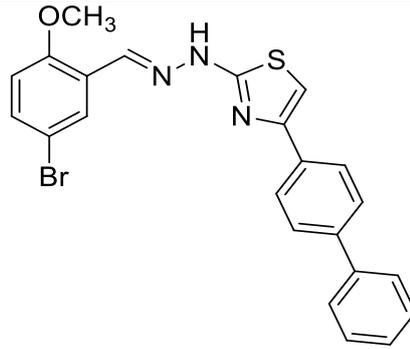
NJ19



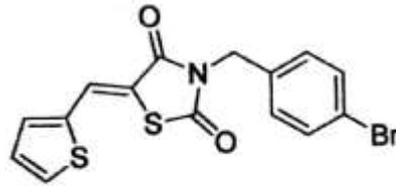
NJ20



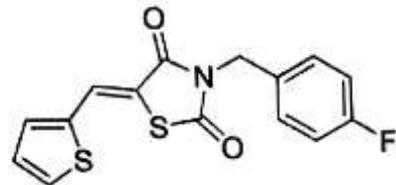
NJ21

**Derivados tiazolidinediônicos**

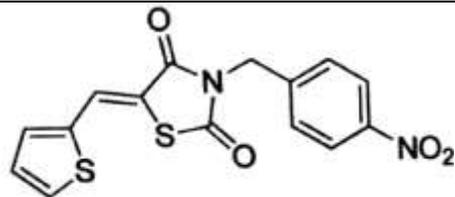
ST01



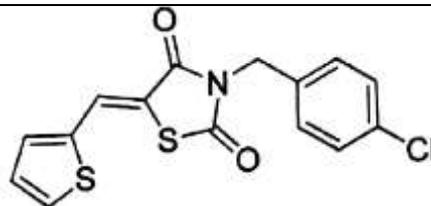
ST02



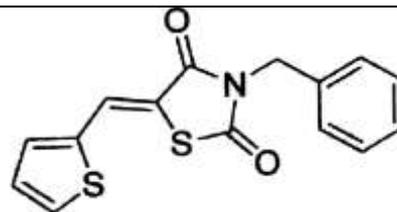
ST03



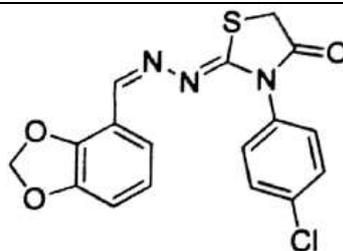
ST04



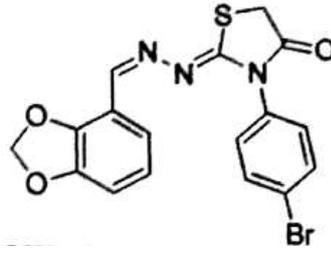
ST05



NW05



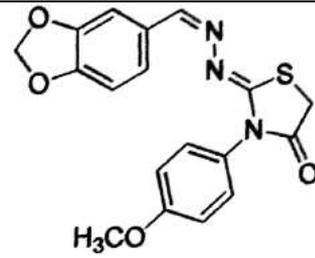
NW06



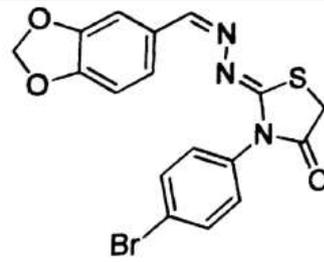
NW07



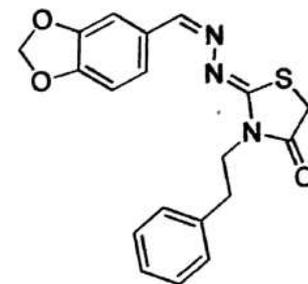
NW10



NW17



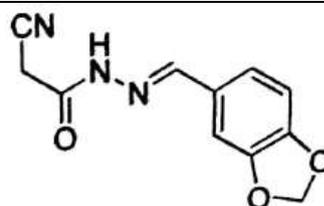
NW18



NW19



NW21



3.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA ANTIBACTERIANA

3.2.1 Linhagens bacterianas utilizadas

Para essa atividade foram utilizadas duas linhagens de *Staphylococcus aureus*, SA 1199 e a SA 1199B, as quais expressam o gene *norA*, que codifica de proteína de efluxo NorA, este atuando principalmente frente às fluoroquinolonas (KAATZ; SEO, 1995; KAATZ; SEO; RUBLE, 1993). As estirpes foram gentilmente cedidas pelo professor Simon Gibbons (Universidade de Londres), e foram mantidas em infusão de coração em Agar. Antes dos ensaios, as linhagens foram cultivadas por 24 h a 35 °C em caldo de infusão de cérebro e coração.

3.2.2 Substâncias utilizadas

Dos 19 derivados, somente 15 foram utilizados, os pertencentes as classes dos tiazóis (série NJ) e das tiozolidinedionas (SW), fornecidos pelo Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), coordenado pela Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima.

3.2.3 Antibiótico

O antibiótico utilizado, Norfloxacin e suas soluções estoque foram preparadas de acordo com as diretrizes da CLSI (CLSI., 2015).

3.2.4 Teste da concentração inibitória mínima (CIM)

Para distribuição na placa de CIMrodiluição foram preparados tubos eppendorf® contendo cada um deles 1 mL de solução contendo 900 µL de BHI 10 % e 100 µL da suspensão bacteriana, previamente diluída em solução salina de acordo com a escala de McFarland, 0.5, até estabelecer 10^5 UFC. A placa de 96 poços foi preenchida no sentido numérico, adicionando-se 100 µL desta solução em cada poço, procedendo-se a microdiluição seriada com 100 µL da solução da substância testada, variando nas concentrações de 512 a 0,5 µg/mL. As placas foram levadas à incubadora por 24 horas a 37 °C (NCCLS, 2003). A revelação da CIM bacteriana foi feita utilizando-se 20 µL de resazurina. Sendo que a mudança de cor do meio de

azul para vermelho indica a presença de crescimento bacteriano e a permanência em azul, indica a ausência de crescimento. O controle negativo usado como medida de comparação para a substância testada foi o grupo do antibiótico norfloxacin. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.2.5 Ensaio de inibição de bomba de efluxo por redução do CIM do antibiótico

Para verificar o efeito de redução da concentração inibitória mínima (CIM) do antibiótico, foram utilizados inóculos bacterianos preparados com solução salina anteriormente esterilizada e uma alíquota de bactérias recolhidas de placas de Petri, esta anteriormente incubadas em estufa bacteriológica por 24 h a 37 °C, de forma que o inóculo final siga o padrão de turbidez correspondente a escala de McFarland 0.5 que corresponde a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) / mL. Como etapa inicial, foram preparados em eppendorfs®, o meio de distribuição correspondente às substâncias testadas e os controles norfloxacin.

No teste foram colocados 150 µL do inóculo da sub-inibitória (CIM/8), foi obtida utilizando-se como base o resultado do teste de concentração inibitória mínima, onde a concentração determinada como inibitória, foi em seguida dividida por oito e utilizada nessa etapa de avaliação de inibição de bomba de efluxo. Após colocar 150 µL do inóculo, foi complementado o eppendorf® com meio de cultura até atingir-se o volume de 1,5 mL. Para o controle foi colocado o mesmo volume de inóculo e completado o volume do eppendorf® novamente com BHI até atingir-se 1,5 mL. Em seguida foram transferidos para placas de microdiluição de 96 poços, retirando-se 100 µL do conteúdo do eppendorf® e distribuído em cada poço. Em seguida foram realizadas a microdiluição do antibiótico, adicionando-se 100 µL deste no meio até penúltima cavidade, em uma proporção de 1:1. Na última cavidade não foi realizada microdiluição por ser o controle de crescimento bacteriano. As concentrações variaram de 512 µg/mL a 0,5 µg/mL, do primeiro ao último poço, respectivamente. Para o controle do antibiótico foi utilizada a solução preparada anteriormente. Após 24h foi realizado a leitura das placas da mesma forma citada no item 4.3.4. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. A redução da CIM do antibiótico específico, em cepas portadoras de bomba de efluxo, é um indicativo de inibição de bomba de efluxo. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.3 ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR

3.3.1 Procedimento de modelagem e ancoragem da NorA (docking)

A previsão da estrutura tridimensional e a identificação de potenciais bolsões de ligação de efluxo de NorA é baseada na concordância do estudo de Dos Santos et al. (2018). As simulações de acoplamento foram realizadas pelo servidor *SWISSDOCK* (www.swissdock.ch/) (GROSDIDIER; ZOETE; CIMHIELIN, 2011). Todas as coordenadas das estruturas químicas foram geradas usando CORINA e a carga parcial *Gasteiger* também foi utilizada. Antes de realizar o acoplamento molecular, a proteína NorA foi modelada de acordo com Dos Santos et al. (2018) e todos os arquivos foram preparados usando ferramenta de preparação *Dock* disponível no pacote de software livre *UCSF Chimera*. As corridas de ancoragem (*Docking*) flexíveis foram executadas às cegas cobrindo toda a proteína e definindo uma região de coordenadas de interesse com 5 Å desta coordenada ($x = -29,78$, $y = 49,65$, $z = 71,78$ e tamanho de caixa com $x = 46,00$, $y = 38,00$ e $z = 30,00$) da proteína como bolsa de ligação para garantir uma abordagem de encaixe cego. Os resultados do docking foram visualizados com a ajuda do programa de visualização *UCSF Chimera* e o *Discovery studio* (DS) foi utilizado para detalhar como os tiazóis (NJ 16 e NJ 17) interagem com o NorA.

3.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA TUMORAL *IN VITRO*

3.4.1 Linhagens celulares

As linhagens tumorais (Tabela 2) utilizadas para a avaliação da atividade antitumoral foram obtidas da seção de culturas celulares do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas de acordo com o protocolo estabelecido pelo Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Tabela 2 – Linhagens celulares utilizadas nos experimentos de citotoxicidade *in vitro*.

Linhagem celular	Doença	Origem	Meio de cultivo	Concentração (células/mL)
------------------	--------	--------	-----------------	---------------------------

HL-60	Leucemia promielocítica aguda	Humana	RPMI	0,3 x 10 ⁶
K562	Leucemia mieloide crônica	Humana	RPMI	0,3 x 10 ⁶
NCI-H292	Carcinoma mucoepidermoide de pulmão	Humana	DMEM	10 ⁵
HCT116	Câncer de cólon humano	Humana	DMEM	10 ⁵
HT29	Adenocarcinoma de cólon	Humana	DMEM	10 ⁵
MCF7	Adenocarcinoma de mama humano	Humana	DMEM	10 ⁵
P815	Mastocitoma	Rato (<i>Mus musculus</i>)	DMEM	10 ⁵
L929	Tecido conjuntivo (fibroblasto)	Rato (<i>Mus musculus</i>)	DMEM	10 ⁵
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico	Humana	RPMI	1,0 x 10 ⁶

3.4.2 Célula mononuclear do sangue periférico humano (PBMC)

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas de doadores saudáveis e voluntários do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE e serviram como modelo para avaliar a atividade citotóxica sobre células humanas normais (Tabela 2). O projeto foi submetido ao Comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Pernambuco (processo nº 18031519.7.0000.5208).

3.4.3 Índice de seletividade

A citotoxicidade para PBMC e para linhagens tumorais foram comparadas utilizando o índice de seletividade (IS), que consiste na razão entre o CI₅₀ de PBMC

e CI_{50} das linhagens tumorais. Os resultados de índice de seletividade foram considerados significativos quando ($IS \geq 2,0$).

3.4.4 Manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares foram manuseadas em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical (Filterflux) e mantidas em incubadoras de CO_2 a $37\text{ }^\circ\text{C}$ com atmosfera de 5 % de CO_2 (LABOVEN, modelo HF-212 UV).

As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas de cultura de células. Os meios DMEM e RPMI 1640 suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) foram utilizados. O tipo de meio utilizado variou de acordo com a linhagem celular utilizada (Tabela 1). Diariamente acompanhava-se o crescimento das células em microscópio invertido (LEITZ, modelo Diavert).

Para a manutenção de células aderidas, retirou-se o meio, lavou-se a garrafa 2x com PBS (*Phosphate Buffer Solution*) estéril e, em seguida, utilizou-se tripsina + EDTA (0,5 %) para que as células se desprendessem da garrafa. Parte das células era removida da garrafa e o volume preenchido com meio completo. Para a manutenção de células suspensas trocava-se apenas parte do meio de cultura.

3.4.5 Atividade citotóxica

3.4.5.1 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais - MTT

Este teste baseia-se na conversão do sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-tetrazólio (MTT) em cristais de formazan, pela ação da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria de células viáveis (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983). Esta enzima reduz o sal de tetrazólio solúvel e de cor amarela e converte-o num produto insolúvel de cor violeta (cristais de formazan), cuja quantidade pode ser determinada por espectrofotometria, onde a intensidade da cor resultante da dissolução dos cristais de formazan é proporcional à atividade da enzima e, por conseguinte ao número de células viáveis (VAN MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011).

Inicialmente, os 19 novos compostos tiazolidínicos e tiazólicos foram testadas em concentração única (50 $\mu\text{g/mL}$), para avaliação do potencial citotóxico utilizando

7 linhagens celulares tumorais (HL-60, K562, NCI-H292, HCT-116, HT29, MCF7 e P815) e uma célula normal (L929). Nessa triagem (*screening*) inicial, foram consideradas ativas, e, portanto, selecionadas, as amostras que apresentaram percentual de inibição do crescimento celular maior ou igual a 75 % em pelo menos uma das linhagens testadas. Em seguida, os compostos selecionados foram testados para a determinação de suas CI_{50} (concentração capaz de inibir 50 % do crescimento celular), como descrito a seguir.

As células tumorais foram semeadas ($1,0 \times 10^5$ células/mL para linhagens aderidas e $0,3 \times 10^6$ células/mL em suspensão) em placas de 96 poços. Em seguida as substâncias previamente dissolvidas em DMSO, 100 μ L. Poço⁻¹, (Dimetilsufóxido), foram diluídas em série em meio DMEM ou RPMI para obtenção das concentrações (0,39 – 25 μ g.mL⁻¹) e adicionadas nas placas de 96 poços (100 μ L. Poço⁻¹). A doxorrubicina foi utilizada como padrão. Após 72h de contato das células com os compostos o sobrenadante foi aspirado e foram adicionados 25 μ L de solução de MTT ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)] (Sigma-Aldrich®) na concentração de 5 mg.mL⁻¹. As placas foram deixadas por 3 h em estufa a 37 °C e ao final desse período, 100 μ L de DMSO foram adicionados a cada poço para a dissolução dos cristais de formazan. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas (Modelo 3550 BIO-RAD, Inc.) no comprimento de onda de 560 nm e o efeito dos compostos foi quantificado pela comparação com a absorbância do grupo controle. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.4.5.2 Ensaios de seletividade para as células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

As células foram isoladas a partir da amostra de sangue periférico humano através do método padrão de centrifugação por gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque (GE Health Care). Após a separação por ficol as células foram lavadas por 2 vezes e posteriormente contadas em Câmara de Neubauer. Os ensaios prosseguiram apenas quando a viabilidade celular foi superior a 98%. As células foram plaqueadas em placa de 96 poços (10^6 células/poço) e mantidas em estufa de atmosfera úmida a 37 °C, com 5 % de CO₂. Após 24 horas, foram adicionados os derivados dos tiazóis (série NJ) e das tiazolidinedionas (séries ST e NW) nas concentrações que variaram de 0,192 a 25 μ g/mL. Após 72 horas em estufa a 5 %

de CO₂ a 37 °C, foi adicionada a solução de MTT (0,5 mg/mL), e incubado por 3 horas. Em seguida, foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO), 100 µL, em todos os poços e a absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 560nm (Biotek UV-VIS 200). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.4.5.3 Atividade hemolítica

Os eritrócitos foram lavados com solução salina (NaCl 0,85 % + CaCl₂ 10 mM) por centrifugação (3000 rpm, 5min), o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em solução salina para se obter uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2 %. Este experimento foi realizado em placas de 96 poços: 100 µL de solução salina (controle negativo); 50 µL da solução salina e 50 µL do veículo (branco); 80 µL de solução salina + 20 µL de Triton X – 100 a 1% (controle positivo); 100 µL de solução salina + 100 µL dos derivados e fases que apresentaram citotoxicidade em células tumorais (0,01525 a 2000 µg/mL) diluídas em DMSO a 10% foram plaqueados. Em seguida, 100 µL da solução de eritrócitos foram plaqueadas em todos os poços. Após incubação de 1 h, sob agitação constante à temperatura ambiente, a placa permaneceu em repouso por um período de 1 h, onde o sobrenadante foi transferido para outra placa e a absorbância foi medida em um leitor de placa de microdiluição no comprimento de onda de 560 nm. Amostras com valores de CE₅₀ < 200 µg/mL são consideradas hemolíticas (COSTA-LOTUFO et al., 2002). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Nos ensaios de citotoxicidade em cultura de células foram calculadas as CI₅₀ a partir das curvas dose-resposta por regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism® (versão 6).

Para os testes microbiológicos, a significância estatística foi avaliada através do software GraphPad Prisma® (versão 5.0), realizando-se ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni como *post hoc*, onde $p < 0,05$ é considerado significativo.

4 RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE BIOLÓGICA BACTERIANA

4.1.1 Atividade antibacteriana

Os derivados do tiazol (NJ) e da tiazolidinediona (SW) testados não apresentaram atividade antibacteriana intrínseca, fato comprovado pelo alto valor da concentração inibitória mínima (CIM), considerada irrelevante, por estar acima de 1000 µg/mL (HOUGHTON et al., 2007). Entretanto, uma das vantagens dos inibidores eficazes da bomba de efluxo é a ausência de atividade antibacteriana, uma vez que a falta dessa atividade evita o desenvolvimento de uma possível resistência bacteriana às substâncias em questão (BHARDWAJ; MOHANTY, 2012), o que levou a investigar suas ações como inibidores da bomba de efluxo.

4.1.2 Atividade inibitória dos compostos frente a bomba NorA contra a cepa SA 1199B multirresistente

Na Figura 6, os compostos NJ16, NJ17, NJ18 e NJ20 apresentaram efeito inibitório sinérgico com a norfloxacin contra a estirpe selvagem tipo SA 1199. Em relação à estirpe mutante 1199B, que transporta a bomba NorA, observou-se também um efeito sinérgico com a norfloxacin para os compostos NJ16, NJ17, NJ18 e NJ20. Já os compostos NJ19, NJ21 apresentaram efeito antagônico quando associados à norfloxacin contra ambas as cepas.

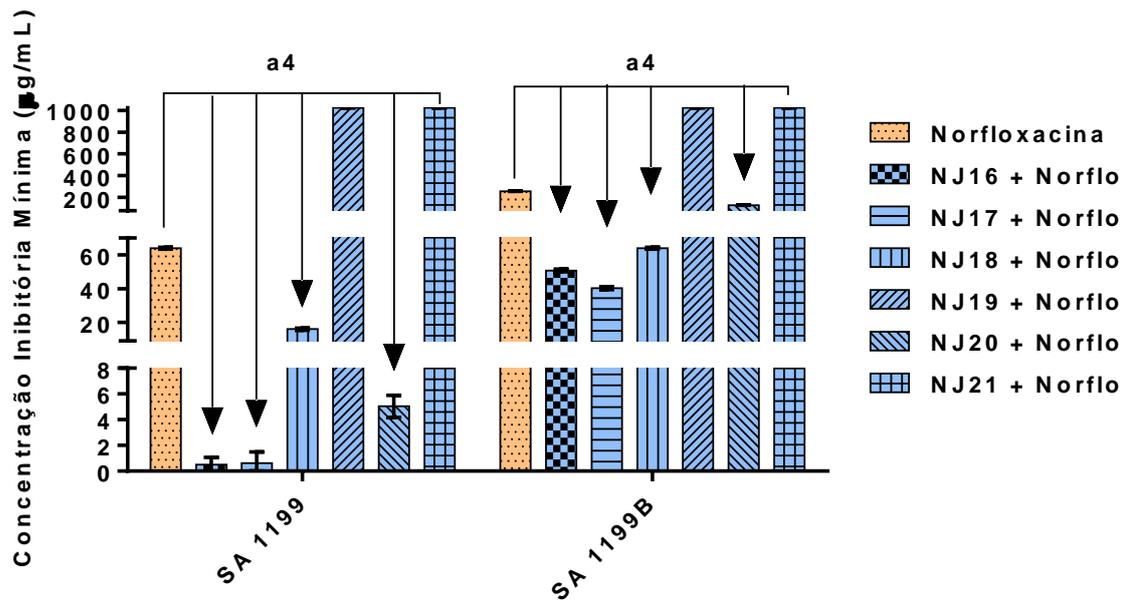


Figura 6 – A capacidade de substâncias da série NJ em inibir bombas de efluxo NorA em estirpes multirresistentes SA 1199B, em associação com norfloxacina, comparativamente com a estirpe SA1199 de tipo selvagem, desprovida da bomba. Os valores representam a média geométrica \pm S.E.M. (erro padrão da média). Two-way ANOVA, seguido pelo teste post-hoc de Bonferroni. a4: $p < 0,0001$ vs controle antibiótico; Norflo: Norfloxacina.

De acordo com a Figura 7, as moléculas NW05, NW10, NW18, NW19 e NW21 apresentaram efeitos sinérgicos quando associadas à norfloxacina contra a cepa SA 1199 (selvagem) e a cepa com superexpressão de NorA, a SA 1199B, quando comparados ao controle norfloxacina.

Um efeito antagônico foi observado com as combinações entre a norfloxacina e as substâncias NW06, NW07 e NW17, onde uma concentração maior de norfloxacina foi necessária para inibir o crescimento bacteriano.

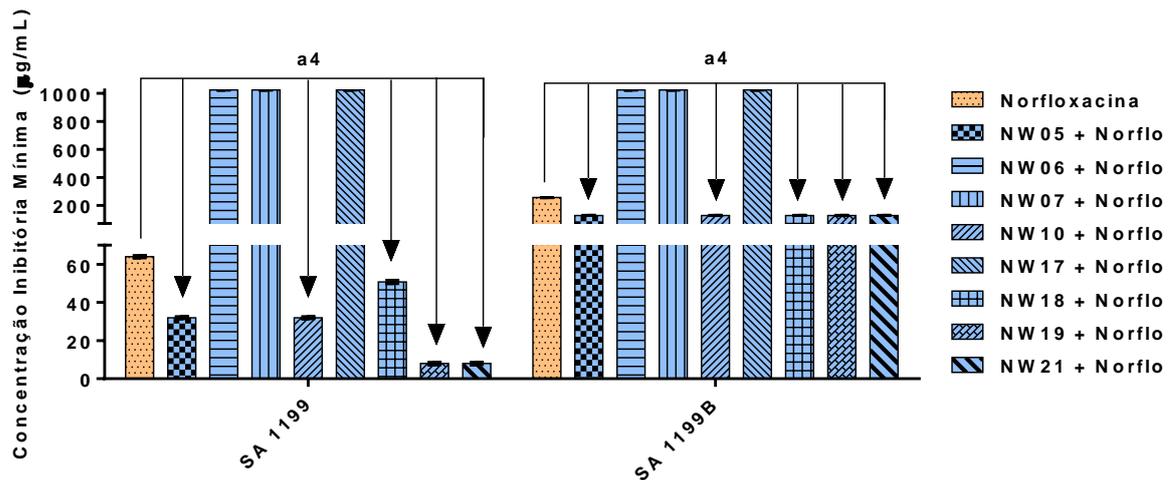


Figura 7 – Capacidade de substâncias NW associadas à norfloxacina para inibir a bomba de efluxo NorA em estirpes multirresistentes SA 1199B, em comparação com a estirpe SA1199 de tipo selvagem desprovida da bomba. Os valores representam a média geométrica \pm S.E.M. (erro padrão da média). Two-way ANOVA, seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. a4: $p < 0,0001$ vs controle antibiótico; Norflo: Norfloxacina.

A redução na concentração inibitória já é bem conhecida na literatura como uma indicação de inibição da bomba de efluxo (COSTA et al., 2013). Segundo pesquisas realizadas, uma redução da concentração inibitória mínima em três vezes ou mais, usando o método de microdiluição em caldo é indicativo de um efeito inibitório da bomba (COSTA et al., 2011, 2013; SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013). Esta redução foi observada para os compostos NJ16, NJ17, NJ18 e NJ20 quando associados à norfloxacina contra as cepas que expressam a NorA. Além disso, é importante destacar que o efeito sinérgico foi muito mais evidente na estirpe de tipo selvagem.

A série NJ, mostrou o melhor potencial para inibição da bomba de efluxo com uma redução 3 vezes na CIM da norfloxacina, como foi observado nos compostos NJ16, NJ17 e NJ20, onde o sinergismo maior foi observado contra a cepa selvagem com baixo nível de expressão da bomba NorA (SA 1199), caracterizando a mudança do fenótipo dessa cepa de resistente para sensível. Isto é evidente devido os pontos de corte de *S. aureus* para norfloxacina, nos quais a NJ16 e NJ17 obtiveram valores de CIM de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e NJ20 de 5 $\mu\text{g/mL}$, ou seja, uma concentração de inibição inferior à CIM do ponto de corte de linhagens de *S. aureus* sensíveis, que

corresponde a ≤ 4 $\mu\text{g/mL}$; enquanto a CIM determinada para o ponto de corte de linhagens de *S. aureus* resistentes à norfloxacin é ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2003).

A inibição da bomba de efluxo observada no presente estudo corroborou com a análise *in silico*, pois os grupos substituintes dos compostos tais como cloro da série NW não apresentaram grande influência na ação de inibição da bomba por essas moléculas. Além disso, moléculas da série NW apresentaram um efeito antagônico, mais especificamente a NW6 e NW17, sendo que, as características estruturais de ambas contam com a adição de bromo em seus grupos substituintes. Vale ressaltar que o antagonismo observado em muitas associações de drogas pode estar relacionado a um efeito de quelatação do antibiótico, onde os grupos de ligação presentes nessas moléculas podem formar ligações com o antibiótico e evitar que atuem no alvo (GRANOWITZ; BROWN, 2008).

Os compostos NJ16, NJ17 e NJ18, já mencionados anteriormente, mostraram efeito potencial para inibição da bomba de efluxo. Nestes compostos, a presença de vários grupos funcionais que atuam como locais de ligação à bomba, pode ter favorecido este efeito. Sabe-se na literatura que moléculas com muitos ligantes podem interagir melhor com bombas de efluxo e causar sua inibição (ARON; OPPERMAN, 2016; BUONERBA et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2018).

A inibição da bomba de efluxo é uma das principais estratégias no controle da resistência bacteriana. Existem várias maneiras pelas quais os inibidores da bomba de efluxo podem atuar, tais como: desacoplamento de energia, ligação direta e inibição da bomba, inibição da expressão gênica da bomba, quelatação de ferro necessária para a ação da bomba, alterações na fluidez da membrana. Além disso, inibidores da bomba de efluxo podem ser peptidomiméticos e análogos de antibióticos (BHARDWAJ; MOHANTY, 2012). Diante de tais observações, acredita-se que a ligação direta à proteína foi um dos principais mecanismos responsáveis pelo efeito observado.

4.2 Modelagem molecular e estudos de ancoragem (*docking*)

Neste estudo, apenas os compostos que mostraram atividade significativa contra a estirpe SA 1199B multirresistente foram utilizados no estudo de ancoragem. A Figura 8 mostra todas as posições de interação entre os aminoácidos presentes no local de ancoragem para o composto NJ16 (Figura 8A) e NJ17 (Figura 8C)

revelando a orientação de todos os possíveis modos de ligando dentro do local de ligação. Os ensaios de ancoragens realizados mostram complexos proteicos ligados a ligantes com clusters de saída, obtidos após cada execução. Os ensaios de ancoragem também mostraram que o *cluster* (agregado de átomos) apresenta estruturas com as melhores interações.

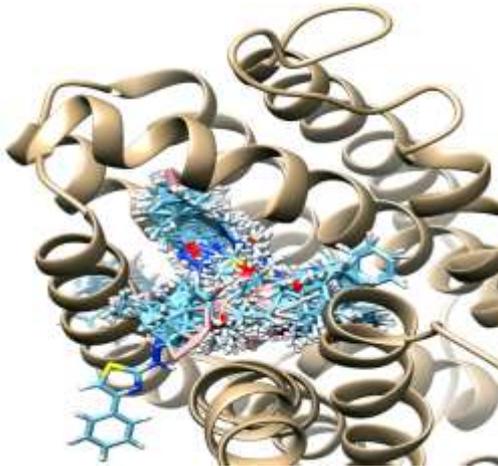
Estudos de ancoragem revelaram que os derivados tiazólicos foram registrados como os mais favoráveis com uma energia de ligação de -9,34 Kcal/mol para o composto NJ17 e -9,03 Kcal/mol para o composto NJ16 com diferentes tipos de interação envolvidos na estabilização do complexo (Van der Waals, ligação de hidrogênio, efeito eletrostático e interações pi-alquila, entre outros). O composto NJ16 apresenta interações do tipo Pi-Alquila entre ALA18 e bromo com uma distância de 4,31 Å, interações Pi-Pi entre TYR287 e benzeno com uma distância de 5,82 Å, interações do tipo Pi-Alquilo entre ALA339 e ILE341 e o grupo 1,3-tiazolidina com uma distância de 4,38 Å e 5,04 Å, respectivamente, interações Pi-Pi entre LEU269 e benzeno com uma distância de interações de 7.1Å e Pi-sigma entre LEU325 e benzeno com uma distância de 6,06Å (Figura 8B). Em média, o composto NJ17 apresentou interações mais significativas com o SER262 com ligações de hidrogênio com o grupo amina, com uma distância de 2,43Å. Outras interações do tipo Pi-alquilo entre LEU269 e bromo com uma distância de 4,32Å, interações alquila entre ALA339, ILE341, ALA261, ALA180 e anéis benzenos com uma distância de 5,0Å, 5,02Å, 4,53Å, 4,92Å e 3,55Å, respectivamente. Interações do tipo Pi-Pi entre PHE283 e 1,3-tiazolidina e anéis de benzeno com uma distância de 4,87 Å e 5,46 Å, respectivamente, foram encontradas para interagir com o complexo NorA (Figura 8D). A energia de ligação da interação para os diferentes compostos é mostrada na Tabela 3. Esses resultados corroboram com os ensaios de modulação *in vitro*.

Este estudo relata que a interação da tiazolidinediona e os compostos derivados do tiazol podem interferir nos mecanismos da bomba de efluxo. Os resultados dos ensaios de ancoragem corroboram com outros estudos atuais, nos quais as propriedades lipofílicas e de ligação de hidrogênio melhoram a capacidade de inibir essa bomba. Em estudos de realizados, as cadeias laterais lipofílicas mostraram-se importantes para a melhora da atividade antibacteriana (GUZ et al., 2001; LEWIS; JACOBS; DICKINS, 2004).

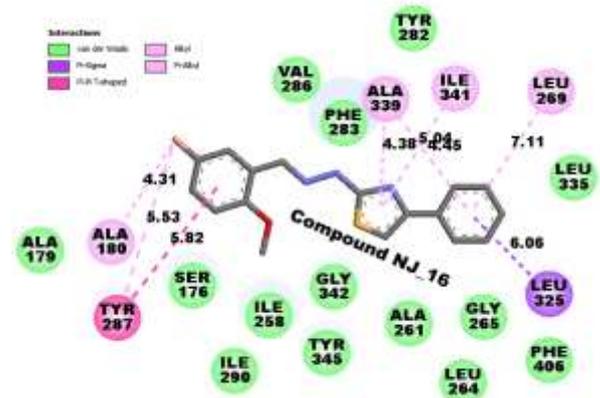
Tabela 3 – A ΔG energia de ligação com a NorA.

Compostos	Energia (Kcal/mol)
NJ16	-9.11
NJ17	-9.34
NJ18	-8.92
NJ19	-8.93
NJ20	-9.01
NJ21	-8.18
NW05	-8.99
NW06	-9.03
NW07	-8.60
NW10	-8.73
NW17	-9.00
NW18	-8.56
NW19	-8.60
NW21	-7.73

A



B



C



D

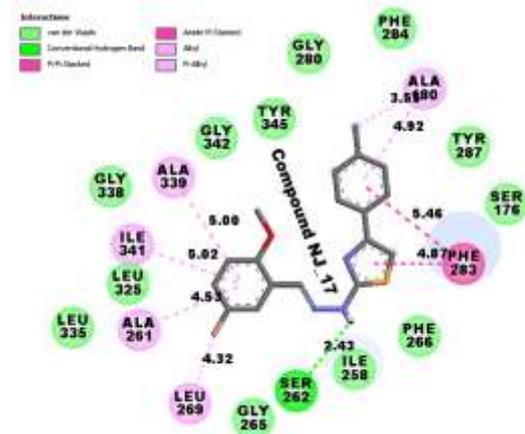


Figura 8 – Ancoragem demonstrando todas as posições possíveis para a interação entre a bomba de efluxo NorA e os compostos NJ16 (A) e NJ17 (C) com os Ligplots mostrando os resíduos envolvidos nas interações entre a bomba de efluxo NorA com a NJ16 (B) e NJ17 compostos (D) (modelo em bastão) (B).

Compostos derivados dos tiazóis acoplados com alquila têm sido relatados como inibidores da bomba de efluxo de *S. aureus* NorA (PEREIRA et al., 2019). O estudo QSAR mostra que os índices de E-state e os tipos de átomos de Alog P são importantes descritores responsáveis por descrever a atividade do alquil inibidores da bomba de efluxo à base de amida / imina (NARGOTRA et al., 2009). Esta hipótese também é validada neste estudo, onde o LogP teórico calculado pelo ALOGPS - VCCLAB, Laboratório Virtual de Química Computacional (<http://www.vcclab.org>), mostrou o composto NJ17 (LogP = 5,91) possui propriedades lipofílicas superiores ao composto NJ16 (LogP = 5,15) (TETKO et al., 2005).

Outros estudos sobre os mecanismos de interações moleculares demonstram que as interações hidrofóbicas e de pontes de hidrogênio são responsáveis pela estabilização dos derivados de fenotiazina a 3-fenil-1,4-benzotiazina (SABATINI et al., 2008). Meijer et al. (2003) mostraram que a seletividade do tiazol-metoxibenzil-tiourea é devido à presença da orientação de Arg141, o que favorece uma orientação estrutural capaz de estabilizar as interações hidrofóbicas π - π com outros aminoácidos. Interações similares também foram observadas aqui, o que pode em parte inferir que esses compostos derivados interferem no mecanismo da bomba NorA.

4.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS TUMORAIS

4.3.1 Percentual de inibição do crescimento celular (IC%)

A atividade citotóxica dos compostos expressos em valores de percentual de inibição do crescimento celular (IC%), na concentração de 50 μ g/mL, determinados pelo meio do ensaio de MTT estão resumidas na Tabela 4 e Figura 9. Inicialmente foi realizada uma triagem citotóxica dos derivados tiazólicos (NJ) e tiazolidinediônicos (ST e NW) em linhagens de células tumorais e normal. De acordo com Crouch e Slater (2001), o objetivo da triagem (*screening*) é mostrar potenciais

candidatos a futuros fármacos. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico dos compostos testados, sendo classificados em: alta atividade citotóxica (variando entre 75 a 100 % de inibição), atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 75 %) e baixa atividade (inibição de crescimento menor que 50 %) (RODRIGUES et al., 2014).

Tabela 4 – Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos derivados Tiazóis (NJ) e Tiazolidinedionas (ST e NW), em linhagens tumorais na concentração de 50 µg/mL pelo método do MTT após 72 h de incubação.

Amostras	Linhagens Celulares (IC%)							
	HL-60	K562	NCI-H292	HCT116	HT29	MCF7	P815	L929
ST01	67,64 ± 2,05	43,67 ± 7,41	22,54 ± 7,36	58,24 ± 4,55	28,00 ± 0,71	47,82 ± 1,15	60,79 ± 0,28	16,39 ± 1,58
ST02	65,60 ± 6,96	29,18 ± 8,36	23,68 ± 6,13	52,71 ± 5,93	43,86 ± 3,79	53,54 ± 1,17	66,11 ± 0,47	15,73 ± 6,62
ST03	66,23 ± 6,34	22,21 ± 3,02	23,15 ± 5,19	53,14 ± 2,68	44,01 ± 4,59	46,81 ± 0,67	70,25 ± 2,57	14,90 ± 9,09
ST04	80,32 ± 0,54	30,33 ± 5,21	12,73 ± 0,49	62,28 ± 0,12	46,02 ± 2,22	40,40 ± 0,18	81,76 ± 1,18	5,14 ± 0,77
ST05	75,75 ± 0,40	17,85 ± 4,14	24,32 ± 9,12	58,09 ± 0,18	39,25 ± 7,73	48,14 ± 0,12	58,26 ± 2,09	16,63 ± 1,23
NJ16	66,31 ± 4,63	22,93 ± 3,05	34,90 ± 2,58	68,60 ± 0,53	29,97 ± 4,77	51,63 ± 0,47	59,00 ± 8,26	24,37 ± 1,67
NJ17	49,02 ± 5,53	36,31 ± 5,64	43,30 ± 2,84	60,85 ± 4,83	25,48 ± 5,44	52,87 ± 0,18	80,83 ± 0,28	30,07 ± 5,46
NJ18	41,66 ± 6,82	45,08 ± 0,28	42,28 ± 1,13	64,89 ± 0,24	34,54 ± 4,73	58,28 ± 0,71	65,62 ± 1,50	17,29 ± 1,05
NJ19	77,76 ± 0,24	49,57 ± 0,43	44,56 ± 4,17	61,45 ± 4,25	26,68 ± 2,30	58,28 ± 0,71	60,54 ± 0,39	31,25 ± 1,58
NJ20	79,17 ± 0,06	76,29 ± 0,25	82,58 ± 0,33	58,01 ± 2,33	82,27 ± 0,13	81,12 ± 0,12	63,76 ± 1,78	35,10 ± 0,31
NJ21	77,55 ± 0,21	28,78 ± 2,09	20,42 ± 5,10	82,09 ± 0,24	26,24 ± 6,92	29,45 ± 0,34	59,68 ± 2,24	15,03 ± 6,41
NW05	67,79 ± 2,59	80,07 ± 0,03	81,67 ± 0,05	81,97 ± 0,12	80,08 ± 0,17	60,92 ± 0,41	58,87 ± 0,28	25,49 ± 0,48
NW06	32,74 ± 1,52	52,59 ± 1,34	63,65 ± 0,46	69,99 ± 3,42	70,03 ± 0,28	84,62 ± 0,12	66,05 ± 0,98	15,03 ± 6,41
NW07	40,61 ± 4,48	26,36 ± 2,50	28,23 ± 3,69	61,49 ± 5,40	49,38 ± 1,70	58,24 ± 0,75	82,44 ± 1,98	21,08 ± 8,80
NW10	63,30 ± 5,80	6,51 ± 0,17	27,34 ± 3,88	59,98 ± 4,53	28,18 ± 1,81	56,10 ± 0,18	67,97 ± 3,54	6,11 ± 3,13
NW17	77,84 ± 0,45	77,58 ± 0,05	31,40 ± 9,41	52,43 ± 4,39	14,80 ± 10,26	45,22 ± 2,47	69,76 ± 3,07	15,83 ± 5,26
NW18	67,62 ± 6,03	67,43 ± 2,25	37,39 ± 1,49	56,23 ± 4,19	32,53 ± 9,68	43,08 ± 1,06	65,12 ± 3,62	15,10 ± 3,13
NW19	63,15 ± 3,58	24,56 ± 8,83	36,19 ± 3,86	55,36 ± 4,38	35,38 ± 9,41	38,85 ± 1,28	56,52 ± 0,60	9,20 ± 0,75
NW21	64,53 ± 1,01	67,08 ± 3,88	27,95 ± 9,67	68,49 ± 0,45	35,60 ± 6,77	42,15 ± 3,22	65,49 ± 3,87	19,58 ± 3,82
DOXO	91,26 ± 0,30	89,93 ± 0,03	92,74 ± 0,05	86,75 ± 0,36	76,60 ± 0,27	86,95 ± 0,12	84,66 ± 0,11	92,94 ± 0,41

HL-60 (leucemia promielocítica aguda), K562 (leucemia mieloide crônica), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão), HCT116 (câncer de cólon humano), HT29 (adenocarcinoma de cólon), MCF7 (adenocarcinoma de mama humano), P815 (mastocitoma), L929 (fibroblasto), DOXO (doxorubicina).

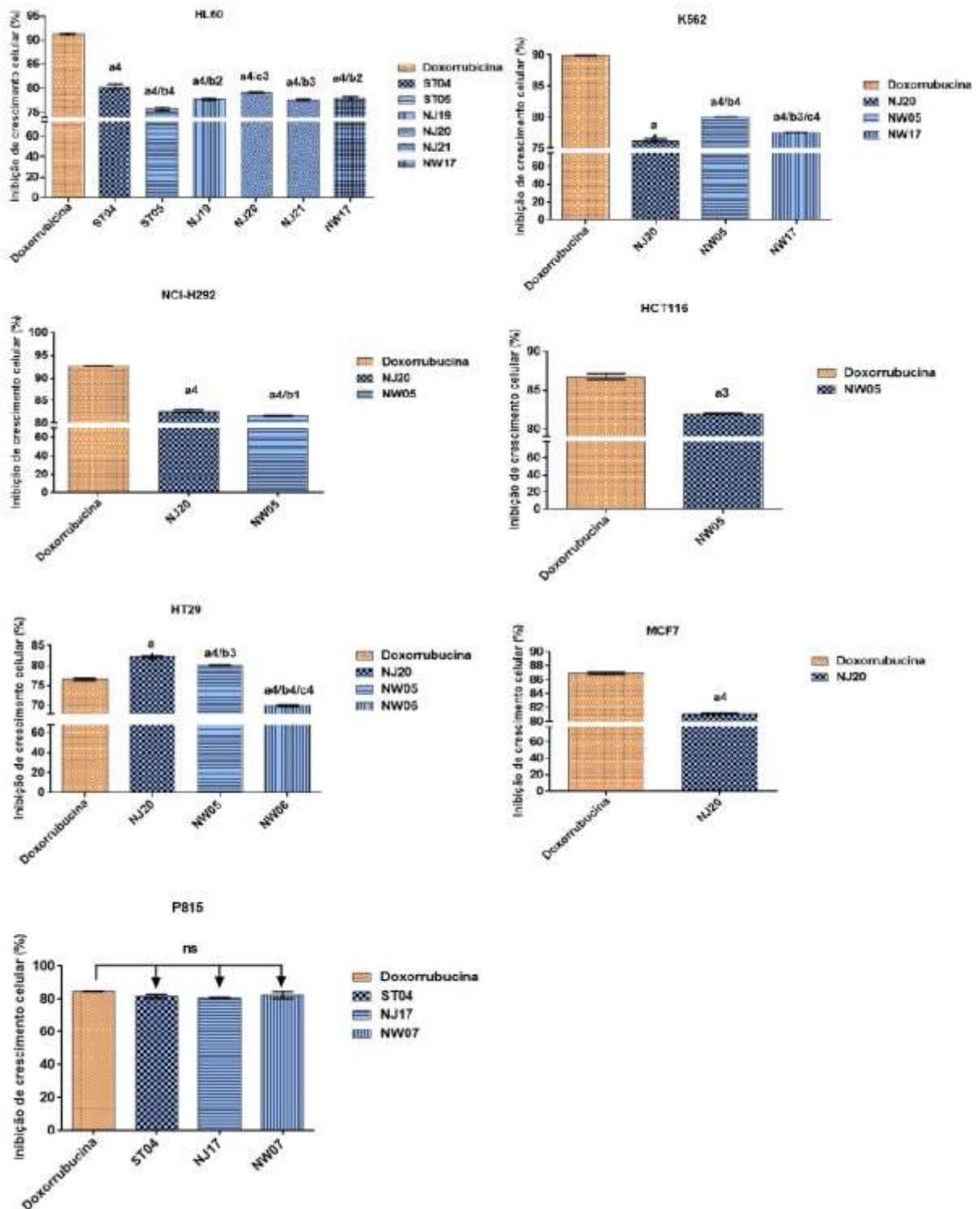


Figura 9 – Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos derivados Tiazólico e Tiazolidinedionicos, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ pelo método do MTT, em linhagens tumorais HL60, K562, NCI-H292, HCT116, HT29, MCF7 e P815. Os valores representam a média geométrica \pm S.E.M. (erro padrão da média). Two-way ANOVA, seguido pelo teste post-hoc de Bonferroni. a4: $p < 0,0001$ vs controle doxorubicina; a3: $p < 0,001$ vs controle doxorubicina; b2: $p < 0,01$ vs coluna b; b3: p

< 0,001 vs coluna b; b4 p < 0,0001 vs coluna b; c4: p < 0,001 vs coluna c; ns: não significativo.

Parte dos estudos realizados por pesquisadores em atividade antitumoral, *in vitro*, iniciam na concentração de 50 µg/mL (HERRERA-ESPAÑA et al., 2020; RODRIGUES et al., 2018; ROQUE MARQUES et al., 2019; SANTANA et al., 2018). Esta concentração é importante pois colabora na seleção dos compostos mais promissores a fármacos (FALLAH-TAFTI et al., 2011).

Os compostos que apresentaram uma inibição do crescimento celular acima de 75% na concentração de 50 µg/mL (Tabela 4; Figura 9), foram testados em várias concentrações para a determinação da CI_{50} (FOUCHE et al., 2008). Dentre os compostos testados, as amostras da série tiazol (NJ20) e tiazolidinediona (NW05), apresentaram predominância, na concentração de 50 µg/mL. A NJ20 predominou frente as linhagens HL-60 (79,17%), K562 (76,29%), NCI-H292 (82,58%), HT29 (82,27%) e MCF7 (81,12%); enquanto que a NW predominou frente as linhagens K562 (80,07%), NCI-H292 (81,67%), HCT116 (81,97%) e HT29 (80,08%). É possível observar também que frente a HCT116 a NJ20 foi a que mais se destacou em comparação aos demais derivados (Figura 9). Também foi possível observar que os compostos testados em uma linhagem de célula normal (L929) não foram citotóxicos, mostrando assim que esses compostos são promissores como futuros fármacos.

4.3.2 Determinação das CI_{50} dos derivados do tiazol e da tiazolidinediona

Na atividade citotóxica *in vitro* dos 19 derivados (seis tiazóis e treze tiazolidinedionas) foram avaliados nas linhagens celulares tumorais (HL-60, K562, NCI-H292, HCT116, HT29, MCF7 e P815) e normal (L929) e apenas 10 substâncias (NJ17, NJ19, NJ20, NJ21, ST04, ST05, NW05, NW06, NW07 e NW17) apresentaram atividade citotóxica superior a 75% de inibição de crescimento das linhagens celulares de característica aderente e uma linhagem em suspensão, sendo estas escolhidas para a determinação da CI_{50} (Tabela 4; Figura 10).

Entre os tiazóis, a NJ17 foi mais citotóxica para a linhagem P815, com CI_{50} de 1,05 µg/mL e a NJ20 se destacou por apresentar atividade frente a cinco das sete linhagens testadas, sendo mais ativas nas linhagens HL-60 (CI_{50} = 1,12 µg/mL), K562 (CI_{50} = 1,54 µg/mL), NCI-H292 (CI_{50} = 2,20 µg/mL), HT29 (CI_{50} = 1,43 µg/mL) e

MCF7 ($CI_{50} = 1,53 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 5; Figura 10). Especificamente o tiazól NJ20, em relação aos outros derivados, apresentou uma CI_{50} ainda menor frente as linhagens de K562 e HT29 (Figura 10). Em relação as tiazolidinedionas a ST04 foi mais citotóxica para a linhagem HL-60, com CI_{50} de $2,06 \mu\text{g/mL}$ e a NW05 se destacou por apresentar atividade frente a quatro das sete linhagens testadas, sendo mais ativas nas linhagens K562 ($CI_{50} = 2,06 \mu\text{g/mL}$), NCI-H292 ($CI_{50} = 2,32 \mu\text{g/mL}$), HCT116 ($CI_{50} = 3,62 \mu\text{g/mL}$) e HT29 ($CI_{50} = 5,21 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 5; Figura 10).

Tabela 5 – Valores da concentração que inibe 50 % do crescimento celular (CI₅₀) e o intervalo de confiança (IC 95 %) das fases em linhagens tumorais testadas pelo método do MTT após 72 h de incubação.

Amostras	CI ₅₀ (µg/mL) e IC 95 %						
	HL60	K562	NCI-H292	HCT116	HT29	MCF7	P815
NJ17							1,05 (0,88 – 1,26)
NJ19	1,18 (0,89 - 1,55)						
NJ20	1,12 (0,69 - 1,83)	1,54 (0,96 - 2,49)	2,20 (1,83 - 2,65)		1,43 (1,00 - 2,04)	1,53 (1,27 - 1,84)	
NJ21	1,49 (1,05 - 2,10)			4,24 (3,08 - 5,84)			
ST04	2,06 (1,32 – 3,22)						8,25 (6,46 - 10,54)
ST05	5,96 (3,94 - 9,04)						
NW05		2,44 (2,14 - 2,78)	2,32 (1,70 - 3,16)	3,62 (2,14 - 6,13)	5,21 (4,22 - 6,43)		
NW06						12,46 (5,97 - 26,03)	N.T.
NW07							5,82 (4,54 - 7,46)
NW17	4,09 (3,29 - 5,07)	4,36 (3,81 – 5,00)					
DOXO	0,04 (0,01 - 0,09)	0,17 (0,15 - 0,20)	0,06 (0,03 - 0,12)	0,46 (0,30 - 0,71)	0,78 (0,60 - 1,03)	0,18 (0,13 - 0,26)	0,26 (0,24 - 0,29)

HL-60 (leucemia promielocítica aguda), K562 (leucemia mieloide crônica), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão), HCT116 (câncer de cólon humano), HT29 (adenocarcinoma de cólon), MCF7 (adenocarcinoma de mama humano), P815 (mastocitoma), L929 (fibroblasto), DOXO (doxorubicina).

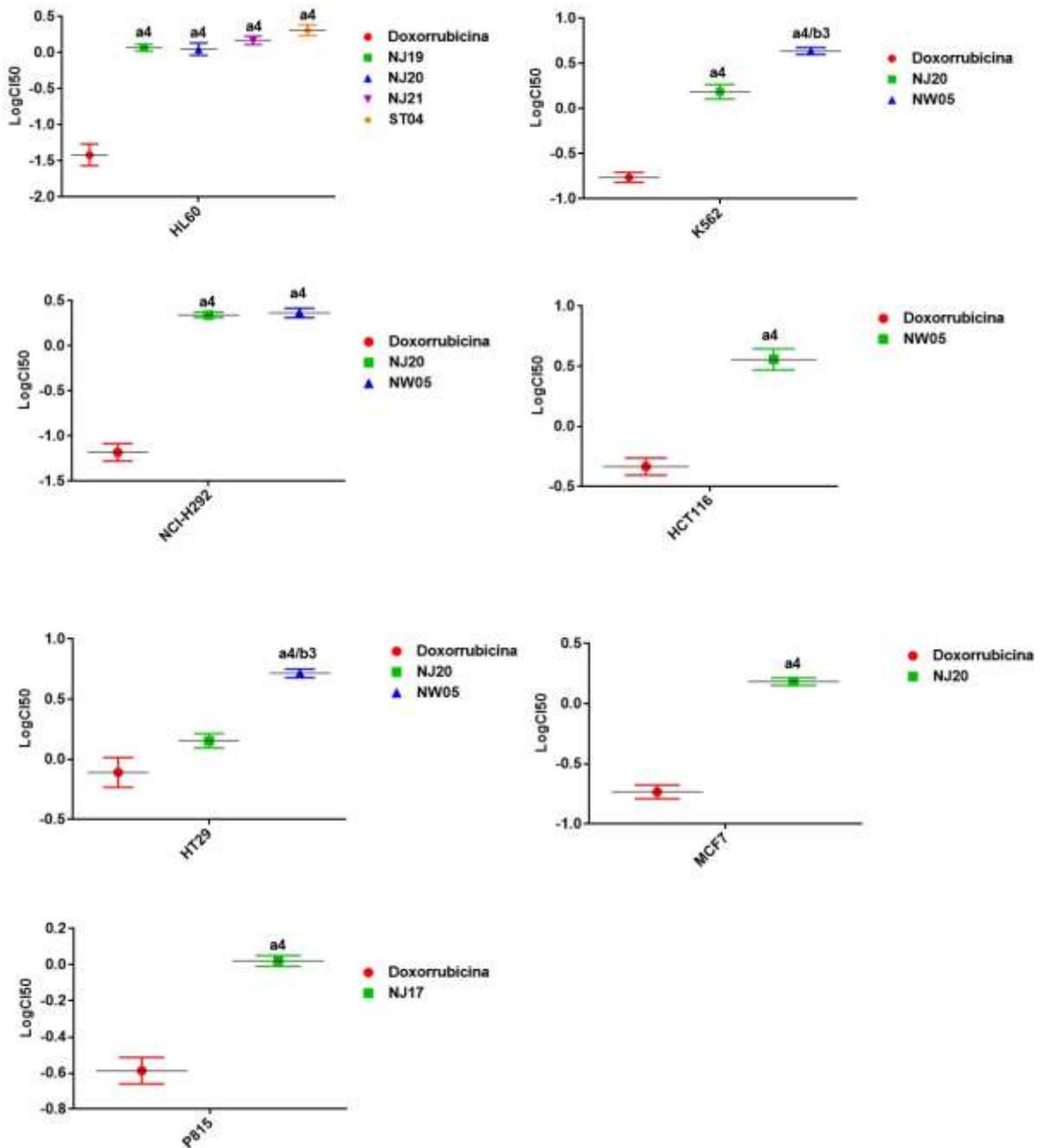


Figura 10 – Concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI₅₀) expresso em LogCI₅₀, dos derivados de Tiazóis e Tiazolidinedionas, em linhagens tumorais HL60, K562, NCI-H292, HCT116, HT29, MCF7 e P815 testadas pelo método do MTT. ANOVA, seguido pelo teste post-hoc de Bonferroni. a4: p <0,0001 vs controle doxorubicina; b3: p <0,001 vs coluna b.

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são importantes para verificar a toxicidade de novos compostos nos estágios iniciais de desenvolvimento do fármaco

(PUTNAM; BOMBICK; DOOLITTLE, 2002). Li, Zhou e Xu (2015) e Soenen et al. (2012) relatam que a citotoxicidade é um dos testes de avaliação biológica e rastreamento que utiliza células de tecidos *in vitro* para observar o crescimento celular, reprodução e efeitos morfológicos. De acordo com Uboldi et al. (2012), o desenvolvimento contínuo de testes de citotoxicidade, métodos de detecção de dano celular, mensuração do crescimento celular e propriedades metabólicas, foram gradativamente sendo desenvolvidos de forma qualitativa para quantitativa, fornecendo assim informações significativas (EISENBRAND et al., 2002). Segundo os parâmetros definidos pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), uma substância é considerada citotóxica quando apresenta $CI_{50} \leq 4,0 \mu\text{g/mL}$ para células tumorais (ITHARAT et al., 2004). Tais critérios reforçam que os derivados tiazólicos e tiazolidinediônicos avaliados apresentaram considerável potencial citotóxico em células tumorais humanas, sendo não citotóxico para células normais utilizadas neste estudo.

Estudos realizados por Santana et al. (2018) com derivados tiazólicos, mostraram que os compostos apresentaram forte atividade citotóxica, com CI_{50} menor que $10 \mu\text{M}$ frente as linhagens NCI-H292, K-562 e HL-60. Ainda de acordo com Santana et al. (2018), os compostos que possuem um grupo NO_2 na posição para, podem apresentar valores significativos de CI_{50} . Este estudo corrobora com os resultados encontrados na presente pesquisa, onde o derivado tiazólico NJ20 apresentou inibição nas linhagens tumorais HL60, K562, NCI-H292, HT29 e MCF7.

Omair e colaboradores (2018), realizaram testes com derivados tiazólicos e mostraram que os compostos apresentaram atividade citotóxica moderada, com CI_{50} maior que $4 \mu\text{g/mL}$ para as células tumorais testadas, HCT-116, MCF-7 e HePG-2. Shakir et al. (2016), em experimentos realizados em derivados tiazólicos, em células tumorais HCT-116 e MCF-7, apresentaram atividade citotóxica de moderada a alta.

De acordo com Oliveira (2014), a presença de halogênios substituintes no anel aromático dos derivados tiazólicos, provocam uma tendência para o aumento da atividade biológica, pois quanto maior o raio atômico do átomo nos compostos para-substituídos com F, Cl e Br, mais potente será inibição. Oliveira (2014) também observou que a presença de um outro halogênio nas demais posições de fenila como inserir um halogênio na posição orto da fenila, provoca uma melhora da atividade biológica. Hassan et al. (2012) avaliaram a importância dos substituintes

presentes no anel aromático ligado na posição C4 do 1,3-tiazol e afirmaram ser essencial a substituição 2,4 do anel tiazol para a efetiva atividade antitumoral.

Com relação as tiazolidinedionas, Trotsko et al. (2018), observaram que o acetato de 2-[[2-(3-clorobenzoil)hidrazinilideno]metil}fenil(2,4-dioxo1,3-tiazolidin-5-ilideno) apresentou alta citotoxicidade para a linhagem MCF7. Rodrigues et al. (2018) em estudos com derivados de tiazolidinedionas, verificou que o composto 5-(2-bromo-5-metoxibenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona apresentou uma citotoxicidade alta contra a linhagem de células de câncer de pulmão NCI-H292, com valor de CI₅₀ de 1,26 µg/mL.

Tendo em vista esses dados apresentados, os resultados apresentados no presente estudo indicam que os derivados NJ20 e a NW05 se apresentam como moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais, visto que a citotoxicidade variou de moderada a alta.

4.3.3. Atividade citotóxica em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs)

O objetivo deste teste é avaliar a seletividade dos compostos. A atividade citotóxica em PBMCs dos derivados dos tiazólicos e tiazolidinônicos neste trabalho apresentaram CI₅₀ < 50 µg/mL (Tabela 6; Figura 11). Os derivados demonstraram baixa toxicidade para as células mononucleares quando comparados com o fármaco controle (doxorrubicina). Quando comparados todos os derivados entre si, observou-se que não houve diferença estatística significativa em relação à toxicidade em PBMC, quando expressa em LogCI₅₀ (Figura 11). De acordo com Granados-Principal et al. (2010), a doxorrubicina embora utilizado na terapia anticâncer, tem a sua administração limitada, principalmente por causar cardiotoxicidade e alterações renais decorrente da sua ação mediada por radicais livres. Desse modo, os resultados indicam que os derivados tiazólicos e tiazolidinônicos podem apresentar-se como moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos, visto o perfil citotóxico baixo frente às células mononucleares de sangue periférico humano.

Tabela 6 – Atividade citotóxica e hemolítica dos derivados tiazólicos e tiazolidinediônicos em células mononucleares do sangue periférico humano. Os valores representam o percentual de inibição do crescimento celular (IC%) em linhagens tumorais na concentração de 50 µg/mL.

Amostras	PBMC	Eritrócitos
	CI ₅₀ (µg/mL) e IC 95 %	CE ₅₀ (µg/mL)
NJ17	26,87 (17,97 - 40,19)	> 200
NJ19	26,62 (17,45 - 40,61)	> 200
NJ20	26,20 (17,61 - 38,98)	> 200
NJ21	26,33 (15,37 - 45,10)	> 200
ST04	34,25 (22,07 - 53,16)	> 200
ST05	31,18 (29,18 - 34,77)	> 200
NW05	25,03 (17,90 - 34,99)	> 200
NW06	31,25 (21,58 - 45,26)	> 200
NW07	31,01 (21,11 - 45,53)	> 200
NW17	32,13 (20,00 - 51,61)	> 200
Doxorrubicina	0,41 (0,38-0,46)	N.T.

*CE₅₀: Concentração efetiva em que a substância testada possui em causar hemólise em 50 % dos eritrócitos. Resultados expressos em µg/mL. N.T. = Não Testada

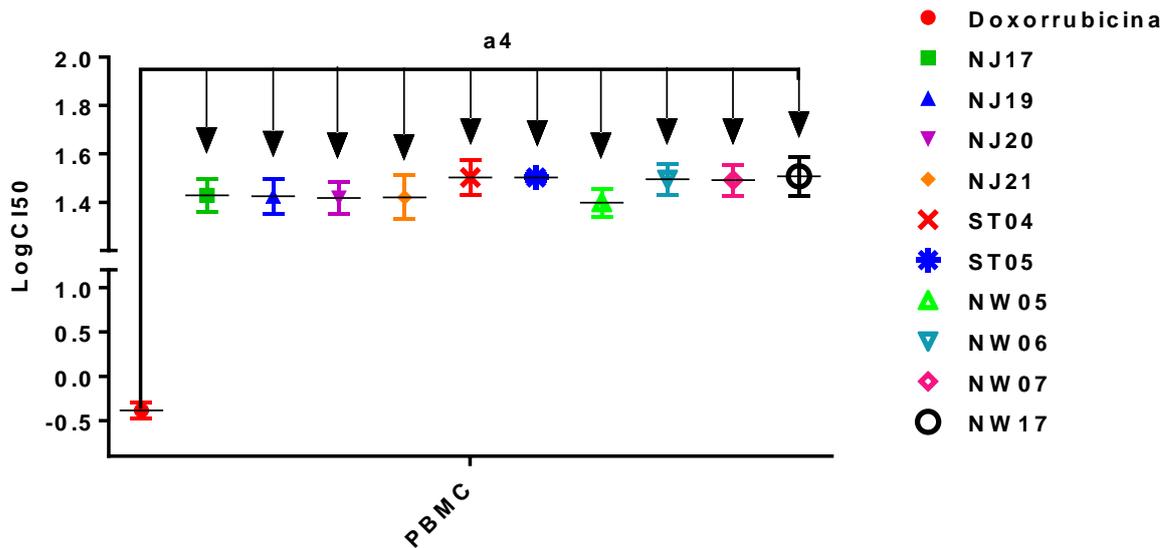


Figura 11 – Atividade citotóxica em células mononucleares do sangue periférico (PBMC), expressa em LogCI50, dos derivados Tiazólicos e Tiazolidinedionicos que inibiram anteriormente o crescimento celular (IC%) em linhagens tumorais.

A citotoxicidade para os derivados tiazólicos e tiazolidinônicos também foram comparadas utilizando o índice de seletividade (IS), que consiste na razão entre o CI50 de PBMC e CI50 das linhagens tumorais HL60, K562, NCI-H292, HCT-116, HT29, MCF7 e P815 (Tabela 7; Figura 12 e 13).

Tabela 7 – CI₅₀ dos derivados tiazólicos e tiazolidinediônicos em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) com as linhagens celulares no ensaio de viabilidade celular e seus respectivos índices de seletividade (IS).

HL60	
Amostras	IS (µg/mL)
NJ19	22,56
NJ20	23,39
NJ21	17,67
ST04	15,46
ST05	6,28
K562	
NJ20	17,01
NW05	10,26

NCI-H292	
NJ20	11,91
NW05	10,78
HCT116	
NW05	6,91
HT29	
NJ20	18,32
MCF7	
NJ20	17,12
P815	
NJ17	25,59

Os resultados de índice de seletividade foram considerados significativos, conforme Tabela 7 e as Figuras 12 e 13. Os compostos que apresentaram maior seletividade entre os tiazóis foram a NJ17. Esta apresentou potente atividade citotóxica frente linhagem de mastocitoma (P815), com $CI_{50} = 1,05 \mu\text{g/mL}$ e $CI_{150} = 26,87 \mu\text{g/mL}$ frente PBMCs. Isso representa que esse composto possui seletividade 25 vezes maior para a linhagem tumoral que para células mononucleares do sangue periférico. Também é possível observar que frente a cepa HL60 os compostos NJ19, NJ20 e NJ21 foram os que apresentaram maior valores de IS, onde observa-se um valor médio de IS maior para a NJ20, seguido pela NJ19 e pela NJ21, apesar de todas mostrarem uma seletividade considerada significativa e efetiva (Figura 12 e 13).

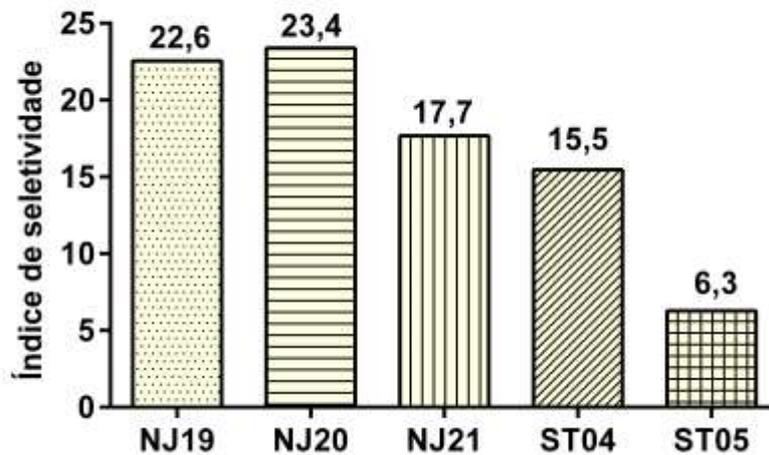


Figura 12 – Valores do índice de seletividade entre derivados Tiazóis e Tiazolidinedionas, frente à linhagem HL60.

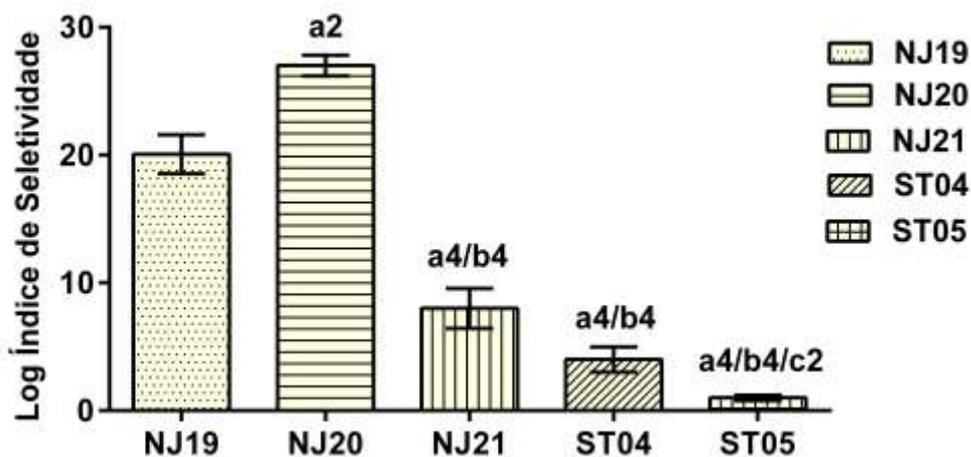


Figura 13 – Índice de seletividade representado em escala logarítmica, entre derivados Tiazóis e Tiazolidinedionas, frente à linhagem HL60. Anova de uma via, média aritmética seguida do erro padrão da média (EPM). a2: $p < 0,01$ vs NJ19; a4: $p < 0,001$ vs NJ19; b4: $p < 0,0001$ vs NJ20; c2: $p < 0,01$ vs NJ21.

De acordo com Sykes e Avery (2015), o índice de seletividade pode indicar o potencial e segurança do composto em testes clínicos. A maioria dos fármacos disponíveis destroem as células tumorais e células normais com maior taxa de

mitose, como por exemplo as células sanguíneas e como consequência desta baixa seletividade, ocorrem inúmeras reações adversas e tóxicas (OLIVEIRA; ALVES, 2002; FERREIRA et al., 2014).

4.3.4 Atividade hemolítica

Este teste, de acordo com Chen et al. (2015) e Saurav e Kannabiran (2012), é realizado para determinar a capacidade em causar lesões na membrana plasmática dos eritrócitos, uma estrutura dinâmica que responde diretamente a interações com fármacos.

Na avaliação da atividade hemolítica por derivados tiazólicos (NJ) e tiazolidinediônicos (ST e SW) foi obtida uma $CE_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 7; Figura 12 e 13). Uma substância é considerada hemolítica quando apresenta uma $CE_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$ (COSTA-LOTUFO et al., 2002). Portanto, estes derivados demonstraram não provocar lise em eritrócitos humanos, o que sugere que seus efeitos citotóxicos estejam associados a um mecanismo de morte mais específico e não diretamente a algum dano causado na membrana plasmática da célula (COSTA-LOTUFO et al., 2002; COSTA et al., 2008).

Estes resultados corroboram com estudos realizados por outros pesquisadores que comprovaram não haver hemólise por seus compostos testados, mesmo na concentração mais alta (200 $\mu\text{g/mL}$) em derivados tiazólicos e tiazolidinônicos (ABBASI et al., 2020; SANTANA et al., 2018; UWABAGIRA; SAROJINI, 2019).

5 CONCLUSÃO

- ❑ As novas moléculas obtidas dos derivados do tiazol (série NJ) e tiazolidinediona (séries ST e NW), apresentaram atividade citotóxica frente linhagens celulares tumorais. Os compostos não mostraram atividade antibacteriana intrínseca;
- ❑ Apresentou-se atividade citotóxica significativa frente as linhagens HL-60, K562, NCI-H292, HCT116, HT29, devendo-se destacar dentre todos os resultados obtidos neste estudo, a ação da NJ17 para P815 (mastocitoma) e NJ20, mostrando-se mais seletiva para a HL-60 (leucemia promielocítica aguda). Esta última e a NW05 foram as que apresentaram maior índice de seletividade e menor citotoxicidade em linhagem de linfócitos;
- ❑ Os compostos não causaram hemólise ou lesões na membrana plasmática dos eritrócitos;
- ❑ Os compostos não apresentaram atividade antibacteriana intrínseca apresentando uma CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ frente todas as cepas multirresistentes testadas, SA 1199 e SA1199B;
- ❑ Na avaliação da inibição de bomba de efluxo, os derivados da série NJ (NJ16, NJ17 e NJ20) e NW (NW05, NW10, NW18, NW19 e NW21) quando associados à norfloxacin, reduziram em três vezes ou mais o valor da CIM da norfloxacin frente à SA1199B que superexpressa a bomba de efluxo NorA, sendo um indicativo da inibição de bomba de efluxo. Além de se observar uma redução de CIM da norfloxacin considerável induzida pelas NJ16 e NJ17, enquadrando-se em modificação do fenótipo da cepa selvagem SA1199, sendo sugerida a ocorrência de tal mecanismo;
- ❑ Os resultados dos testes *in silico* de ancoragem corroboraram com os resultados dos testes *in vitro* e revelaram que principalmente a NJ16 e NJ17 apresentam interações importantes que justificam a possibilidade de inibição

da NorA, colaborando assim para evidenciar os derivados de tiazóis como promissors frente células tumorais e de inibição de resistência por efluxo, podendo ser utilizados no desenvolvimento de novos fármacos com atividade anticancerígena.

PERSPECTIVAS

- Desenvolver ensaios de citotoxicidade frente a outras linhagens de células tumorais, a fim de estabelecer a seletividade dos derivados tiazólicos;
- Selecionar o melhor composto entre as duas classes e estudar possíveis mecanismos de ação antitumoral *in vitro*;
- Testar os derivados promissores em modelos experimentais *in vivo*;
- Avaliar o efeito dos derivados tiazólicos e tiazolidinônicos em outras bombas de efluxo bacterianas com características específicas.

REFERENCIAS

ABBASI, M. A.; RAMZAN, M. S.; REHMAN, A. -ur.; SIDDIQUI, S. Z.; HASSAN, M.; ALI-SHAH, S. A.; ASHRAF, M.; SHAHID, M.; SEOG, S.-Y. Novel Bi-heterocycles as Potent Inhibitors of Urease and Less Cytotoxic Agents: 3-({5-((2-Amino-1,3-thiazol-4-yl)methyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl}sulfanyl)-N-(un/substituted-phenyl)propanamides. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, p. 1–30, 2020.

ACTON, D. S.; TEMPELMANS PLAT-SINNIGE, M. J.; VAN WAMEL, W.; DE GROOT, N.; VAN BELKUM, A. Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: how does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact? **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 28, n. 2, p. 115, 2009.

ADAMI, H.-O.; HUNTER, D. J.; LAGIOU, P.; MUCCI, L. **Textbook of Cancer Epidemiology**. 3rd. ed. London: Oxford University Press, 2018.

AGARWAL, S.; KALAL, P.; GANDHI, D.; PRAJAPAT, P. Thiazole Containing Heterocycles with CNS Activity. **Current Drug Discovery Technologies**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 178–195, 2018.

ALIANÇA, A. S. dos S.; OLIVEIRA, A. R.; FEITOSA, A. P. S.; RIBEIRO, K. R. C.; DE CASTRO, M. C. A. B.; LEITE, A. C. L.; ALVES, L. C.; BRAYNER, F. A. In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, p. 1–10, 2017.

ALLEY, M. C.; SCUDIERO, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M. L.; CZERWINSKI, M. J.; FINE, D. L.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer research**, v. 48, n. 3, p. 589–601, 1988.

ALVAREZ, M.; PAULL, K.; MONKS, A.; HOSE, C.; LEE, J.S.; WEINSTEIN, J.; GREVER, M.; BATES, S.; FOJO, T. Generation of a drug resistance profile by quantitation of *mdr-1*/P-glycoprotein in the cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen. **Journal of Clinical Investigation**, n. 95, v. 2205–2214, 1995.

AMBUDKAR, S. V.; KIM, I. W.; XIA, D.; SAUNA, Z. E. 2006. The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker a motif in ABC transporters, is critical for ATP binding. **FEBS Letters**, n. 580, p. 1049–1055, 2006.

ARAÚJO, T. G.; CARVALHO, B. M.; MARTINS DA FONSECA, C. S.; DE LIMA, M. do C. A.; GALDINO, S. L.; DA ROCHA PITTA, I.; DE MENEZES LIMA, V. L. Metabolic effects of benzylidene thiazolidinedione derivatives in high-fat fed CIME. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 9, p. 2408–2414, 2012.

ARON, Z.; OPPERMAN, T. J. Optimization of a novel series of pyranopyridine RND efflux pump inhibitors. **Current Opinion in Microbiology**, v. 33, p. 1–6, 2016.

ATEF, N. M.; SHANAB, S. M.; NEGM, S. I.; ABBAS, Y. A. Evaluation of antimicrobial activity of some plant extracts against antibiotic susceptible and resistant bacterial strains causing wound infection. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n.

1, p. 144, 2019.

AURELIO, L.; SCULLINO, C. V.; PITMAN, M. R.; SEXTON, A.; OLIVER, V.; DAVIES, L.; REBELLO, R. J.; FURIC, L.; CREEK, D. J.; PITSON, S. M.; FLYNN, B. L. From Sphingosine Kinase to Dihydroceramide Desaturase: A Structure–Activity Relationship (SAR) Study of the Enzyme Inhibitory and Anticancer Activity of 4-((4-(4-Chlorophenyl)thiazol-2-yl)amino)phenol (SKI-II). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 965–984, 2016.

ASSARAF, Y. G. Molecular basis of antifolate resistance. **Journal of Cancer Metastasis and Treatment**, n. 26, p. 153–181, 2007.

ASSARAF, Y. G.; DRORI, S.; BACHRACH, U.; SHAUGAN-LABAY, V. Determination of multidrug resistance levels in cultured mammalian cells using ornithine decarboxylase activity. **Anal Biochemical**, n. 216, p. 97–109, 1994.

AWASTHI, T. R.; PANT, N. D.; DAHAL, P. R. Prevalence of multidrug resistant bacteria in causing community acquired urinary tract infection among the patients attending outpatient department of Seti Zonal Hospital, Dhangadi, Nepal. **Nepal Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 55–59, 2015.

AYDIN, S.; INCE, B.; INCE, O. Development of antibiotic resistance genes in microbial communities during long-term operation of anaerobic reactors in the treatment of pharmaceutical wastewater. **Water Research**, v. 83, p. 337–344, 2015.

BAKOS, E.; EVERS, R.; SZAKACS, G.; TUSNADY, G. E.; WELKER, E.; SZABO, K.; DE HAAS, M.; VAN DEEMTER, L.; BORST, P.; VARADI, A.; SARKADI, B. Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. **Journal of Biological Chemistry**, n. 273, p. 32167–32175, 1998.

BAYLAY, A. J.; PIDDOCK, L. J. V.; WEBBER, M. A. Molecular mechanisms of antibiotic resistance – Part I. In: **Bacterial Resistance to Antibiotics – From Molecules to Man**. Wiley, 2019. p. 1–26.

BHARDWAJ, A. K.; MOHANTY, P. Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: rejuvenating the antiCIMicrobial chemotherapy. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 7, n. 1, p. 73–89, 2012.

BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews CIMrobiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015.

BOSS, R.; OVERESCH, G.; BAUMGARTNER, A. AntiCIMicrobial resistance of *Escherichia coli*, *Enterococci*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* from Raw Fish and Seafood Imported into Switzerland. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 7, p. 1240–1246, 2016.

BOURGEOIS-NICOLAOS, N.; LUCET, J.-C.; DAUBIÉ, C.; BENCHABA, F.; RAJGURU, M.; RUIMY, R.; ANDREMONT, A.; ARMAND-LEFÈVRE, L. Maternal vaginal colonisation by *Staphylococcus aureus* and newborn acquisition at delivery. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 24, n. 5, p. 488–491, 2010.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BUONERBA, F.; LEPRI, S.; GORACCI, L.; SCHINDLER, B. D.; SEO, S. M.; KAATZ, G. W.; CRUCIANI, G. Improved potency of indole-based nora efflux pump inhibitors: from serendipity toward rational design and development. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 517–523, 2017.

CARNEIRO, J. C. O. **Padrão de consumo de antibacterianos em uma UTI geral : correlação com a resistência bacteriana**. 2006. 107f. Dissertação (Ciências Médicas). Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2006.

CHAMI, M.; STEINFELS, E.; ORELLE, C.; JAULT, J.-M.; DI PIETRO, A.; RIGAUD, J.-L.; MARCO, S. Three-dimensional structure by cryo-electron CIMroscopy of YvcC, an homodimeric ATP-binding cassette transporter from *Bacillus subtilis*. **Journal of Molecular Biology**, v. 315, n. 5, p. 1075–1085, 2002.

CHANG, S.; ZHANG, Z.; ZHUANG, X.; LUO, J.; CAO, X.; LI, H.; TU, Z.; LU, X.; REN, X.; DING, K. New thiazole carboxamides as potent inhibitors of Akt kinases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 2, p. 1208–1212, 2012.

CHARAYA, N.; PANDITA, D.; GREWAL, A. S.; LATHER, V. Design, synthesis and biological evaluation of novel thiazol-2-yl benzamide derivatives as glucokinase activators. **Computational Biology and Chemistry**, v. 73, p. 221–229, 2018.

CHEN, K.; LIN, S.; LI, P.; SONG, Q.; LUO, D.; LIU, T.; ZENG, L.; ZHANG, W. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from patients with burns in a regional burn center, Southeastern China. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 51, 2018.

CHEN, L. Q.; FANG, L.; LING, J.; DING, C. Z.; KANG, B.; HUANG, C. Z. Nanotoxicity of Silver Nanoparticles to Red Blood Cells: Size Dependent Adsorption, Uptake, and Hemolytic Activity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 501–509, 2015.

CHHABRIA, M. T.; PATEL, S.; MODI, P.; BRAHMKSHATRIYA, P. S. Thiazole: A review on chemistry, synthesis and therapeutic importance of its derivatives. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 16, n. 26, p. 2841–2862, 2016.

CHURCHILL, W. **Box memórias da Segunda Guerra Mundial**. Editora: HarperCollins, 1174 páginas. 2018.

CHUNG, P. Y. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 20, p. fnw219, 2016.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**; Twenty-fifth informational supplement. 2015. PA, USA.: Approved standard M100-S25, CLSI, 2015.

_____ **Performance standards for antiCIMrobal disk susceptibility tests**. 8th ed.

ed. Wayne, PA, USA.: Approved standard M2-A8. CLSI, 2003.

COLE, C.; GAZEWOOD, J. Diagnosis and treatment of impetigo. **American family physician**, v. 75, n. 6, p. 859–64, 2007.

COLE, S. P.; BHARDWAJ, G.; GERLACH, J. H.; MACKIE, J. E.; GRANT, C. E., ALMQUIST, K. C.; STEWART, A. J.; KURZ, E. U.; DUNCAN, A. M.; DEELEY, R. G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. **Science**, n. 258, p. 1650–1654, 1992.

CONTI, I.; MORIGI, R.; LOCATELLI, A.; RAMBALDI, M.; BUA, G.; GALLINELLA, G.; LEONI, A. Synthesis of 3-(Imidazo[2,1-b]thiazol-6-yl)-2H-chromen-2-one derivatives and study of their antiviral activity against Parvovirus B19. **Molecules**, v. 24, n. 6, p. 1037, 2019.

CORNEJO-JUÁREZ, P.; VELÁSQUEZ-ACOSTA, C.; SANDOVAL, S.; GORDILLO, P.; VOLKOW-FERNÁNDEZ, P. Antimicrobial resistance patterns of isolates from urine cultures at an oncological center. **Salud publica de Mexico**, v. 49, n. 5, p. 330–6, 2007.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P. A. M.; VIANA, G. S. B.; CUNHA, K. M. A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. S. N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1231–1234, 2002.

COSTA, P. M.; FERREIRA, P. M. P.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; CORSINO, J.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 4, p. 854–863, 2008.

COSTA, S.; FALCÃO, C.; VIVEIROS, M.; MACHADO, D.; MARTINS, M.; MELO-CRISTINO, J.; AMARAL, L.; COUTO, I. Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 241, 2011.

COSTA, S. S.; VIVEIROS, M.; AMARAL, L.; COUTO, I. Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. **The Open Microbiology Journal**, v. 7, n. 1, p. 59–71, 2013.

COX, G.; WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 287–292, 2013.

CROUCH, S. P. .; SLATER, K. J. High-throughput cytotoxicity screening: hit and miss. **Drug Discovery Today**, v. 6, p. 48–53, 2001.

DALLOUL, H. M. M.; EL-NWAIRY, K. A.; SHORAF, A. Z.; ABU SAMAHA, A. S. Synthesis and antimicrobial activities evaluation of some new thiadiazinone and thiadiazepinone derivatives bearing sulfonamide moiety. **Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements**, v. 193, n. 5, p. 288–293, 2018.

DA SILVA, V. P.; MESQUITA, C. B.; NUNES, J. S.; DE BEM PRUNES, B.; RADOS, P. V.; VISIOLI, F. Effects of extracellular acidity on resistance to chemotherapy treatment: A systematic review. **Medical Oncology**, n. 35, p. 161, 2018.

DAVID, A. R.; ZIMMERMAN, M. R. Cancer: an old disease, a new disease or something in between? **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 10, p. 728–733, 2010.

DEAN, M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, n. 14, p. 3–9, 2009.

DEAN, M.; RZHETSKY, A.; ALLIKMETS, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **Genome Research**. 11, 1156–1166, 2001.

DEAN, M.; ALLIKMETS, R. Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. **Current Opinion in Genetics and Development**, n. 5, p. 779–785, 1995.

DEELEY, R. G.; WESTLAKE, C.; COLE, S. P. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. **Physiological Reviews**, n. 86, p. 849–899, 2006.

DELEBARRE, M.; DESSEIN, R.; LAGRÉE, M.; MAZINGUE, F.; SUDOUR-BONNANGE, H.; MARTINOT, A.; DUBOS, F. Differential risk of severe infection in febrile neutropenia among children with blood cancer or solid tumor. **Journal of Infection**, v. 79, n. 2, p. 95–100, 2019.

DE GROUW, E. P. L. M.; RAAIJMAKERS, M. H. G. P.; BOEZEMAN, J. B.; VAN DER REIJDEN, B. A.; VAN DE LOCHT, L. T. F.; DE WITTE, T. J. M.; RAYMAKERS, R. A. P. Preferential expression of a high number of ATP binding cassette transporters in both normal and leukemic CD34+ CD38- cells. **Leukemia**, n. 20, p. 750-754, 2006.

DENG, W.; DAI, C. L.; CHEN, J. J.; KATHAWALA, R. J.; SUN, Y. L.; CHEN, H. F.; FU, L. W.; CHEN, Z. S. Tandutinib (MLN518) reverses multidrug resistance by inhibiting the efflux activity of the multidrug resistance protein 7 (ABCC10). **Oncology Reports**, n. 29, p. 2479–2485, 2013.

DESAI, N. C.; JOSHI, V. V.; RAJPARA, K. M.; VAGHANI, H. V.; SATODIYA, H. M. Synthesis of quinoline-pyrazoline based thiazole derivatives endowed with antimicrobial activity. **Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 1191–1201, 2013.

DI PIERRO, F. Comment on: “Probiotics in addition to antibiotics for the treatment of acute tonsillitis: a randomized, placebo-controlled study”. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, n. 7, p. 1485–1486, 2015.

DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; SHORTRIDGE, D.; ZERVOS, M.; JONES, R. N. Twenty-year trends in antimicrobial susceptibilities among *Staphylococcus aureus* from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. Supplement_1, p. S47–S53, 2019.

DOS SANTOS, J. F. S.; TINTINO, S. R.; DE FREITAS, T. S.; CAMPINA, F. F.; DE A. MENEZES, I. R.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; COUTINHO, H. D. M.; CUNHA, F. A. B. *In vitro* e *in silico* evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious**

Diseases, v. 57, p. 22–28, 2018.

DU, D.; WANG-KAN, X.; NEUBERGER, A.; VAN VEEN, H. W.; POS, K. M.; PIDDOCK, L. J. V.; LUISI, B. F. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 523–539, 2018.

DUBREUIL, P.; LETARD, S.; CIUFOLINI, M.; GROS, L.; HUMBERT, M.; CASTERAN, N.; BERGE, L.; HAJEM, B.; LERMET, A.; SIPPL, W.; VOISSET, E.; AROCK, M.; AUCLAIR, C.; LEVENTHAL, P.S.; MANSFIELD, C.D.; MOUSSY, A.; HERMINE, O. Masitinib (AB1010), a potent and selective tyrosine kinase inhibitor targeting KIT. **PLoS ONE**, n. 4, p. e7258, 2009.

DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; BLAZENKA, K. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. **Food technology and biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 11–21, 2008.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B. .; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J.-C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of *in vitro* toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 2–3, p. 193–236, 2002.

FALLAH-TAFTI, A.; FOROUMADI, A.; TIWARI, R.; SHIRAZI, A. N.; HANGAUER, D. G.; BU, Y.; AKBARZADEH, T.; PARANG, K.; SHAFIEE, A. Thiazolyl N-benzyl-substituted acetamide derivatives: Synthesis, Src kinase inhibitory and anticancer activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4853–4858, 2011.

FAN, S.; NIU, Y.; TAN, N.; WU, Z.; WANG, Y.; YOU, H. LASS2 enhances chemosensitivity of breast cancer by counteracting acidic tumor microenvironment through inhibiting activity of V-ATPase proton pump. **Oncogene**, n. 25, p. 1682–90, 2013.

FARGHALY, A. M.; ABOULWAFI, O. M.; ELSHAIER, Y. A. M.; BADAWI, W. A.; HARIDY, H. H.; MUBARAK, H. A. E. Design, synthesis, and antihypertensive activity of new pyrimidine derivatives endowing new pharmacophores. **Medicinal Chemistry Research**, v. 28, n. 3, p. 360–379, 2019.

FEDERICI, C.; PETRUCCI, F.; CAIMI, S.; CESOLINI, A.; LOGOZZI, M.; BORGHI, M. Exosome release and low pH belong to a framework of resistance of human melanoma cells to cisplatin. **PLoS ONE**, n. 2, p. e88193, 2014.

FERREIRA, A. L.; ROCHA, C. P.; VIEIRA, L. M.; SANT'ANA DUSSE, L. M. D. R. G. J.; CARVALHO, M. G. Alterações hematológicas induzidas por medicamentos convencionais e alternativos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, p. 94–101, 2014.

FLETCHER, J. I.; HABER, M.; HENDERSON, M. J.; NORRIS, M. D. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. **Nature Reviews Cancer**, n. 10, v. 2, p. 147–156, 2010.

FONTAINE, F.; HÉQUET, A.; VOISIN-CHIRET, A.-S.; BOUILLON, A.; LESNARD, A.; CRESTEIL, T.; JOLIVALT, C.; RAULT, S. Boronic species as promising inhibitors of

the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump: Study of 6-substituted pyridine-3-boronic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 95, p. 185–198, 2015.

FOSTER, T. J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 430–449, 2017.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171–177, 2006.

FOUCHE, G.; CRAGG, G. M.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N.; MAHARAJ, V. J.; SENABE, J. In vitro anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 455–461, 2008.

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n. 4, p. 369–378, 2017.

FRÖHLICH, E.; WAHL, R. Chemotherapy and chemoprevention by thiazolidinediones. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–14, 2015.

GAO, Y.; VAN BELKUM, M. J.; STILES, M. E. The outer membrane of gram-negative bacteria inhibits antibacterial activity of brochocin-C. **Applied and environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4329–33, 1999.

GARNEAU-TSODIKOVA, S.; LABBY, K. J. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. **MedChemComm**, v. 7, n. 1, p. 11–27, 2016.

GIEDRAITIENĖ, A.; VITKAUSKIENĖ, A.; NAGINIENĖ, R.; PAVILONIS, A. Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. **Medicina**, v. 47, n. 3, p. 19, 2011.

GILL, E. E.; FRANCO, O. L.; HANCOCK, R. E. W. Antibiotic adjuvants: diverse strategies for controlling drug-resistant pathogens. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 85, n. 1, p. 56–78, 2015.

GILLET, J-P.; EFFERTH, T.; REMACLE, J. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, n. 1775 p. 237–62, 2007.

GLICKMAN, M. S.; SAWYERS, C. L. Converting cancer therapies into cures: lessons from infectious diseases. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1089–1098, 2012.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nature Reviews Cancer**, n. 2, p. 48–58, 2002.

GOUVEIA, F. L.; DE OLIVEIRA, R. M. B.; DE OLIVEIRA, T. B.; DA SILVA, I. M.; DO NASCIMENTO, S. C.; DE SENA, K. X. F. R.; DE ALBUQUERQUE, J. F. C. Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of some 5-arylidene-4-thioxo-thiazolidine-2-ones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 2038–2043, 2009.

GRANADOS-PRINCIPAL, S.; QUILES, J. L.; RAMIREZ-TORTOSA, C. L.;

SANCHEZ-ROVIRA, P.; RAMIREZ-TORTOSA, Mc. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 6, p. 1425–1438, 2010.

GRANOWITZ, E. V.; BROWN, R. B. Antibiotic adverse reactions and drug interactions. **Critical Care Clinics**, v. 24, n. 2, p. 421–442, 2008.

GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; CIMHIELIN, O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. suppl, p. W270–W277, 2011.

GUIMARÃES, K. Superbactérias avançam no Brasil e levam autoridades de saúde a correr contra o tempo. **BBC Brasil**, Brasil, 2017.

GUZ, N. R.; STERMITZ, F. R.; JOHNSON, J. B.; BEESON, T. D.; WILLEN, S.; HSIANG, J.-F.; LEWIS, K. Flavonolignan and flavone inhibitors of a *Staphylococcus aureus* multidrug resistance pump: structure–activity relationships. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 261–268, 2001.

HANAHAH, D. Rethinking the war on cancer. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 558–563, 2014.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HANTZSCH, A.; WEBER, J. H. Ueber verbindungen des thiazols (Pyridins der Thiophenreihe). **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 20, n. 2, p. 3118–3132, 2007.

HASSAN, G. S.; EL-MESSERY, S. M.; AL-OMARY, F. A. M.; EL-SUBBAGH, H. I. Substituted thiazoles VII. Synthesis and antitumor activity of certain 2-(substituted amino)-4-phenyl-1,3-thiazole analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 20, p. 6318–6323, 2012.

HEIMERL, S.; BOSSERHOFF, A. K.; LANGMANN, T.; ECKER, J.; SCHMITZ, G. Mapping ATP-binding cassette transporter gene expression profiles in melanocytes and melanoma cells. **Melanoma research**, n. 17, p. 265-273, 2007.

HERNANDO-AMADO, S.; BLANCO, P.; ALCALDE-RICO, M.; CORONA, F.; REALES-CALDERÓN, J. A.; SÁNCHEZ, M. B.; MARTÍNEZ, J. L. Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. **Drug Resistance Updates**, v. 28, p. 13–27, 2016.

HERRERA-ESPAÑA, A. D.; US-MARTÍN, J.; HERNÁNDEZ-ORTEGA, S.; MIRÓN-LÓPEZ, G.; QUIJANO, L.; VILLANUEVA-TOLEDO, J. R.; MENA-REJÓN, G. J. Synthesis, structure analysis and activity against breast and cervix cancer cells of a triterpenoid thiazole derived from ochraceolide A. **Journal of Molecular Structure**, v. 1204, p. 127555, 2020.

HIRSCHMANN-JAX, C.; FOSTER, A. E.; WULF, G.G.; NUCHTERN, J. G.; JAX, T. W.; GOBEL, U.; GOOD-ELL, M. A.; BRENNER, M. K. A distinct “side population” of

cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 101, p. 14228–14233, 2004.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M.-J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p. 391–400, 2007.

HU, S.; NIU, H.; INABA, H.; ORWICK, S.; ROSE, C.; PANETTA, J. C.; YANG, S.; POUNDS, S.; FAN, Y.; CALABRESE, C.; REHG, J. E.; CAMPANA, D.; RUBNITZ, J. E.; BAKER, S. D. Activity of the multikinase inhibitor sorafenib in combination with cytarabine in acute myeloid leukemia. **Journal of the National Cancer Institute**, n. 103, p. 893–905, 2011.

INCA. **Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>

ITHARAT, A.; HOUGHTON, P. J.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P. .; SAMPSON, J. H.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 33–38, 2004.

JAIN, V. S.; VORA, D. K.; RAMAA, C. S. Thiazolidine-2,4-diones: Progress towards multifarious applications. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 7, p. 1599–1620, 2013.

JANGANAN, T. K.; BAVRO, V. N.; ZHANG, L.; BORGES-WALMSLEY, M. I.; WALMSLEY, A. R. Tripartite efflux pumps: energy is required for dissociation, but not assembly or opening of the outer membrane channel of the pump. **Molecular Microbiology**, v. 88, n. 3, p. 590–602, 2013.

JASOVSKÝ, D.; LITTMANN, J.; ZORZET, A.; CARS, O. Antimicrobial resistance—a threat to the world's sustainable development. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 121, n. 3, p. 159–64, 2016.

JULIANO, R. L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 455, p. 152–162, 1976.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 12, p. 2650–5, 1995.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M.; RUBLE, C. A. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 1086–94, 1993.

KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 300, 2017.

KATHAWALA, R. J.; CHEN, J. J.; ZHANG, Y. K.; WANG, Y. J.; PATEL, A.; WANG, D. S.; TALELE, T. T.; ASHBY JR. C.R.; CHEN, Z. S. Masitinib antagonizes ATP-binding cassette subfamily G member 2-mediated multidrug resistance. **International Journal of Oncology**, 44, 1634–1642, 2014a.

KATHAWALA, R. J.; SODANI, K.; CHEN, K.; PATEL, A.; ABUZNAIT, A. H.; ANREDDY, N.; SUN, Y. L.; KADDOUMI, A.; ASHBY JR., C. R.; CHEN, Z. S. Masitinib antagonizes ATP-binding cassette subfamily C member 10-mediated paclitaxel resistance: a preclinical study. **Molecular Cancer Therapeutics**, n. 13, p. 714–723, 2014b.

KARALE, B. K.; TAKATE, S. J.; SALVE, S. P.; ZAWARE, B. H.; JADHAV, S. S. Synthesis and biological screening of novel thiazolyl triazoles and thiadiazoles. **Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 3, p. 339–344, 2014.

KASHYAP, S. J.; GARG, V. K.; SHARMA, P. K.; KUMAR, N.; DUDHE, R.; GUPTA, J. K. Thiazoles: having diverse biological activities. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 8, p. 2123–2132, 2012.

KASPAR, U.; KRIEGESKORTE, A.; SCHUBERT, T.; PETERS, G.; RUDACK, C.; PIEPER, D. H.; WOS-OXLEY, M.; BECKER, K. The culturome of the human nose habitats reveals individual bacterial fingerprint patterns. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 7, p. 2130–2142, 2016.

KASRALIKAR, H. M.; JADHAVAR, S. C.; GOSWAMI, S. V.; KAMINWAR, N. S.; BHUSARE, S. R. Design, synthesis and molecular docking of pyrazolo [3,4d] thiazole hybrids as potential anti-HIV-1 NNRT inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 86, p. 437–444, 2019.

KHAMENEH, B.; DIAB, R.; GHAZVINI, K.; FAZLY BAZZAZ, B. S. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. **Microbial Pathogenesis**, v. 95, p. 32–42, 2016.

KHAN, I. H.; PATEL, N. B.; PATEL, V. M. Synthesis, In silico Molecular Docking and Pharmacokinetic Studies, In vitro Antimycobacterial and AntiCIMicrobial Studies of New Imidazolones Clubbed with Thiazolidinedione. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 14, n. 4, p. 269–283, 2018.

KHILLARE, L.; BHOSLE, M.; BHALERAO, M.; KHARAT, K.; MANE, R. Synthesis of new thiazolyl coupled pyrazoles bearing 2,4-thiazolidinedionyl pharmacophore and their anti-inflammatory and antibacterial evaluation. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 16, 2017.

KIM, J. IL; SON, S.-K. Stable AntiCIMicrobial Activity Achieved via Immobilization of Quaternary Ammonium Chloride on Hair. **Biocontrol Science**, v. 23, n. 2, p. 71–76, 2018.

KOURTESI, C. CIMicrobial Efflux Systems and Inhibitors: Approaches to Drug Discovery and the Challenge of Clinical Implementation. **The Open Microbiology Journal**, v. 7, n. 1, p. 34–52, 2013.

KRAAKMAN, M. J.; LIU, Q.; POSTIGO-FERNANDEZ, J.; JI, R.; KON, N.; LARREA, D.; NAMWANJE, M.; FAN, L.; CHAN, M.; AREA-GOMEZ, E.; FU, W.; CREUSOT, R. J.; QIANG, L. PPAR γ deacetylation dissociates thiazolidinedione's metabolic benefits from its adverse effects. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 6, p. 2600–2612, 2018.

KRISHNAMURTHY, S.; NOR, J. E. Orosphere assay: a method for propagation of head and neck cancer stem cells. **Head Neck**, n. 35, p. 1015–21, 2013.

KRUH, G. D.; GUO, Y.; HOPPER-BORGE, E.; BELINSKY, M. G.; CHEN, Z. S. ABCC10, ABCC11, and ABCC12. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, n. 453, p. 675–684, 2007.

KRUH, G. D.; BELINSKY, M. G. The MRP family of drug efflux pumps. **Oncogene**, n. 22, p. 7537–7552, 2003.

KUMAR, S.; MUKHERJEE, M. M.; VARELA, M. F. Modulation of Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps of the Major Facilitator Superfamily. **International Journal of Bacteriology**, v. 2013, p. 1–15, 2013.

LABI, V.; ERLACHER, M. How cell death shapes cancer. **Cell Death & Disease**, v. 6, n. 3, p. e1675–e1675, 2015.

LAM, F. C.; LIU, R.; LU, P.; SHAPIRO, A. B.; RENOIR, J. M.; SHAROM, F. J. beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. **Journal of Neurochemistry**, n. 76, p. 1121–8, 2001.

LAUREANO, A. C.; SCHWARTZ, R. A.; COHEN, P. J. Facial bacterial infections: Folliculitis. **Clinics in Dermatology**, v. 32, n. 6, p. 711–714, 2014.

LE CESNE, A.; BLAY, J. Y.; BUI, B.N.; BOUCHE, O.; ADENIS, A.; DOMONT, J.; CIOFFI, A.; RAY-COQUARD, I.; LASSAU, N.; BONVALOT, S.; MOUSSY, A.; KINET, J.P.; HERMINE, O. Phase II study of oral masitinib mesilate in imatinib-naïve patients with locally advanced or metastatic gastro-intestinal stromal tumour (GIST). **Europe Journal of Cancer**, n. 46, p. 1344–1351, 2010.

LEFRANC, F.; XU, Z.; BURTH, P.; MATHIEU, V.; REVELANT, G.; VELHO DE CASTRO FARIA, M.; NOYON, C.; GARCIA, D. G.; DUFOUR, D.; BRUYÈRE, C.; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, C. F.; VAN ANTWERPEN, P.; ROGISTER, B.; HESSE, S.; KIRSCH, G.; KISS, R. 4-Bromo-2-(piperidin-1-yl)thiazol-5-yl-phenyl methanone (12b) inhibits Na⁺/K⁺-ATPase and Ras oncogene activity in cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 213–223, 2013.

LENSKI, R. E. Experimental evolution and the dynaCIMS of adaptation and genome evolution in CIMicrobial populations. **The ISME Journal**, v. 11, n. 10, p. 2181–2194, 2017.

LEWIS, D. F. V.; JACOBS, M. N.; DICKINS, M. Compound lipophilicity for substrate binding to human P450s in drug metabolism. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 12, p. 530–537, 2004.

LI, W.; ZHANG H.; ASSARAF, Y. G.; ZHAO, K.; XU, X; XIE, J. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. **Drug Resistance Updates**, n. 27, p. 14–29, 2016.

LI, W.; ZHOU, J.; XU, Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. **Biomedical Reports**, v. 3, n. 5, p. 617–620, 2015.

LI, X.-Z.; NIKAIDO, H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. **Drugs**, v. 69, n. 12, p. 1555–1623, 2009.

LIVERMORE, D. M. Fourteen years in resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 4, p. 283–294, 2012.

LU, X.; LIU, X.; WAN, B.; FRANZBLAU, S. G.; CHEN, L.; ZHOU, C.; YOU, Q. Synthesis and evaluation of anti-tubercular and antibacterial activities of new 4-(2,6-dichlorobenzoyloxy)phenyl thiazole, oxazole and imidazole derivatives. Part 2. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 164–171, 2012.

MALDONADO, R. F.; SÁ-CORREIA, I.; VALVANO, M. A. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. **FEMS Microbiology reviews**, v. 40, n. 4, p. 480–93, 2016.

MATHEWS, S. T.; KOTHARI, V.; GALDO, J. Hypoglycemic agents and potential anti-inflammatory activity. **Journal of Inflammation Research**, p. 27, 2016.

MEIJER, L.; SKALTSOUNIS, A.-L.; MAGIATIS, P.; POLYCHRONOPOULOS, P.; KNOCKAERT, M.; LEOST, M.; RYAN, X. P.; VONICA, C. A.; BRIVANLOU, A.; DAJANI, R.; CROVACE, C.; TARRICONE, C.; MUSACCHIO, A.; ROE, S. M.; PEARL, L.; GREENGARD, P. GSK-3-Selective Inhibitors Derived from *Tyrian Purple* Indirubins. **Chemistry & Biology**, v. 10, n. 12, p. 1255–1266, 2003.

MELLOR, H. R.; CALLAGHAN, R. Accumulation and distribution of doxorubicin in tumour spheroids: The influence of acidity and expression of P-glycoprotein. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, n.68, p. 1179–90, 2011.

MISHRA, G.; SACHAN, N.; CHAWLA, P. Synthesis and evaluation of thiazolidinedione-coumarin adducts as antidiabetic, anti-inflammatory and antioxidant agents. **Letters in Organic Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 429–455, 2015.

MOHAMMADI-FARANI, A.; FOROUMADI, A.; KASHANI, M. R.; ALIABADI, A. N-Phenyl-2-p-tolylthiazole-4-carboxamide derivatives: synthesis and cytotoxicity evaluation as anticancer agents. **Iranian Journal of basic medical sciences**, v. 17, n. 7, p. 502–8, 2014.

MOHIL, R.; KUMAR, D.; MOR, S. Synthesis and antimicrobial activity of some 1,3-Disubstituted Indeno[1,2- c]pyrazoles. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 203–211, 2014.

MOREIRA, T. L. B.; BARBOSA, A. F. S.; VEIGA-SANTOS, P.; HENRIQUES, C.; HENRIQUES-PONS, A.; GALDINO, S. L.; LIMA, M. C. A.; PITTA, I. da R.; DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U. Effect of thiazolidine LPSF SF29 on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 2, p. 183–187, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, [s. l.], v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOSQUITO, S.; RUIZ, J.; BAUER, J. L.; OCHOA, T. J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli*-associated diarrhea. **Revista Peruana de**

Medicina Experimental y Salud Pública, v. 28, n. 4, p. 648–56, 2011.

MOUSAVI, S. M.; ZAREI, M.; HASHEMI, S. A.; BABAPOOR, A.; AMANI, A. M. A conceptual review of rhodanine: current applications of antiviral drugs, anticancer and antimicrobial activities. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 1132–1148, 2019.

NAIM, M. J.; ALAM, M. J.; AHMAD, S.; NAWAZ, F.; SHRIVASTAVA, N.; SAHU, M.; ALAM, O. Therapeutic journey of 2,4-thiazolidinediones as a versatile scaffold: An insight into structure activity relationship. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 129, p. 218–250, 2017.

NAQUIN, A.; SHRESTHA, A.; SHERPA, M.; NATHANIEL, R.; BOOPATHY, R. Presence of antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant in Thibodaux, Louisiana, USA. **Bioresource Technology**, v. 188, p. 79–83, 2015.

NARGOTRA, A.; KOUL, S.; SHARMA, S.; KHAN, I. A.; KUMAR, A.; THOTA, N.; KOUL, J. L.; TANEJA, S. C.; QAZI, G. N. Quantitative structure–activity relationship (QSAR) of aryl alkenyl amides/imines for bacterial efflux pump inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 229–238, 2009.

NCCLS. Standards., National Committee for Clinical Laboratory. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard. p. 1–47, 2003.

NEUPANE, S.; PANT, N. D.; KHATIWADA, S.; CHAUDHARY, R.; BANJARA, M. R. Correlation between biofilm formation and resistance toward different commonly used antibiotics along with extended spectrum beta lactamase production in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from the patients suspected of urinary tract infections visit. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 5, n. 1, p. 5, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years \perp . **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461–477, 2007.

NIKAIDO, H.; LI, X.-Z. **Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update**. v. 69. p. 1555-623. 2009.

NIKAIDO, H.; PAGÈS, J.-M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 340–363, 2012.

O'NEILL, J. **Review on antimicrobial resistance. tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations**. London, England: Wellcome Trust, HM Government, 2016.

OLIVEIRA, A. R. **Obtenção de novos ftalil-tiazóis e avaliação das atividades antitumoral e imunomodulatória in vitro**, 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2014.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, p. 976–984, 2002.

OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F.-T.; ZHOU, T.-T.; LIU, B.; BAO, J.-K.

Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487–498, 2012.

PALING, F. P.; WOLKEWITZ, M.; BODE, L. G. M.; KLEIN KLOUWENBERG, P. M. C.; ONG, D. S. Y.; DEPUYDT, P.; DE BUS, L.; SIFAKIS, F.; BONTEN, M. J. M.; KLUYTMANS, J. A. J. W. *Staphylococcus aureus* colonization at ICU admission as a risk factor for developing *S. aureus* ICU pneumonia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 1, p. 49.e9-49.e14, 2017.

PANICO, R.; POWELL, W. H.; RICHER, J. C. **IUPAC – Nomenclature of organic compounds**. ed. Blackw ed. London.

PARK, S.; SHIMIZU, C.; SHIMOYAMA, T.; TAKEDA, M.; ANDO, M.; KOHNO, T.; FUJIWARA, Y. Gene expression profiling of ATP-binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. **Breast cancer research and treatment**, n. 99, p. 9-17, 2006.

PARTAP, S.; AKHTAR, M. J.; YAR, M. S.; HASSAN, M. Z.; SIDDIQUI, A. A. Pyridazinone hybrids: Design, synthesis and evaluation as potential anticonvulsant agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 77, p. 74–83, 2018.

PASQUALOTTO, A. C.; THIELE, K. O.; GOLDANI, L. Z. Novel triazole antifungal drugs: focus on isavuconazole, ravuconazole and albaconazole. **Current opinion in investigational drugs**, v. 11, n. 2, p. 165–74, 2010.

PATIL, V.; TILEKAR, K.; MEHENDALE-MUNJ, S.; MOHAN, R.; RAMAA, C. S. Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new 5-benzylidene-2,4-thiazolidinedione derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 4539–4544, 2010.

PAULSEN, I. T.; BROWN, M. H.; SKURRAY, R. A. Proton-dependent multidrug efflux systems. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 4, p. 575–608, 1996.

PEREIRA, P. S.; LIMA, M. C. A.; NETO, P. P. M.; OLIVEIRA-TINTINO, C. D. de M.; TINTINO, S. R.; MENEZES, I. R. de A.; DE OLIVEIRA, J. F.; MARCHAND, P.; COUTINHO, H. D. M.; RODRIGUES, M. do D.; DA SILVA, T. G. Thiazolidinedione and thiazole derivatives potentiate norfloxacin activity against NorA efflux pump over expression in *Staphylococcus aureus* 1199B strains. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 17, p. 3797–3804, 2019.

PÉREZ, J.; ROBLES, A. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. **Revista Médica Medigraphic**, v. 4, n. 3, p. 187–191, 2013.

PÉREZ, M. J.; QUINTANILLA, R. A. Therapeutic actions of the thiazolidinediones in alzheimer's disease. **PPAR Research**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

PETERSEN, I. S.; LARSEN, P. L.; BRANDELEV, B. L.; HALD, J.; PRÆTORIUS, C.; WELINDER, R.; BRUUN, B. Close association between oropharyngeal and rhinopharyngeal colonization with *Staphylococcus aureus* – clues to new insight of MRSA colonization of the oropharynx. **Journal of Hospital Infection**, v. 84, n. 3, p. 259–262, 2013.

PIDDOCK, L. J. V. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 382–402, 2006.

PONTE-SUCRE, A. Availability and applications of ATP-binding cassette (ABC) transporter blockers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 76, p. 279–86, 2007.

POOLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. **Annals of Medicine**, v. 39, n. 3, p. 162–176, 2007.

POPOVICH, K. J.; ZAWITZ, C.; AROUTCHEVA, A.; PAYNE, D.; SCHOENY, M.; DIEP, L.; HOTA, B.; HAYDEN, M. K.; WEINSTEIN, R. A. 1229. Prevalence and acquisition of MRSA in females during incarceration at a large inner-city jail. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 5, n. suppl_1, p. S373–S373, 2018.

POS, K. M. Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 5, p. 782–793, 2009.

PRASANNA, D. S.; KAVITHA, C. V.; VINAYA, K.; RANGANATHA, S. R.; RAGHAVA, B.; KUMAR, Y. C. S.; RAGHAVAN, S. C.; RANGAPPA, K. S. Synthesis and Antileukemic Activity of 1-((S)-2-Amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[d]thiazol-6-yl)-3-(substituted phenyl)urea Derivatives. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 83, n. 6, p. 689–697, 2010.

PUTNAM, K. P.; BOMBICK, D. W.; DOOLITTLE, D. J. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. **Toxicology in Vitro**, v. 16, n. 5, p. 599–607, 2002.

PUTTA, R. R.; DONTAMSETTY V, S.; GUDA, D. R.; ADIVIREDDY, P.; VENKATAPURAM, P. Synthesis and Anti-allergic Activity of Bis-heteroaryl Hydrazines. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 2216–2222, 2017.

RAGHUNAND, N.; MAHONEY, B.P.; GILLIES, R. J. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics: II. pH-dependent partition coefficients predict importance of ion trapping on pharmacokinetics of weakly basic chemotherapeutic agents. **Biochemical Pharmacology**, n. 66, p. 1219–29, 2003.

RAGHUNAND, N.; GILLIES, R. J. pH and drug resistance in tumors. **Drug Resistance Updates**, n. 3, p. 39–47, 2000.

RAHIM, F.; JAVED, M. T.; ULLAH, H.; WADOOD, A.; TAHA, M.; ASHRAF, M.; QURAT-UL-AIN; KHAN, M. A.; KHAN, F.; MIRZA, S.; KHAN, K. M. Synthesis, molecular docking, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory potential of thiazole analogs as new inhibitors for Alzheimer disease. **Bioorganic Chemistry**, v. 62, p. 106–116, 2015.

REID, M. J. A.; STEENHOFF, A. P.; MANNATHOKO, N.; MUTHOGA, C.; MCHUGH, E.; BROWN, E. L.; FISCHER, R. S. B. *Staphylococcus aureus* nasal colonization among HIV-infected adults in Botswana: prevalence and risk factors. **AIDS Care**, v. 29, n. 8, p. 961–965, 2017.

REVELES, K. R.; DUHON, B. M.; MOORE, R. J.; HAND, E. O.; HOWELL, C. K. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* diabetic foot infections in a large academic hospital: implications for antimicrobial stewardship. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0161658, 2016.

RODRIGUES, F. A. R.; BOMFIM, I. da S.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; GONCALVES, R. S. B.; WARDELL, J. L.; WARDELL, S. M. S. V.; DE SOUZA, M. V. N. Mefloquine-oxazolidine derivatives: a new class of anticancer agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 83, n. 1, p. 126–131, 2014.

RODRIGUES, M. do D.; SANTIAGO, P. B. G. S.; MARQUES, K. M. R.; PEREIRA, V. R. A.; DE CASTRO, M. C. A. B.; CANTALICE, J. C. L. L.; DA SILVA, T. G.; ADAM, M. L.; DO NASCIMENTO, S. C.; DE ALBUQUERQUE, J. F. C.; MILITAO, G. C. G. Selective cytotoxic and genotoxic activities of 5-(2-bromo-5-methoxybenzylidene)-thiazolidine-2,4-dione against NCI-H292 human lung carcinoma cells. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 3, p. 446–454, 2018.

RODRÍGUEZ-NORIEGA, E.; SEAS, C. The changing pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America: implications for clinical practice in the region. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. 87–96, 2010.

RODRÍGUEZ-ROJAS, A.; RODRÍGUEZ-BELTRÁN, J.; COUCE, A.; BLÁZQUEZ, J. Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 293–297, 2013.

ROLSTON, K. V.; WANG, W.; NESHER, L.; SMITH, J. R.; RYBAK, M. J.; PRINCE, R. A. Time-kill determination of the bactericidal activity of telavancin and vancomycin against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from cancer patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, n. 4, p. 338–342, 2017.

ROQUE MARQUES, K. M.; DO DESTERRO, M. R.; DE ARRUDA, S. M.; DE ARAÚJO NETO, L. N.; DO CARMO ALVES DE LIMA, M.; DE ALMEIDA, S. M. V.; DA SILVA, E. C. D.; DE AQUINO, T. M.; DA SILVA-JÚNIOR, E. F.; DE ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; DE M. SILVA, M.; DE A. DANTAS, M. D.; SANTOS, J. C. C.; FIGUEIREDO, I. M.; BAZIN, M.-A.; MARCHAND, P.; DA SILVA, T. G.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B. 5-Nitro-thiophene-thioseCIMarbazone derivatives present antitumor activity mediated by apoptosis and DNA intercalation. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 13, p. 1075–1091, 2019.

ROUF, A.; TANYELI, C. Bioactive thiazole and benzothiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 911–927, 2015.

SABATINI, S.; KAATZ, 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. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 14, p. 4321–4330, 2008.

SADEK, B.; AL-TABAKHA, M. M.; FAHELELBOM, K. M. S. Antimicrobial Prospect of Newly Synthesized 1,3-Thiazole Derivatives. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9386–9396, 2011.

SANTANA, T. I.; BARBOSA, M. de O.; GOMES, P. A. T. de M.; DA CRUZ, A. C. N.;

DA SILVA, T. G.; LEITE, A. C. L. Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 144, p. 874–886, 2018.

SAURAV, K.; KANNABIRAN, K. Cytotoxicity and antioxidant activity of 5-(2,4-dimethylbenzyl)pyrrolidin-2-one extracted from marine *Streptomyces* VITSVK5 spp. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 1, p. 81–86, 2012.

SCHINDLER, B. D.; JACINTO, P.; KAATZ, G. W. Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: current status of potentiating existing antibiotics. **Future Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 491–507, 2013.

SHAFI, S.; MAHBOOB ALAM, M.; MULAKAYALA, N.; MULAKAYALA, C.; VANAJA, G.; KALLE, A. M.; PALLU, R.; ALAM, M. S. Synthesis of novel 2-mercapto benzothiazole and 1,2,3-triazole based bis-heterocycles: Their anti-inflammatory and anti-nociceptive activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 324–333, 2012.

SHEN, H.; LAIRD, P. W. Interplay between the cancer genome and epigenome. **Cell**, v. 153, n. 1, p. 38–55, 2013.

SHU, L.; HUANG, R.; WU, S.; CHEN, Z.; SUN, K.; JIANG, Y.; CAI, X. PPAR γ and Its ligands: potential antitumor agents in the digestive system. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 3, p. 274–281, 2016.

SHUKLA, S.; WU, C. P.; AMBUDKAR, S. V. Development of inhibitors of ATP-binding-cassette drug transporters: present status and challenges. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, n. 4, p. 205–223, 2008.

SIDDIQUI, N.; ALAM, M. S.; SAHU, M.; NAIM, M. J.; YAR, M. S.; ALAM, O. Design, synthesis, anticonvulsant evaluation and docking study of 2-[(6-substituted benzo[d]thiazol-2-ylcarbonyl)methyl]-1-(4-substituted phenyl)isothioureas. **Bioorganic Chemistry**, v. 71, p. 230–243, 2017.

SIDDIQUI, N.; ARYA, S. K.; AHSAN, W.; AZAD, B. Diverse biological activities of thiazoles: a retrospect. **International Journal of Drug Development & Research**, v. 3, n. 4, p. 156–164, 2011.

SILVA, L. M. M. G.; OLIVEIRA, J. F.; SILVA, W. J.; SILVA, A. L.; JUNIOR, A. S. A. A.; SANTOS, V. H. B.; ALVES, L. C.; SANTOS, F. B.; COSTA, V. M. A.; AIRES, A. L.; LIMA, M. C. A.; M.C.P.A. ALBUQUERQUE. New 1,3-benzodioxole derivatives: Synthesis, evaluation of in vitro schistosomicidal activity and ultrastructural analysis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 283, p. 20–29, 2018.

SINDHU, J.; SINGH, H.; KHURANA, J. M.; SHARMA, C.; ANEJA, K. R. Multicomponent domino process for the synthesis of some novel 5-(arylidene)-3-((1-aryl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-thiazolidine-2,4-diones using PEG-400 as an efficient reaction medium and their antimicrobial evaluation. **Chinese Chemical Letters**, v. 26, n. 1, p. 50–54, 2015.

SINGH, S. P.; PARMAR, S. S.; RAMAN, K.; STENBERG, V. I. Chemistry and biological activity of thiazolidinones. **Chemical Reviews**, v. 81, n. 2, p. 175–203,

1981.

SINGHAL, A.; JIE, L.; KUMAR, P.; HONG, G. S.; LEOW, M. K.-S.; PALEJA, B.; TSENOVA, L.; KUREPINA, N.; CHEN, J.; ZOLEZZI, F.; KREISWIRTH, B.; POIDINGER, M.; CHEE, C.; KAPLAN, G.; WANG, Y. T.; DE LIBERO, G. Metformin as adjunct antituberculosis therapy. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 263, p. 263ra159-263ra159, 2014.

SINHA, S.; DOBLE, M.; MANJU, S. L. Design, synthesis and identification of novel substituted 2-amino thiazole analogues as potential anti-inflammatory agents targeting 5-lipoxygenase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 158, p. 34–50, 2018.

SOENEN, S. J.; MANSHIAN, B.; MONTENEGRO, J. M.; AMIN, F.; MEERMANN, B.; THIRON, T.; CORNELISSEN, M.; VANHAECKE, F.; DOAK, S.; PARAK, W. J.; DE SMEDT, S.; BRAECKMANS, K. Cytotoxic effects of gold nanoparticles: a multiparametric study. **ACS Nano**, v. 6, n. 7, p. 5767–5783, 2012.

STEEL, H. C.; THERON, A. J.; COCKERAN, R.; ANDERSON, R.; FELDMAN, C. Pathogen- and host-directed anti-inflammatory activities of macrolide antibiotics. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, p. 1–17, 2012.

STEINBACH, D.; GILLET, J. P.; SAUERBREY, A.; GRUHN, B.; DAWCZYNSKI, K.; BERTHOLET, V.; EFFERTH, T. ABCA3 as a possible cause of drug resistance in childhood acute myeloid leukemia. **Clinical cancer research**, n. 12, p. 4357-4363, 2006.

STEINFELS, E.; ORELLE, C.; FANTINO, J.-R.; DALMAS, O.; RIGAUD, J.-L.; DENIZOT, F.; DI PIETRO, A.; JAULT, J.-M. Characterization of YvcC (BmrA), a multidrug abc transporter constitutively expressed in *Bacillus subtilis* †. **Biochemistry**, v. 43, n. 23, p. 7491–7502, 2004.

SUN, J.; DENG, Z.; YAN, A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, n. 2, p. 254–267, 2014.

SUN, S.; WANG, Z. ALDHhigh adenoid cystic carcinoma cells display cancer stem cell properties and are responsible for mediating metastasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, n. 4, p. 843–848, 2010.

SYKES, M. L.; AVERY, V. M. Development and application of a sensitive, phenotypic, high-throughput image-based assay to identify compound activity against *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, n. 3, p. 215–228, 2015.

SZAKÁCS, G.; ANNÉREAU, J. P.; LABABIDI, S.; SHANKAVARAM, U.; ARCIELLO, A.; BUSSEY, K. J.; WEINSTEIN, J. N. Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. **Cancer cell**, n. 6, v. 2, 129-137, 2004.

TADESSE, S.; YU, M.; MEKONNEN, L. B.; LAM, F.; ISLAM, S.; TOMUSANGE, K.; RAHAMAN, M. H.; NOLL, B.; BASNET, S. K. C.; TEO, T.; ALBRECHT, H.; MILNE, R.; WANG, S. Highly Potent, Selective, and Orally Bioavailable 4-Thiazol- N -(pyridin-

2-yl)pyrimidin-2-amine cyclin-dependent kinases 4 and 6 inhibitors as anticancer drug candidates: design, synthesis, and evaluation. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 5, p. 1892–1915, 2017.

TAFUR, J. D.; TORRES, J. A.; VILLEGAS, M. V. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas mechanisms of antibiotic resistance in Gram negative bacteria. **Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas**, v. 12, n. 3, p. 217–226, 2008.

TAKATE, S. J.; SHINDE, A. D.; KARALE, B. K.; AKOLKAR, H.; NAWALE, L.; SARKAR, D.; MHASKE, P. C. Thiazolyl-pyrazole derivatives as potential antimycobacterial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 10, p. 1199–1202, 2019.

TANG, S. C.; LAGAS, J. S.; LANKHEET, N. A.; POLLER, B.; HILLEBRAND, M. J.; ROSING, H.; BEIJNEN, J. H.; SCHINKEL, A. H. Brain accumulation of sunitinib is restricted by P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) and can be enhanced by oral elacridar and sunitinib coadministration. **The International Journal of Cancer**, n. 130, p. 223–233, 2012.

TETKO, I. V.; GASTEIGER, J.; TODESCHINI, R.; MAURI, A.; LIVINGSTONE, D.; ERTL, P.; PALYULIN, V. A.; RADCHENKO, E. V.; ZEFIROV, N. S.; MAKARENKO, A. S.; TANCHUK, V. Y.; PROKOPENKO, V. V. Virtual computational chemistry laboratory – design and description. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 19, n. 6, p. 453–463, 2005.

THOTA, N.; REDDY, M. V.; KUMAR, A.; KHAN, I. A.; SANGWAN, P. L.; KALIA, N. P.; KOUL, J. L.; KOUL, S. Substituted dihydronaphthalenes as efflux pump inhibitors of *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 3607–3616, 2010.

TIWARI, A. K.; SODANI, K.; DAI, C. L.; ASHBY JR.; C. R.; CHEN, Z. S. Revisiting the ABCs of multidrug resistance in cancer chemotherapy. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, n. 12, p. 570–594, 2011.

TONG, S. Y. C.; DAVIS, J. S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T. L.; FOWLER, V. G. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015.

TROTSKO, N.; KOSIKOWSKA, U.; PANETH, A.; WUJEC, M.; MALM, A. Synthesis and antibacterial activity of new (2,4-dioxothiazolidin-5-yl/ylidene)acetic acid derivatives with thiazolidine-2,4-dione, rhodanine and 2-thiohydantoin moieties. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 4, p. 568–577, 2018.

TRUONG-BOLDUC, Q. C.; HOOPER, D. C. Phosphorylation of MgrA and Its effect on expression of the NorA and NorB efflux pumps of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 10, p. 2525–2534, 2010.

UBOLDI, C.; GIUDETTI, G.; BROGGI, F.; GILLILAND, D.; PONTI, J.; ROSSI, F. Amorphous silica nanoparticles do not induce cytotoxicity, cell transformation or genotoxicity in Balb/3T3 mouse fibroblasts. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 745, n. 1–2, p. 11–20, 2012.

UEDA, K. ABC proteins protect the human body and maintain optimal health. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, p. 401–9, 2011.

UEDA, K.; CORNWELL, M. M.; GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I.; RONINSON, I. B.; LING, V.; RIORDAN, J. R. The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 141, p. 956–962, 1986.

UWABAGIRA; SAROJINI. 3-[(2,3-Dichlorophenyl)amino]methyl-5-(furan-2-ylmethylidene)-1,3-thiazolidine-2,4-dione. **Molbank**, v. 2019, n. 4, p. M1083, 2019.

VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M.; WIEMER, E. A.; PRINS, A.; MEIJERINK, J.P.; VOSSEBELD, P. J.; VAN DER HOLT, B.; PIETERS, R.; SONNEVELD, P. Increased expression of the breast cancer resistance protein (BCRP) in relapsed or refractory acute myeloid leukemia (AML). **Leukemia**, n. 16, p. 833–839, 2002.

VAN HOEK, A. H. A. M.; MEVIUS, D.; GUERRA, B.; MULLANY, P.; ROBERTS, A. P.; AARTS, H. J. M. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, 2011.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 731, p. 237–245, 2001.

VERHOEVEN, P. O.; GAGNAIRE, J.; BOTELHO-NEVERS, E.; GRATARD, F.; CARRICAJÓ, A.; LUCHT, F.; POZZETTO, B.; BERTHELOT, P. Detection and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage: an update. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 12, n. 1, p. 75–89, 2014.

VISIOLI, F.; WANG, Y.; ALAM, G. N.; NING, Y.; RADOS, P. V.; NÖR, J. E. Glucose-regulated protein 78 (Grp78) confers chemoresistance to tumor endothelial cells under acidic stress. **PLoS ONE**, n. 9, p. 1–9, 2014.

WANG, J.-L.; DONG, Y.-H.; KO, W.-C.; CHANG, C.-H.; WU, L.-C.; CHUANG, L.-M.; CHEN, P.-C. Thiazolidinediones and reduced risk of incident bacterial abscess in adults with type 2 diabetes: A population-based cohort study. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 20, n. 12, p. 2811–2820, 2018.

WANG, X.-K.; SUN, T.; LI, Y.-J.; WANG, Y.-H.; LI, Y.-J.; YANG, L.-D.; FENG, D.; ZHAO, M.-G.; WU, Y.-M. A novel thiazolidinedione ATZD2 rescues memory deficits in a rat model of type 2 diabetes through antioxidant and antiinflammation. **Oncotarget**, v. 8, n. 64, 2017.

WBG. **World Bank Group: Drug resistant infections: a threat to our economic future. Final Report.** International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank, 2017.

WERTHEIM, H. F.; MELLES, D. C.; VOS, M. C.; VAN LEEUWEN, W.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. A.; NOUWEN, J. L. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p. 751–762, 2005.

WANG, X.; ZHANG, H.; CHEN, X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. **Cancer Drug Resistance**, v. 2, p. 141–160, 2019.

WHO. **World Health Organization: Fact Sheet on Cancer.** <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. 2019.

WILLIAMS, M. R.; NAKATSUJI, T.; GALLO, R. L. *Staphylococcus aureus*: Master Manipulator of the Skin. **Cell Host & Microbe**, v. 22, n. 5, p. 579–581, 2017.

WU, C. P.; HSIEH, C. H.; WU, Y. S. The emergence of drug transporter-mediated multidrug resistance to cancer chemotherapy. **Molecular Pharmaceutics**, n. 8, p. 1996–2011, 2011.

XU, C.; LIN, X.; REN, H.; ZHANG, Y.; WANG, S.; PENG, X. Analysis of outer membrane proteome of *Escherichia coli* related to resistance to ampicillin and tetracycline. **Proteomics**, v. 6, n. 2, p. 462–473, 2006.

XU, Z.; LI, L.; SHIRTLIFF, M. E.; PETERS, B. M.; LI, B.; PENG, Y.; ALAM, M. J.; YAMASAKI, S.; SHI, L. Resistance class 1 integron in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in southern China, 2001–2006. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 5, p. 714–718, 2011.

YADAV, P. S.; DEVPRAKASH, D.; SENTHILKUMAR, G. P. ChemInform Abstract: Benzothiazole: Different Methods of Synthesis and Diverse Biological Activities. **ChemInform**, v. 42, n. 40, p. no-no, 2011.

YARNELL, A. SALVARSAN. **Chemical & Engineering News Archive**, v. 83, n. 25, p. 116, 2005.

YU, M; OCANA, A; TANNOCK, IF. Reversal of ATP-binding cassette drug transporter activity to modulate chemoresistance: why has it failed to provide clinical benefit? **Cancer and Metastasis Reviews**, n. 32, p. 211–27, 2013.

YU, J.-L.; GRINIUS, L.; HOOPER, D. C. NorA functions as a multidrug efflux protein in both cytoplasmic membrane vesicles and reconstituted proteoliposomes. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 5, p. 1370–1377, 2002.

ZHANG, L.; GUERRERO-JUAREZ, C. F.; HATA, T.; BAPAT, S. P.; RAMOS, R.; PLIKUS, M. V.; GALLO, R. L. Dermal adipocytes protect against invasive *Staphylococcus aureus* skin infection. **Science**, v. 347, n. 6217, p. 67–71, 2015.

ZHANG, L.; MA, S. Efflux Pump Inhibitors: A strategy to combat p-glycoprotein and the nora multidrug resistance pump. **ChemMedChem**, v. 5, n. 6, p. 811–822, 2010.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY

Bioorganic & Medicinal Chemistry 27 (2019) 3797–3804



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc



Thiazolidinedione and thiazole derivatives potentiate norfloxacin activity against NorA efflux pump over expression in *Staphylococcus aureus* 1199B strains



Pedro Silvino Pereira^a, Maria do Carmo Alves de Lima^{a,*,1}, Pedro Paulo Marcelino Neto^a, Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino^a, Saulo Relison Tintino^b, Irwin Rose de Alencar Menezes^b, Jamerson Ferreira de Oliveira^a, Pascal Marchand^c, Henrique Douglas Melo Coutinho^b, Maria do Desterro Rodrigues^a, Teresinha Gonçalves da Silva^{a,*,1}

^a Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Arar de Sá, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE 54740-520, Brazil

^b Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri (URCA), Av. Cel. Antonio Luiz, 1161, Pombal, Crato, CE 63105-000, Brazil

^c Département de Chimie Thérapeutique, EA11255 - BCMed, Université de Nantes, Institut de Recherche en Santé 2, F-44200 Nantes, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Docking
Antimicrobial resistance
Efflux pump
Gram-positive

ABSTRACT

Thiazol and thiazolidinedione derivatives are known in the literature for presenting several biological activities, such as anti-diabetic, anti-inflammatory, antiparasitic, antifungal and antimicrobial activity. With this in mind, this study reports on the synthesis and antibacterial activity of thiazole (NJ) and thiazolidinedione (NW) derivatives, as well as their effects in association with norfloxacin, against NorA efflux pumps in the *Staphylococcus aureus* 1199B (SA-1199B) strain. Among the 14 compounds evaluated, 9 were found to potentiate norfloxacin activity, with 4 compounds from the NJ series promoting a threefold norfloxacin MIC reduction. Molecular docking assays were used to confirm the binding mode of most active compounds. In the *in silico* study, the efficiency of the interaction of NJ series compounds with the NorA pump were evaluated. Derivatives from both series did not show considerable intrinsic antibacterial activity (MIC > 1024 µg/mL) against any of the tested strains. However, the NJ16 and NJ17 compounds, when associated with norfloxacin, reduced the MIC of this drug threefold and inhibited NorA pumps in the 1199B strain. Moreover, some NW (05, 10, 18, 19 and 21) and NJ compounds (16, 17, 18 and 20) presented low to moderate cytotoxicity against normal cells. Molecular docking studies supported the potent *in vitro* inhibitory activity of NJ16 and NJ17, which showed NJ16 and NJ17 possessed more favorable binding energies of -9.03 Kcal/mol and -9.34 Kcal/mol, respectively. In addition, NJ16 showed different types of interactions involved in complex stabilization. In conclusion, NJ16 and NJ17, in combination with norfloxacin, were able to completely restore the antibacterial activity of norfloxacin against *S. aureus* SA-1199B, the norA-overexpressing strain, with low cytotoxicity in normal cells.

1. Introduction

Bacterial infections are increasing worldwide and constitute a serious public health problem being responsible for increasing mortality rates and public health costs.^{1,2} The emergence of multidrug resistant (MDR) microorganisms in different bacterial species is a worrying factor and has evolved into a worldwide health threat.^{3,4} The severity of antibiotic resistance lies in the fact that bacterial strains are not only resistant to commonly available antibacterials but may also have

increased virulence, with these highly pathogenic and often resistant strains increasing mortality rates.^{5,6} One of the contributing factors to bacterial resistance is the abusive and indiscriminate use of antibiotics, primarily responsible for promoting a selective bacterial effect, resulting in the emergence of MDR strains.^{7,8} Therefore, the discovery and development of new antibiotics or agents capable of reversing bacterial resistance are of crucial importance to counter the accelerated growth of multidrug resistant pathogens.

Staphylococcus aureus, a commensal Gram-positive bacterial

* Corresponding authors.

E-mail addresses: maria.lima@pq.cnpq.br (M.d.C.A.d. Lima), teresinha.goncalves@pq.cnpq.br (T.G. da Silva).

¹ These authors contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.07.006>

Received 7 April 2019; Received in revised form 28 June 2019; Accepted 3 July 2019

Available online 04 July 2019

0968-0896/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

pathogen, is associated with community and hospital infections which may cause bacteremia, skin infections, pneumonia, bone and joint infections, as well as endocarditis.^{9,10} This bacterium is generally isolated from infected surgical wounds, which may represent foci for the development of systemic infections, and is able to colonize several ecological niches within its human host, including the skin and the respiratory tract.^{9,11} According to Liu et al.,¹² *S. aureus* strains may become resistant to methicillin, penicillins, lincomycins, tetracyclines, rifampicin and vancomycin. As described by Gibbons,¹³ this bacterium is capable of acquiring resistance to all antibiotics, which becomes a global public health problem. Different factors contribute to bacterial resistance, including numerous efflux systems which reduce the effective intracellular concentration of antibiotics and which have been reported in Gram-positive and Gram-negative bacteria.¹⁴ According to Hernando-Amado et al.¹⁵ and Nikaïdo,¹⁶ multiple drug efflux pumps constitute a group of carriers in organisms, and which contribute to the resistance to compounds used in the treatment of different diseases, including resistance to anticancer drugs, antibiotics or antifungal compounds. Bacterial efflux pumps are classified into five families: the resistance nodulation and cell division (RND), the major facilitator superfamily (MFS), ATP-binding cassette ABC superfamily, small multidrug resistance Family (family-SMR), and the multidrug and toxic compound extrusion family (MATE).^{17–19} The *S. aureus* NorA MFS efflux pump actively transports several antibiotics including fluoroquinolones (e.g. ciprofloxacin and norfloxacin) and contributes to the MDR phenotype in these bacteria.²⁰ Co-administration of an efflux pump inhibitor (EPI) with antibiotics is therefore a promising strategy against resistant clinical strains.^{21,22}

According to Herlishberg et al.²³ and Thota et al.,²⁴ studies are being carried out to develop new antibacterial agents capable of preventing the extrusion of drugs such as methicillin, vancomycin and doxycycline and to identify compounds which reduce or block efflux pump activity. Among these compounds, thiazolidinedione and thiazole derivatives may become a new class for the development of antibacterial drugs.²⁵

Studies with thiazole derivatives have shown this class possesses antibacterial and anti-inflammatory,²⁶ antidepressant,²⁷ antitumor,^{28,29} antituberculosis,³⁰ antiprotozoal³¹ and antichagasic³² activities. Thiazolidinediones are important given their biological activities, such as: antimicrobial,³³ hypoglycemic,³⁴ anti-inflammatory,³⁵ steroidogenic³⁶ and antiviral³⁷ properties.

Therefore, the synthesis and evaluation of thiazolidinedione and thiazole derivatives as potential antibacterial agents and/or NorA efflux pump inhibitors present in the *S. aureus* 1199B (SA-1199B) strain were the focus of this research. Docking studies were also performed to observe, *in silico*, interactions between the most active compounds with the molecular target, the NorA efflux pump.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

The compounds synthesized in this study were obtained in two steps (Scheme 1). In the first step, the thiosemicarbazide reacted in equimolar amounts with 2-methoxy-5-bromo-benzaldehyde through a condensation reaction in the presence of hydrochloric acid as the reaction catalyst to obtain a thiosemicarbazone (TSC), which served as an intermediary for thiazole synthesis following its acquisition. This second step was carried out in the presence of different 2-chloro or 2-bromoacetophenones (unsubstituted, 4-chloro, 4-bromo-4-fluoro, 4-nitro, 4-phenyl).

Thereafter, the compounds had their structures determined by ¹H and ¹³C Nuclear Magnetic Resonance. In general, ¹H NMR allows methoxyl group hydrogens (δ 3.80–3.87 ppm), imino hydrogens (δ 8.26–8.62 ppm) and the thiazole ring hydrogen (δ 7.31–7.71 ppm) signals to be highlighted.

During the formation of thiazoles using the adopted methodology,

the generated imine bond may be endocyclic or exocyclic, in relation to the formed thiazole, due to the tautomerism presented in the structure of these compounds.

Thus, a displacement of the hydrogen signal in the –NH group may undergo modifications depending on the organic function generated. The literature shows that hydrogen signals for lactams, 4-thiazolidinones and thiazolidine-2,4-diones appear in a more unprotected region between δ 11.4–12.4 ppm. On the other hand, hydrazinic hydrogens have displacements reported in more protected regions, below 11 ppm.^{38,39} The compounds described in this study showed signals referring to the –NH group in the δ 12.25–12.39 ppm region, which suggests the NJ series thiazol has an exocyclic imine bond.

2.2. Antibacterial activity

The tested thiazolidinedione and thiazole derivatives did not present intrinsic antibacterial activity, a fact supported by the high minimal inhibitory concentration value, which is considered irrelevant since it was above 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.⁴⁰ However, one of the advantages of effective efflux pump inhibitors is the absence of antibacterial activity, since the lack of this activity avoids potential bacterial resistance to the substance in question,⁴¹ which led us to investigate their actions as efflux pump inhibitors.

2.3. Efflux pump inhibitory activity against the multidrug-resistant SA 1199B strain

The molecules NW05, NW10, NW18, NW19 and NW21 presented synergistic effects with norfloxacin against the SA 1199 wild-type strain and the resistant 1199B NorA pump carrier strain when compared to the control (Fig. 1). Therefore, these results indicate this effect may involve other mechanisms beyond efflux pump inhibition, since NW compounds (NW5, NW10, NW18, NW19) presented synergistic effects with norfloxacin, inhibiting the mutant 1199B strain carrying the NorA pump, while compound NW21 presented an inhibitory effect only against the mutant strain.

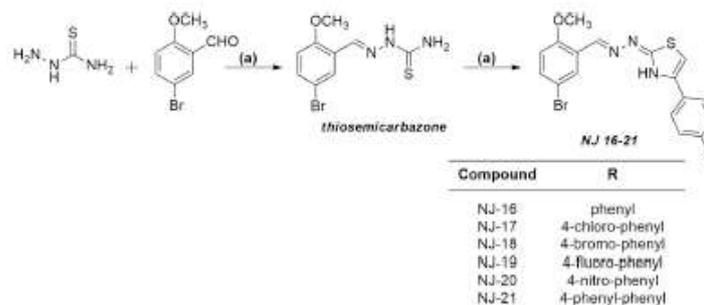
An antagonistic effect was observed with the combinations between norfloxacin and the substances NW06, NW07 and NW17, where a higher concentration of norfloxacin was required to inhibit bacterial growth.

The Table 1 shows details of significant synergistic effects against the SA 1199 strain by NW05, NW10, NW18, NW19 and NW21 substances which obtained, respectively, MIC values of 32, 32, 50.8, 8 and 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. On the other hand, the mutant strain obtained MIC values of 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for these substances. Moreover, the molecules' cytotoxicity were evaluated in L929 fibroblasts, as shown in Table 1.

As shown in Fig. 2, compounds NJ16, NJ17, NJ18 and NJ20 presented a synergistic inhibitory effect with norfloxacin against the SA 1199 wild-type strain, obtaining MIC values of 0.5, 0.63, 16, 5 and 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively (Table 2). As for the 1199B mutant strain carrying the NorA pump, a synergistic effect was observed with norfloxacin for the compounds NJ16, NJ17, NJ18, and NJ20. On the other hand, compounds NJ19, NJ21 presented an antagonistic effect when associated with norfloxacin against both strains.

While analyzing the data set, compounds NJ19 and NJ21 presented antagonistic effects against the two strains when associated with norfloxacin, while other substances presented synergistic effects. Given that NJ16, NJ17, NJ18, and NJ20 compounds in association with norfloxacin showed synergism against both wild-type and resistant strains, these compounds may also be acting by other unidentified mechanisms in addition to inhibiting efflux pumps, especially compound NJ20 where the most pronounced synergistic effects were observed in the wild-type strain.

MIC values for NJ molecules against the NorA overexpressing SA 1199B strain are detailed in Table 2. MIC values for the NJ16, NJ17 and NJ18 molecules were recorded as 50.8, 40.3 and 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$,



Scheme 1. Synthesis of thiazoles and 4-thiazolidinone derivatives. Reagents and conditions: (a) ethanol, HCl, room temperature; (b) NaAcO, substituted acetophenones, ethanol, reflux; (c) NaAcO, ethyl chloroacetate, ethanol, reflux.

respectively, representing a MIC reduction greater than threefold in relation to the effect of Norfloxacin alone. As for the cell growth inhibition percentual (GI%) against L929 fibroblast cells, a low cytotoxicity was observed.

A reduction in inhibitory concentration is already well known in the literature as an indication of efflux pump inhibition.⁴² According to Costa et al.⁴³ and Schindler et al.,⁴⁴ a minimum inhibitory concentration reduction of three times or more using the broth microdilution method is indicative of a pump inhibitory effect. This reduction was observed for compounds NJ16, NJ17 and NJ18 when associated with norfloxacin against the NorA efflux pump carrying strain. In addition, it is noteworthy a synergistic effect was much more evident in the wild-type strain.

The efflux pump inhibition observed in the present study was confirmed by *in silico* analysis. NW series substituent groups in the molecules were observed to have no great influence on pump inhibition, since certain modifications did not increase their ability to inhibit the pump. Moreover, certain substitutions provoked an increase in drug resistance characterized as an antagonism, as was the case for NW16 and NW17 with the addition of bromine.

It is worth mentioning the observed antagonisms in many drug associations may be related to an antibiotic chelation effect, as already described in the literature. The binding groups present in these molecules can form bonds with the antibiotic and prevent it from acting on the target.⁴⁵

The NJ series, as previously mentioned, showed the best potential for efflux pump inhibition with a 3-fold MIC reduction, as observed for compounds NJ16, NJ17 and NJ18 where a greater synergism was observed against both the wild-type and the NorA pump carrier strain. In these compounds, the presence of various functional groups acting as potential pump binding sites may have favored this effect. It is known in the literature that molecules with many binders can better interact

Table 1

Minimal inhibitory concentration of NW series substances against the SA 1199 sensitive and SA 1199B multiresistant strains and the cell growth percentage inhibition (GI%) of NW series substances in fibroblast cells (L929), tested at a concentration of 50 µg/mL using the MTT method following 72 h of incubation.

Compound	Norfloxacin MICs (µg/mL)		L929 Cytotoxicity (GI%)
	SA 1199	SA 1199B	
Norfloxacin	64 ± 1.00	256 ± 1.00	–
NW05	32 ± 1.00	128 ± 1.00	28.95 ± 3.34
NW06	1024 ± 1.00	1024 ± 1.00	15.03 ± 3.70
NW07	1024 ± 1.00	1024 ± 1.00	21.07 ± 5.08
NW10	32 ± 0.58	128 ± 0.58	6.11 ± 1.80
NW17	1024 ± 1.00	1024 ± 1.00	15.83 ± 3.03
NW18	50.8 ± 0.86	128 ± 0.58	15.10 ± 1.80
NW19	8 ± 0.58	128 ± 0.58	9.20 ± 0.43
NW21	8 ± 0.58	128 ± 0.58	19.60 ± 2.20

The values represent the geometric mean ± S.E.M. (standard error of the mean). Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test. Cytotoxicity results are expressed as a cell growth inhibition percentual (GI%) when compared to the control (medium only). Each concentration was tested in triplicates.

with efflux pumps and cause their inhibition.^{46–48}

Efflux pump inhibition is one of the main strategies in bacterial resistance control. There are several ways in which efflux pump inhibitors can act, such as: energy uncoupling, direct binding and pump inhibition, pump gene expression inhibition, iron chelation required for pump action, membrane fluidity alterations. In addition, efflux pump inhibitors may be peptidomimetics and antibiotic analogs.⁴¹ With this in mind, in our study, it is believed direct binding is one of the main mechanisms responsible for the observed effect.

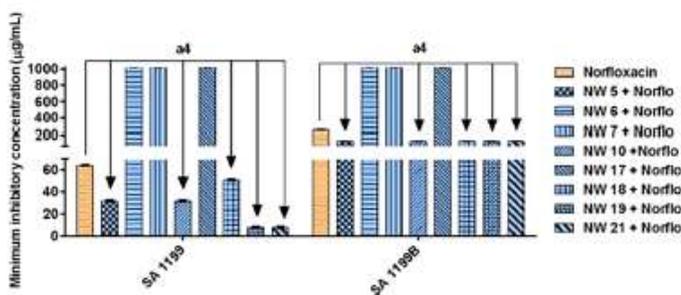


Fig. 1. Ability of NJ substances associated with norfloxacin to inhibit the NorA efflux pump in SA 1199B multiresistant strains, compared to the SA1199 wild-type strain devoid of the pump. The values represent the geometric mean ± S.E.M. (standard error of the mean). Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's post-hoc test. a4: $p < 0.0001$ vs antibiotic control; Norflo: Norfloxacin.

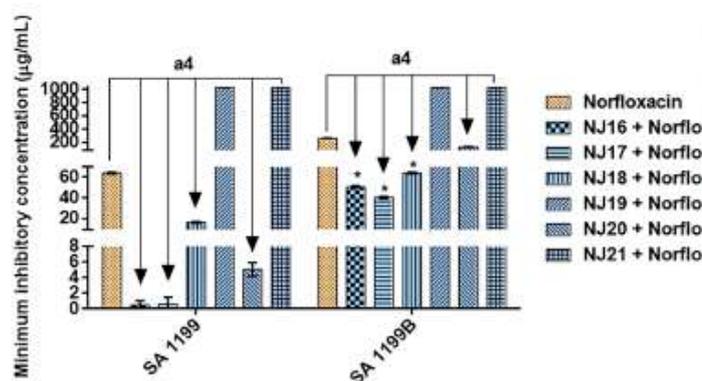


Table 2

Minimal inhibitory concentration (MIC) of NJ series substances against SA 11999 sensitive and SA 1199B multiresistant strains and cell growth inhibition percentage (GI%) of NJ series substances in fibroblast cells (L929), tested at a concentration of 50 µg/ml, using the MTT method following 72 h of incubation.

Compound	Norfloxacin MICs (µg/mL)		L929 Cytotoxicity (GI%)
	SA 11999	SA 1199B	
Norfloxacin	64 ± 1.00	256 ± 1.00	–
NJ16	0.5 ± 0.08	50.8 ± 0.86*	24.4 ± 6.74
NJ17	0.63 ± 0.86	40.3 ± 0.86*	30.07 ± 3.15
NJ18	16.00 ± 1.00	64 ± 1.00*	17.30 ± 6.40
NJ19	1024 ± 1.00	1024 ± 1.00	31.25 ± 0.91
NJ20	5 ± 0.86	128 ± 0.58	39.90 ± 2.60
NJ21	1024 ± 1.00	1024 ± 1.00	15.03 ± 3.70

The values represent the geometric mean ± S.E.M. (standard error of the mean). Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test. Cytotoxicity results are expressed as a cell growth inhibition percentage (GI%) when compared with the control (medium only). Each concentration was tested in triplicate.

* $p < 0.0001$ vs antibiotic control.

2.4. Molecular modeling and docking studies

In this study, only compounds showing significant activity against the multiresistant SA 1199B strain were used in docking studies. Fig. 3 shows all interaction positions between the amino acids present at the docking site for compound NJ16 (Fig. 3A) and compound NJ17 (Fig. 3C) revealing the orientation of all possible ligand modes within the binding site. The docking assays carried out show ligand-bound protein complexes with output clusters, obtained after each run. Docking assays also showed that cluster presents structures with the best full interactions.

Docking studies revealed that thiazoles were recorded as the most favorable with a binding energy of -9.34 Kcal/mol for the compound NJ17 and -9.03 Kcal/mol for the compound NJ16 with different interaction types being involved in stabilizing the complex (Van der Waals, hydrogen bond, electrostatic effect and pi-alkyl interactions, among others). The compound NJ16 shows Pi-Alkyl type interactions between ALA18 and bromo with a distance of 4.31 Å, Pi-Pi interactions between TYR287 and benzene with a distance of 5.82 Å, Pi-Alkyl type interactions between ALA339 and ILE341 and the 1,3-Thiazolidine group with a distance of 4.38 Å and 5.04 Å, respectively, Pi-Pi interactions between LEU269 and benzene with a distance of 7.1 Å and Pi-

Fig. 2. Ability of NJ series substances to inhibit NorA efflux pumps in SA 1199B multiresistant strains, in association with norfloxacin, compared to the SA1199 wild-type strain, devoid of the pump. The values represent the geometric mean ± S.E.M. (standard error of the mean). Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's post-hoc test. a4: $p < 0.0001$ vs antibiotic control; Norflo: Norfloxacin.

sigma interactions between LEU325 and benzene with a distance of 6.06 Å (Fig. 3B). Mean while, the NJ17 compound showed more significant interactions with SER262 with hydrogen bonds with the amine group with a distance of 2.43 Å. Other Pi-Alkyl type interactions between LEU269 and bromo with a distance of 4.32 Å, Alkyl interactions between ALA339, ILE341, ALA261, ALA180 and benzenes rings with a distance of 5.0 Å, 5.02 Å, 4.53 Å, 4.92 Å and 3.55 Å, respectively. Pi-Pi type interactions between PHE283 and 1,3-Thiazolidine and benzene rings with a distance of 4.87 Å and 5.46 Å, respectively, were found to interact with the NorA complex (Fig. 3D). The binding energy of interaction for the different compounds are shown in Table 1. These results corroborate with the *in vitro* modulation assays (Table 3).

This study reports the interaction of thiazolidinedione and thiazole-derived compounds may interfere with efflux pump mechanisms. Results from the docking assays corroborate with other present studies, in which lipophilic and hydrogen bonding properties improve the capacity of inhibiting this pump. In the studies by Guz et al.⁴⁹ and Lewis et al.,⁵⁰ lipophilic side chains were shown to be important for the improvement of antibacterial activity. Citral derivative compounds coupled with Alkyl/alkenyl/allyl amides have been reported as potent *S. aureus* NorA efflux pump inhibitors.⁵¹ The QSAR study shows that E-state indices and Alog P atom types are important descriptors responsible for describing the activity of aryl alkenyl amide/imine based efflux pump inhibitors.⁵² This hypothesis is also validated in this study, where the theoretical LogP calculated by the ALOGPS – VCLAB, Virtual Laboratory of Computational Chemistry (<http://www.vclab.org>), showed the compound NJ17 (LogP = 5.91) has higher lipophilic properties than the NJ16 compound (LogP = 5.15).⁵³ The hydrophobic drugs with high partition coefficients are preferentially distributed and many pharmaceutical and biological events are dependent on their lipophilic characteristics as, absorption of chemicals in the intestine by passive diffusion, able to diffuse over the blood-brain barrier and to work longer in the human organism.

Other studies on the mechanisms of molecular interactions demonstrate that hydrophobic and hydrogen bonding interactions are responsible for the stabilization of the ginsenoside20 (S) – Rh2 with the NorA protein.^{54,55} Sharma et al.⁵⁶ showed the piperine group is able to form hydrogen bonds (2.06 Å) with Arg141, favoring a structural orientation capable of stabilizing the hydrophobic α - π interactions with other amino acids. Similar interactions have also been observed here, which may in part be inferred that these compound derivatives interfere with the NorA pump mechanism.

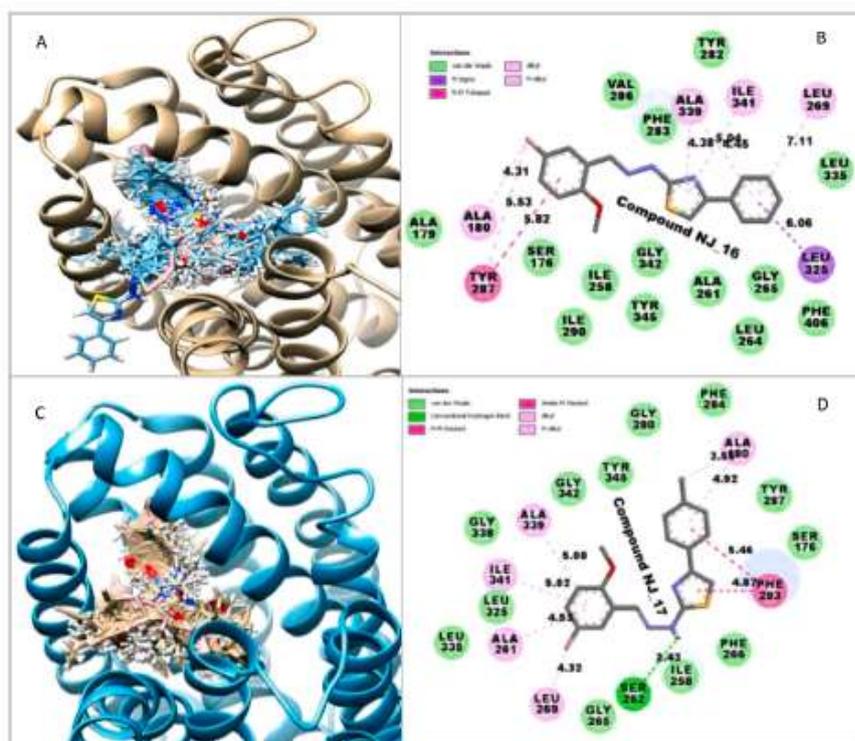


Fig. 3. Docking demonstrating all possible positions for the interaction between the NorA efflux pump and the NJ16 (A) and NJ17 compounds (C) with Ligplots showing the residues involved in the interactions between the NorA efflux pump with the NJ16 (B) and NJ17 compounds (D) (stick model) (B).

Table 3
The ΔG energy of binding with NorA.

Compound	Energy (Kcal/mol)
NJ16	-9.11
NJ17	-9.34
NJ18	-8.92
NJ19	-8.93
NJ20	-9.01
NJ21	-8.18
NW05	-8.99
NW06	-9.03
NW07	-8.60
NW10	-8.73
NW17	-9.00
NW18	-8.56
NW19	-8.60
NW21	-7.73

3. Conclusion

According to results obtained in this study, we can conclude that thiazolidinedione and thiazole derivatives did not present direct clinical antibacterial activity against *S. aureus* 1199 and *S. aureus* 1199B. However, NJ series derivatives (NJ16 and NJ17) when associated with norfloxacin reduced the MIC value in the resistant strain by threefold. Some NW series substances (5, 10, 18, 19 and 21) and NJ (16, 17, 18 and NJ20) presented low cytotoxicity. Docking results were in accordance with the *in vitro* assay and, revealed these compound

derivatives present a potential capacity to explain the NorA inhibition.

4. Experimental protocols

4.1. Chemistry

All reagents used in this study are commercially available (Sigma-Aldrich, Acros Organics, Vetec). The melting points were determined on a Quimis 340 (Quimis, Brazil) apparatus and are uncorrected. Infra red (IR) spectra were measured on a Bruker IFS-66 IR spectrophotometer (Bruker, Germany) using KBr pellets. NMR spectra were recorded on a Varian UnityPlus spectrometer 400 MHz (400 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C) or a Bruker AMX-300 MHz (300 MHz for ^1H and 75.5 MHz for ^{13}C) instrument by using tetramethylsilane as an internal standard. DMSO- d_6 was purchased from Sigma-Aldrich. The chemical shifts were reported in δ units and coupling constants (J) were reported in Hertz (Hz). The multiplicities were given as s (singlet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), dd (double doublet). TLC development was conducted on 0.25 mm silica gel plates (Merck, silica gel 60 F $_{254}$ in aluminium foil).

4.2. General procedure for the synthesis of NJ series

Thiazoles (NJ series) were obtained from a reaction involving 2-(5-bromo-2-methoxybenzylidene)thiosemicarbazone (1 mmol; previously synthesized) and different acetophenones (1.1 mmol) at basic conditions in ethanol. The reaction was processed under magnetic stirring for 24 h under reflux. Thereafter, the precipitate was filtered, washed with

ethanol then dried in a desiccator under vacuum. An additional amount of the desired compound could be recovered from the filtrate after cooling. After drying, the product was recrystallized from ethanol.³⁹ The synthesis of 1,3-benzodioxole derivatives (NW series) evaluated in this study were obtained as described by Silva et al.³⁷

4.2.1. NJ16: (*E*)-2-(2-(5-bromo-2-methoxybenzylidene)-hydrazinyl)-4-phenylthiazole

$C_{17}H_{14}BrN_3OS$. Yield: 57.70%. M.P.: 253–254 °C. Rf: 0.5 (7:3n-hexane/ethyl acetate). NMR 1H (300 MHz, DMSO) δ : 3.84 (s, 3H, OCH_3); 7.07 (d, 1H, CH-Ar, $J = 8.7$ Hz); 7.33 (s, 1H, thiazole); 7.38–7.43 (m, 3H, CH-Ar); 7.52 (m, 1H, CH-Ar); 7.82–7.84 (m, 3H, CH-Ar); 8.30 (s, 1H, HC=N); 12.30 (s, 1H, NH). NMR ^{13}C (DMSO, 75 MHz) δ : 56.08; 103.98; 112.51; 114.34; 124.51; 125.62; 126.75; 127.75; 128.28; 128.61; 132.87; 134.00; 135.73; 136.16; 149.59; 156.21; 168.01. HRMS m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{17}H_{14}BrN_3OS$: 388.0075; found: 388.0083.

4.2.2. NJ17: (*E*)-2-(2-(5-bromo-2-methoxybenzylidene)-hydrazinyl)-4-(4-chlorophenyl)thiazole

$C_{17}H_{13}BrClN_3OS$. Yield: 50.90%. M.P.: 176–178 °C. Rf: 0.52 (8:2n-hexane/ethyl acetate). NMR 1H (300 MHz, DMSO) δ : 3.80 (s, 3H, OCH_3); 7.07 (d, 1H, CH-Ar, $J = 9.0$ Hz); 7.39 (s, 1H, thiazole); 7.64 (d, 2H, CH-Ar, $J = 8.4$ Hz); 7.52 (d, 1H, CH-Ar, $J = 9.0$ Hz); 7.82 (d, 1H, CH-Ar, $J = 3.0$ Hz); 7.87 (d, 2H, CH-Ar, $J = 9.0$ Hz); 8.29 (s, 1H, HC=N); 12.29 (s, 1H, NH). NMR ^{13}C (DMSO, 75 MHz) δ : 56.06; 104.68; 112.53; 114.32; 124.61; 126.70; 127.26; 128.61; 131.99; 132.77; 133.31; 135.33; 149.18; 156.18; 168.13. HRMS m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{17}H_{13}BrClN_3OS$: 421.9685; found: 421.9651.

4.2.3. NJ18: (*E*)-2-(2-(5-bromo-2-methoxybenzylidene)-hydrazinyl)-4-(4-bromophenyl)thiazole

$C_{17}H_{13}Br_2N_3OS$. Yield: 64.10%. M.P.: 248–250 °C. Rf: 0.60 (7:3n-hexane/ethyl acetate). NMR 1H (300 MHz, DMSO) δ : 3.84 (s, 3H, OCH_3); 7.07 (d, 1H, CH-Ar, $J = 8.7$ Hz); 7.40 (s, 1H, thiazole); 7.48–7.53 (m, 1H, CH-Ar); 7.59 (d, 1H, CH-Ar, $J = 9.0$ Hz); 7.66 (d, 1H, CH-Ar, $J = 8.7$ Hz); 7.78–7.82 (m, 3H, CH-Ar); 8.26 (s, 1H, HC=N); 12.27 (s, 1H, NH). NMR ^{13}C (DMSO, 75 MHz) δ : 56.06; 104.75; 112.51; 114.30; 124.59; 126.68; 127.54; 129.78; 131.51; 132.75; 133.09; 135.21; 149.23; 156.14; 168.10. HRMS m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{17}H_{13}Br_2N_3OS$: 465.9180; found: 465.9200.

4.2.4. NJ19: (*E*)-2-(2-(5-bromo-2-methoxybenzylidene)-hydrazinyl)-4-(4-fluorophenyl)thiazole

$C_{17}H_{13}BrFN_3OS$. Yield: 15.00%. M.P.: 209–211 °C. Rf: 0.60 (7:3n-hexane/ethyl acetate). NMR 1H (300 MHz, DMSO) δ : 3.85 (s, 3H, OCH_3); 7.07 (d, 1H, CH-Ar, $J = 8.7$ Hz); 7.21 (s, 1H, CH-Ar); 7.24 (d, 1H, CH-Ar, $J = 8.7$ Hz); 7.31 (s, 1H, thiazole); 7.49–7.53 (m, 1H, CH-Ar); 7.86–7.91 (m, 1H, CH-Ar); 8.26 (s, 1H, HC=N); 12.25 (s, 1H, NH). NMR ^{13}C (DMSO, 75 MHz) δ : 56.52; 104.05; 112.98; 114.78; 115.74; 116.03; 125.12; 127.13; 127.90; 128.00; 131.68; 133.17; 135.45; 156.59; 160.44; 163.68; 168.51. HRMS m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{17}H_{13}BrFN_3OS$: 405.9980; found: 405.9946.

4.2.5. NJ20: (*E*)-2-(2-(5-bromo-2-methoxybenzylidene)-hydrazinyl)-4-(4-nitrophenyl)thiazole

$C_{17}H_{13}BrN_4O_3S$. Yield: 77.90%. M.P.: 231–233 °C. Rf: 0.48 (6:4n-hexane/ethyl acetate). NMR 1H (300 MHz, DMSO) δ : 3.84 (s, 3H, OCH_3); 7.07 (d, 1H, CH-Ar, $J = 9.6$ Hz); 7.48–7.52 (m, 1H, CH-Ar); 7.71 (s, 1H, thiazole); 7.81 (d, 1H, CH-Ar, $J = 2.4$ Hz); 8.09 (d, 2H, CH-Ar, $J = 9.3$ Hz); 8.24 (d, 2H, CH-Ar, $J = 9.6$ Hz); 8.27 (s, 1H, HC=N); 12.39 (s, 1H, NH). NMR ^{13}C (DMSO, 75 MHz) δ : 56.52; 109.20; 112.98; 114.78; 124.52; 124.95; 126.78; 127.16; 133.31; 135.93; 141.00; 148.96; 156.63; 168.83. HRMS m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{17}H_{13}BrN_4O_3S$: 432.9925; found: 432.9970.

4.2.6. NJ21: (*E*)-4-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-(2-(5-bromo-2-methoxybenzylidene)-hydrazinyl)thiazole

$C_{22}H_{18}BrN_3OS$. Yield: 65.70%. M.P.: 225–227 °C. Rf: 0.54 (8:2n-hexane/ethyl acetate). NMR 1H (300 MHz, DMSO) δ : 3.84 (s, 3H, OCH_3); 7.06 (d, 1H, CH-Ar, $J = 9.3$ Hz); 7.36 (d, 1H, CH-Ar, $J = 7.8$ Hz); 7.39 (s, 1H, thiazole); 7.43–7.53 (m, 3H, CH-Ar); 7.68–7.72 (m, 4H, CH-Ar); 7.83 (d, 1H, CH-Ar, $J = 3$ Hz); 7.93 (d, 2H, CH-Ar, $J = 8.7$ Hz); 8.30 (s, 1H, HC=N); 12.28 (s, 1H, NH). NMR ^{13}C (DMSO, 75 MHz) δ : 56.09; 104.18; 112.55; 114.35; 124.57; 126.18; 126.48; 126.62; 126.75; 126.85; 127.51; 128.97; 132.85; 133.34; 135.51; 139.19; 139.59; 149.58; 156.20; 168.07. HRMS m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{22}H_{18}BrN_3OS$: 464.0388; found: 464.0339.

4.3. Antibacterial activity

4.3.1. Strains

The following *S. aureus* strains were used in the tests: 1199B with resistance to hydrophilic fluoroquinolones via the NorA efflux protein and the 1199 strain which is considered a wild-type. Bacteria were kept on blood agar for phenotype testing (Laboratories Difco Ltda., Brazil) then transferred and maintained in two stocks, one in glycerol at –80 °C and the other in Heart Infusion Agar slants (HIA, Difco) at 4 °C. The strains, kindly provided by Prof. S. Gibbons (University of London), were maintained on blood agar base (Laboratories Difco Ltda., Brazil) slants where, prior to use, the cells were grown overnight at 37 °C in Heart Infusion Agar slants (HIA, Difco Laboratories Ltda.).

4.3.2. Antibiotic

The used antibiotic, norfloxacin, was obtained from Sigma Chemical Co., USA and its stock solutions were prepared according to guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute.³⁸

4.3.3. Minimum inhibitory concentration (MIC) assays

All microbiological procedures as well as readings were performed following the CLSI guidelines with adaptations.³⁸ In the minimum inhibitory concentration assays using thiazolidinones and thiazole derivatives, ethidium bromide and the antibiotics, the distribution media were prepared in eppendorfs using 900 μ L of BHI liquid culture medium and 100 μ L of the inoculum, previously diluted in saline solution according to the McFarland scale until reaching 10^5 CFU. Afterwards, the solutions contained in the eppendorfs were transferred to a 96-well microdilution plate, in a horizontal fashion. 100 μ L were placed in each well, making up 10 wells. Subsequently, serial microdilution of the substances was performed, where 100 μ L of each substance was microdiluted up to the penultimate well (1:1), where the last well is intended for growth control. The range of concentration used was 512–0.5 μ g/mL. The plates were incubated for 24 h at 35 °C.³⁹ The reading was performed by visualization of a color change in the medium, as indicated by the addition of 20 μ L of resazurin. The color change of the medium from blue to red indicates the presence of bacterial growth, while the permanence of the blue color indicates the absence of growth. All experiments were prepared in triplicates. The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration at which no growth was observed.

4.4. Efflux pump inhibition assays by reduction of antibiotic MIC

To verify the effect of reducing the MIC of norfloxacin inocula from plaques incubated in a bacteriological oven for 24 h at 37 °C with the stock replicate were used. After this period, the inocula were prepared in a saline solution according to the McFarland 0.5 scale corresponding to 10^5 CFU. In the procedure, 150 μ L of the inoculum and the substances at a sub-inhibitory concentration (MIC/8) were added to eppendorfs and these were filled up to the volume of 1.5 mL. In the preparation of the control, the same inoculum volume of the test was added and the eppendorf volume was completed up to 1.5 mL. The

solutions were then transferred to 96-well microdilution plates, where 100 μ L of the eppendorf content was placed in each well. Subsequently, the microdilution of 100 μ L of the antibiotic was performed in this medium until the penultimate cavity (1:1). The last cavity was reserved as the control. Concentrations ranged from 512 μ g/mL to 0.5 μ g/mL. After 24 h the plates were read by visualization of a color change of the medium characterized by the addition of 20 μ L of resazurin. All experiments were performed in triplicates. The MIC reduction of specific antibiotics in strains carrying efflux pumps is an indication of efflux pump inhibition.

4.5. Cell viability assay

The cell line was obtained from a Cell Bank in Rio de Janeiro and maintained in the Cell Culture Laboratory at the Department of Antibiotics of the Federal University of Pernambuco. The L929 line (mouse connective tissue) was cultured in DMEM medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin (Gibco™ Life Technologies, USA), at 37 °C and 5% CO₂. Cytotoxicity evaluation of the compounds was performed using the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) method (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO/USA). To perform the assay the cells were seeded in 96-well plates at the 10⁵ cells/mL. Briefly, the compounds previously dissolved in DMSO (dimethylsulfoxide, Vetec, Brazil), were diluted in medium and added to each well at 50 μ g/mL. After 24 h of contact with the cells, 25 μ L of MTT solution (5 mg/mL) were added to each well. The plates were left for another 3 h in an incubator at 37 °C and at the end of that period the supernatant was aspirated. To perform the reading, 100 μ L of DMSO were added in each well for the dissolution of the formazan crystals. The amount of formazan was measured by reading the absorbance at 560 nm. The growth inhibition percentage (GI%) was calculated in relation to the control group without treatment. Each sample was tested in triplicate in three independent experiments.

Funding

This work was supported by Capes/Cofecub Program N° 865-15.

Declaration of Competing Interest

The authors declare they have no conflict of interest

Acknowledgement

The authors would like to acknowledge Fundação de Amparo à Pesquisa de Desenvolvimento do Estado de Pernambuco – FACEPE for grants.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.07.006>.

References

- Paulsen IT, Brown ME, Dunstan SJ, Skurray RA. Molecular characterization of the staphylococcal multidrug resistance export protein QacC. *J Bacteriol*. 1995;177:2827–2833. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7751201>.
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;48:1–12. <https://doi.org/10.1093/cid/cin501>.
- Spillberg 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. <https://doi.org/10.1093/cid/cin501>.
- Feltriotti T, Cannalire R, Burali MS, et al. Searching for novel inhibitors of the S. aureus NorA efflux pump: synthesis and biological evaluation of the 3-phenyl-1,4-benzothiazine analogues. *ChemMedChem*. 2017;12:1293–1302. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700286>.
- Nahata C, Cars O. Antibiotic resistance — problems, progress, and prospects. *N Engl J Med*. 2014;371:1761–1763. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1408040>.
- Prabhavathi F. Antibacterial discovery and development—the future of success? *Nat Biotechnol*. 2006;24:1407–1503. <https://doi.org/10.1038/nbt1206-1407>.
- Devi P, Arora U, Devi R, Arora S. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a Tertiary Care Hospital in Northern India. *J Lab Phys*. 2010;2:78. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.72154>.
- Yevseyev SK, Busberg KO, Atkins M, et al. Situational analysis of antibiotic use and resistance in Ghana: policy and regulation. *BMC Public Health*. 2017;17:896. <https://doi.org/10.1186/s12889-017-4910-7>.
- Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, HOOK M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12:49–62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>.
- Kievans RM. Invasive methicillin-resistant *S. aureus* (EMRSA) TYPE – “ITAL” > *Staphylococcus aureus* < /EMRSA > infections in the United States. *JAMA*. 2007;298:1763. <https://doi.org/10.1001/jama.298.15.1763>.
- Bosi E, Monk JM, Aziz RK, Fondi M, Nizet V, Pauson BØ. Comparative genome-scale modelling of *Staphylococcus aureus* strains identifies strain-specific metabolic capabilities linked to pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci*. 2016;113:E3801–E3809. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523199113>.
- Liu SJ, Ung SW, Chan KC, et al. In vitro elution of vancomycin from biodegradable beads. *J Biomed Mater Res*. 1999;48:613–620. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.10067>.
- Gibbons S. Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat Prod Rep*. 2004;21:263. <https://doi.org/10.1039/b212695h>.
- Blair JMA, Bastro VN, Reed V, et al. AcrB drug-binding pocket substitution confers clinically relevant resistance and altered substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112:3511–3516. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419991112>.
- Homando-Amado S, Blanco P, Alcázar-Rico M, et al. Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. *Drug Resist Update*. 2016;28:13–27. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.06.007>.
- Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:119–146. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923>.
- Poola K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med*. 2007;39:162–176. <https://doi.org/10.1080/07853890701195262>.
- Piddock LJV. Multidrug-resistance efflux pumps? Not just for resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4:629–636. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1464>.
- Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64:672–693. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11104814>.
- Kumar A, Schwelzer H. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57:1486–1513. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.004>.
- Zhang L, Ma S. Efflux pump inhibitors: a strategy to combat p-glycoprotein and the NorA multidrug resistance pump. *ChemMedChem*. 2010;5:811–822. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201000006>.
- Gill EE, Franco OL, Hancock REW. Antibiotic adjuvants: diverse strategies for controlling drug-resistant pathogens. *Chem Biol Drug Des*. 2015;85:56–78. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12478>.
- Hershberger E, Donabedian S, Konstantinou K, Zarvos MJ. Quinupristin-dalfopristin resistance in gram-positive bacteria: mechanism of resistance and epidemiology. 2004;38.
- Thota N, Reddy MV, Kumar A, et al. Substituted dihydronaphthalenes as efflux pump inhibitors of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Med Chem*. 2010;45:3607–3616. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.05.006>.
- Khilaro I, Rhoads M, Shaleroo M, Kharat K, Mane R. Synthesis of new thiazolyl coupled pyrazoles bearing 2,4-thiazolidinediethyl pharmacophore and their anti-inflammatory and antibacterial evaluation. *Anti-Inflammatory and Allergy Agents Med Chem*. 2017;16. <https://doi.org/10.2174/1871523016666170616120346>.
- Holla BS, Malini KV, Rao BS, Sarojini BK, Kumari NS. Synthesis of some new 2,4-disubstituted thiazoles as possible antibacterial and anti-inflammatory agents. *Eur J Med Chem*. 2003;38:313–318. [https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(02\)01447-2](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(02)01447-2).
- Harnett JJ, Boubert V, Dolo C, et al. Phenolic thiazoles as novel orally active neuroprotective agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004;14:157–160. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2003.09.077>.
- El-Messery SM, Hassan GS, Al-Omary FAM, El-Subbagh HI. Substituted thiazoles VI. Synthesis and antitumor activity of new 2-acetamido- and 2 or 3-propanamido-thiazole analogs. *Eur J Med Chem*. 2012;54:615–625. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.06.013>.
- Al-Omary FAM, Hassan GS, El-Messery SM, El-Subbagh HI. Substituted thiazoles V. Synthesis and antitumor activity of novel thiazolo[2,3-b]quinoxaline and pyrido[4,3-d]thiazolo[3,2-s]pyrimidine analogues. *Eur J Med Chem*. 2012;47:65–72. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.10.025>.
- Androuni A, Gramalola M, Leoni A, Locatelli A, Morigi R, Rambaldi M. Synthesis and antibacterial activity of imidazo[2,1-b]thiazoles. *Eur J Med Chem*. 2001;36:743–746. [https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(01\)01266-1](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(01)01266-1).
- Branowska D, Farahat AA, Kumar A, et al. Synthesis and antiprotocoll activity of 2,5-bis[amidoaryloxy]thiazoles. *Bioorg Med Chem*. 2010;18:3551–3558. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.03.058>.
- Cardoso MV de O, Siqueira LRP da, Silva EB da, et al. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-Trypanosoma cruzi agents: structural design, synthesis and pharmacological evaluation. *Eur J Med Chem*. 2014;86:48–59. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.012>.
- Bozdağ-Dündar O, Özgen Ö, Mentşçe A, et al. Synthesis and antimicrobial activity of some new thiazolyl thiazolidine-2,4-dione derivatives. *Bioorg Med Chem*. 2007;15:6012–6017. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.06.049>.

34. Davidson MA, Mattison DH, Azoulay L, Krowicki D. Thiazolidinedione drugs in the treatment of type 2 diabetes mellitus: past, present and future. *Crit Rev Toxicol*. 2018;48:52–108. <https://doi.org/10.1080/10408444.2017.1351420>.
35. Schoss AJ, Esser N, Paquot N. Antidiabetic agents: potential anti-inflammatory activity beyond glucose control. *Diabetes Metab*. 2015;41:183–194. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2015.02.003>.
36. Seo-Young D, Pailou M, Schlosser J, et al. Direct thiazolidinedione action in the human ovary: insulin-independent and insulin-sensitizing effects on steroidogenesis and insulin-like growth factor binding protein-1 production. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:6099–6105. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0460>.
37. Sharma P, Reddy TS, Kumar NP, Senwar KB, Bhargava SK, Shankaratah N. Conventional and microwave-assisted synthesis of new 1 H-benzimidazole-thiazolidinedione derivatives: a potential anticancer scaffold. *Eur J Med Chem*. 2017;138:234–245. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.035>.
38. Vlečič P, Geronikaki A, Anastasi K, Incerti M, Zani F. Synthesis and antimicrobial activity of novel 2-thiazolylimino-5-arylidene-4-thiazolidinones. *Bioorg Med Chem*. 2006;14:3859–3864. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.01.043>.
39. de Oliveira Filho GB, Cardoso MV de O, Espindola JWP, et al. Structural design, synthesis and pharmacological evaluation of thiazoles against *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Med Chem*. 2017;141:346–361. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.047>.
40. Houghton PJ, Howes M-J, Lee CC, Stevenson G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J Ethnopharmacol*. 2007;110:391–400. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.032>.
41. Bhardwaj AK, Mohanty P. Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: rejuvenating the antimicrobial chemotherapy. *Recent Pat Ant-Antic Drug Discovery*. 2012;7:73–89. <https://doi.org/10.2174/157489112799829710>.
42. Costa SS, Viveiros M, Amaral L, Couto I. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update. *Open Microbiol J*. 2013;7:59–71. <https://doi.org/10.2174/1874285801307010050>.
43. Costa S, Falção C, Viveiros M, et al. Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol*. 2011;11:241. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-241>.
44. Schindler BD, Jacinto P, Kartz GW. Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: current status of potentializing existing antibiotics. *Future Microbiol*. 2013;8:491–507. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.16>.
45. Granowitz EV, Brown RB. Antibiotic adverse reactions and drug interactions. *Crit Care Clin*. 2008;24:421–442. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.12.011>.
46. Buonafina F, Lepri S, Gonacci L, et al. Improved potency of indole-based NorA efflux pump inhibitors: from serendipity toward rational design and development. *J Med Chem*. 2017;60:517–523. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01281>.
47. Aron Z, Opperman TJ. Optimization of a novel series of pyranopyridine RND efflux pump inhibitors. *Curr Opin Microbiol*. 2016;33:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.05.007>.
48. dos Santos JFS, Timine SR, de Freitas TS, et al. In vitro e in silico evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2018;57:22–28. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.03.001>.
49. Guz NR, Sternitz FR, Johnson JB, et al. Flavonolignan and flavone inhibitors of a *Staphylococcus aureus* multidrug resistance pump: structure – activity relationships. *J Med Chem*. 2001;44:261–268. <https://doi.org/10.1021/jm000419a>.
50. Lewis DFV, Jacobs MN, Dickens M. Compound lipophilicity for substrate binding to human P450s in drug metabolism. *Drug Discovery Today*. 2004;9:530–537. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03115-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03115-0).
51. Thota N, Koul S, Reddy MV, et al. Citral derived amides as potent bacterial NorA efflux pump inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2008;16:6535–6543. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.05.030>.
52. Nargoita A, Koul S, Sharma S, et al. Quantitative structure–activity relationship (QSAR) of aryl alkenyl amides/imines for bacterial efflux pump inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2009;44:229–238. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.02.015>.
53. Totko IV, Gastolger J, Todeschini R, et al. Virtual computational chemistry laboratory – design and description. *J Comput Aided Mol Des*. 2005;19:453–463. <https://doi.org/10.1007/s10822-005-8694-y>.
54. Zhang J, Sun Y, Wang Y, et al. Non-antibiotic agent ginsenoside 20(S)-R_{h2} enhanced the antibacterial effects of ciprofloxacin in vitro and in vivo as a potential NorA inhibitor. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:277–284. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.020>.
55. Kalia NP, Mahajan P, Mehra R, 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. <https://doi.org/10.1093/jac/dks232>.
56. Sharma S, Kumar M, Sharma S, Nargoita A, Koul S, Khan IA. Piperine as an inhibitor of Rv1258c, a putative multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:1694–1701. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq186>.
57. Silva MC, Oliveira LM, Silva FJ, et al. New 1,3-benzodioxole derivatives: synthesis, evaluation of in vitro schistosomicidal activity and ultrastructural analysis. *Chem Biol Interact*. 2018;283:20–29. <https://doi.org/10.1016/j.cb.2018.01.016>.
58. CLSI. *Clinical and Laboratory Standards Institute Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 15th informational supplement, M700-S15. 2005; 2005.
59. NCCLS. *Standards, National Committee for Clinical Laboratory. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Approved standard. 2003:1–47.