



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – RENORBIO

KÊSIA XISTO DA FONSECA RIBEIRO DE SENA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE DERIVADOS TIAZOLIDINA-
2,4-DIONA E 4-TIOXOTIAZOLIDINA-2-ONA FRENTE A ISOLADOS CLÍNICOS DE
Staphylococcus aureus RESISTENTES A MÚLTIPLOS FÁRMACOS**

Recife
2022

KÊSIA XISTO DA FONSECA RIBEIRO DE SENA

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE DERIVADOS TIAZOLIDINA-2,4-DIONA E 4-TIOXOTIAZOLIDINA-2-ONA FRENTE A ISOLADOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES A MÚLTIPLOS FÁRMACOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

Coorientadora: Profa. Dra. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque

Recife

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
ELAINE C BARROSO CRB-4 /1728

Sena, Kêsia Xisto da Fonseca Ribeiro de

Atividade antibacteriana e antibiofilme de derivados Tiazolidina-2,4-diona e 4-tioxotiazolidina-2-ona frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a múltiplos fármacos / Kêsia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena. – 2022.

139 f. : il., fig., tab.

Orientador: Rafael Matos Ximenes

Coorientadora: Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Recife, 2022.

Inclui referências.

1. Tiazóis 2. Infecção 3. Testes de toxicidade I. Ximenes, Rafael Matos (orient.) II. Albuquerque, Julianna Ferreira Cavalcanti de (coorient.) III. Título

547.594

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022 - 105

KÊSIA XISTO DA FONSECA RIBEIRO DE SENA

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE DERIVADOS TIAZOLIDINA-2,4-DIONA E 4-TIOXOTIAZOLIDINA-2-ONA FRENTE A ISOLADOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES A MÚLTIPLOS FÁRMACOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

APROVADA EM 13/06/2022.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes – UFPE
Presidente – Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque
Examinador externo – Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Glaucia Manoella de Souza Lima
Examinadora Interna – Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva
Examinadora Interna – Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão
Examinador externo – Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel
Examinador externo – Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esta tese a minha mãe Adilce Calheiros Xisto de Almeida (*in memoriam*) e a minha tia Azenath Calheiros Xisto (*in memoriam*) que estiveram sempre do meu lado em todos os momentos da minha vida. Agradeço a Deus por ter me escolhido como filha e sobrinha.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque, amiga, companheira que muito admiro, tenho carinho especial e respeito, sempre me estimulou e cedeu seus compostos para realização da tese.

Aos meus amigos do Departamento de Antibióticos que acompanharam de perto o desenrolar deste trabalho, sempre me incentivando em todos os momentos, em especial as Profa. Alda Chiappeta, Ana Maria Souto Maior, Gláucia Manoella de Souza Lima, Márcia da Silva Nascimento, Norma Buarque de Gusmão, Salomé Serrano e Silene Nascimento.

A grandiosa equipe do Departamento de Antibióticos por todo o suporte, em especial a Alana, Betânia, Fátima, Marcela e Luiz Carlos.

A Bruno Amorim e Igor Damasceno, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pelas análises morfológicas por microscopia eletrônica de varredura.

Ao casal amigos Cláudia Sampaio de Andrade Lima e Ricardo Yara, o meu muito obrigada por todo o apoio que vocês prestaram.

A Rosilma de Oliveira Araújo Melo, Raudiney Frankilin Vasconcelos Mendes e Evillyn Xavier Botelho que ficaram horas intermináveis na bancada comigo, apoiando e colaborando.

Ao meu marido, Davino, meus filhos Guilherme e Mônica, minha nora Juliana, meus netos Pedro, Maiara e Lucas pelo companheirismo, compreensão e pelos momentos de alegria que tornaram o período da tese mais harmônico.

Ao meu orientador, amigo e colega Prof. Rafael Matos Ximenes pelo apoio prestado.

Principalmente ao ser supremo que sempre iluminou o meu caminho, amparando, dando força e coragem em todos os momentos da execução deste trabalho.

“Somente a fé remove a desordem mental e
devolve a clareza de espírito.”

Dalai Lama

RESUMO

As infecções relacionadas a assistência à saúde representam um grave problema de saúde mundial. *Staphylococcus aureus* é o patógeno humano mais comum e um dos seus principais agentes causadores. As tiazolidinas são consideradas um grupo farmacofórico de interesse no desenvolvimento de fármacos devido as suas atividades biológicas, principalmente antimicrobiana. Este estudo objetivou avaliar as atividades antibacteriana e antibiofilme de duas séries análogas de tiazolidina-2,4-diona e 4-tioxotiazolidina-2-ona frente a isolados clínicos de *S. aureus* resistente a múltiplos fármacos. Vinte isolados clínicos de *S. aureus* foram avaliados quanto a presença de genes de resistência aos antimicrobianos (*vanA*, *mecA*, *norA* e *ermA*) e formação de biofilme. Neste trabalho foram determinadas as CMI e CMB, cinética de morte, atividade antibiofilme, atividade antibacteriana *in vivo* e alterações morfológicas promovidas pelos derivados tiazolidínicos, bem como sua citotoxicidade. Os genes *mecA*, *norA* e *ermA* foram encontrados em 95%, 95% e 80% dos isolados clínicos, respectivamente. Nenhum deles apresentou o gene *vanA*. Todos os isolados foram formadores de biofilme, 85% deles classificados como fortemente aderentes. Os derivados mais ativos (**1a**, **2a** e **2b**) apresentaram CMI entre 1 e 16 µg/mL, com curvas de morte apresentando efeito bactericida até 24 h. Na atividade antibiofilme, os derivados mais ativos inibiram cerca de 90% da formação do biofilme. No modelo de infecção *in vivo* utilizando *Caenorhabditis elegans*, os derivados **1a**, **2a** e **2b** aumentaram a sobrevivência dos nematódeos de forma concentração-dependente. A exposição de *S. aureus* aos derivados **2a** e **2b** promoveu alterações na superfície externa e diminuição do tamanho das células. Nenhum derivado foi citotóxico para células mononucleadas de sangue periférico humano, mas apresentaram citotoxicidade moderada para fibroblastos L929. Somente o derivado **2b** apresentou índices de seletividade maiores que 10 para as duas células. Dessa forma, esses derivados são candidatos a fármacos para o desenvolvimento de novos antimicrobianos.

PALAVRAS-CHAVE: Biofilme; citotoxicidade; *Caenorhabditis elegans*; MEV.

ABSTRACT

Healthcare-associated infections represent a serious global health problem. *Staphylococcus aureus* is the most common human pathogen and one of its main causative agents. Thiazolidines are a pharmacophoric group of interest in the development of new drugs due to their biological activities, such as antimicrobial. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activities of two analog series of thiazolidine-2,4-dione and 4-thioxothiazolidine-2-one against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Twenty *S. aureus* clinical isolates were evaluated for the presence of antimicrobial resistance genes (*vanA*, *mecA*, *norA*, and *ermA*) and biofilm formation. We determined the MIC and MBC, time-to-kill, antibiofilm, *in vivo* antibacterial activity, and morphological changes induced by the thiazolidine derivatives, as well as their cytotoxicity. The *mecA*, *norA*, and *ermA* genes were found in 95%, 95% and 80% of the clinical isolates, respectively. None of the isolates had the *vanA* gene. All clinical isolates were biofilm formers, 85% of them classified as strongly adherent. The most active derivatives (**1a**, **2a**, and **2b**) exhibited MIC between 1 and 16 µg/mL, with time-to-kill curves showing a bactericidal effect up to 24 h. In the antibiofilm assay, the most active derivatives were able to inhibit about 90% of biofilm formation. In the *in vivo* infection model using *Caenorhabditis elegans* as a host, the derivatives **1a**, **2a**, and **2b** increased nematode survival with a concentration-dependent effect. The exposure of *S. aureus* to the derivatives **2a** and **2b** induced surface changes and decrease cell size. None of the derivatives was cytotoxic for human peripheral blood mononuclear cells but showed moderate cytotoxicity for L929 fibroblasts. Only derivative **2b** showed selectivity indices greater than 10 for both cells. Thus, these derivatives are drug candidates for the development of new antimicrobials.

KEYWORDS: Biofilm; cytotoxicity; *Caenorhabditis elegans*; SEM.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Figura demonstrativa da estrutura do biofilme.....	32
Figura 2 –	Ciclo do biofilme.....	33
Figura 3 –	Representação do sistema de detecção <i>quorum sensing</i> codificado pelo <i>locus</i> regulador de gene acessório (<i>agr</i>) em <i>Staphylococcus aureus</i>	36
Figura 4 –	Estrutura geral das a) penicilinas, b) cefalosporinas, c) monobactâmicos e d) carbapenêmicos com destaque para o anel β -lactâmicos (vermelho).....	39
Figura 5 –	Quebra do anel β -lactâmico (a) em ácido penicilóico (b) pela ação da enzima penicilinase.....	40
Figura 6 –	Representação químicas de MLSb: a) eritromicina (macrolídeo); b) clindamicina (lincosamida); c) dalbopristina e d) quinupristina (estreptograminas B)...	43
Figura 7 –	Estrutura química do ciprofloxacino com núcleo básico das quinolonas destacado em vermelho.....	44
Figura 8 –	Estrutura química da vancomicina.....	45
Figura 9 –	Número de casos de VRSA, VISA e hVISA nos continentes.....	48
Figura 10 –	Representação dos anéis: a) tiazolidina; b) tiazolidina-2,4-diona; e c) tioxotiazolidina-2-ona.....	57
Figura 11 –	Principais locais de reações no anel tiazolidina-2,4-diona.....	58
Figura 12 –	Reação de tionação da carbonila na posição 4 da tiazolidina-2,4-diona (a) para formação da 4-tioxotiazolidina-2-ona (b).....	58
Figura 13 –	Potencial biológico do núcleo tiazolidina-2,4-diona.....	60
Figura 14 –	Esquema de síntese das tiazolidina-2,4-diona (1a-f) e das 4-tioxotiazolidina-2-ona (2a-f).....	72
Figura 15 –	Gel representativo dos produtos de PCR do gene <i>mecA</i> . Estão destacados em vermelho os isolados	91

	negativos para o gene <i>mecA</i> , enquanto as cabeças de seta indicam os isolados sem resistência fenotípica, mas com presença do gene <i>mecA</i>	
Figura 16 –	Gel representativo dos produtos de PCR do gene <i>norA</i> . Estão destacados em vermelho os isolados negativos para o gene <i>norA</i> , enquanto as cabeças de seta indicam os isolados sem resistência fenotípica, mas com presença do gene <i>norA</i>	92
Figura 17 –	Gel representativo dos produtos de PCR do gene <i>ermA</i> . Estão destacados em vermelho os isolados negativos para o gene <i>ermA</i> , enquanto as cabeças de seta indicam os isolados sem resistência fenotípica, mas com presença do gene <i>ermA</i>	93
Figura 18 –	Gel representativo dos produtos de PCR do gene <i>vanA</i> . Estão destacados em vermelho os isolados negativos para o gene <i>van</i>	94
Figura 19 –	Cinética de morte do isolado clínico de <i>Staphylococcus aureus</i> (UFPEDA 1058) após exposição aos derivados tiazolidínicos: a) 2a ; b) 1a ; c) 2b ; d) 1f ; e e) 2c	103
Figura 20 –	Inibição da formação inicial de biofilme dos derivados tiazolidínicos e fármacos padrão frente ao isolado UFPEDA 1058. A) 2a ; B) 1a ; C) 2b ; D) 1f ; E) 2c ; F) Cipro; G) E e H) Ox.....	105
Figura 21 –	Inibição do biofilme formado dos derivados tiazolidínicos e fármacos padrão frente ao isolado UFPEDA 1058 após 1, 5 e 20 h de exposição. A) 2a ; B) 1a ; C) 2b ; D) 1f ; E) 2c ; F) Cipro; G) E e H) OX.....	107
Figura 22 –	Curvas de sobrevivências de <i>C. elegans</i> infectados com o isolado UFPEDA 1058 e tratados com os derivados tiazolidínicos. A) 1a ; B) 2a ; C) 1b ; D) 2b	111
Figura 23 –	Imagens representativas dos grupos de <i>C. elegans</i>	112

após 72 h de infecção com o isolado UFPEDA 1058 e
seus respectivos tratamentos.....

Figura 24 – Aspectos morfológicos de *S. aureus* UFPEDA 1058
exposto aos derivados tiazolidínicos. A) e B)
controles expostos a DMSO 1%; C) e D) **1a**; E) e F)
2a; G) e H) **1b**; I) e J) **2b**..... **114**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Nomenclatura dos derivados tiazolidina-2,4-diona e 4-tioxotiazolidina-2-ona.....	73
Tabela 2 –	Número do registro, sítio de infecção e origem dos isolados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i> obtidos da Coleção de Cultura do Departamento de Antibióticos da UFPE.....	75
Tabela 3 –	Iniciadores específicos utilizados para amplificação e detecção dos genes <i>mecA</i> , <i>vanA</i> , <i>norA</i> , <i>ermA</i> e os produtos amplificados.....	78
Tabela 4 –	Componentes das reações de amplificação do gene <i>mecA</i>	79
Tabela 5 –	Dados clínicos, perfil de resistência e formação de biofilme dos isolados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i>	87
Tabela 6 –	Concentração do DNA (<u>ng/uL</u>) nas amostras extraídas.	89
Tabela 7 –	Relação fenotípica /molecular dos isolados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i>	95
Tabela 8 –	Inibição de isolados clínicos multirresistente por derivados tiazolidínicos (CMI e CMB em µg/mL).....	99
Tabela 9 –	Citotoxicidade e índice de seletividade dos derivados tiazolidínicos para células do sangue periférico humano (PBMC) e fibroblastos L929.....	116

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1 CARACTERÍSTICAS DE <i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.1.1 Fatores de virulência.....	21
2.1.1.1 Alfa-toxina (Hla) ou alfa-hemolisina.....	22
2.1.1.2 Beta-toxina (Hlb) ou beta-hemolisina.....	22
2.1.1.3 Gama-toxina (Hlg) ou gama-hemolisina ou toxina de Panton- Valentine.....	23
2.1.1.4 Delta-toxina (Hld) ou delta-hemolisina.....	24
2.1.1.5 Toxina do choque tóxico.....	25
2.1.1.6 Enterotoxina estafilocócicas (SEs).....	26
2.1.1.7 Toxina esfoliativa.....	28
2.1.2 Produção de enzimas.....	30
2.1.3 Biofilme.....	32
2.1.4 Quorum Sensing.....	35
2.1.5 Mecanismo de evasão da resposta imune.....	36
2.2 RESISTÊNCIA DE <i>Staphylococcus aureus</i> AOS ANTIMICROBIANOS.....	37
2.2.1 β-lactâmicos.....	38
2.2.2 Macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas B.....	41
2.2.3 Quinolonas.....	43
2.2.4 Glicopeptídeos.....	45
2.3 OCORRÊNCIA E RESISTÊNCIA DE <i>Staphylococcus aureus</i> EM HOSPITAIS DO BRASIL.....	48
2.3.1 Ocorrência de <i>Staphylococcus aureus</i> em pacientes hospitalares.....	49
2.3.2 Ocorrência de <i>Staphylococcus aureus</i> em profissionais de saúde e superfícies hospitalares.....	52
2.4 TIAZOLIDINAS E SEUS DERIVADOS.....	56
2.4.1 Obtenção e reatividade das tiazolidinas e seus derivados..	56

2.4.2 Atividades biológicas das tiazolidinas e seus derivados.....	58
2.4.2.1 Atividade antimicrobiana.....	59
2.4.2.2 Atividade citotóxica e antiproliferativa.....	63
2.4.2.3 Atividade hipoglicemiante.....	66
2.4.2.4 Outras atividades biológicas importantes.....	68
3. OBJETIVOS.....	71
3.1 OBJETIVO GERAL.....	71
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	71
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
4.1 DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS.....	72
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>Staphylococcus aureus</i>	74
4.2.1 Avaliação da formação de biofilme dos isolados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i>.....	75
4.2.2 Caracterização dos genes de resistência dos isolados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i>.....	76
4.2.2.1 Extração de DNA de <i>Staphylococcus aureus</i>	76
4.2.2.2 Condições da PCR para amplificação dos genes <i>mecA</i> , <i>vanA</i> , <i>norA</i> e <i>erma</i>	77
4.3 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS INIBITÓRIAS E BACTERICIDAS DOS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS.....	79
4.4 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE MORTE DE <i>Staphylococcus aureus</i> EXPOSTOS AOS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS.....	80
4.5 ATIVIDADE ANTIBIOFILME DOS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS.....	80
4.5.1 Inibição da formação inicial do biofilme.....	80
4.5.2 Inibição do biofilme formado.....	81
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>in vivo</i> UTILIZANDO <i>Caenorhabditis elegans</i> COMO HOSPEDEIRO.....	81
4.6.1 Manutenção de <i>C. elegans</i>.....	81
4.6.2 Nematódeos infectados por <i>Staphylococcus aureus</i>.....	82

4.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	83
4.8 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO E FIBROBLASTOS.....	83
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	85
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	86
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>Staphylococcus aureus</i>	86
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>Staphylococcus aureus</i>	89
5.2.1 Gene <i>mecA</i>	90
5.2.2 Gene <i>norA</i>	91
5.2.3 Gene <i>ermA</i>	92
5.2.4 Gene <i>vanA</i>	93
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS.....	96
5.4 CINÉTICA DE MORTE DE <i>Staphylococcus aureus</i> EXPOSTOS AOS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS.....	101
5.5 ATIVIDADE ANTIBIOFILME DOS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS.....	104
5.5.1 Inibição da formação inicial do biofilme.....	104
5.5.2 Inibição do biofilme formado.....	106
5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>in vivo</i> UTILIZANDO <i>C. elegans</i> COMO HOSPEDEIRO.....	109
5.7 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	113
5.8 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO E FIBROBLASTOS.....	115
6. CONCLUSÕES.....	117
REFERÊNCIAS.....	118

1. INTRODUÇÃO

As bactérias resistentes a múltiplos fármacos provocam um forte impacto global não apenas na saúde, mas na economia em geral. Predições estatísticas apontam que somente em 2019 ocorreram 4,95 milhões de mortes associadas a infecções bacterianas. Destas, 1,27 milhões diretamente relacionadas a resistência a múltiplos fármacos. Neste cenário, *Staphylococcus aureus* é uma das espécies de cocos Gram-positivos com maior resistência aos antibióticos (MURRAY et al., 2022).

Staphylococcus aureus é um patógeno humano que pode causar uma gama ampla de infecções que podem variar desde infecções da pele e tecidos moles até bacteremia. Quando chega a corrente sanguínea pode atingir diferentes órgãos, causando graves manifestações (BARROS et al., 2016; TONG et al., 2015). Esse microrganismo se destaca como principal agente causador de IRAS (Infecção Relacionadas a Assistência à Saúde), especialmente os isolados que apresentam resistência aos β -lactâmicos, denominadas genericamente de MRSA/ORSA, do inglês: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ou Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (SOUSA et al., 2016).

S. aureus tem reconhecida importância médica mundial como um verdadeiro desafio à saúde pública, com os isolados MRSA apresentando altas taxas de morbidade e mortalidade, não sendo exclusivos do ambiente hospitalar. Ocorrências de infecções por MRSA na comunidade são cada vez mais frequentes, com grande frequência e patogenicidade necessitando da adoção de medidas de controle mais eficazes (SALES; SILVA, 2012).

A capacidade de *Staphylococcus aureus* de aderir e formar biofilmes nas superfícies do hospedeiro está diretamente relacionada a sua virulência. Esta capacidade de produzir biofilme é crucial para infecções crônicas e persistentes (MAHMOUDI et al., 2019).

Os diferentes resultados de uma infecção estafilocócica dependem, além da combinação dos fatores de virulência da cepa, do local da infecção e da resposta imune do hospedeiro (LOWY, 1998 apud ZECCONI; SCALI, 2013).

Dentre os grupos farmacofóricos de interesse para o desenvolvimento de novos antimicrobianos – também chamados de estruturas privilegiadas – destacam-

se as tiazolidinas (GOWDRA et al., 2014). As tiazolidinas são substâncias heterocíclicas com anel pentagonal e heteroátomos de nitrogênio e enxofre em sua estrutura, podendo ser substituídas nas diversas posições do anel. Essas substâncias vêm sendo sintetizadas e avaliadas durante as últimas décadas, por apresentarem diversas propriedades biológicas como, antimicrobiana, anticancerígenas (KUMAR et al., 2020), antiproliferativa (ÖNEN-BAYRAM et al., 2013), anti-*Trypanosoma cruzi*, (CORRÊA et al., 2016), antileishmania (LEITE et al., 2016), cicatrizante de feridas (PIAO et al., 2015) e hipoglicemiante (KUMAR et al., 2018).

Devido a necessidade urgente de novas opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus* resistentes a múltiplos fármacos, as tiazolidinas surgem como um núcleo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos. Este trabalho objetivou avaliar a atividade antimicrobiana de duas séries análogas de tiazolidinas frente a isolados clínicos de *S. aureus* resistentes a múltiplos fármacos, evidenciando o papel da substituição do oxigênio por enxofre na posição 4 do anel tiazolidínico.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CARACTERÍSTICAS DE *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus foi isolado pela primeira vez por Alexander Ogston de secreção de feridas cirúrgicas, sendo chamado nesta ocasião de *Micrococcus*. O gênero *Staphylococcus* inicialmente foi classificado na família *Micrococcaceae*, mas com o avanço da biologia molecular, genética e bioquímica, o gênero passou a ser descrito em 2009 na nova família *Staphylococcaceae*, que teve sua validação em 2010. Com a nova filogenia *Staphylococcus aureus* foi classificado como uma eubactéria do filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Bacillales, família Staphylococcaceae (OGSTON, 1881 apud THOMER et al., 2016; SCHLEIFER; BELL, 2010).

O gênero é chamado de *Staphylococcus* (*Staphylo* = uva) porque as suas células possuem a morfologia de cocos com arranjos em forma de cachos de uva. No entanto também podem aparecer de diversas formas como células isoladas, em pares, em cadeias curtas ou agrupados irregulares, devido sua divisão celular ocorrer em três planos perpendiculares (MURRAY et al., 2009).

Staphylococcus aureus são imóveis, anaeróbios facultativos, catalase positiva, coagulase positiva, DNase e manitol positivos, resistentes a altas concentrações de sal, com crescimento em temperaturas que podem variar de 18 °C a 40 °C. Estes medem cerca de 1 µm de diâmetro podendo variar de 0,5 a 1,5 µm. Em algumas cepas podem ser observada uma cápsula de polissacarídeo e geralmente não são esporulados. São classificados como bactéria Gram-positiva, por possuir uma espessa camada de peptidoglicano que retém o corante cristal violeta, durante a coloração de Gram. No meio ágar sangue suas colônias geralmente se apresentam com coloração amarelo ouro devido a produção de carotenoides, podendo apresentar β-hemólise (KONEMAN et al., 2014; MURRAY et al., 2009).

S. aureus coloniza as fossas nasais, a pele e o períneo. No entanto é um patógeno humano de extrema importância que causa uma gama ampla de diferentes tipos de infecções que pode variar de infecções cutâneas e respiratórias a

bacteremias. Uma vez na corrente sanguínea, pode ser introduzido em diferentes locais causando graves manifestações. *S. aureus* pode induzir ainda intoxicações alimentares estafilocócicas pela produção de enterotoxinas (DAVID; DAUM, 2010).

S. aureus é um importante patógeno humano responsável pela alta taxa de morbimortalidade em nível hospitalar, sendo um dos principais causadores de Infecção Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). Sendo associado as infecções adquiridas não só no ambiente hospitalar, mas também na comunidade onde possui uma alta frequência e patogenicidade (BREVES et al., 2015).

2.1.1 Fatores de virulência

Uma infecção é considerada bem-sucedida quando os fatores de virulência atuam. Existem vários fatores de virulência que são secretados e associados a superfície celular. Estes fatores quando expressos promovem adesão aos componentes da matriz extracelular do hospedeiro, danificam as células do hospedeiro e protegem a bactéria do sistema imune (FOSTER, 2005 apud ACOSTA et al., 2017). Os diferentes resultados de uma infecção estafilocócica vai depender dos diferentes fatores de virulência como também das combinações desses fatores, o local da infecção e a resposta imune do hospedeiro (LOWY, 1998 apud ZECCONI; SCALI, 2013).

Segundo Velázquez-Meza (2005), os fatores de virulência podem ser classificados, basicamente, em três categorias: a) fatores relacionados com a aderência as células do hospedeiro ou a matriz extracelular, como a produção de moléculas de fibrinogênio, fibronectina, colágeno ou da enzima coagulase; b) fatores relacionados com a evasão da defesa do hospedeiro, como diversas enterotoxinas estafilocócicas (SEs A-E, G-J, K, L, M, O e P), a toxina da síndrome do choque tóxico, a proteína A, lipases e polissacarídeos capsulares; e c) fatores relacionados com a invasão na célula do hospedeiro e a penetração nos tecidos ou adesão de superfícies de cateteres e proteases, os quais incluem as proteínas (toxinas) α , β , δ , γ e δ – hemolisinas.

2.1.1.1 Alfa-toxina (Hla) ou alfa-hemolisina

A alfa-toxina, codificada pelo gene *hla*, é capaz de lisar um amplo espectro de tipos celulares como células epiteliais, endoteliais, monócitos, macrófagos e neutrófilos. Ela é considerada um dos principais fatores de patogenicidade, provocam efeitos hemolíticos, dermonecroticos e neurotóxicos. Esta toxina é capaz de formar poros heptaméricos nas células levando a quebra da membrana celular (HODILLE et al., 2017). Os poros permitem o efluxo dos íons potássio e o influxo dos íons de sódio e cálcio provocando um edema osmótico e lise celular. Por causar hemólise nos eritrócitos, a alfa-toxina é responsável pelo aparecimento do halo transparente ao redor das colônias de *S. aureus* no meio Agar sangue de carneiro (KONEMAN et al, 2014).

A expressão de *hla* foi relatada como sendo regulada positivamente durante a infecção. A alfa-toxina pode provocar desde infecção na pele a infecções invasivas letais determinando, neste sentido, seu papel na patogênese do *Staphylococcus aureus* bem estabelecida. Por esta razão, existe um grande interesse por parte de pesquisadores de incluir esta toxina como potencial alvo para o desenvolvimento de vacinas (TABOR et al., 2016).

A alfa-toxina aumenta a produção *in vivo* das citocinas interleucina-1 (IL-1), IL-6 e IL-8 e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e tem efeito sobre as citocinas envolvidas na adaptação da imunidade, em especial IL-17 (BERUBE & WARDENBURG, 2013).

Mesmo em níveis sub-líticos, Hla demonstra afetar as células da imunidade inata, estimulando uma resposta hiper inflamatória característica das pneumonias bacterianas, rompendo as barreiras epiteliais e endoteliais (TABOR et al., 2016).

2.1.1.2 Beta-toxina (Hlb) ou beta-hemolisina

A hemolisina beta tem a capacidade de degradar a esfingomielina, sendo tóxica para muitos tipos de células, incluindo os eritrócitos humanos (BROOKS et al., 2014). É uma exotoxina que precisa de íons de magnésio para atuar sobre seu

substrato, esfingomielina e lisofosfatidilcolina presentes na membrana dos eritrócitos (KONEMAN et al., 2014).

A beta toxina interage com as células de carneiro a 37 °C sem promover lise, no entanto se as hemácias são colocadas a 4 °C, as células são lisadas. Esta observação é feita em placas de ágar sangue a 37 °C onde não ocorre hemólise e uma hemólise completa a 4 °C. Por esta razão a beta toxina é conhecida como quente-frio (HUSEBY et al., 2007).

A toxina beta é uma esfingomielinase neutra que forma ligações covalentes entre *Staphylococcus aureus* na presença de DNA, denominada pelos autores de atividade de biofilme ligase, produzindo um material insolúvel na matriz de nucleoproteína *in vitro*. Também foi demonstrado que a toxina beta estimula fortemente a produção de biofilme *in vivo*. Os autores sugeriram que a reticulação da toxina beta na presença do eDNA (DNA extracelular) auxilia na formação da estrutura esquelética sobre a qual os biofilmes estafilocócicos são estabelecidos (HUSEBY et al., 2010).

2.1.1.3 Gama-toxina (Hlg) ou gama-hemolisina ou toxina de Panton-Valentine

Para que a atividade hemolítica da gama-toxina possa acontecer é necessário a ação conjunta de dois polipeptídios codificados por dois genes independentes. Os polipeptídios foram denominados componentes S e F (*Slow- and Fast-eluting Proteins*). Quando o isolado produz os dois polipeptídios pode estar presente uma das três unidades S (HlgA, HlgC e LukS-PV) e uma das unidades F (HlgB e LukF-PV), sendo assim possível seis formas da toxina. Em 1995 foram clonados e sequenciados os genes *lukS-PV* e *lukF-PV* (*Panton-Valentine-Leukocidin*) (ACOSTA et al., 2017).

A leucocidina de Panton-Valentine (PVL) é uma citotoxina capazes de formar poros heptaméricos nas membranas dos leucócitos levando a sua destruição, provocando a necrose tecidual, facilitando a formação de abscessos. Os genes codificadores desta exotoxina são *lukF* e *lukS* (GELATTI et al., 2009).

Staphylococcus aureus que possuem esta enzima podem causar infecções de pele e tecidos mole como furunculoses (93%) e abscessos (50%), como também

pneumonia (10%) com alto grau de mortalidade. Nas cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de origem comunitária é mais frequente a produção de PVL do que nas MRSA de origem hospitalar ou nas cepas sensíveis a meticilina (DE COLSA, 2011).

Abente et al. (2016) determinaram a frequência de MRSA e PVL em isolados ambulatoriais de pacientes com infecções de pele e tecidos moles entre 2012 e 2014. Foram avaliados neste estudo 70 isolados de *Staphylococcus aureus* com 54% desse resistentes a meticilina. O gene Luk-PV foi detectado em 15,7% dos isolados de *S. aureus* sendo oito resistentes a meticilina e três sensíveis.

A PVL e a alfa-hemolisina são seguramente as toxinas mais reconhecidas quanto aos efeitos dos antibióticos na expressão da virulência. Vários relatos publicados indicam um aumento da expressão gênica de PVL em cepas de diferentes origens cultivadas com beta-lactâmicos. Os autores afirmam que existem fortes evidências que sub-CMIs de oxacilina e nafcilina aumentam a expressão gênica de PVL. A clindamicina, linezolida e rifampicina suprimem a expressão, enquanto a vancomicina não afeta a modulação da expressão (HODILLE et al., 2017).

A existência da LPV está associada a uma situação clínica com mais gravidade e com recidivas das lesões que podem ser profundas e múltiplas, usualmente a transmissão é feita por contato independente da resistência à meticilina. *Staphylococcus aureus* positivos para esta toxina são frequentemente resistentes a múltiplos fármacos (KLEIN et al., 2020).

2.1.1.4 Delta-toxina (Hld) ou delta-hemolisina

A toxina delta é uma exotoxina de baixo peso molecular que forma estruturas poliméricas com capacidade de lisar diferentes tipos celulares, sendo produzida por 97% dos isolados de *Staphylococcus aureus* (ACOSTA et al., 2017).

A hemolisina delta pode provocar diarreia aguda pois é capaz de inibir a absorção de água pelo íleo por promover alterações do mecanismo de ação do monofosfato de adenosina cíclico (AMP-c). Atua como detergente pois possui

propriedades tensoativas sendo responsáveis pelos efeitos sobre as membranas de eritrócitos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e plaquetas (SANTOS et al., 2007).

2.1.1.5 Toxina do choque tóxico

A Toxina do Choque Tóxico (TSST-1) é a responsável pela síndrome do choque tóxico (TSS). Esta síndrome foi descrita pela primeira vez em 1978 por Todde e colaboradores em crianças. Posteriormente, a TSST-1 foi associada como uma síndrome ligada a mulheres no período menstrual (mTSS), devido ao uso de tampões menstruais (SHARMA et al., 2018).

Os tampões menstruais contêm uma grande quantidade de oxigênio para aumentar o seu poder de absorção, deste modo o ambiente de anaerobiose da vagina diminui e o aumento de oxigênio torna o ambiente favorável para o *Staphylococcus* produzir a toxina-1 choque estafilocócico (TSST-1) que necessita obrigatoriamente de oxigênio para sua produção, no entanto não precisa do mesmo para crescer (SCHLIEVERT et al., 2019).

Para que a mTSS se estabeleça é necessário quatro fatores ocorram: (a) colonização vaginal com cepas de *Staphylococcus aureus* toxigênicos; (b) produção de TSST-1, para isso o gene tem que ser expresso e regulado pela presença do oxigênio, dióxido de carbono e pH neutro; (c) penetração através do epitélio de uma concentração suficiente de TSST-1 capaz de causar doença; e (d) ausência de títulos suficientes de anticorpos neutralizantes anti-TSST-1. Ou seja, ela precisa driblar as defesas do hospedeiro, evitando ser degradada por proteases ou inativada pelos anticorpos IgM ou IgG que estão presentes no epitélio vaginal (PARSONNET et al., 2005).

Casos de TSS não menstruais podem surgir de colonização de ferimento cirúrgico com ou sem infecção, queimaduras, tamponamento nasal, pneumonia pós influenza, infecções pós-partos e locais de infusão de insulina, a infecção invasiva não é necessária para o desenvolvimento do *Staphylococcus aureus* TSS (BURNHAM; KOLLEF, 2015). Casos de ocorrência de TSS não associados a menstruação (nmTSS) também foi relatado em crianças de faixa etária de 1 a 14

anos, tanto do sexo feminino quanto do sexo masculino (HASAN; HWAID; MAHDI, 2017).

A TSS é uma condição de risco de vida causada por *Staphylococcus aureus* produtora de toxinas superantígeno. Esses superantígenos iniciam uma grande quantidade de liberação de citocinas provocando o aparecimento de sintomas como *rash* cutâneo, febre, hipotensão e sinais de envolvimento de múltiplos órgãos. Esta é uma síndrome de alta taxa de mortalidade e morbidade, neste sentido, a rápida identificação da TSS para implementação de um tratamento apropriado é de fundamental importância (WILKINS et al., 2017).

Os sintomas multissistêmicos ocorrem por causa dos efeitos tóxicos da TSST-1 que desencadeiam secreção maciça de citocinas pelos linfócitos T que levam a hipotensão e falência de vários órgãos. A ocorrência da TSS é verificada nos extremos da idade, sendo a mortalidade maior em pacientes com comorbidades, em recuperação de infecção por varicela e que fazem uso de anti-inflamatórios não esteroides. Tem uma incidência de 1-5 por 100.00 habitantes. A cultura e sinais clínicos são a base para o diagnóstico de TSS, porém a presença ou ausência do *Staphylococcus aureus* não afetará o prognóstico (DÍAZ et al., 2016).

Os sinais da insuficiência de múltiplos órgãos incluem arritmias, falha renal, falha hepática, coagulação intravascular disseminada e síndrome da insuficiência respiratória aguda (FREIMAN; BORSUK; SASSEVILLE, 2005).

2.1.1.6 Enterotoxina estafilocócicas (SEs)

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma doença causada pela ingestão de alimentos contaminados com cepas de *Staphylococcus aureus* produtoras de enterotoxinas (SEs) (FEITOSA et al., 2017). As enterotoxinas são proteínas de cadeias curtas que contêm na sua estrutura primária os aminoácidos lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e tripsina (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

A adaptação do *Staphylococcus aureus* no alimento acaba causando a intoxicação alimentar. Diferentes alimentos especialmente os úmidos que integram amido e/ou proteínas como carnes, aves, ovos, leite e laticínios, bem como os

produtos de confeitaria podem ser contaminados por SE. Temperaturas de 20-37 °C e pH (4-7,4) aumentam rapidamente a produção de SEs (WU et al., 2016).

Os alimentos curados (ricos em sal) são também transmissores efetivos de intoxicação, tendo em vista, que *Staphylococcus aureus* tem a capacidade de sobreviver, multiplicar e produzir enterotoxina em concentrações de até 10% de cloreto de sódio (SANTANA et al., 2010).

Essas toxinas possuem um baixo peso molecular (26 a 30 kDa) e são codificadas por elementos móveis como plasmídeos, bacteriófagos e ilhas de patogenicidade. Por esta razão, a disseminação horizontal entre populações bacterianas é facilitada, são hidrossolúveis e resistentes às ações de enzimas proteolíticas como pepsina e tripsina, logo, permanecem ativas mesmo depois da digestão (YEINY et al., 2014). As toxinas são termoestáveis e mantêm a sua patogenicidade mesmo após serem submetidas a altas temperaturas (MACHADO et al., 2020).

Já foram identificadas 23 enterotoxinas como entidades sorológicas distintas, incluindo a SEA, SEB, SEC, SED e SEE. A mais frequente no processo de infecção alimentar é a SEA e a SEB (WU et al., 2016). Elas podem ser divididas em dois grandes grupos: 1) SE com atividade enterotóxica e emética, que compreende as SE clássicas, incluindo SEA, SEB, SEC, SED, SEE e SEH; 2) grupo de toxinas similares a enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* (JØRGENSEN et al., 2005 apud YEINY et al., 2014).

Essas toxinas são classificadas como superantígenos devido as suas habilidades de gerar uma poderosa resposta imune por se ligarem às moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade Classe II (MHC), promovendo uma forte estimulação do sistema imunológico pela proliferação de células T, ou seja, a combinação de MHC e peptídeos são reconhecidas pelos receptores de células T (TcRs) expresso nas células T, estimulando uma resposta imuno específica para o antígeno peptídico (FRASER, 2011).

Alguns autores asseguram que a intoxicação alimentar deriva de uma resposta inflamatória em todo o trato gastrointestinal, outros relatam que as toxinas não atuam diretamente no trato gastrointestinal, mas atuam indiretamente na

expressão de citocinas e metabólitos produzidos por células T, bem como de macrófagos, monócitos e mastócitos (FEITOSA et al., 2017).

Para que a intoxicação alimentar se estabeleça, cinco condições fundamentais são necessárias: 1. *Staphylococcus aureus* produtor de enterotoxina presente em fontes como matérias primas ou indivíduos portadores; 2. Ocorrer a transferência do *Staphylococcus* da fonte para o alimento; 3. A composição do alimento tem que apresentar características físico-químicas que favoreçam o crescimento e a toxinogênese de *Staphylococcus aureus*; 4. Temperatura e tempo adequados para o crescimento da bactéria e para a produção de toxinas; 5. Ingestão do alimento contaminado em quantidades satisfatórias de enterotoxinas para provocar os sintomas (HENNEKINNE; DE BUYSER; DRAGACCI, 2012).

Os sintomas surgem habitualmente entre duas e seis horas após a ingestão do alimento contaminado e consistem em vômito, náuseas, dores abdominais e diarreia. Em pessoas com comprometimento do sistema autoimune pode levar a óbito. A intoxicação alimentar estafilocócica não é uma doença notificada, por esta razão muitos casos e surtos não são relatados (HERRERA; SANTOS, 2015).

O diagnóstico de intoxicação alimentar por estafilococos geralmente é confirmado pela identificação de pelo menos 10^6 UFC/g de *Staphylococcus aureus* nos alimentos ou pela detecção das SE. Três tipos de métodos são utilizados para detectar toxinas bacterianas nos alimentos: bioensaios, biologia molecular e imunológico (FEITOSA et al., 2017).

O tratamento consiste normalmente na reidratação do indivíduo por causa da perda líquida no vômito e diarreia, quando a perda do líquido é grande é necessário a internação para reposição endovenosa (KONEMAN et al., 2014).

2.1.1.7 Toxina esfoliativa

As toxinas esfoliativas (TE) também conhecidas como toxinas epidermolíticas são moléculas pequenas, com aproximadamente 30 kDa. São serinoproteases do tipo quimiotripsina, produzidas e secretadas pela bactéria para o ambiente externo, provocando efeitos sistêmicos no hospedeiro. As proteases reconhecem e clivam caderinas desmossômicas (desmogleinas, Dsg-1) somente nas camadas superficiais

da pele. Este efeito é diretamente responsável pela manifestação da síndrome da pele escaldada estafilocócica (SSSS) (BUKOWSKI et al., 2010).

Segundo Araújo et al. (2017) a síndrome da pele escaldada (SSSS) é o resultado da produção de toxinas pelo *Staphylococcus aureus* e se apresenta sob duas formas: a síndrome esfoliativa generalizada (Doença de Ritter) que envolve boa parte da superfície corporal, sendo de natureza grave com risco de vida e a forma local ou impetigo bolhoso caracterizado por bolhas eritematosas.

A característica principal da síndrome da pele escaldada (SSSS) é a esfoliação da pele. A manifestação inicial é a febre, mal-estar, letargia e falta de apetite seguida de erupções cutânea eritematosas com bolhas e líquido no interior. As bolhas, geralmente livres de *Staphylococcus* cultiváveis, se rompem levando a toxina as diferentes partes do corpo pela corrente sanguínea. Uma forma específica da SSSS é o impetigo bolhoso (BUKOWSKI et al., 2010).

A incidência estimada da doença está entre 0,09 e 0,56 por milhão de habitantes, acometendo mais frequentemente recém-nascidos e crianças. Esta doença também ocorre em adultos, que geralmente são imunocomprometidos e/ou portadores de doença renal crônica. A taxa de mortalidade nas crianças varia de 3,6-11%, nos adultos a taxa de mortalidade é elevada ficando entre 40-63%, isto possivelmente em virtude de comorbidade existente (HANDLER; SCHWARTZ, 2014; ARAÚJO et al., 2017).

A SSSS ocorre geralmente em bebês e crianças que têm sistemas imunológicos imaturos. Quando as crianças são submetidas ao tratamento adequado a taxa de mortalidade é baixa em torno de 5%, no entanto, quando afeta adultos, em especial os imunossuprimidos, a taxa de mortalidade aumenta consideravelmente ficando em aproximadamente em 59% (OLIVEIRA et al., 2018).

O impetigo bolhoso é mais comum em criança, sua frequência é maior quando na pele já existe algum traumatismo (picada de inseto, dermatite pruriginosa). É considerada uma forma leve da síndrome da pele escaldada (SSSS), onde a toxina não se espalha além do foco infeccioso (PÉREZ; GARCIA-ROMERO, 2017)

O impetigo bolhoso está mais associado à produção de ETA enquanto a síndrome esfoliativa generalizada com a produção de ETB. A ETD está relacionada

com a formação de abscessos e furúnculos, provocando danos extensivos na pele (ARAUJO et al., 2017).

As toxinas A/B/C/D são as principais TEs conhecidas, sendo a A, B e C as mais frequentes em danos a pele humana. Em torno de 5% das cepas de *Staphylococcus aureus* produzem essas toxinas. A prevalência da toxina esfoliativa A se encontra na Europa, África e América (OLIVEIRA et al., 2018).

ETA, ETB e ETD são estruturalmente homólogas, a ETA é codificada pelo gene *eta* do DNA cromossomal, a ETB é codificada pelo gene *etb* de um DNA plasmidial e a ETD é codificado pelo gene *etd* de um DNA cromossomal em uma ilha de patogenicidade (MARIUTTI et al., 2017). As toxinas ETA e ETB provocam sintomas dermatologicamente idênticos agindo sobre a Dsg-1. As manifestações clínicas que ocorrem estão diretamente ligadas a clivagem das caderinas desmossomais das camadas superficiais (BOTKA et al., 2017).

O diagnóstico clínico do impetigo é realizado pela identificação do patógeno por meio do crescimento em cultura ou pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A realização da cultura permite a pesquisa de resistência por meio da realização do antibiograma, dando um direcionamento melhor para o tratamento (GALLI et al., 2019). O tratamento é realizado com o uso de antibióticos tópicos em casos de lesões mais leves e em casos de lesões mais intensas é recomendado o uso de antibióticos sistêmicos (PÉREZ; GARCIA-ROMERO, 2017). Caso não tratado pode evoluir e se espalhar provocando celulites, osteomielite, artrite, pneumonia, sepse e SSSS (GALLI et al., 2019).

2.1.2 Produção de enzimas

A coagulase, protease, hialuronidase, lipase e fosfolipase são enzimas extracelulares que permitem a penetração e invasão nos diferentes tecidos. A produção dessas enzimas está relacionada ao alto grau de patogenicidade do *Staphylococcus aureus* (YEINY et al., 2014).

A enzima coagulase é secretada por todos os *Staphylococcus aureus* e usada rotineiramente no laboratório de análises clínicas para identificação deste microrganismo em infecções humanas (KONEMAN et al., 2014). Esta enzima pode

ser produzida como produto livre ou pode ficar ligada a parede bacteriana, desta forma pode haver precipitação da fibrina na superfície dos *Staphylococcus aureus* impedindo a sua destruição ou digestão por células fagocitárias. Elas ativam a protrombina em trombina que conseqüentemente converte o fibrinogênio em fibrina estimulando a coagulação (ECHIODA-OGBOLE et al., 2018).

As lipases produzidas pelo *Staphylococcus aureus* inativam os lipídeos bactericidas, interferindo deste modo com a função dos granulócitos e aumentando a sobrevivência da bactéria no hospedeiro. Estudos sugerem que a lipase pode desempenhar um importante papel na formação de biofilmes (HU et al., 2012).

O ácido hialurônico é um dos principais componentes da matriz extracelular de mamíferos que dependendo do seu peso molecular atuam de forma a interferir no processo inflamatório. Quando a massa molecular é alta, funcionam como anti-inflamatório e imunossupressor, no entanto, quando a massa molecular é baixa/média, promovem produção de citocinas inflamatórias. Esses ácidos atuam também como barreiras para prevenir a propagação de patógenos. *Staphylococcus aureus* produz a enzima hialuronidase para clivar o ácido hialurônico durante a infecção, facilitando a propagação local da infecção para tecidos adjacentes (IBBERSON et al., 2016).

A enzima nuclease é um fator de virulência importante e tem um papel colaborador para doenças invasivas. Elas conseguem driblar as armadilhas dos neutrófilos, hidrolisam o DNA e modulam a formação de biofilme. Esta enzima tem sido usada como marcador para detecção direta de *Staphylococcus aureus* (OLSON et al., 2013).

Staphylococcus aureus produz uma variedade de proteases entre elas as cisteínas proteases, as estafofaínas A (ScpA) e B (ScpB), metaloproteinase, aureolisina (Aur), serina protease (V8 ou SspA) e proteínas semelhantes a serinoproteases (Spls), todas codificadas em um operon reguladas positivamente pelo sistema *Quorum Sensing*. Essas proteases além de serem fatores de virulência (clivam proteínas de superfície estafilocócicas, modulam a resposta imune e promovem a degradação do tecido do hospedeiro), ajudam na aquisição de nutrientes. Também podem lisar proteínas específicas do hospedeiro, a estafofaína

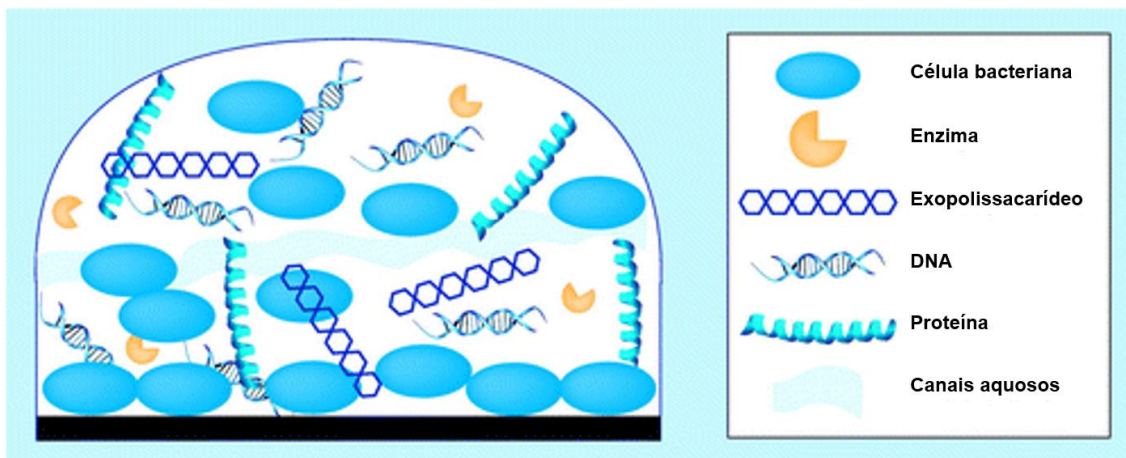
(SspB) degrada colágeno, fibronectina humana e fibrinogênio (LEHMAN et al., 2019).

2.1.3 Biofilme

Biofilme são comunidades de microrganismos que estão ligados a uma superfície promovendo uma ação importante na persistência de infecções bacterianas (Figura 1). Desta forma, essas bactérias são mais resistentes aos antibióticos em comparação às bactérias planctônicas. O termo biofilme foi introduzido formalmente em 1978 (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978 apud RABIN et al., 2015).

O biofilme pode se fixar às superfícies bióticas e abióticas sendo envolvido por uma complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas (EPS) compostas por um ou mais polissacarídeos extracelulares, DNA e proteínas. Os biofilmes apresentam estruturas variadas que dependem das bactérias que os constituem e as condições que o biofilme foi formado (MENOITA et al., 2012).

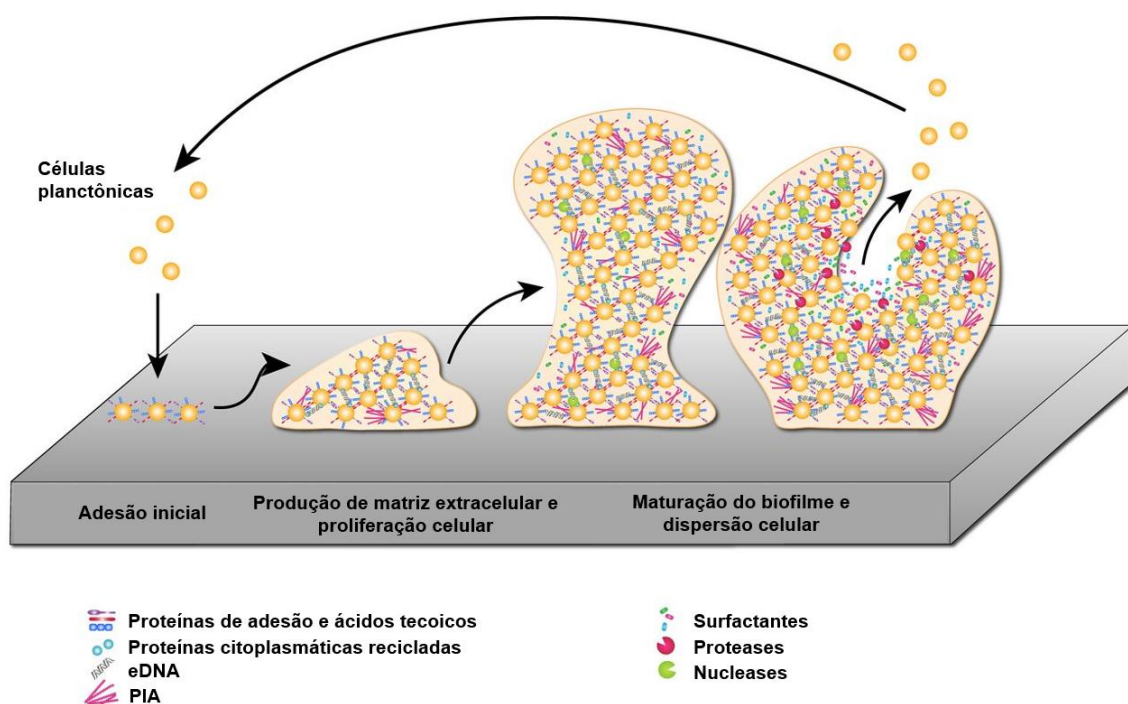
Figura 1 – Figura demonstrativa da estrutura do biofilme.



Fonte: Rabin et al. (2015).

No biofilme podem ser encontrado dois tipos de células, as células sésseis, que se aderem à superfície e as células planctônicas que estão dispersas no meio, com capacidade de iniciar um ciclo de novos biofilmes (Figura 2).

Figura 2 – Ciclo do biofilme.



Fonte: Schilcher & Horswill (2020).

As células planctônicas se aderem à superfície de forma reversível em um primeiro estágio, neste momento é importante a concentração de moléculas orgânicas no meio aquoso que tem contato com a superfície sólida. No segundo estágio, as células se prendem a superfície de forma irreversível. O processo de formação do biofilme é facilitado quando presentes *pilli*, flagelos e fimbrias. Após a adesão, inicia-se a produção de matriz extracelular e proliferação celular, culminando com o início da maturação do biofilme. A maturação completa do biofilme ocorre em seguida, com dispersão de células planctônicas responsáveis pela propagação do biofilme, iniciando um novo processo de aderência (MONROE et al., 2007; MENOITA et al., 2012; RABIN et al., 2015; SCHILCHER; HORSWILL, 2020).

Os biofilmes podem se desprender na fase de dispersão por algumas possíveis causas como: alterações do ambiente externo, alterações internas do biofilme e a degradação enzimática endógena (CARVALHO et al., 2019).

A adesina intercelular polissacarídica (PIA), também conhecida como poli-N-acetil-glicosamina, é o exopolissacarídeo relacionado ao biofilme no gênero *Staphylococcus*. A PIA é um polímero linear composto por resíduos de glicosamina. Quatro proteínas conduzem a biossíntese da PIA, as IcaA, IcaB, IcaC e IcaD. A IcaC está envolvida na formação de oligômeros longos e no transporte de oligômeros para o espaço extracelular (MACK et al., 1996; CUE; LEI; LEE, 2012).

Em uma pesquisa realizada por Thurlow et al. (2011) para determinar como ocorre a fagocitose e a diminuição da resposta inflamatória pela formação de biofilme foi demonstrado que os biofilmes de *Staphylococcus aureus* são capazes de diminuir as respostas pró-inflamatórias do hospedeiro, este fato pode explicar a persistência de infecção por biofilmes em pacientes imunocompetentes.

A fase inflamatória de feridas crônicas geralmente é prolongada pela presença do biofilme. Esses biofilmes são mais resistentes aos antibióticos do que as células planctônicas e geralmente são polimicrobianos, o que explica a pouca atuação de antibióticos, ou seu uso limitado em feridas crônicas (ZHAO et al., 2013).

Segundo Percival; McCarty; Lipsky (2015), os biofilmes podem ser encontrados em todas as feridas agudas ou crônicas, no entanto a razão das feridas crônicas não cicatrizarem em tempo hábil é a virulência e a patogenicidade do biofilme. Os estudos relatam que o biofilme impede a formação de fibroblastos no hospedeiro diminuindo o processo de cicatrização e a eficácia da terapia antimicrobiana. Os biofilmes também evidenciam induzir uma reação inflamatória no hospedeiro regulando positivamente muitos genes ligados as MMPs (metaloproteinases da matriz).

O sucesso do *Staphylococcus aureus* como patógeno é determinada pela tendência de adaptação do microrganismo a diferentes microambientes, apontando que a patogênese funciona como um processo complexo que vai depender dos fatores de virulência e da resistência do hospedeiro. Neste sentido a patogenicidade é o resultado da interligação complexa de sistemas regulatórios que respondem a múltiplos sinais do hospedeiro, do ambiente e da população bacteriana (HAAG; BAGNOLI, 2016).

2.1.4 Quorum Sensing

Quorum Sensing (QS) é um mecanismo pelo qual as bactérias monitoram a densidade celular e regulam comportamentos coletivos. Na formação de um biofilme as bactérias precisam regular sua expressão gênica e algumas utilizam o mecanismo de *Quorum Sensing*. Na regulação da expressão gênica muitos fatores intra e intercelulares estão envolvidos. Estes fatores ou moléculas sinalizadoras são denominados autoindutores (AI). O *Quorum Sensing* é capaz de induzir as moléculas sinalizadoras (AI) para comunicação entre as células (RABIN et al., 2015).

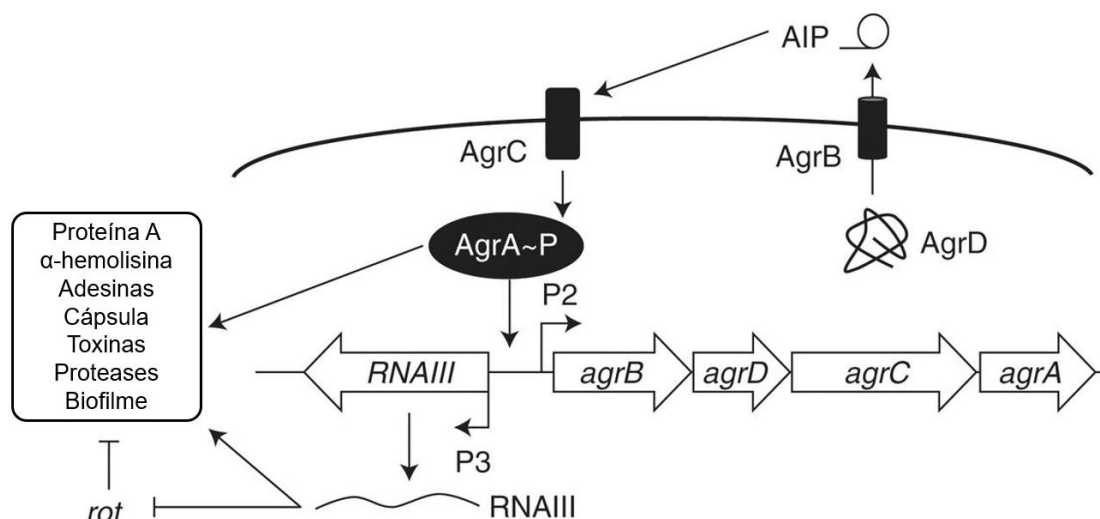
No gênero *Staphylococcus*, o regulador gene acessório (*agr*) é o sistema de *Quorum Sensing* gênero-específico que usa um peptídeo pós-traducional modificado como um sinal autoindutor, chamados de peptídeos autoindutores (PAI) (KONG; VUONG; OTTO, 2006).

Staphylococcus aureus possui dois sistemas de QS codificados pelo *locus agr*. A ativação do sistema *agr* faz com que *S. aureus* modifique seu estado comensal de adesão e colonização para o estado de um patógeno invasivo e agressivo, participando ativamente na regulação de genes de virulência. Regulam positivamente a α -hemolisina, promovem repressão da síntese da proteína A, reduzem a expressão de adesinas de superfície e aumenta a produção de cápsula, toxinas e proteases, participam na formação de biofilme e na comunicação entre as células. Mais de 70 genes são regulados pelo sistema *agr*, desses 23 são fatores de virulência (ANTUNES et al., 2010).

Para detecção do *Quorum Sensing*, inicialmente ocorre pelo *Staphylococcus aureus* a síntese do peptídeo linear codificado em AgrD. O AgrD começa a interagir com a endopeptidase transmembrana AgrB que por sua vez vai promover a secreção de AgrD, peptídeo autoindutor (PAI). Quando a densidade celular é baixa, a concentração de PAI não é capaz de ativar o sensor histidina quinase AgrC. No entanto, aumentando a concentração celular e por conseguintes concentrações de PAI, AgrC é ativado e sofre autofosforilação, transferindo em seguida o grupo fosforil ao regulador de resposta AgrA. Este vai se ligar aos promotores P2 e P3 do *locus agr*, acarretando uma forte indução de sua transcrição, com autoamplificação do seu sinal. Com a ativação da cascata do QS ocorre amplificação do RNA III. O RNA III

pode induzir ou reprimir expressões de fatores de virulência (Figura 3) (RUTHERFORD; BASSLER, 2012).

Figura 3 – Representação do sistema de detecção *quorum sensing* codificado pelo locus regulador de gene acessório (*agr*) em *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Adaptado de Rutherford e Bassler (2012).

2.1.5 Mecanismo de evasão da resposta imune

Vários fatores podem estar ligados ao mecanismo de evasão da resposta imune de *Staphylococcus aureus* e o estabelecimento desses fatores está diretamente ligado ao sucesso da infecção. Após violação epitelial e invasão sistêmica, *Staphylococcus* penetra na corrente sanguínea e secreta uma série de moléculas para evitar a sua destruição. Essas moléculas inibem a opsonização mediante a expressão de proteínas anti-opsônicas, inibem a ativação do complemento e a adesão de neutrófilos ao endotélio vascular, por impedir a diapedese, deste modo ocorre a inibição do extravasamento de neutrófilos dos vasos para os tecidos infectados (FOSTER, 2005). A enzima lipase vai atuar diminuindo a atividade pró-inflamatória do *S. aureus* em conjunto com a lipoproteína molecular padrão ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (CHEN; ALONZO, 2019).

A cápsula e a adesina intercelular polissacarídica (PIA) inibem a fagocitose, sendo que a inibição pela PIA pode ocorrer pela proteção da superfície celular de ataques de fagócitos ou contribuindo para a rede de biofilmes, pois é um componente importante na matriz de biofilme de *Staphylococcus* (CERCA et al., 2007).

Outro mecanismo de evasão da resposta imune e a formação de trombos com uma ação combinada de dois fatores de coagulação, a coagulase e o fator de Von Willebrand. Esses fatores reagem com a protrombina formando o complexo estafilotrombina que converte o fibrinogênio em fibrina culminando na coagulação ou formação de trombos. *S. aureus* utiliza o fator A de aglutinação – ClfA (*Clumping* fator A) para se aderir aos coágulos de fibrina, formando agregados bacterianos de fibrina (CHENG et al., 2010; MCADOW et al., 2011).

As espécies reativas de oxigênio podem ser formadas no momento da ingestão de *S. aureus* pelos neutrófilos no interior do fagossomo pela enzima mieloperoxidase (MPO) liberada dentro do fagossomo pelos grânulos primários dos neutrófilos. *S. aureus* tem muitos mecanismos que oferecem resistência e inibição a produção de espécies reativas de oxigênio sendo a estafiloxantina (pigmento amarelo do *S. aureus*) um importante componente. Os grânulos primários também podem liberar peptídeos antimicrobianos (AMPs) que podem ter a sua ação reduzida por proteases (KOBAYASHI; MALACHOWA; DELEO, 2018).

A produção de α -toxina é uma das mais importantes contribuições em termos da patogênese. Esta toxina funciona como uma citolisina para as células dos leucócitos, induz um processo inflamatório e possivelmente fazendo parte dos processos que levam à morte celular por piroptose. As leucocidinas de Pantón-Valentine codificadas pelos genes lukS-PV e lukF-PV são outras toxinas importantes no processo de lise dos leucócitos (CHEUNG et al., 2021).

2.2 RESISTÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* AOS ANTIMICROBIANOS

Os mecanismos de resistência de *Staphylococcus aureus* são bem determinados. Alguns antibióticos como vancomicina, daptomicina, clindamicina e linezolida são utilizados como recurso terapêutico para infecções por linhagens

resistentes a antibióticos como ocorre em *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA). No entanto, estes *Staphylococcus* desenvolvem resistência mesmo com terapias de último recurso, ocasionando falhas terapêuticas e aumento de mortalidade (DAVID; DAUM, 2010).

S. aureus possui em seu genoma uma flexibilidade que lhe permite a capacidade de se adaptar a diversas condições ambientais. Dentre elas são incluídas a aquisição de genes de resistência a antibióticos e o mecanismo de se adaptar a concentrações crescentes de antibióticos (DUMITRESCU, 2010).

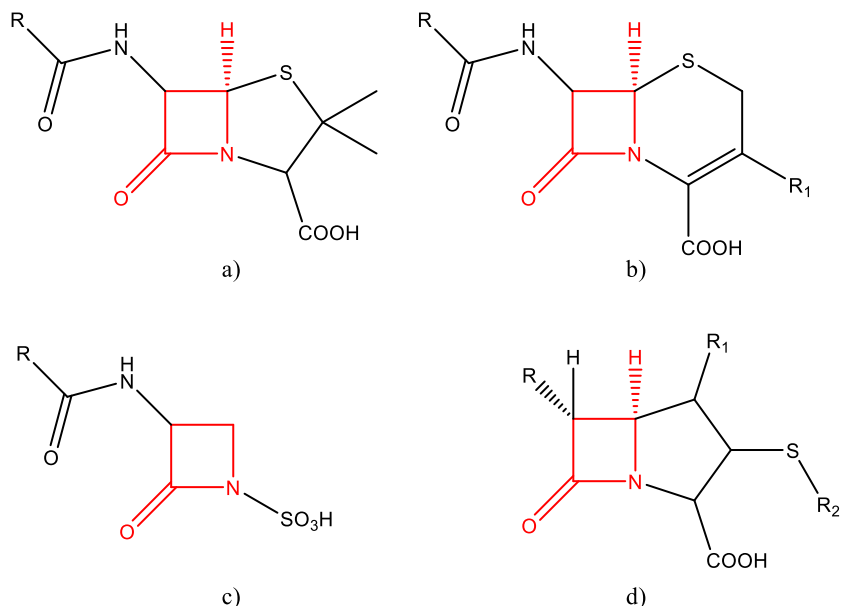
Os antibióticos são utilizados para tratamento e profilaxia de infecções humanas e animais, mas também tem seu uso na avicultura industrial para prevenção de infecção e como promotores de crescimento na ração animal. Devido ao uso irracional de antibióticos a resistência do *Staphylococcus aureus* tem aumentado cada vez mais, levando a uma escolha limitada de antibióticos e falhas no tratamento (PARTHASARATHY; CHOUGALE, 2021).

2.2.1 β -lactâmicos

Os beta-lactâmicos são uma classe de antibióticos que apresentam uma mesma estrutura básica que consiste em um anel β -lactâmico. Em sua maioria são bactericidas para os microrganismos sensíveis, pois agem na parede celular, impedindo que as camadas de peptidoglicano mantenham-se estáveis, tornando a bactéria mais susceptível à lise osmótica. Eles se ligam às Proteínas Ligadoras de Penicilinas (PBPs) de forma irreversível, impedindo a transpeptidação (ligação-cruzada) do peptidoglicano (MACHADO et al., 2019).

Pertencem a classe dos β -Lactâmicos as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. A oxacilina e meticilina são penicilinas β -lactamase estáveis, ou seja, não são hidrolisadas pela penicilinase, enzima que hidrolisa o anel azetidinona. Todos os antibióticos β -lactâmicos têm um elemento estrutural farmacofórico em comum, o anel azetidinona de quatro membros, ou anel β -lactâmico (Figura 4) (CLSI, 2018; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Figura 4 – Estrutura geral das a) penicilinas, b) cefalosporinas, c) monobactâmicos e d) carbapenêmicos com destaque para o anel β -lactâmico (vermelho).

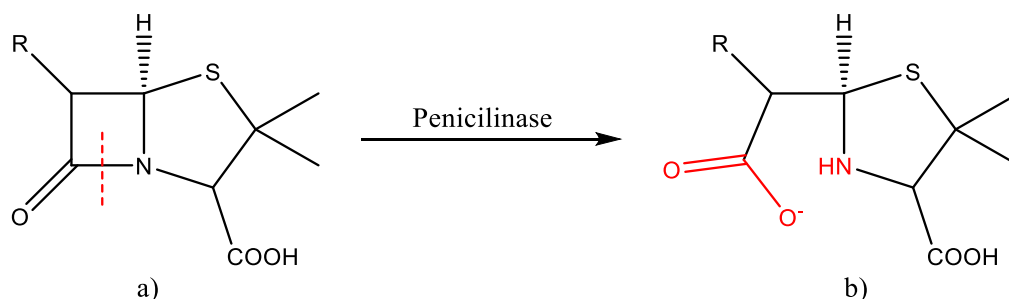


Fonte: A autora (2022).

A resistência a penicilina foi observada logo nos primeiros anos da sua utilização, no início da década de 1940, quando houve o surgimento em diferentes regiões de cepas resistentes. A resistência era mediada por aquisição de genes que codificavam a enzima penicilinase (Figura 5). Essas cepas produtoras de penicilinase fizeram com que o uso da penicilina se tornasse limitado. Em 1960 surgiu no mercado a meticilina como uma alternativa terapêutica as linhagens produtoras de penicilinase, nesta ocasião cerca de 80% dos isolados de *Staphylococcus aureus* eram resistentes a penicilina (ROSSI; ANDREAZZI, 2006).

Após a introdução da meticilina na clínica médica foi relatado os primeiros casos de resistência dos *Staphylococcus aureus*. O principal mecanismo de resistência a meticilina é a produção da proteína ligadora de penicilina 2a (PBP2a) codificada pelo gene *mecA*. Este gene é parte de um elemento denominado cassete cromossômico estafilocócico mec (SCC mec) (MARTINEZ-MARTINEZ, 2016).

Figura 5 – Quebra do anel β -lactâmico (a) em ácido penicilóico (b) pela ação da enzima penicilinase.



Fonte: Adaptado de Brunton et al. (2012).

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) foi definido como *S. aureus* que detém o gene *mecA* ou apresenta resistência fenotípica a oxacilina/cefoxitina (HOSOSAKA et al., 2007; SAEED et al., 2014).

Isolados de *S. aureus* resistentes à meticilina/oxacilina (MRSA) são resistentes a todos os antibióticos β -lactâmicos, com exceção das cefalosporinas mais recentes com atividade anti-MRSA, cefalosporinas de 5 geração (ceftarolina, cetobiprole). Os MRSA já foram restritos em grande parte a hospitais, outros ambientes de assistência médica e pacientes que frequentavam essas instalações. Em meados dos anos 90, no entanto, houve uma explosão no número de infecções MRSA relatado em populações sem fatores de risco para exposição ao sistema de saúde (CLSI, 2018; BATISTA et al., 2015; DAVID; DAUM, 2010).

Atualmente, o MRSA é endêmico em hospitais de todo o mundo e o surgimento de MRSA associado a comunidade (CA) provocou um alerta em toda a população médica (SHARIATI et al., 2020).

Existem diferenças genéticas, clínica e epidemiológicas entre os isolados de MRSA de origem comunitária (CA-MRSA) e MRSA de origem hospitalar (HCA-MRSA). Uma diferença de grande importância são os tipos de SCCmec (*Staphylococcal Cassette Chromosome mecA*) entre os dois tipos de isolados. O SCCmec dos tipos I a III são carregados pelos isolados hospitalares enquanto os CA-MRSA estão mais associados ao SCCmec tipo IV. O tipo IV é um elemento genético mais móvel e menor, além de carregar um número mais limitado de genes de

resistência. Os tipos I e II tem mais determinantes de resistência. Desta forma, os HCA-MRSA tendem a ser resistentes a múltiplos fármacos e os CA-MRSA resistentes apenas aos β -lactâmicos (CARVALHO; BEREZIN; MIMICA, 2012).

Alguns isolados de *Staphylococcus aureus* mecA positivo são susceptíveis a oxacilina/cefoxitina sendo referido como MSRA susceptível a oxacilina (OS-MRSA), fato descritos em diferentes partes do mundo. A frequência desses isolados é de aproximadamente 3%. No entanto já foi relatado casos de reversão de OS- MRSA durante uso prolongado do antibiótico (SAEED et al., 2014; PROULX et al., 2016).

De acordo com o *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility testing* (BrCast) se o gene *mecA* for detectado o isolado deve ser sempre relatado como resistente (BrCAST, 2018).

A cefoxitina é um marcador muito sensível e específico da resistência mediada por *mecA/mecC* e é o fármaco de eleição para o disco-difusão. Isolados testados com cefoxitina, devem ser relatados oxacilina sensível ou resistente com base no resultado da cefoxitina. Os pontos de corte da resistência à metilina são um CMI de oxacilina ≥ 4 e um CMI de cefoxitina ≥ 4 (CLSI, 2018).

O controle de MRSA é necessário em ambientes de saúde para aprimorar os resultados dos pacientes e ao mesmo tempo reduzir o risco de exposição e colonização dos profissionais de saúde. Como as opções de tratamento são limitadas é necessário a pesquisa e desenvolvimento de novos agentes anti-MRSA (KUBDE; DANGRE; MUDEY, 2020).

2.2.2 Macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas B

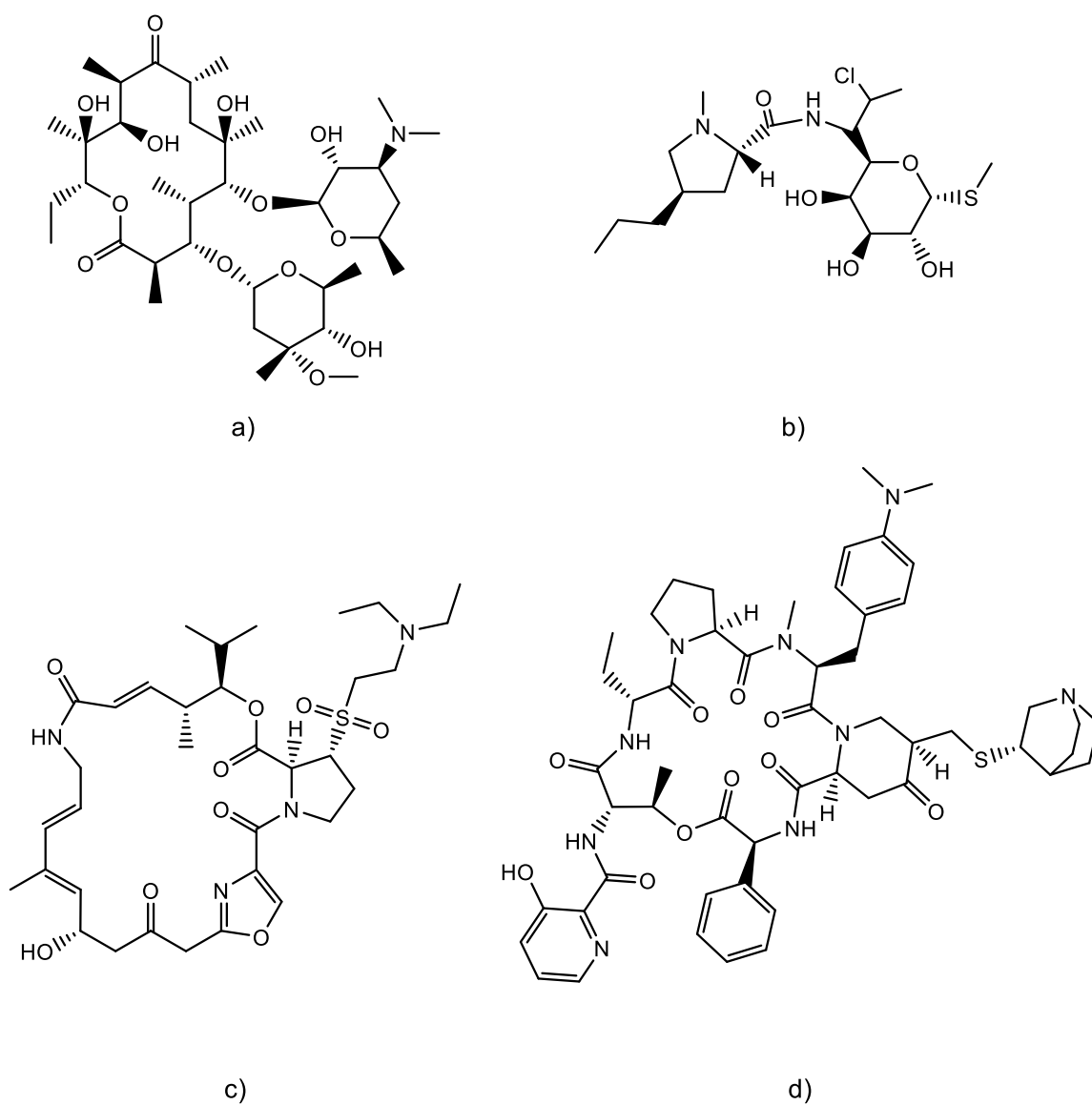
Os antibióticos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (MLSb) são rotineiramente utilizados para tratamento de infecções estafilocócicas causadas por MRSA. O uso continuado desses antibióticos tem provocado o aparecimento de resistência constitutiva (MLSbc), que ocasiona resistência a todos os antibióticos do grupo, e a forma induzível (MLSbi,) que provoca resistência a eritromicina e azitromicina, mas sensibilidade *in vitro* à clindamicina e estreptograminas B (PARRA et al., 2016).

A resistência de *Staphylococcus aureus* à eritromicina pode provocar resistência cruzada com outros macrolídeos (claritromicina, azitromicina, espiamicina), bem como resistência a lincosamidas (clindamicina) e estreptograminas do grupo B (quinupristina/dalfopristina) (LECLERCQ, 2002). Para observação da resistência induzida a clindamicina a técnica do teste D apresenta sensibilidade e especificidade em torno de 100% quando comparado com os estudos de genotipificação, sendo considerado o teste padrão ouro para detecção de linhagens que apresentam resistência induzível a clindamicina (TALEBI et al., 2019).

Três mecanismos estão associados a resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B: a metilação de rRNA (modificação de alvo), bombas de efluxo e inativação enzimática. A modificação de alvo está relacionada ao gene *erm*. *Staphylococcus aureus* que carregam o gene *erm* expressam resistência aos MLSb. Os genes que codificam bombas de efluxo (*mrsA* e *Isa*) e enzimas que inativam fármacos (*Inu* e *mphC*) conferem resistência apenas a determinados antibióticos macrolídeos não oferecendo resistência para clindamicina. As enzimas que inativam estreptograminas B raramente são encontradas em *Staphylococcus* (PETINAKI; PAPAGIANNITSIS, 2018).

Na Figura 6 estão representadas as estruturas químicas dos antibióticos MLSb.

Figura 6 – Representação químicas de MLSb: a) eritromicina (macrolídeo); b) clindamicina (lincosamida); c) dalfopristina e d) quinupristina (estreptograminas B).



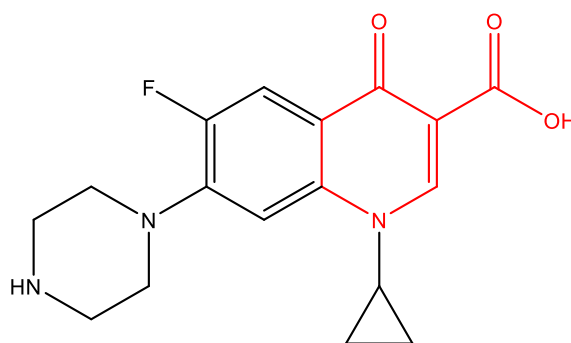
Fonte: Adaptado de Machado et al. (2019).

2.2.3 Quinolonas

As quinolonas são antibióticos sintéticos de amplo espectro que atuam na síntese do DNA inibindo diretamente a sua replicação interagindo com as enzimas DNA girase e topoisomerase IV, penetrando na parede celular através de porinas.

São usados amplamente em infecções comunitárias e nas IRAS, possuem alta biodisponibilidade e forma de administração (parenteral ou oral). A DNA girase é uma proteína tetramérica composta por dois pares de subunidades A e B codificadas pelos genes *GyrA* e *GyrB*. A topoisomerase é uma proteína tetramérica composta por dois pares de subunidades A e B codificada pelos genes *ParC* e *ParE* (MEHLHORN; BROWN, 2007). Na figura 7 está evidenciado o núcleo básico das quinolonas na estrutura química do ciprofloxacino.

Figura 7 – Estrutura química do ciprofloxacino com núcleo básico das quinolonas destacado em vermelho.



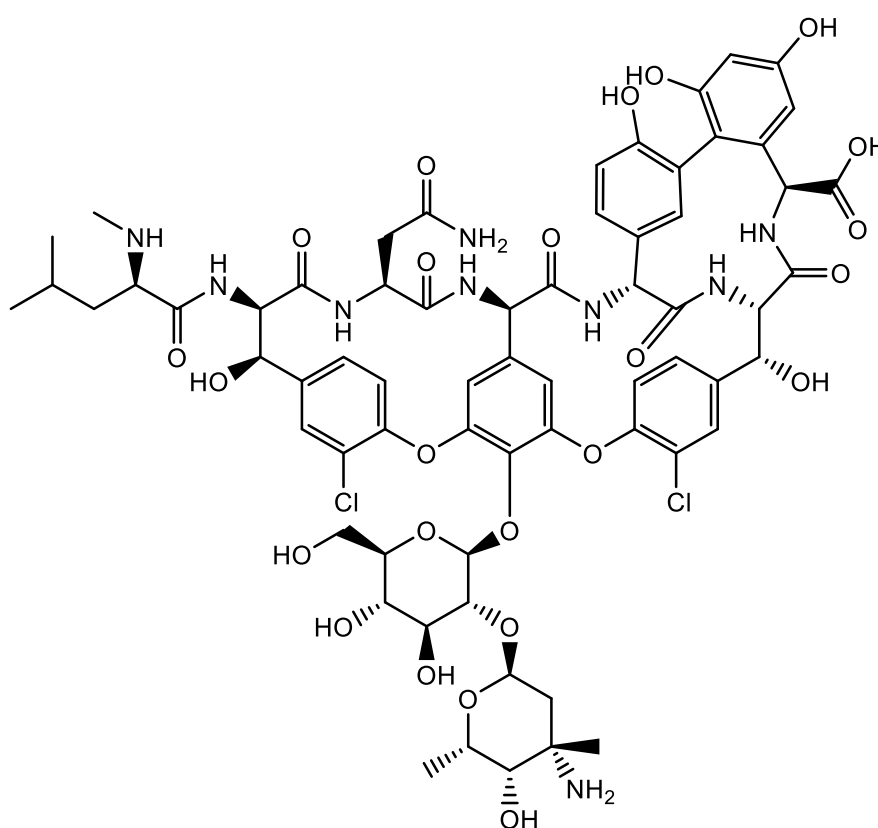
Fonte: A autora (2022).

A primeira quinolona a ser introduzida no mercado foi o ácido nalidíxico, em 1967, para ser utilizada em infecções urinárias não complicadas causadas por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, sendo considerada uma quinolona de 1ª geração. As classificações das quinolonas por geração tem em conta o espectro de ação e a indicação terapêutica, onde cada nova geração corresponde a um maior espectro de ação, estando disponível as quinolonas até a quarta geração. A partir da segunda geração as quinolonas apresentam um átomo de flúor na sua estrutura sendo assim chamadas de fluoroquinolonas (RODRIGUES-SILVA et al., 2014).

2.2.4 Glicopeptídeos

A vancomicina e teicoplanina são os representantes da classe dos glicopeptídeos, sendo a vancomicina a primeira a ser descoberta e a principal representante da classe. A estrutura química da vancomicina está representada na figura 8 (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Figura 8 – Estrutura química da vancomicina.



Fonte: A autora (2022).

Com o aumento da disseminação das cepas de MRSA em infecções hospitalares e comunitárias, os glicopeptídeos, em especial a vancomicina, passaram a ser a medicação de escolha para casos graves de infecção por *Staphylococcus aureus*. Com isto, algumas cepas de MRSA passaram a desenvolver mecanismos de resistência aos glicopeptídeos (LEVINE, 2006).

As falhas do tratamento com vancomicina são evidentes nos casos em que os isolados de *S. aureus* são resistentes à vancomicina (VRSA), tem resistência intermediária (VISA) ou se apresenta como VISA heterogêneo (hVISA) (SHARIATI et al., 2020).

Staphylococcus aureus com resistência intermediária à vancomicina (VISA) foi identificado pela primeira vez em 1996 em uma amostra (CMI 8 µg/mL) de um paciente no Japão. Este paciente fez vancomicina várias vezes e durante um tempo prolongado, devido a uma infecção de sítio cirúrgico. Este isolado não possuía o gene *vanA* e a sua susceptibilidade diminuída foi atribuída a uma parede celular mais espessa (HIRAMATSU et al., 1997 apud SHARIATI et al., 2020). No Brasil, o primeiro relato ocorreu em 2001 no Estado de São Paulo em um hospital de referência para queimados (OLIVEIRA et al., 2001).

Os isolados VISA, além de apresentarem a parede celular mais espessa, também tinham crescimento mais lento comparando com *S. aureus* sensíveis à vancomicina. Esta resistência não era detectada pelo teste de disco difusão, mas observada pela CMI (MIMICA; BEREZIN, 2006).

Em 2002, foi relatado nos Estados Unidos o primeiro caso de *Staphylococcus* resistente à vancomicina (VRSA) em um paciente diabético. Neste caso, o gene *vanA* foi detectado e a CMI de vancomicina para este isolado foi de 1024 µg/mL. O mecanismo de resistência desta cepa envolveu a transferência de plasmídeo contendo o transposon do gene *vanA* de um *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina para um *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA). A transmissão deste novo plasmídeo e a expressão da resistência à vancomicina foi conduzida para outros *Staphylococcus*. No entanto, esses casos são raros em todo o mundo (SHARIATI et al., 2020; HOWDEN et al., 2010; MIMICA; BEREZIN, 2006).

Os glicopeptídeos atuam inibindo a biossíntese da parede celular bacteriana pela complexação com o resíduo dipeptídico terminal D-Ala-D-Ala das cadeias peptídicas que constituem a parede celular. A complexação inibe a reação de transpeptidação porque o substrato não fica disponível para a ação da transpeptidase. Desprovidas de parede celular, as bactérias sensíveis sofrem lise, devido à elevada pressão osmótica do seu meio interno. Seu efeito é, portanto, bactericida (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

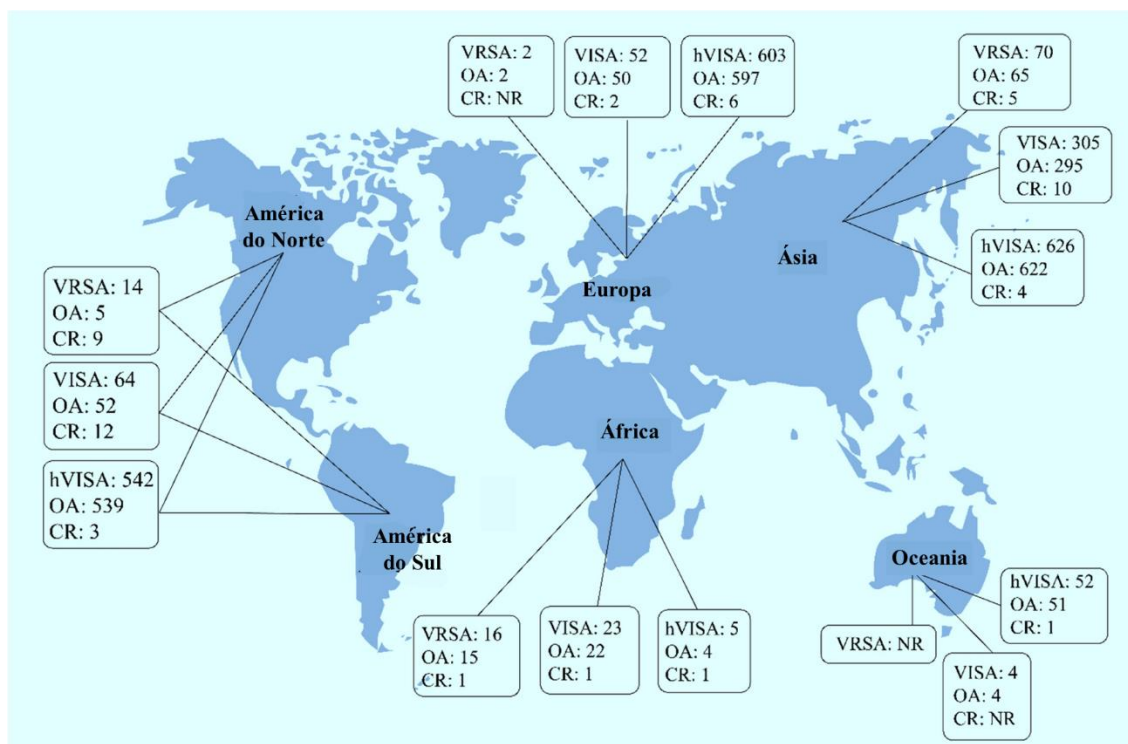
Segundo o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2017), os pontos de corte para vancomicina em *Staphylococcus aureus* foram reduzidos, desta forma foi eliminado o grupo intermediário. No entanto, as designações de *Staphylococcus aureus* intermediário à vancomicina (VISA) e *S. aureus* com heterorresistência intermediária à vancomicina (hVISA), tem sido mantida para isolados com resistência de baixo nível não mediada pelo gene *vanA*. *S. aureus* com alto nível de resistência à vancomicina apresenta CIM >8 mg/L, enquanto os que apresentam resistência de baixo nível - VISA as CMI se encontram entre 4-8 mg/L. *S. aureus* com heterorresistência intermediária à vancomicina (hVISA) são aquelas sensíveis à vancomicina (CIMs ≤ 2 mg/L), mas com populações minoritárias (1 em cada 10^6 células) com CIM de vancomicina > 2 mg/L, conforme investigação do perfil por análise populacional.

Segundo Howden et al. (2010), a parede celular de cepas VSSA e VISA tem algumas características distintas que estão ligadas a resistência a vancomicina. Cepa VSSA apresenta camada normal de peptidoglicano, produção de proteína A e expressão normal do polissacarídeo capsular. As cepas VISA apresentam espessamento da parede celular, redução da autólise e da proteína A, aumento da expressão da cápsula e da D-alanilação de ácidos teicoicos.

Custos elevados de tratamento, alto risco de infecção persistente e internações prolongadas estão associadas as infecções por VISA e hVISA que levam a taxas mais altas de falha no tratamento com vancomicina (MAOR et al., 2009).

Shariati et al. (2020) em seu estudo avaliaram a prevalência de VRSA, VISA e hVISA e analisaram dois períodos antes de 2010 e de 2010-2019. A prevalência dos três tipos de resistência foi progressivamente aumentando. Os resultados indicaram que a prevalência de VRSA, VISA e hVISA após 2010 representam um aumento de 2,0; 3,6 e 1,3 respectivamente, em relação aos anos anteriores. O número de isolados de VRSA, VISA e hVISA relatada pelos autores nos 5 continentes está representada na figura 9.

Figura 9 – Número de casos de VRSA, VISA e hVISA nos continentes.



Fonte: Shariati et al. (2020).

2.3 OCORRÊNCIA E RESISTÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* EM HOSPITAIS DO BRASIL

Isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes vêm aumentando desde que foram encontrados os primeiros casos de resistência. Este aumento, segundo Guo et al. (2020), deve-se em parte ao uso indiscriminado de antibióticos. Por outro lado, os profissionais de saúde, que devido às suas atividades laborais em contato direto com pacientes, são apontados como uma população suscetível à colonização por microrganismos resistentes a múltiplos fármacos, incluindo *S. aureus*. A falta de protocolos de prevenção contribui para a colonização por esses microrganismos, ocasionando riscos reais de surtos de infecção (LOPES et al., 2017).

2.3.1 Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em pacientes hospitalares

Um estudo realizado com 68 paciente internados em UTI de quadro clínico de pneumonia associada a ventilação mecânica revelou que das amostras que apresentaram crescimento bacteriano, 24% (16 pacientes) não possuíam microrganismos resistentes, enquanto 58% (40 pacientes) possuíam microrganismos resistentes a algum fármaco antimicrobiano. *Staphylococcus aureus* apresentou prevalência 11,9%, com 56% dos isolados resistentes à oxacilina (CALCAGNOTTO et al., 2011).

Almeida et al. (2012) avaliaram 363 pacientes internados no Hospital Estadual de Bauru – SP, e encontraram em seu estudo 1.078 amostras positivas para o crescimento de *S. aureus*. Das amostras analisadas, 810 mostraram resistência à meticilina (75,1%), das quais 797 (98,4%) foram resistentes à oxacilina e todas apresentaram resistência à cefoxitina. Por sua vez, Rodrigues et al. (2013), neste mesmo hospital, avaliaram 367 pacientes da unidade de queimados, dos quais 96 apresentaram *S. aureus* MRSA. Destes, oito pacientes apresentaram no período de admissão e 88 durante a internação.

Rocchetti et al. (2018) analisaram 371 amostras de cultura de sangue, nas quais *S. aureus* apresentou prevalência de 23% (85 amostras). Destes, 43 amostras (50,6%) apresentaram perfil de resistência à oxacilina. Duarte et al. (2018) avaliaram o perfil de resistência de 720 isolados de *S. aureus* oriundos de amostras de sangue, dos quais 96,5% foram resistentes para penicilina, 45% para eritromicina, 43,7% para oxacilina e 39,8% para clindamicina. No mesmo sentido, Dallacorte et al. (2016) determinaram o perfil etiológico e a sensibilidade antimicrobiana dos principais microrganismos isolados do sangue de pacientes internados em hospitais privados de Cascavel/PR. Destes foram analisados 5.059 laudos de 6 hospitais, destes 613 (12,1%) foram positivos para o crescimento de microrganismos. *S. aureus* apresentou prevalência de 17,9% e resistência aos antimicrobianos: clindamicina (33%), eritromicina (84%), gentamicina (54%), oxacilina (37%) e tetraciclina (14%). Da mesma forma, Pena et al. (2014) realizaram o isolamento de 602 amostras de cocos Gram-positivos de pontas de cateter e sangue, dos quais 268 foram identificadas como *S. aureus* (128 isolados de sangue e 140 de ponta de

cateter). Destes, 233 (87%) eram resistentes à meticilina. Andrade et al. (2021), em contraposição aos autores citados encontraram menor prevalência de *S. aureus* em hemoculturas (10,3%) e nenhuma amostra resistente à oxacilina.

No estudo de Gonçalves et al. (2013) foi avaliada a incidência de infecções provocadas por MRSA em um hospital da zona sul do Rio de Janeiro. Todos os dados foram obtidos através da leitura de rotina de cultura de vigilância e no relatório diário enviado à Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do hospital. Na ocasião, foram coletadas 2517 amostras da mucosa nasal para análise. Em 88 amostras (3,49%) foi confirmada a presença de *S. aureus*, e destas 44 (50%) foram resistentes à oxacilina. Por outro lado, Goulart et al. (2015) analisaram 348 amostras de cultura de swab nasal de pacientes internados no Hospital de Força Aérea do Galeão (HFAG), também no Rio de Janeiro. Das 348, 50 (14,3%) mostraram-se positivas para *S. aureus*, e destas 29 (42%) foram resistentes à oxacilina. Os dois autores em seus estudos evidenciaram a prevalência de MRSA em amostras nasais no âmbito hospitalar.

Rodrigues et al. (2015) analisaram os dados de todas as amostras positivas para o crescimento de *Staphylococcus aureus*, independente do sítio de infecção, durante cinco anos do Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM). A pesquisa teve como objetivo determinar a prevalência de isolados resistentes a oxacilina. De 1.852 amostras isoladas de *Staphylococcus aureus*, 616 (33,3%) foram resistentes à oxacilina.

Rabelo et al. (2014) avaliaram diferentes amostras de pacientes, além de amostras de swab nasal de profissionais de saúde de vários setores do Hospital das Clínicas da UFPE, com o objetivo de determinar a ocorrência e disseminação de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina e vancomicina. Das 211 amostras coletadas (91 de pacientes e 120 profissionais de saúde) foram identificadas 30 bactérias do gênero *Staphylococcus*. Dentre as espécies mais prevalentes estavam *Staphylococcus coagulase negativa* (11) e *S. aureus* (19). Dos isolados de *S. aureus*, quatro apresentaram o gene *mecA*, indicativo da resistência à oxacilina.

Em um estudo descritivo, do tipo retrospectivo realizado a partir de dados obtidos de um Laboratório de Análises Clínicas que atende a três hospitais da região de Porto Alegre/RS, relativos a pacientes que passaram pela UTI no período do

estudo, foram analisados os dados de 98 pacientes. As culturas destes pacientes foram positivas e bactérias isoladas em 45,9% dos aspirados traqueais, 18,4% das hemoculturas e das uroculturas, 8,2% das amostras de escarro, 6,1% das pontas de catéteres, e 1% dos lavados brônquicos, secreções conjuntivais e de coto umbilical. A prevalência de *S. aureus* foi de 7,2%, dos quais 28,5% apresentaram perfil de resistência à clindamicina, gentamicina e oxacilina (BASSO et al., 2016).

Andrade et al. (2017) em seu estudo analisaram amostras de diferentes sítios de infecção de paciente internados em um hospital particular no município de Santos-SP. Os autores analisaram 8.211 amostras, destas, 1.614 apresentaram crescimento bacteriano. As amostras que apresentaram crescimento bacteriano foram obtidas de sangue (34%), secreções (31%), urina (28%), ponta de cateter (4%) e líquidos (3%). Das 1641 amostras com crescimento, 104 foram positivas para *S. aureus* (8,2%) e destes 73 (70,1%) foram resistentes à clindamicina e 68 (65,4%) à oxacilina.

Oliveira et al. (2017) analisaram os dados de 2.154 pacientes internados na UTI de um hospital universitário de Belo Horizonte, dos quais foram elegíveis para o estudo 2.137 (99,2%). Destes, 426 foram positivas para o crescimento microbiano e 263 eram resistentes, dentre as quais *S. aureus* apresentou prevalência de 14% (resistentes à oxacilina).

Um estudo de dados do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN/DF) foi realizado por Silva et al. (2017), com os casos de bactérias do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp). Foram analisadas 577 amostras: o maior percentual foi de *Klebsiella pneumoniae* a (41%), seguido por *Staphylococcus aureus* (22%), *Pseudomonas aeruginosa* (14%), *Enterobacter* spp. (11%) *Acinetobacter baumannii* (8%) e *Enterococcus faecium* (4%). Dos *S. aureus* isolados (127), 40% foram resistentes à oxacilina (MRSA), 96,9% a penicilina, 75,8% a eritromicina e 63,3% a ciprofloxacino/levofloxacino. Também foram relatadas resistência à linezolida (3,9%), daptomicina (4,7%) e vancomicina (2,3%). O relato de resistência a vancomicina no Brasil é pouco descrito na literatura (Rossi et al. 2014).

Nos artigos citados foi observada a presença de *Staphylococcus aureus* no âmbito hospitalar com prevalência que variou de 7,7% a 63,3%. Com exceção do estudo de Andrade et al. (2021) todos os autores relatam em suas análises resistência à oxacilina. Os dados apontados pelos pesquisadores indicam a necessidade de maior limpeza e monitoramento ambiental efetivo, em especial nas UTIs.

2.3.2 Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em profissionais de saúde e superfícies hospitalares

Moura et al. (2011) realizaram estudo com o objetivo de verificar a presença de *Staphylococcus aureus* na saliva da equipe de enfermagem de um hospital escola. Três amostras da saliva de 351 profissionais de saúde foram coletadas, totalizando 1.053 amostras. A colonização por *S. aureus* foi observada em 144 (41%) dos 351 profissionais. Entre os colonizados, 7,1% (25/35) foram considerados portadores de *S. aureus* resistentes à metilicina (MRSA). Tendo em vista que os isolados de MRSA foram encontrados em setores hospitalares com grande vulnerabilidade para seus pacientes, como a unidade metabólica, UTI, unidade de transplante de fígado, hematologia e clínica ginecológica e obstétrica, os riscos para os pacientes e demais profissionais de saúde é considerável. Os autores reforçaram a necessidade de estudos específicos e medidas preventivas no controle de MRSA.

Silva et al. (2012) realizaram um estudo com o objetivo avaliar a prevalência e resistência de *Staphylococcus aureus* em profissionais de enfermagem de um hospital universitário de Pernambuco, totalizando 150 profissionais. Neste estudo, foram avaliadas 352 amostras biológicas da região palmar/interdigital das duas mãos e da cavidade nasal. A prevalência geral de colonização pelo *S. aureus* foi de 25,8%. Destes, 25,6% apresentaram colonização exclusivamente das mãos, 48,8% exclusivamente da cavidade nasal e 25,6% apresentaram colonização em ambos os sítios avaliados. Os profissionais estavam presentes em maior proporção nas UTIs (42,4%) e relataram usar luvas nos procedimentos. Na avaliação do perfil de resistência, foi observado que 100% dos isolados eram resistentes à penicilina,

11,9% a clindamicina, 4,8% ao sulfametoxazol/trimetoprima, 7,1% ao cloranfenicol, 4,8% a gentamicina, 2,4% à cefoxitina, 2,4% à teicoplanina, 23,8% à rifampicina e 42,8% à eritromicina. Quanto à oxacilina foram três amostras com fenótipo de resistência e duas com resistência intermediária. Além destas, três (7,14%) amostras apresentaram resistência intermediária à vancomicina. Os autores afirmam que os profissionais de saúde estão expostos por um longo período aos pacientes e materiais médicos hospitalares que podem estar colonizados.

Moreira et al. (2013) pesquisaram a prevalência de portadores de *S. aureus* em amostras coletadas dos vestíbulos nasais e das mãos de pacientes e membros da equipe de enfermagem. Neste estudo foram coletadas 84 amostras de pacientes e 22 de membros da equipe de enfermagem de uma UTI de um hospital geral. Entre os 22 membros da equipe de enfermagem, 13 (59,1%) carregavam *Staphylococcus aureus*, sendo que foi maior nos vestíbulos nasais (92,3%) do que nas mãos dos profissionais. Destas amostras, foi observado 100% de resistência a penicilina, 80% para oxacilina e cefoxitina, 85% para azitromicina e clindamicina e 40% para sulfametoxazol/trimetoprima. Os autores ressaltam que a alta resistência observada nos membros da equipe, em especial para oxacilina, indicam que as opções terapêuticas para eliminação de ORSA diminuem cada vez mais.

Camilo et al. (2016) realizaram uma pesquisa em um hospital da cidade de Cascavel/PR com o objetivo de avaliar a prevalência de *Staphylococcus aureus* entre profissionais de enfermagem. Esta pesquisa avaliou 50 profissionais de enfermagem, lotados na UTI e no centro cirúrgico, unidades de internamento particular/convênio e unidades de internamento do SUS, com um total de 200 amostras de swab nasal e mãos com intervalo de coleta de trinta dias. A prevalência geral de colonização foi de 56% (28/50) sendo que 23 (82,15%) com colonização exclusivamente da mucosa nasal, 5 (17,85%) em ambas as regiões, e nenhum apresentou colonização exclusivamente nas mãos, sendo que 8% (4/50) eram colonizados por *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA). Os autores também relataram a importância do monitoramento dos profissionais de enfermagem por serem um grupo vulnerável ao contato com microrganismos resistentes durante o exercício da profissão.

Silva et al. (2012), Moreira et al. (2013), Camilo et al. (2016) em suas pesquisas verificaram que a maior ocorrência de colonização de *Staphylococcus aureus* entre os profissionais de enfermagem foi nas amostras coletadas na cavidade nasal. Os percentuais de colonização foram de 48,80%, 92,30% e 82,15%, respectivamente. A presença de MRSA neste local é um alerta para medidas mais efetivas de controle de MSRA entre estes profissionais. Estes resultados mostram a importância do uso de EPIs como máscaras na manipulação de pacientes.

Entretanto, na pesquisa realizada por Linardi et al. (2014) em funcionários de um hospital geral da região leste de Minas Gerais, foram coletadas 91 amostras da mucosa nasal de enfermeiros, médicos, copeiros, fisioterapeutas e funcionários da limpeza. Das amostras coletadas, 20 (22,0%) foram positivas para a presença de *S. aureus* e dessas, 14 (70%) eram *S. aureus* MRSA. Os autores salientaram que cada funcionário dentro da unidade tem o papel de preservar vidas, no entanto também podem transmitir microrganismos capazes de provocar doenças.

Reinato et al. (2015) e Carvalho et al. (2016) demonstraram em seus resultados a presença de *Staphylococcus aureus* multirresistente na cavidade nasal dos profissionais de saúde e estudantes de enfermagem. Reinato et al. (2015) analisaram 61 amostras de mucosa nasal de enfermeiros, técnicos de enfermagem e auxiliares de enfermagem. Dessas, 23% (14/61) apresentaram crescimento de *S. aureus*, sendo 4 (28,6%) resistentes à oxacilina, o que representa uma prevalência de 6,6% (4/61). Carvalho et al. (2016) observaram que de 138 amostras de mucosa nasal de estudantes de graduação de enfermagem que desenvolviam sua formação acadêmica nos ambientes hospitalares, ambulatoriais e em laboratórios, 29 (21,7%) apresentaram crescimento de *S. aureus*, onde 7 (24,1%) se mostraram resistentes à oxacilina.

Ferreira et al. (2011) em sua pesquisa, analisaram 63 superfícies como: manivela da cama, mesa, botões da bomba de infusão e aventais de algodão e grade em uma UTI médico-cirúrgica de um hospital universitário. *S. aureus* foi encontrado em 48 superfícies (76,2%), dos quais 60,4% foram resistentes à metilicina. Renner et al. (2013) e Brixner et al. (2016) realizaram um estudo onde também verificaram o crescimento de microrganismos em superfícies hospitalares e avaliaram os índices de resistência a antimicrobianos. Na pesquisa de Renner et al.

(2013) foram analisados estetoscópio, respirador, mesa, cama, dispensador de soro/alimento, 2 teclados e 1 prontuário. 89% das amostras foram positivas para o crescimento bacteriano, sendo a prevalência de *S. aureus* de 37%. Destes, 60% foram resistentes à meticilina. Já Brixner et al. (2016) analisaram as superfícies de estetoscópio, monitor, respirador, incubadora, mesa e suporte de tomada elétrica e encontraram uma positividade 100% para o crescimento bacteriano, com prevalência de 52% para *S. aureus*, dos quais 78,6% foram resistentes à oxacilina. A resistência de *Staphylococcus aureus* à oxacilina/meticilina (60% a 78%) encontrada nas superfícies analisadas demonstra a importância da higienização das superfícies hospitalares que podem ser um ponto de disseminação de MRAS.

Almeida et al. (2017) e Silveira et al. (2020) analisaram a contaminação de superfícies hospitalares. Das 60 superfícies analisadas (leitos de UTI) por Almeida et al. (2017), 86,7% (52/60) apresentaram crescimento bacteriano, sendo 12 amostras positivas para *S. aureus* (23%), nas quais foi evidenciada resistência para cefoxitina, ciprofloxacino, eritromicina e clindamicina, sabendo-se que a resistência à cefoxitina reporta resistência à oxacilina. Entretanto das 22 amostras de superfícies avaliadas por Silveira et al. (2020), foi observado crescimento bacteriano em 19 (86%), com prevalência de 31,6% (7/19) para *S. aureus*.

Fenalte & Gelatti (2012) analisaram 106 amostras obtidas de jalecos utilizados por técnicos de enfermagem, nas quais foi verificada a prevalência de *S. aureus* em 21 (19,8%). Destes, 5 (4,71%) foram resistentes à cefoxitina, a ciprofloxacino, gentamicina, eritromicina, clindamicina, apresentando portando perfil de multirresistência. Já Dantas et al. (2014) pesquisaram a presença de *S. aureus* na região diafragmática de 32 estetoscópios de médicos, residentes, enfermeiros e auxiliares de enfermagem de um hospital público da cidade de Maceió. Todas as amostras foram positivas para o crescimento microbiano, com prevalência de *S. aureus* em 41% das amostras (13/32), das quais 3 (23%) foram resistentes à oxacilina.

Reis et al. (2015) e Oliveira et al. (2021) verificaram a presença de contaminação em celulares de profissionais de saúde que trabalhavam em UTI. Reis et al. (2015) realizaram uma pesquisa com 50 amostras de celulares de diferentes profissionais da saúde como: médicos, enfermeiros, técnicos em enfermagem,

fisioterapeutas e acadêmicos de enfermagem e medicina. Todas as amostras analisadas apresentaram crescimento bacteriano e a prevalência de *S. aureus* foi de 28% (14) das amostras, destes 18% demonstraram resistência à oxacilina. Na pesquisa de Oliveira et al. (2021) foi realizada a coleta em 27 celulares de profissionais da saúde (médicos, enfermeiros, técnicos de enfermagem e fisioterapeutas). Das 27 amostras, 6 (28,5%) foram classificadas como *S. aureus*, nas quais foi observada 100% de resistência à azitromicina e eritromicina, 83% a amoxicilina, penicilina e ciprofloxacino; 66% a tetraciclina; 50% linezolida; e 33% a lincomicina, sendo considerado um microrganismo multirresistente. Nos dois estudos os autores relataram a evidente contaminação de *Staphylococcus aureus* em aparelhos celulares das equipes de profissionais de saúde sugerindo que os celulares podem ser instrumento de disseminação de microrganismos multirresistentes.

Analisando os dados acima é possível enfatizar que a colonização de profissionais de saúde e de superfícies hospitalares, incluindo utensílios médico-hospitalares, jalecos e celulares, por *Staphylococcus aureus* facilita sua disseminação. Deste modo, aumentando a morbidade e mortalidade dos pacientes, principalmente os internados em Unidades de Terapia Intensiva. Também devem ser adotadas medidas eficazes no controle da transmissão deste microrganismo como lavagem de mãos, utilização de luvas e máscaras além de limpeza eficiente das superfícies hospitalares.

2.4 TIAZOLIDINAS E SEUS DERIVADOS

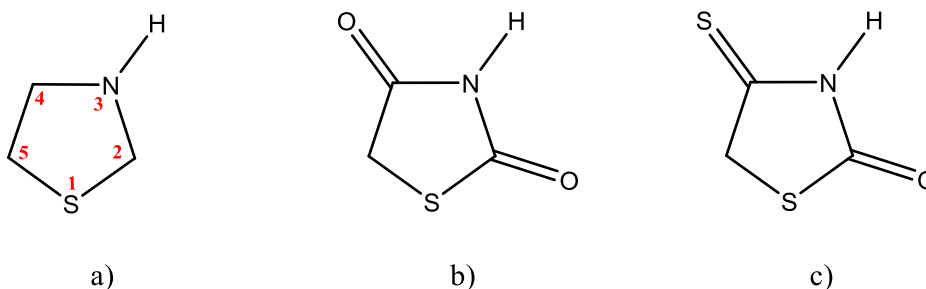
2.4.1 Obtenção e reatividade das tiazolidinas e seus derivados

As tiazolidinas são uma classe de compostos orgânicos heterocíclicos representada por um anel saturado de 5 membros (pentagonal) com um grupo tioéter na posição 1 e um grupo amina na posição 3. A tiazolidina-2,4-diona é representada por um anel pentagonal que além do enxofre e nitrogênio nas posições 1 e 3 possui duas carbonilas nas posições 2 e 4. A 4-tioxotiazolidina-2-ona difere da

tiazolidina-2,4-diona por possui enxofre na posição 4 (Figura 10) (PANDEY et al., 2011).

Esse núcleo pode sofrer substituições em várias posições do anel heterocíclico, como reação de oxidação do enxofre na posição 1, reações de Mannich e *N*-alquilação na posição 3, tionação utilizando reagente de Lawesson ou pentassulfeto de fósforo na carbonila na posição 4 e condensação com aldeídos, cetonas ou com sais de diazônio na posição 5 que contém o carbono metilênico (Figura 11) (LIESEN et al., 2008).

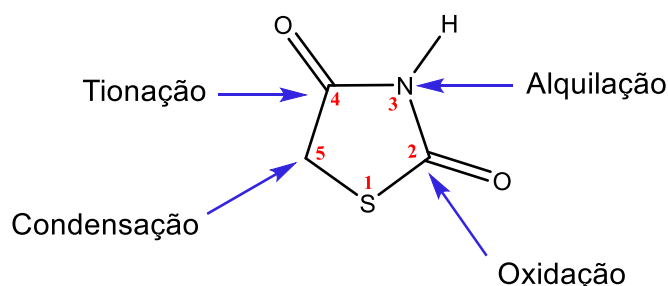
Figura 10 – Representação dos anéis: a) tiazolidina; b) tiazolidina-2,4-diona; e c) tioxotiazolidina-2-ona.



Fonte: A autora (2022).

A substituição no anel heterocíclico da tiazolidina é processada nos vários sítios reativos. Nas tiazolidina-2,4-dionas são encontrados quatro sítios reativos nas posições 1, 3, 4 e 5 (Figura 11). Suas propriedades químicas e biológicas variam de acordo com os substituintes na estrutura. Os principais sítios reativos de interesse são o nitrogênio na posição 3 e o átomo de carbono metilênico da posição 5. A substituição do oxigênio da carbonila na posição 4 por enxofre, origina uma série de moléculas com atividades biológicas muitas vezes potencializadas, as 4-tioxo-tiazolidina-2-onas (NERI et al., 2020; VERMA; SARAF, 2008).

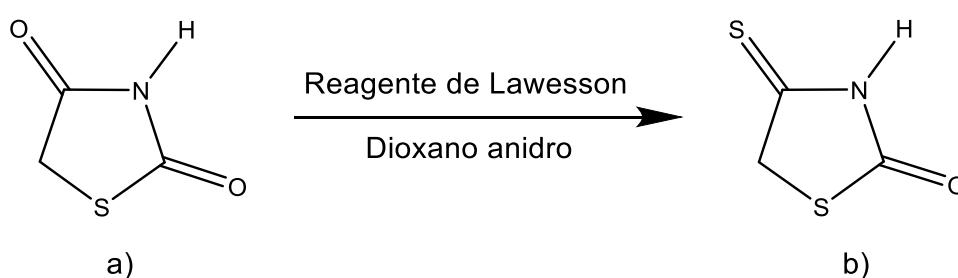
Figura 11 – Principais locais de reações no anel tiazolidina-2,4-diona.



Fonte: Adaptado de Liesen et al. (2008).

As 4-tioxo-tiazolidina-2,4-dionas foram obtidas primeiramente por Grishchuk et al. (1967) utilizando pentassulfeto de fósforo. Atualmente, a tionação da carbonila na posição 4 das tiazolidina-2,4-dionas pode ser obtida utilizando o reagente de Lawesson [1,3-ditio-2,4-difosfatano-2,4-dissulfeto-2,4-bis(4-metóxfenil)] em dioxano anidro. A seletividade da carbonila que será tionada e a velocidade da reação dependem diretamente da densidade eletrônica da carbonila que será tionada. Além de ser mais rápida, a utilização do reagente de Lawesson proporciona rendimentos de 80% (Figura 12).

Figura 12 – Reação de tionação da carbonila na posição 4 da tiazolidina-2,4-diona (a) para formação da 4-tioxotiazolidina-2-ona (b).



Fonte: A autora (2022).

2.4.2 Atividades biológicas das tiazolidinas e seus derivados

Dentre as moléculas pequenas heterocíclicas, o anel tiazolidina (Figura 10a) é reconhecido como um bom farmacóforo para potenciais fármacos ou candidatos a

fármacos. Algumas das atividades biológicas relacionadas ao anel tiazolidina são antimicrobiana, anti-inflamatória, anticonvulsivante, sedativa, antidepressiva, anti-hipertensiva e antiartrítica. Além da diversidade de atividades biológicas, a diversidade de transformações químicas simples que podem ser feitas no anel tiazolidina tem fascinado os químicos medicinais e impulsionado o estudo desta classe de compostos heterocíclicos (PRABHAKAR et al., 2006).

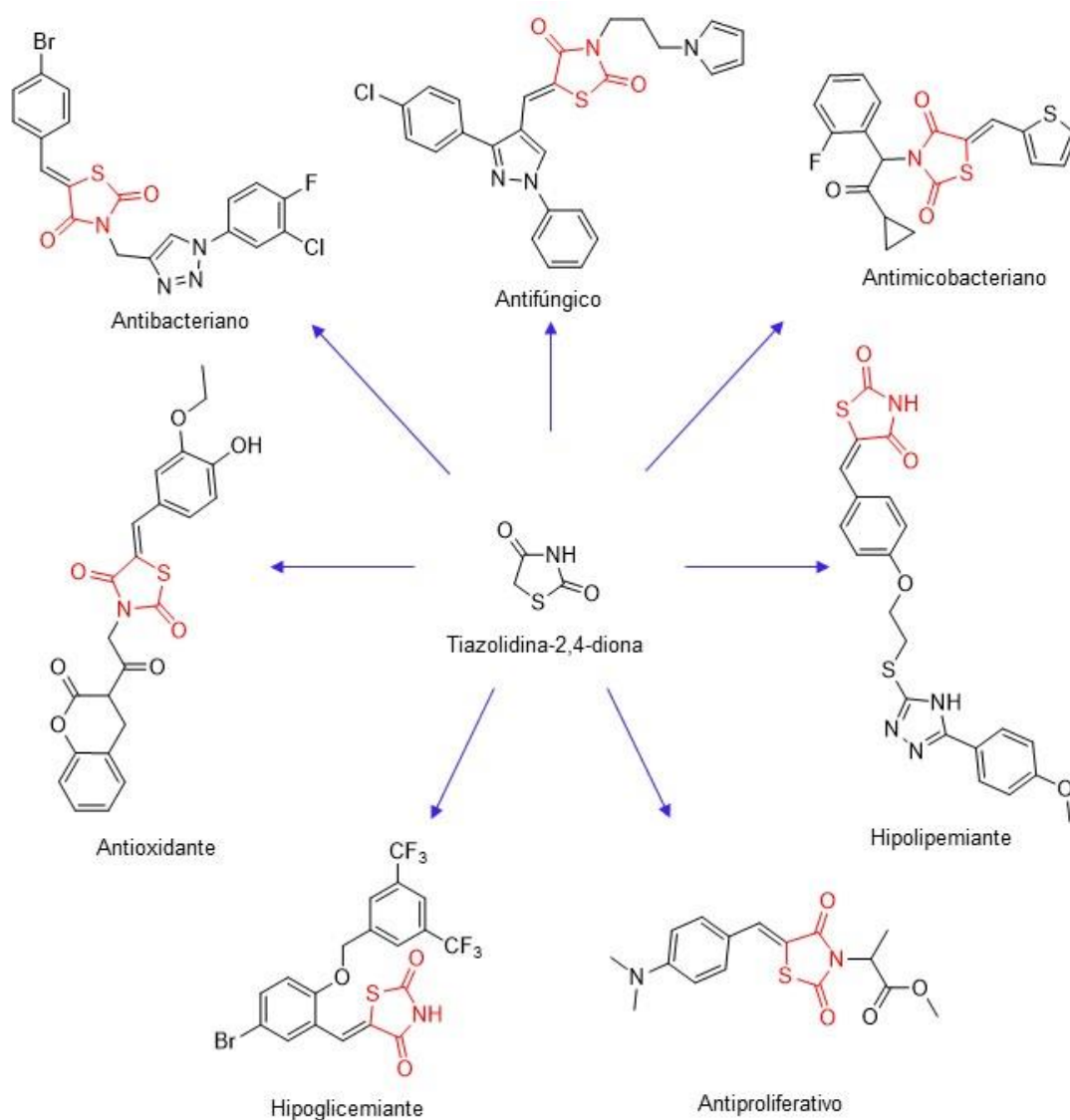
Dos derivados da tiazolidina, a tiazolidina-2,4-diona (Figura 10b) está entre as mais estudadas em virtude de suas propriedades biológicas e variedade estrutural (PRASAD et al., 2011). Esses compostos são uma classe conhecida de moléculas biologicamente ativas. Estudos recentes mostraram que são promissores agentes farmacológicos com amplo espectro de atividades conforme ilustrado na figura 13 (KUMAR et al., 2020).

2.4.2.1 Atividade antimicrobiana

Bonde & Gikwad (2004) sintetizaram duas séries de N'-[3,4-dissubstituído-1,3-tiazol-2(3H)-ilideno]-2-(pirazin-2-iloxi)-acetohidrazida e N'-[(2Z)-3-(4-bromofenil)-4-oxo-1,3-tiazolidin-2-ilideno]-2-(pirazin-2-iloxi)-acetohidrazida, as quais foram avaliadas quanto a atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhi*), Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e *Mycobacterium tuberculosis*. Alguns dos compostos sintetizados apresentaram ótima atividade para todos os microrganismos testados. Em geral, substituições com cloro e nitro no anel tiazolina substituídos foram essenciais para a atividade antimicrobiana.

Bozdağ-Dündar et al. (2007) avaliaram as atividades antifúngicas e antibacterianas de uma série de derivados de tiazolil-tiazolidina-2,4-diona frente a *Staphylococcus aureus* (isolados clínicos MRSA, MRSA ATCC e *Staphylococcus aureus* ATCC não resistente), *Escherichia coli* ATCC e *Candida albicans* ATCC. Estes autores verificaram que a maioria dos compostos inibiram os microrganismos avaliados com CMI entre 6,25 e 12,5 µg/mL, exceto para *E. Coli*, cujo valores variaram entre 6,25-50 µg/mL.

Figura 13 – Potencial biológico do núcleo tiazolidina-2,4-diona.



Fonte: Adaptado de Kumar et al. (2020).

Outro importante grupo de derivados da tiazolidina foi avaliado por Gouveia et al. (2009) que sintetizou 13 derivados 5-arilideno-4-tioxi-tiazolidina-2-onas e testou sua atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, Mycobacteria e levedura. Os derivados inibiram as bactérias Gram-positivas e levedura, mas foram inativos para Gram-negativas e Mycobacteria. A CMI dos

compostos avaliados frente a *Staphylococcus aureus* de coleção e isolados clínicos variaram de 32 a 2 µg/mL.

Derivados de tiazolidina-4-ona, pirimidina-4,6-diona e rodanina (2-tioxi-tiazolidina-4-ona) substituídos na posição 5 por grupamentos 2,3,4-trifluoro ou 3,4,5-trimetóxi-benzilideno foram sintetizados e testados quanto a sua atividade antibacteriana para *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, MRSA, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*. Neste estudo foi observado que o grupo 2,3,4-trifluorobenzilideno foi importante para a inibição de *S. aureus* e que os compostos contendo o anel rodanina foram mais ativos do que aqueles que continham outros anéis heterocíclicos. Nenhum dos compostos inibiu o crescimento de *E. coli* ou *P. aeruginosa* (Gram-negativas) (TOMASIC et al., 2010).

Prasad et al. (2011) avaliaram o potencial antimicrobiano de derivados 2-aril-tiazolidina-4-ona contra fungos filamentosos (*Sporothrix schenckii*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Aspergillus fumigatus*) e leveduras (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Candida parapsilosis*), bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*). Neste estudo foi observado que a substituição por um grupamento imidazolilmetilfenil na posição 3 do anel contribuiu para a atividade antimicrobiana para *Klebsiella pneumoniae* com CMI que variou de 12,5-50 µg/mL. Para as outras bactérias e fungos (filamentosos e leveduras) foram considerados inativos (> 50 µg/mL).

A atividade antimicrobiana de derivados da série de 5-arilideno-4-tioxi-tiazolidina-2-ona foi avaliada quanto a atividade antimicrobiana *in vitro* frente a bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *E. faecalis*, Gram-negativas *P. aeruginosa* e *E. coli*, e aos fungos *C. albicans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *C. neoformans*. As CMI dos quinze compostos avaliados variaram de 64 a 2 µg/mL para bactérias e de 64 a 4 µg/mL para fungos. Dentre os compostos mais ativos, os dicloro substituídos apresentaram CMI de 16 a 2 µg/mL para bactérias Gram-positivos e fungos (ALEGAON & ALAGAWADI, 2011).

A avaliação antimicrobiana de 24 compostos derivados de tiazolidina-2,4-diona foi determinada frente aos microrganismos Gram-positivos *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *S. aureus* e *Micrococcus luteus*; Gram-negativos *P. aeruginosa*, *K.*

pneumoniae, *E. coli* e *Proteus vulgaris*; e fungos *C. albicans*, *A. niger*, *A. oryzae* e *Penicillium chrysogenum*. O composto mais ativo (Z)-5-(4-((E)-3-(3,5-bis(benziloxi)fenil)-3-oxoprop-1-enil)benzilideno)-1,3-tiazolidina-2,4-diona teve CMI que variou de 32 a 16 µg/mL para bactérias e 16 µg/mL para os fungos testados, resultados semelhantes aos fármacos padrão, cloranfenicol e cetoconazol (AVUPATI et al., 2012).

Silva et al. (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana de derivados 5-arilideno-tiazolidina-2,4-diona frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, álcool-ácido resistentes e levedura. A atividade antimicrobiana foi mais evidente para bactérias Gram-positivas com valores de CMI que variaram de 2 a 64 µg/mL. A melhor atividade antimicrobiana foi observada nos compostos que continham cloro em sua estrutura.

Novos híbridos entre tiazolidina-2,4-diona e clorofenil-tiossemicarbazonas foram ativos frente a microrganismos Gram-positivos (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *Bacillus cereus* e *Micrococcus luteus*). A CMI e a CMB para *S. aureus* variaram entre 3,91 - 500 e 3,91 - >1000 µg/mL, respectivamente (TROTSKO et al., 2018b).

Vários derivados de tiazolidina-2,4-diona com grupamento indol na posição 5 foram sintetizados e avaliados quanto a atividade antimicrobiana *in vitro* contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, utilizando ampicilina como fármaco padrão. Os compostos testados apresentaram valores de CMI entre 320-40 µg /mL para *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, demonstrando atividade também para bactérias Gram-negativas. Contudo, os autores não determinaram a CMB dos compostos (KUMAR et al., 2018).

Novos derivados de 5-arilideno-tiazolidina-2,4-diona-N-(4-fluorofenil)acetamida foram sintetizados e avaliados quanto a atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *S. pyogenes*), Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) e levedura (*C. albicans*). Os quinze compostos avaliados apresentaram atividade que variaram de boa a moderada com CMI de 64 – 4 µg/mL para bactérias e de 32-8 µg/mL para *C. albicans* (JOSHI, MAHAJAN, CHEJARA, 2020).

Kulkarni et al. (2020) descreveram a síntese de uma nova série de 5-arilidenos-tiazolidina-2,4-dionas conjugadas a 4-tiazolidinonas 2-substituídas. Quatorze compostos com atividade antimicrobiana foram sintetizados e apresentaram promissora frente aos microrganismos Gram-positivos *S. aureus*, *B. cereus* e *M. luteus*, com CMI entre 32 e 2 µg/mL. Os compostos também foram avaliados para bactérias Gram-negativas *Pseudomonas fluorescens*, *E. coli* e *Flavobacterium devorans* com CMI que variou de 32 e 2 µg/mL. Os fármacos padrão utilizados (ampicilina, Canamicina e cloranfenicol) apresentaram valores de CMI entre 16 e 2 µg/mL. Os autores também concluíram que os grupos metóxi, flúor, cloro e bromo presentes em sistemas heterocíclicos aumentaram a atividade biológica dos novos derivados.

Kumar et al. (2020) sintetizaram e avaliaram 20 derivados 4-aril/alquil/metil-5-(4-aril/alquil/metil-arilideno)-tiazolidina-2,4-diona quanto a atividade antimicrobiana. Os derivados apresentaram CMI entre 101,2 e 17,9 µM, correspondendo entre 6,25 e 25 µg/mL, para *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. typhi*, *C. albicans*, *A. niger*. Cálculos de docking molecular indicaram a DNA girase como possível alvo de ação.

A atividade antibacteriana e antifúngica de novos derivados de tiazolidina-2,4-diona contendo grupos carboxamida e aminoácidos foram sintetizadas e avaliadas frente a bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B. subtilis*), Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) e levedura (*C. albicans*) pela técnica de difusão em poço, utilizando como fármacos padrão imipenem (10 µg/disco) e sulfametoxazol/trimetoprim (23.75/1.25 µg/disco) para bactérias e fluconazol (25 µg/disco) para levedura. A maioria dos derivados não apresentou atividade satisfatória, com exceção do 2-(5-(3-metóxi-benzilideno)-2,4-dioxotiazolidin-3-il)ácido acético, o qual formou halo de inibição de 20 mm para *S. aureus* de 20 mm (ALHAMEED et al., 2020).

2.4.2.2 Atividade citotóxica e antiproliferativa

A citotoxicidade *in vitro* de compostos derivados de 4-tioxo-tiazolidina-2-ona foi avaliada contra quatro linhagens de células tumorais (HeLa - carcinoma cervical, HT29 - câncer colorretal, A549 – carcinoma de pulmão e MCF-7-adenocarcinoma

de mama) utilizando o ensaio do MTT. Quatro compostos apresentaram atividade citotóxica significativas, sendo o composto (Z)-5-(3,4,5-trimetóxi-benzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona o mais ativo, com Cl_{50} variando entre 20 e 23 μM (ALEGAON; ALAGAWADI, 2011).

Em busca de novos derivados tiazolidina-2,4-diona com atividade biológica foram sintetizadas duas séries de 5-benzilideno-tiazolidina-2,4-dionas contendo o grupo benzenossulfonamida. Onze compostos foram avaliados frente as linhagens celulares SW620 (câncer de cólon), PC-3 (câncer de próstata) e NCI-H460 (câncer de pulmão). Ácido suberoilânilida (SAHA) e Adriamicina (ADR) foram usados como controles positivos. No geral, os novos derivados foram mais efetivos frente às linhagens celulares de câncer de pulmão. Os autores também verificaram que a citotoxicidade aumentava em comparação ao controle positivo SAHA nas 5-benzilideno-tiazolidina-2,4-dionas com um substituinte cloro no grupo benzenossulfonamida (THUAN et al., 2015).

No estudo realizado por Rodrigues et al. (2018), quatro derivados de 5-benzilideno-tiazolidina-2,4-dionas foram sintetizados e avaliados quanto a sua atividade citotóxica *in vitro* usando o ensaio MTT frente as células HL60 e K562 (leucemia), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), HT29 (adenocarcinoma de cólon), HEP-2 (carcinoma de colo de útero) e NCI-H292 (carcinoma de pulmão). O melhor resultado foi para o derivado 5-(2-bromo-5-metóxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona com Cl_{50} de 1,2 $\mu g/mL$ para câncer de pulmão (NCI-H292). A atividade genotóxica também foi avaliada *in vitro* em PBMC e na linhagem de células NCI-H292 para o composto mais ativo. Não houve detecção de nenhum dano ao DNA no ensaio PBMC nas concentrações testadas (2,52 $\mu g/mL$ e 5,0 $\mu g/mL$). No entanto, para linhagem de câncer de pulmão ocorreu um aumento no índice de dano do DNA nas concentrações (1,26 $\mu g/mL$ e 2,52 $\mu g/mL$).

Atividade antiproliferativa de novas tiazolidinas-2,4-diona foi realizada usando fibroblastos normais da pele humana e células tumorais das linhagens A549, HepG2 (carcinoma hepatocelular) e MCF-7. Entre os derivados testados, o acetato de 2-[[2-(3-clorobenzoil)hidrazinilideno]metil]fenil-2,4-dioxo-5-tiazolidinilideno apresentou alto índice antiproliferativo contra todas as células avaliadas e atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* (CMI 62,5 $\mu g/mL$). Os autores ressaltam que a

atividade antimicrobiana e antiproliferativa junta é muito importante para os pacientes com câncer que geralmente tem imunidade baixa e adquirem infecções comumente (TROTSKO et al., 2018c).

Uma série de derivados de 2-tioxo-4-tiazolidinona (rodanina) e tiazolidina-2,4-diona foram sintetizados. Os derivados, N-(fenil)-2-{4-[(4-oxo-2-tioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno)metil]fenoxi}acetamida e 2-{4-[(2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno)-metil]fenoxi}-N-(fenil)-acetamida, foram avaliados quanto às suas propriedades anticancerígenas frente linhagens celulares CEM (células de leucemia de células T). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de exclusão de corante azul de Tripan e o efeito citotóxico pelo ensaio MTT. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento das células CEM com os derivados tiazolidínicos afetou a viabilidade das células de uma maneira concentração-dependente (250 μ M após 24 h e 75-100 μ M após 72 h). No ensaio MTT, foi observada diminuição na proliferação celular na concentração de 100-250 μ M, mesmo após 72 h de incubação (SOMASEKHAR; UDAINIYA; KUMAR, 2018).

O potencial anticâncer de novos derivados tiazolidina-2,4-diona foram avaliados contra linhagens de células de câncer de mama (MCF-7), usando o método da sulforrodamina B (SRB). Dos vinte e quatro compostos avaliados, o 2-(5-(4-((2,4-dioxotiazolidin-5-ilideno)metil)fenil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)benzonitrila, contendo o grupo 2-cianofenil foi o que apresentou melhor atividade citotóxica, comparada com a da adriamicina, utilizada como fármaco padrão. A CI_{50} foi de 0,004 μ M e 0,00018 μ M para o derivado e o fármaco padrão, respectivamente (ASATI; BHARTI, 2018).

Derivados de 5-benzilideno-tiazolidina-2,4-diona foram avaliados frente a linhagens celulares HepG2, HCT-116 e MCF-7 pelo método do MTT. Sorafenibe e doxorubicina foram utilizadas como fármacos citotóxicos de referência. Dezesete compostos foram atestados um deles, composto benzoato de etil-4-(4-(2-(5-benzilideno-2,4-dioxotiazolidin-3-il)acetamida)benzamida) foi considerado o composto mais potente contra as linhagens celulares HepG2, HCT116 e MCF-7 com CI_{50} de $11,19 \pm 0,8$, $8,99 \pm 0,7$ e $7,10 \pm 0,4$ μ M, respectivamente (EL-ADL et al., 2020).

Uma nova série de tiazolidina-2,4-dionas (Z)-3,5-dissubstituída foi projetada, sintetizada e avaliada quanto a sua atividade anticâncer de mama. Três desses novos compostos foram ativos na avaliação preliminar contra a linhagem celular MCF-7 pelo método do MTT. Os compostos (Z)-3-(morfolin-4-ilmetil)-5-(3,4,5-trimetoxibenzilideno)tiazolidina-2,4-diona e (Z)-5-(3,4,5-trimetoxibenzilideno)-tiazolidina-2,4-dion-3-il)acetonitrila e acetato de etil (Z)-5-(3,4,5-trimetoxibenzilideno)-tiazolidina-2,4-dion-3-il) inibiram a proliferação de das células de maneira concentração dependente com CI_{50} de 1,27, 1,50 e 1,31 μ M, respectivamente (EL-KASHEF et al., 2020).

Um dos alvos emergentes expressos por vários tipos de células cancerosa são os transportadores de glicose (GLUTs). No estudo realizado por Tilekar et al. (2020), os autores projetaram e sintetizaram novos derivados de tiazolidina-2,4-diona e avaliaram quanto ao seu potencial inibitório de GLUT1, GLUT4 e GLUT5, bem como a determinação da citotoxicidade em linhagens celulares de leucemias. Para a determinação da citotoxicidade, foram utilizadas as linhagens CEM e K562. Dezesete compostos foram avaliados, o derivado 2-[5-(4-clorobenzilideno)-2,4-dioxotiazolidin-3-il]-N-(4-cloro-2-trifluorometilfenil)acetamida inibiu todos os três tipos de GLUT. Também inibiu a proliferação de células CEM na faixa de baixo micromolar (CI_{50} de 13,4 μ M) e induziu a apoptose, revelado pelo estudo de citometria de fluxo.

2.4.2.3 Atividade hipoglicemiante

Estudo realizado por Elhenawy et al. (2015) avaliaram a atividade hipoglicemiante de derivados da tiazolidine-2,4-diona. Ratos Wistar, de ambos os sexos, pesando 150-250 g foram utilizados. O diabetes foi induzido por uma única injeção subcutânea de aloxana (100 mg/kg). O composto avaliado reduziu o nível de glicose sanguínea em 56,65 e 57,47% nos dias 2 e 4, respectivamente em comparação com o fármaco padrão metformina, que diminuiu os valores de glicemia em 66,08 e 71,47%, nos dias 2 e 4, respectivamente.

A atividade hipoglicemiante *in vivo* de derivados tiazolidínicos revelou dois compostos com boa atividade hipoglicemiante em estudos agudos e crônicos

utilizando ratos Wistar, os derivados 3-[(4-clorofenil)aminometil]-5-[(indol-3-il)metileno]-tiazolidina-2,4-diona e 3-[(2,4-dinitrofenil)aminometil]-5-[(indol-3-il)metileno]-tiazolidina-2,4-diona. Os autores enfatizaram que o primeiro derivado mostrou maior afinidade de ligação pelos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma tipo gama (PPAR γ) (KUMAR et al., 2018).

Segundo Tavares, Hirata e Hirata (2007), os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) são fatores de transcrição pertencentes à família de receptores nucleares que regulam a homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e inflamação. A ativação do PPAR γ pode diminuir a progressão da aterosclerose e aumentar a sensibilidade à insulina. Desta forma esses receptores podem ser um potencial alvo terapêutico para o tratamento de diversas enfermidades, incluindo o diabetes melito do tipo 2 e dislipidemia.

A atividade inibitória de amilase e antioxidante de derivados 5-(benzaldeído substituídos) da tiazolidina-2,4-diona foram avaliadas. Nesta série, apenas dois compostos apresentaram atividade inibitória de amilase com CI_{50} de 27,63 e 22,35 $\mu\text{g/mL}$, comparando com o fármaco padrão acarbose (21,54 $\mu\text{g/mL}$). A atividade antioxidante variou de fraca a ótima sendo dois derivados com atividade considerada ótima (CI_{50} de 29,04 e 27,66 $\mu\text{g/mL}$), comparando com o ácido ascórbico (CI_{50} de 21,64 $\mu\text{g/mL}$) (SUCHETA et al., 2018).

A ação antidiabética de derivados de 5-(2-metoxi-6-pentadecilbenzilideno)-3-alquil/aril tiazolidina-2,4-diona foi avaliada *in vivo* em camundongos Swiss. Três dos compostos avaliados apresentaram ação antidiabética com significativa diminuição dos níveis de glicose de jejum quando comparado ao fármaco padrão, insulina, em modelo de diabetes induzido por aloxana (REDDY & REDDY, 2018).

A α -glicosidase (decompõe amido e dissacarídeos em glicose) é uma enzima considerada um alvo terapêutico para o tratamento da diabetes tipo 2. Neste estudo foram sintetizados derivados de pirrolidina-2,5-diona (succinimida) e tiazolidina-2,4-diona e avaliado sua capacidade de inibir α -glucosidase. Os derivados da pirrolidina-2,5-diona, no experimento *in vitro*, apresentaram atividades antiglicemiante de moderada a forte, a acarbose serviu como fármaco controle. No estudo *in vivo* foram avaliados três compostos usando o modelo de camundongos induzidos por aloxana. Dois compostos evidenciaram efeitos hipoglicemiante (HUSSAIN et al., 2019).

Lobeglitazona é um novo derivado tiazolidínico descrito como medicamento antidiabético que atua na via PPAR- γ , potencial alvo terapêutico para diabetes melito tipo 2. Os autores avaliaram se a lobeglitazona também teria efeito na proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B), um outro potencial alvo terapêutico. Foi constatado que a lobeglitazona é um inibidor da PTP1B *in vitro* e apresentou uma inibição reversível do tipo não competitiva. Como ocorreu a inibição *in vitro*, os autores sugerem que também pode ocorrer esta sinalização *in vivo* e assim uma potencialização dos efeitos antidiabéticos do fármaco (ROCHA et al., 2020).

2.4.2.4 Outras atividades biológicas importantes

A atividade analgésica, anti-inflamatória e antiúlcera foi avaliada em quatro derivados tiazolidina-4-ona 2,3-substituída. Todos os quatro compostos apresentaram a inibição no edema de pata induzido por carragenina em uma dose de 100 mg/kg de peso corporal quando comparado com o fármaco padrão nimesulida. Todos os compostos também apresentaram significativa atividade analgésica pelos métodos utilizados (contorção induzido por ácido acético e imersão caudal em ratos). Os compostos testados exibiram níveis variáveis de atividade antiulcerativa, sendo os compostos TH1 e TH3 os que demonstraram melhores efeitos gastroprotetores (TARANALLI et al., 2009).

Novas pirazolil-2,4-tiazolodionas foram testadas quanto as suas propriedades anti-inflamatórias *in vitro* e *in vivo*. Quatro derivados da série mostraram efeitos protetores *in vitro* e foram selecionados para os testes *in vivo*. Nos experimentos em animais, os compostos evidenciaram ótima atividade anti-inflamatória semelhante ao fármaco padrão celecoxibe. No modelo *in vivo*, foram usados os testes de indução do edema de pata por formalina e de granuloma induzido por terebintina (YOUSSEF et al., 2010).

Novos derivados 3-cumarinil-5-arilideno-1,3-tiazolidina-2,4-dionas foram avaliados quanto à atividade antioxidante utilizando o método de sequestro do radical livre DPPH. Trinta e três compostos foram avaliados. Destes, cinco apresentaram bons resultados. Os autores enfatizaram que os substituintes no anel fenil tem grande influência na atividade antioxidante (CACIC; MOLNAR, 2011).

Shaikh et al. (2015) estudaram a atividade antiviral de 16 derivados da tiazolidina-2,4-diona contra o vírus da imunodeficiência tipo 1 (HIV-1), utilizando células MT-4. Como fármaco padrão foi utilizado efavirenz. Os ensaios para avaliação da indução do HIV-1 e a citotoxicidade pelo método MTT foram realizados. Nenhum dos compostos apresentou atividade frente o HIV-1, entretanto um dos compostos mostrou-se citotóxico para o crescimento exponencial das células MT-4.

Rekha e Chandrashekhara (2017) em seus estudos relataram a síntese de treze novos derivados 5-(benzilideno substituído) tiazolidina-4-ona e avaliaram a atividade antioxidante pelos métodos do DPPH e de redução do íon férrico. Todos os compostos avaliados apresentaram atividade antioxidante.

Avaliando a série de derivados 3-substituídos-5-[(indol-3-il)metileno]-tiazolidina-2,4-diona quanto a atividade antioxidante *in vitro* utilizando os ensaios de DPPH e peróxido de hidrogênio, foi verificado que dois compostos (3-[(4-clorofenil)aminometil]-5-[(indol-3-il)metileno]-tiazolidina-2,4-diona e 3-[(4-fluorofenil)aminometil]-5-[(indol-3-il)metileno]-tiazolidina-2,4-diona apresentaram atividade antioxidante significativa (KUMAR et al., 2018).

Doze novos derivados fenólicos de tiazolidina-2,4-diona foram sintetizados e caracterizados físico-quimicamente e avaliados quanto a capacidade antioxidante dos compostos sintetizados. Os ensaios do ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS), sequestros dos radicais livres DPPH, potencial redutor do íon férrico (FRAP), capacidade antioxidante total (TAC), ensaio de potência redutora (RP) e ensaio de quelação Fe^{2+} foram realizados. Dois compostos atuaram como potentes doadores de elétrons com atividade semelhante ao antioxidante de referência utilizado (MARC et al., 2019a).

As atividades anti-inflamatória, antioxidante e antidiabética de treze novos derivados 3,5-derivados dissustituídos de 2,4-tiazolodinedionas foram avaliadas *in vivo* (anti-inflamatória e antidiabética) e *in vitro* (antioxidante). Todos os compostos avaliados exibiram boa a moderada atividade anti-inflamatória comparável ao medicamento de referência diclofenaco de sódio. Os autores evidenciaram que a presença de grupo na posição 4 do arilideno é necessária para uma boa atividade anti-inflamatória. Na atividade antidiabética, os compostos contendo halogênio, em especial aqueles contendo cloro, evidenciaram uma ótima atividade em relação aos

demais. Quanto a atividade antioxidante, um dos compostos apresentou concentração efetiva equivalente ao ácido ascórbico de 42,68 µg/mL (SRIVASTAVA; BHATIA; CHAWLA, 2019).

Neri et al. (2020) avaliaram a atividade antileishmania de 16 derivados da tiazolidia-2,4-diona utilizando cepas de referência de *Leishmania* (V.) *braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *Leishmania* (L.) *infantum* (MHOM/BR/74/PP75). Dois dos compostos avaliados apresentaram atividade antileishmania superior ao seu efeito citotóxico, e um deles mostrou o melhor índice de seletividade e a melhor resposta frente a *L. infantum*.

A atividade antiviral de 40 novos derivados tiazolidinas (TZDs) foi avaliada tanto *in vitro*, quanto *in silico* como possíveis agentes terapêuticos candidatos para o tratamento da infecção causada pelo vírus Zika (ZIKV). O mecanismo de ação de 4 novos derivados tiazolidínicos com ação contra o ZIKV também foram elucidados. Dois deles (derivados FT32 e FT39) foram capazes de se ligar à proteína NS5 e reduzir a expressão do RNA viral, quando as células foram tratadas com os derivados após a infecção. Foi observado que os derivados GQ402 e ZKC4 se ligaram a proteína do envelope e assim reduziram a ação do vírus quando as células foram tratadas previamente com os derivados tiazolidínicos. Também foi observado pelos autores que a adição dos radicais cloro, bromo e iodo na estrutura dos derivados garantiram melhor atividade frente diferentemente daqueles que não possuíam esses radicais (GONÇALVES, 2020).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana de duas séries análogas de 5-benzilideno-tiazolidina-2,4-diona e 5-benzilideno-4-tioxotiazolidina-2-ona frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a múltiplos fármacos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

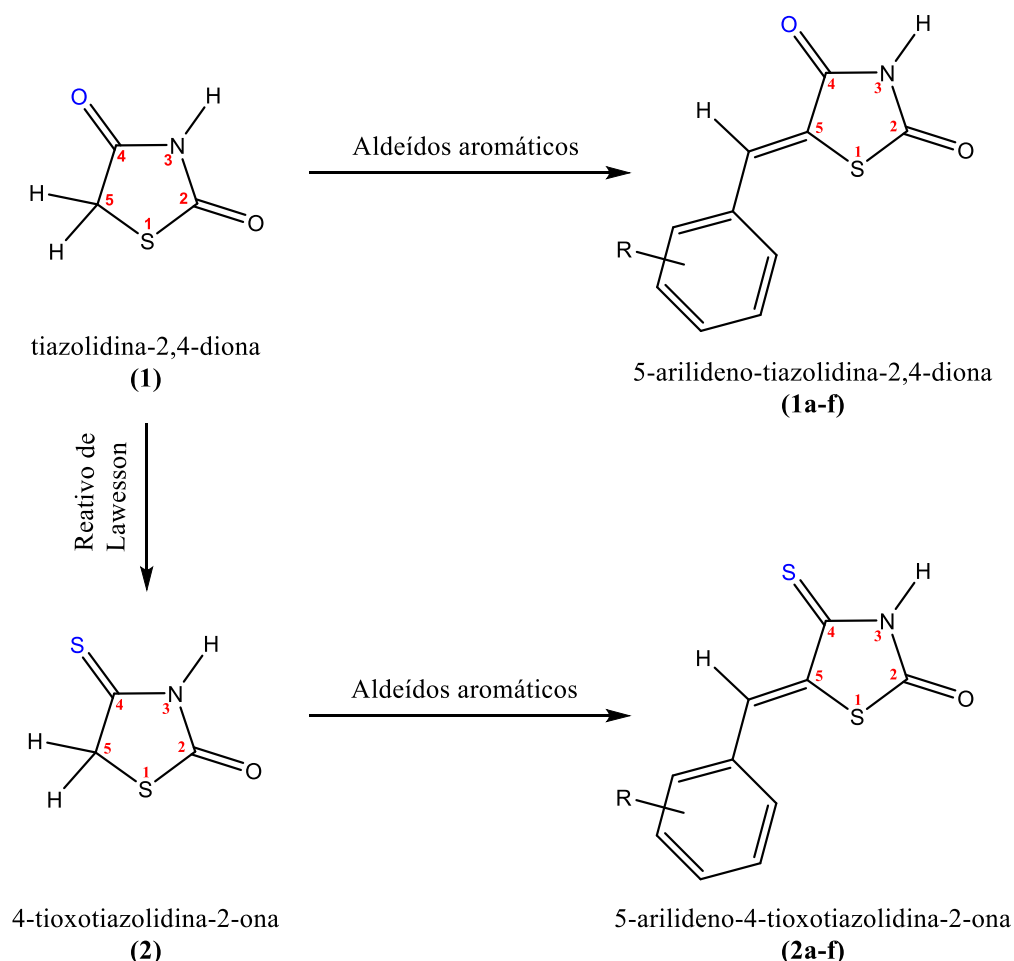
- Determinar o seu perfil de resistência fenotípica aos antimicrobianos e selecionar isolados clínicos de *S. aureus* de diferentes sítios de infecção da Coleção de Cultura do Departamento de Antibióticos (UFPEDA) para o estudo;
- Caracterizar o perfil de resistência genotípica dos isolados clínicos selecionados;
- Classificar os isolados clínicos de *S. aureus* quanto ao potencial de formação de biofilme;
- Determinar a atividade antimicrobiana dos derivados tiazolidínicos e a cinética de morte dos isolados clínicos de *S. aureus* expostos aos derivados mais ativos;
- Investigar a atividade antibiofilme dos derivados tiazolidínicos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vivo* dos derivados utilizando *Caenorhabditis elegans* como hospedeiro;
- Avaliar as alterações morfológicas induzidas pela exposição aos derivados tiazolidínicos por microscopia eletrônica de varredura;
- Determinar a citotoxicidade dos derivados tiazolidínicos para células mononucleadas de sangue periférico humano e fibroblastos.

4. MATERIAIS E METODOS

4.1 DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS

Os derivados tiazolidínicos foram sintetizados no Departamento de Antibióticos/UFPE pela Profa. Dra. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque e gentilmente cedidos para realização deste projeto de pesquisa. Séries análogas tiazolidina-2,4-diona e 4-tioxotiazolidina-2-ona foram utilizadas, ambas substituídas na posição 5 do anel tiazolidínico pelo mesmo grupamento, formando pares que diferem entre si apenas na posição 4 do anel tiazolidínico (Figura 14, Tabela 1).

Figura 14 – Esquema de síntese das tiazolidina-2,4-diona (**1a-f**) e das 4-tioxotiazolidina-2-ona (**2a-f**).



Fonte: A autora (2022).

Tabela 1 – Nomenclatura dos derivados tiazolidina-2,4-diona e 4-tioxotiazolidina-2-ona.

(continua)

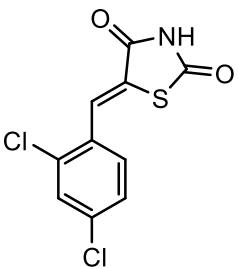
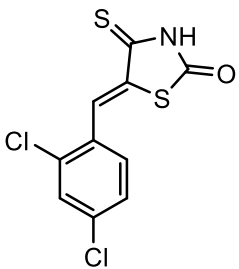
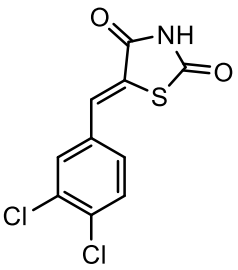
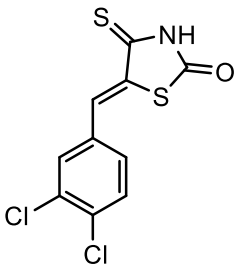
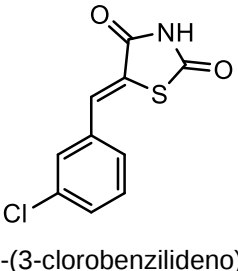
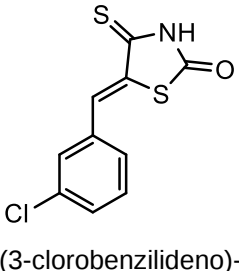
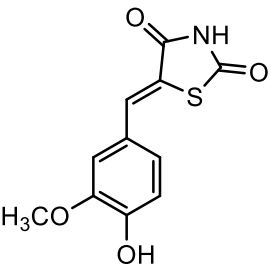
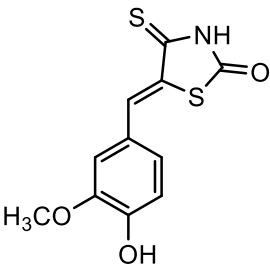
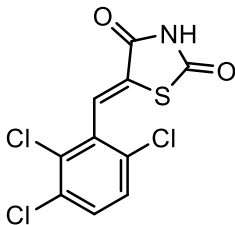
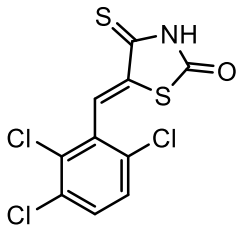
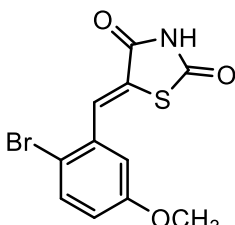
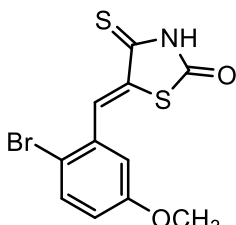
Séries análogas					
Tiazolidina-2,4-diona			4-tioxotiazolidina-2-ona		
Nº	Nomenclatura	Código	Nº	Nomenclatura	Código
1a		JU-296	2a		HRJ-1
5-(2,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona			5-(2,4-diclorobenzilideno)-4-tioxotiazolidina-2-ona		
1b		JU-298	2b		HRJ-2
5-(3,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona			5-(3,4-diclorobenzilideno)-4-tioxotiazolidina-2-ona		
1c		JU-395	2c		HRJ-11
5-(3-clorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona			5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona		
1d		JU-414	2d		HRJ-26
5-(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona			5-(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona		

Tabela 1 – Nomenclatura dos derivados tiazolidina-2,4-diona e 4-tioxotiazolidina-2-ona.

(conclusão)

Séries análogos					
Tiazolidina-2,4-diona			4-tioxotiazolidina-2-ona		
Nº	Nomenclatura	Código	Nº	Nomenclatura	Código
1e		JU-2222	2e		HRJ-1503
	5-(2,3,6-triclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona			5-(2,3,6-triclorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona	
1f		JU-625	2f		HRJ-53
	5-(2-bromo-5-metóxibenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona			5-(2-bromo-5-metóxibenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona	

Fonte: A autora (2022).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus aureus*

Os isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* que foram avaliados estão depositados na Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da UFPE e preservados liofilizados. Vinte isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* de diferentes sítios de infecção, 10 de origem hospitalar e 10 ambulatoriais, foram selecionados para este trabalho (Tabela 2). Após subcultivo dos isolados, a resistência fenotípica foi avaliada por antibiograma utilizando discos comerciais para os seguintes fármacos: oxacilina (1 µg), cefoxitina (30 µg), penicilina G (10 UI), eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), ciprofloxacino (5 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), cloranfenicol (30 µg) e

rifampicina (30 µg), incluindo o teste D para detectar a resistente induzida à clindamicina (CLSI, 2018).

Tabela 2 – Número do registro, sítio de infecção e origem dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* obtidos da Coleção de Cultura do Departamento de Antibióticos da UFPE.

Nº de registro na Coleção de Cultura	Sítio de infecção	Origem
UFPEDA 1039	Secreção Orotraqueal	Ambulatorial
UFPEDA 1040	Lesão Perna	Ambulatorial
UFPEDA 1041	Lesão Virilha	Ambulatorial
UFPEDA 1042	Lombar (Escara)	Hospitalar
UFPEDA 1043	Fibrina Peritoneal	Hospitalar
UFPEDA 1044	Conjuntiva	Ambulatorial
UFPEDA 1045	Ponta de Cateter	Hospitalar
UFPEDA 1045	Secreção Traqueal	Hospitalar
UFPEDA 1047	Pericárdio	Hospitalar
UFPEDA 1048	Secreção de Ferida	Hospitalar
UFPEDA 1049	Fragmento de tendão	Hospitalar
UFPEDA 1050	Secreção orotraqueal	Ambulatorial
UFPEDA 1051	Aspirado traqueal	Ambulatorial
UFPEDA 1052	Secreção orotraqueal	Ambulatorial
UFPEDA 1053	Aspirado Traqueal	Ambulatorial
UFPEDA 1054	Conjuntiva	Ambulatorial
UFPEDA 1055	Secreção de Furúnculo	Ambulatorial
UFPEDA 1056	Abscesso	Hospitalar
UFPEDA 1057	Sangue	Hospitalar
UFPEDA 1058	Líquido torácico	Hospitalar

Fonte: A autora (2022).

4.2.1 Avaliação da formação de biofilme dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*

A formação do biofilme foi avaliada pela técnica descrita por Stepanovic et al. (2000). Os isolados clínicos foram cultivados em caldo BHI por 24 h a 37 °C. Posteriormente, 200 µL de cada suspensão bacteriana ($1,5 \times 10^5$ UFC/mL) foram

aplicadas em placas de 96 poços de fundo plano. O experimento foi realizado em triplicata utilizando também um controle negativo (apenas meio de cultura). As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C e o conteúdo do poço removido após o período de incubação. Em seguida, cada poço foi lavado com 250 µL de solução salina 0,9% por três vezes. Posteriormente, foi realizada fixação com 200 µL de metanol absoluto por 15 min. O metanol foi removido e as placas secaram em temperatura ambiente. As placas foram coradas com 200 µL de cristal violeta durante 5 min. Novamente, cada poço foi lavado por três vezes com solução salina 0,9% e mantida a temperatura ambiente para secagem. O cristal violeta foi solubilizado com 200 µL de metanol e a leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA, comprimento de onda 570 nm. As amostras foram classificadas de acordo com critérios estabelecidos por Stepanovic et al. (2000). O valor da densidade ótica (DO_i) de cada isolado foi obtido pela média dos três poços, sendo este valor comparado com a densidade ótica do controle negativo (DO_c). Os isolados foram classificados em quatro categorias: não aderente (DO_i ≤ DO_c); fracamente aderente (+) (DO_c < DO_i ≤ 2 x DO_c); moderadamente aderente (++) (2X DO_c < DO_i ≤ 4 x DO_c) ou fortemente aderente (+++): 4x DO_c < DO_i.

4.2.2 Caracterização dos genes de resistência dos isolados de *Staphylococcus aureus*

4.2.2.1 Extração de DNA de *Staphylococcus aureus*

Cada espécime foi inoculado em ágar sague por 18-24 horas a 35 °C. Após o período de incubação, uma alçada foi transferida para o tubo de ensaio contendo 10 mL de meio BHI e incubado por mais 18 h a 35 °C, 150 rpm. Após o período de incubação, 1,5 mL de cada amostra foi centrifugada a 8.200 x g por 5 minutos e esse processo repetido duas vezes para obtenção da massa celular.

A massa celular obtida de cada amostra foi ressuspensa em 300 µL TEG (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, Glicose 50 mM), adicionados 26 µL de lisozima (4 mg/mL) e incubadas em banho-maria a 37 °C por 20 min. Após a incubação, foi adicionado 150 µL SDS 10% e 5 µL proteinase K (150 µg/mL). O conjunto foi

incubado por 15 min a 65 °C, centrifugado a 8.200 x g por 5 min e o sobrenadante transferido para outro tubo. Ao sobrenadante foram adicionados 400 µL de clorofórmio P.A., homogeneizado, em seguida centrifugado a 8.200 x g por 5 min e transferido o sobrenadante para outro tubo. O processo foi repetido adicionando 400 µL de solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), seguido de centrifugação a 8.200 x g por 5 min e transferência do sobrenadante para outro tubo. Posteriormente, foram adicionados 300 µL de acetato de sódio 3 M, pH 5,2, misturado lentamente, e adicionado 0,6 V de isopropanol P.A. A amostra foi centrifugada a 11.700 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e a massa celular lavada com 400 µL de etanol (70%) e centrifugado por 3 min a 11.700 x g. O sobrenadante foi descartado e após secagem da massa celular foram adicionados 50 – 100 µL de solução tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM). A integridade do DNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8% utilizando 1 µL de tampão de amostra e 3 µL das amostras de DNA. Após a extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

4.2.2.2 Condições da PCR para amplificação dos genes *mecA*, *vanA*, *norA* e *ermA*

A presença dos genes de resistência à oxacilina (*mecA*), glicopeptídeos (*vanA*), fluoroquinolona (*norA*) e eritromicina (*ermA*) foi avaliada por PCR segundo metodologia descrita por Ma et al. (2018).

A amplificação das 20 amostras de *Staphylococcus aureus* foi realizada por meio da técnica de PCR, utilizando oligonucleotídeos dirigidos para cada gene (Tabela 3). Também foram utilizados controles positivos (amostras de *S. aureus* e *Enterococcus faecalis* contendo os genes estudados) e negativo (uma cepa sem os genes estudados – UFPEDA 02). Para a padronização das reações, foi preparado uma mistura com quantidades suficientes para todas as amostras e este dividido em alíquotas para cada reação (Tabela 4). A reação foi realizada em termociclador programado para ciclos de: desnaturação inicial de 2 min a 95 °C, 35x (1 min 95 °C, 1 min 50 °C, 2 min 72 °C) e extensão final de 5 min 72 °C para o gene *mecA*; desnaturação inicial de 2 min a 95 °C, 36x (1 min 95 °C, 1 min 51 °C, 2 min 74 °C) e extensão final de 5 min 74 °C para o gene *vanA*; desnaturação inicial de 2 min a 95

°C, 35x (1 min 95 °C, 1 min 51 °C, 2 min 74 °C) e extensão final de 5 min 74 °C para o gene *norA*; desnaturação inicial de 2 min a 95 °C, 35x (1 min 95 °C, 1 min 52 °C, 2 min 74 °C) e extensão final de 5 min 74 °C para o gene *ermA*. Após a amplificação, 5 µL da reação de PCR foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose (1,2% p/v) a 3 volts/cm em tampão TBE 0,5 x e corado com *Sybr Safe* (1X) (Invitrogen, EUA) para visualização de um fragmento específico de cada gene (Tabela 3).

Tabela 3 – Iniciadores específicos utilizados para amplificação e detecção dos genes *mecA*, *vanA*, *norA*, *ermA* e os produtos amplificados.

Gene	Sequência dos <i>primers</i> 5' - 3'	Produto amplificado	Referência
<i>mecA</i>	TGCTATCCACCCTCAAAC	1000 pb	Silva; Silva (2005)
	CCTGAGATTTTGGCATTG		
<i>vanA</i>	CATGACGTATCGGTAAAATC	885 pb	El-Tawab et al. (2019)
	ACCGGGCAGRGTATTGAC		
<i>norA</i>	TATCGGTTTAGTATTACCAGTC	406 pb	Tang et al. (2015)
	AACTTCTGCCATAAATCCAC		
<i>ermA</i>	GTTCAAGAACAATCAATACAGAG	421 pb	Lina et al. (1999)
	GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC		

Fonte: A autora (2022).

Para detecção dos genes em estudo foi preparado uma mistura com um volume final de 25 µL para cada tubo, incluindo: 1,0 µL de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) 200 µM, 2,5 µL de tampão (1X), 1,5 µL de MgCl₂ 3 mM, 0,5 Taq DNA-polimerase 1 U/µL, 1 µL de DNA 50 ng/µL, 0,5 µL de cada *primer* (2,5 pmol) e água ultrapura q.s.p. 12,5 µL (Tabela 4).

Tabela 4 – Componentes das reações de amplificação dos genes.

Componentes	Concentração*
Tampão de reação	1x
MgCl ₂	3 mM
dNTPs	200 µM
DNA molde	50 ng/µl
Oligo (F)	2,5 pmol
Oligo (R)	2,5 pmol
Taq DNA-polimerase	1 U/µl

Fonte: A autora (2022).

4.3 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES MÍNIMA INIBITÓRIAS E BACTERICIDAS DOS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS

A atividade antimicrobiana dos compostos tiazolidínicos foi determinada por microdiluição, baseado no documento M100 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018). As suspensões microbianas foram padronizadas em espectrofotômetro (DO_{625 nm} 0,08 – 0,13), equivalente aproximadamente a 10⁸ UFC/mL para bactérias. Os compostos tiazolidínicos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO 1%) a uma concentração de 128 – 0,125 µg/mL. As suspensões dos isolados clínicos foram adicionadas ao caldo Müller-Hinton na concentração final de 5 x 10⁵ UFC/mL. Como controle foi utilizado o antimicrobiano oxacilina (128 – 0,125 µg/mL), ciprofloxacino (128 – 0,125 µg/mL) e eritromicina (128 – 0,125 µg/mL). As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após este período 20 µL, do revelador resazurina 0,01% foram adicionados em cada poço e as placas foram reincubadas por 2 h. A menor concentração na qual não ocorreu conversão da resazurina foi considerada a CMI. A concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada a partir das microplacas utilizadas para a determinação da CMI. De cada poço onde não ocorreu crescimento microbiano visível, ou seja, não ocorreu mudança de cor de azul para róseo, foram retirados 10 µL para semeio em placas de ágar Müller-Hinton. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A CMB foi definida como a menor concentração do composto que impediu totalmente o

crescimento microbiano nas placas (SILVEIRA, 2012). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados, expressos em $\mu\text{g/mL}$.

4.4 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE MORTE DE *Staphylococcus aureus* EXPOSTOS AOS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS

A curva de morte das bactérias foi acompanhada por 24 h em microplacas de 96 poços segundo protocolo adaptado de Ferreira et al. (2018). As bactérias foram expostas a diferentes concentrações dos derivados tiazolidínicos (0,5 x CMI, CMI, 2 x CMI) e na ausência do composto (controle negativo). Para cada 80 μL de inóculo (10^6 UFC/mL) foram adicionados 80 μL da substância nas concentrações citadas e 40 μL de caldo Müller-Hinton. O tempo de morte foi determinado pela redução da viabilidade celular nos intervalos 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 h e comparado com a leitura inicial. As leituras das absorbâncias foram realizadas em 625 nm em leitor de microplacas. Para cinética de morte, foi selecionado o isolado clínico UFPEDA 1058. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5 ATIVIDADE ANTIBIOFILME DOS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS

4.5.1 Inibição da formação inicial do biofilme

Para realização do ensaio de atividade de antibiofilme foi utilizado um protocolo adaptado de Jadhav et al. (2013), que se baseia na utilização do cristal violeta em placas de microtitulação de 96 poços. Neste ensaio soluções da substância em estudo equivalente a 0,5 x CMI, CMI e 2 x CMI foram preparadas. Em cada poço foram colocadas 100 μL de cada solução dos derivados e adicionado 100 μL de uma suspensão do isolado clínico UFPEDA 1058 (concentração final 10^6 UFC/mL). O controle negativo foi o meio sem inóculo e o positivo o inóculo bacteriano sem os tratamentos. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h e o conteúdo dos poços foi removido. Posteriormente, cada poço foi lavado três vezes com solução salina esterilizada. As bactérias que permaneceram aderidas foram fixadas com metanol absoluto por 20 minutos e em seguida coradas com cristal

violeta a 0,1% por 5 min à temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido com água destilada por três vezes. O corante que se ligou ao biofilme foi solubilizado com metanol absoluto por 15 min e a absorbância medida com densidade ótica de 570 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A porcentagem de inibição de formação de biofilme para cada concentração foi determinada de acordo com a fórmula descrita por Jadhav et al. (2013):

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left[\left(\frac{\text{DO570 nm amostra}}{\text{DO570 nm controle}} \right) \times 100 \right]$$

4.5.2 Inibição do biofilme formado

O efeito das tiazolidinas sobre o biofilme formado foi avaliado como descrito por Jadhav et al. (2013). A formação do biofilme foi obtida pela transferência de 100 µL da suspensão bacteriana (10^6 UFC/ml) para cada poço da placa de 96 poços de fundo plano. As placas foram incubadas a 37 °C por 6 horas. Após a incubação, 100 µL de cada solução dos compostos tiazolidínicos (0,5 x CMI; CMI; 2 x CMI) foram adicionados aos poços para obter o volume final de 200 µL. O controle negativo foi o meio sem inóculo e o positivo o inóculo bacteriano sem os tratamentos. Oxacilina, eritromicina e ciprofloxacina foram utilizadas como fármacos padrão. Após o tratamento com as substâncias as placas foram incubadas por 1, 5 e 20 h. Em seguida os biofilmes foram avaliados quanto à fixação de biomassa utilizando o ensaio de cristal violeta de acordo com o protocolo descrito no item 4.5.1.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vivo* UTILIZANDO *C. elegans* COMO HOSPEDEIRO

4.6.1 Manutenção de *Caenorhabditis elegans*

A cepa mutante de *C. elegans* AU37 foi utilizada em todos os ensaios como modelo *in vivo* de infecção. A mutação *glp-4(bn2)* torna os nematódeos incapazes de produzir progênie em temperaturas superiores a 25 °C, enquanto a mutação *sek-1(km4)* reduz a imunidade inata dos *C. elegans*, aumentando sua sensibilidade a

patógenos (BEANAN; STROME, 1992; KIM et al., 2002). Como fonte de alimento foi utilizada *Escherichia coli* OP50, uma cepa não patogênica e sem capacidade de formação de biofilme, convencionalmente escolhida para manutenção de *C. elegans* em laboratórios (ARATA et al., 2020). Tanto a cepa AU37 quanto a *E. coli* OP50 foram gentilmente doadas pelo *Caenorhabditis Genetic Center* (Universidade de Minnesota, EUA) para o ETNO – Laboratório de Etnofarmacologia da UFPE.

Os nematódeos foram mantidos em meio ágar NGM (do inglês, *Nematode Growth Medium*), semeado com *E. coli* OP50 sob condições padrão (BRENNER, 1974). Para realização dos testes, os nematódeos foram sincronizados com solução de hipoclorito de sódio conforme descrito por Tampakakis et al. (2008). Após eclosão dos ovos, as larvas no estágio L1 foram transferidas para placas NGM semeadas com *E. coli* OP50 e cultivadas a 25 °C até o estágio L4 (adultos jovens).

4.6.2 Nematódeos infectados por *Staphylococcus aureus*

Os nematódeos no estágio L4 foram coletados utilizando uma peneira com malha de 38 µm e solução Tampão M9 (3 g/L KH₂PO₄; 6 g/L Na₂HPO₄; 5 g/L NaCl; 0,12 g/L MgSO₄), suplementado com ciprofloxacino (100 µg/mL). Foram realizadas cinco lavagens para retirada da *E. coli* OP50 aderida à cutícula. Em seguida, os nematódeos foram submetidos novamente a lavagens consecutivas em meio M9 (70% de tampão M9, 30% de caldo BHI, 10 µg/mL de colesterol), para remover o ciprofloxacino antes da infecção *S. aureus* (UFPEDA 1058). O meio M9 foi usado para diluir as moléculas.

Um inóculo de $1,5 \times 10^7$ UFC foi adicionado a 1 mL de meio LB contendo 10 µg/mL de colesterol e incubado a 37 °C por 24 horas. Após esse período, os nematódeos em meio M9 foram infectados com *S. aureus* em uma proporção de 4:1 (v/v) como descrito por Kong et al. (2014) e Bezerra Filho et al. (2020).

Em seguida, os nematódeos foram transferidos para placa de 96 poços ($\pm$ 20/poço). Os derivados tiazolidínicos (16, 4 e 1 µg/mL) foram adicionadas aos poços em triplicada para cada concentração, contendo volume total de 200 µL em cada poço. OP50 e vancomicina (6 µg/mL) foram usados como controle positivo e *S.*

aureus com DMSO 1% como controle negativo. Os experimentos foram repetidos três vezes.

A longevidade dos nematódeos foram avaliadas através da contagem de nematódeos vivos e mortos a cada 24 h, durante 120 h. Os nematódeos foram identificados como morto quando não apresentavam movimentos espontâneos no intervalo de 10 segundos e não tinham batimento faríngeo. Durante o teste os poços foram fotografados diariamente até 120h utilizando um estereomicroscópio Stemi 305 (Karl-Zeiss, Munique, Alemanha).

4.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As alterações na morfologia das células de *S. aureus* foram avaliadas após incubação com as tiazolidinas nas concentrações de 0,5 x MIC, MIC e 2 x MIC por 18 h. As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) acoplado a espectroscopia de energia dispersiva - EDS (MEV-FEG ZEISS AURIGA 40). Após a incubação, as células foram submetidas ao processo de fixação. Para isso, as bactérias foram centrifugadas a 3000 x g por 10 min e lavadas duas vezes com PBS. As células foram então fixadas com uma solução de 2,5% de glutaraldeído em PBS a 4 °C por 4 h. Após esse período, as bactérias foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol por 15 min e centrifugadas a 13.000 x g por 10 min. O *pellet* celular foi ressuscitado em etanol 100% e 5 µl de amostra foi adicionada em placas de silício, as quais foram secas em dessecador por 3 dias. As amostras preparadas foram submetidas a metalização com ouro para a obtenção das imagens (AMORIM-CARMO et al., 2019).

4.8 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO E FIBROBLASTOS

As células mononucleares de sangue periférico humanas (PBMC) foram isoladas por centrifugação em gradiente de Ficoll (Histopaque® 1077, Sigma-Aldrich, EUA) a partir de bolsas *Buffy-Coat* cedidas pela Fundação de Hematologia e

Hemoterapia do Estado de Pernambuco – HEMOPE após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa de ambas as instituições (CAAE 23236618.1.3001.5195 – Hemope; e 23236618.1.0000.5208 – UFPE). Após centrifugação a 400 x g por 30 min, as células foram coletadas, lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e ressuspensas em meio RPMI 1640 completo. Utilizando uma câmara de Neubauer, as células foram contadas e plaqueadas em placa de 96 poços na concentração de 1×10^5 células/poço, estimuladas com 1% do mitógeno fitohemaglutinina e mantidas sob incubação a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até o dia seguinte. Após a incubação, os compostos tiazolidínicos previamente dissolvidos em DMSO foram diluídos em meio RPMI 1640 e adicionados aos poços em concentrações finais de 100 – 1 µg/mL. A placa foi novamente incubada por 72 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após o período de incubação, foram adicionados em cada poço 25 µL da solução de MTT (5 mg/mL) e a placa foi incubada na estufa por mais 3 h. Em seguida o sobrenadante foi aspirado e, para realizar a leitura espectrofotométrica, 100 µL de DMSO foram adicionados em cada poço para dissolução dos cristais de formazan. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas em 560 nm (RODRIGUES et al., 2018).

Para avaliação da citotoxicidade em fibroblastos, foi utilizada a linhagem L929 obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantida no Laboratório de Cultura de Células, Departamento de Antibióticos - UFPE. A linhagem foi mantida em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado e 1% de solução de antibióticos (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em incubadora a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂. As células semiconfluentes foram tratadas com tripsina 5% por 5 min, recuperadas com meio DMEM suplementado SFB 10% e centrifugadas a 400 x g por 10 min. As células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em placa de 96 poços na concentração de 1×10^4 células/poço. Após 24 horas de incubação, os compostos tiazolidínicos previamente dissolvidos em DMSO foram diluídos em meio DMEM e adicionados aos poços em concentrações finais de 100 – 1 µg/mL e as placas reincubadas por 72 h. A análise da citotoxicidade foi realizada conforme descrito acima para os PBMCs.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média e foram analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnett. Os dados de sobrevivência estão representados em curvas de Kaplan-Meier e analisados por *log-rank*. Ambas as análises foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 9 e os resultados foram considerados significativos quando $*p > 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *S. aureus*

No teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA) dos isolados clínicos de *S. aureus* foi observado resistência à oxacilina e à cefoxitina em 85% dos isolados (17/20), à eritromicina em 90% (18/20), enquanto a resistência ao ciprofloxacino foi encontrada em 70% (14/20). Sulfametoxazol-trimetoprima foi eficiente frente a cinco isolados, correspondendo a 75% de resistência dos isolados a esta associação de antibióticos, enquanto para clindamicina a resistência foi de 65% (13/20). Todos os isolados foram resistentes a penicilina G (Tabela 5). Estes resultados eram esperados e corroboram vários estudos realizados na última década que mostram a ampla resistência de isolados clínicos de *S. aureus* aos antimicrobianos mais utilizados na clínica, principalmente a alta prevalência de MRSA (CARACIOLO et al., 2012; LUJÁN; MÁLAGA, 2014; MONTEIRO et al., 2020).

Todos os 20 isolados clínicos de *S. aureus* avaliados foram formadores de biofilme, no entanto 85% (17/20) se apresentaram na categoria de fortemente aderente e 15% (3/20) foram classificados como moderadamente aderentes. Estes resultados foram independentes do sítio de infecção e origem hospitalar ou ambulatorial (Tabela 5).

Chaudhary et al. (2021) avaliaram 288 isolados de MRSA quanto a formação de biofilme. Destes, 198 (68,75%) foram formadores de biofilme, dos quais 101 foram classificados como fortemente aderentes (35,06%) e 97 como fracamente aderente (33,68%).

Em um estudo realizado em 15 isolados clínicos MRSA para determinar a capacidade de formação de biofilme, 33% dos isolados foram classificados como fortemente aderentes, enquanto o restante foi classificado como fracamente aderente ou não-aderente. Não foi observada nenhuma relação entre resistência a múltiplos fármacos e capacidade de formação de biofilme (BATISTÃO et al., 2016).

Neste estudo, também não foi observada correlação entre resistência a múltiplos fármacos e formação de biofilme, como pode ser exemplificado pelos isolados UFPEDA 1054 (resistente a penicilina G e ciprofloxacino) e os isolados

UFPEDA 1042, UFPEDA 1044, UFPEDA 1051 (resistentes a oxacilina, cefoxitina, penicilina G, eritromicina, gentamicina, clindamicina, ciprofloxacino e sulfametoxazol-trimetropima) que foram classificados como fortemente aderentes e moderadamente aderentes, respectivamente. O inverso também foi observado para alguns isolados, como pode ser visto na Tabela 5.

Rodrigues (2017a) verificou que não havia correlação entre resistência aos antimicrobianos e produção de biofilme em isolados clínicos MRSA, pois de maneira geral os isolados produtores de biofilme eram sensíveis aos antibióticos avaliados.

Tabela 5 – Dados clínicos, perfil de resistência fenotípica e formação de biofilme dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*.

(continua)

Registros	Sítio de infecção	Hospital	Ambulatório	Perfil de resistência fenotípica	Formação de biofilme
UFPEDA 1039	Secreção orofaríngea		X	Ox, Cef, E, D+, P	+++
UFPEDA 1040	Lesão na perna		X	Ox, Cef, E, Clind, P	+++
UFPEDA 1041	Lesão na virilha		X	Ox, Cef, E, P	+++
UFPEDA 1042	Escara	X		Ox, Cef, E, Clind, Cipro, Gen, SXT, P	++
UFPEDA 1043	Fibrina peritoneal	X		Ox, Cef, E, Clind, Cipro, Gen, SXT, P	+++
UFPEDA 1044	Conjuntiva direita		X	Ox, Cef, E, Clind, Cipro, Gen, SXT, P	++
UFPEDA 1045	Ponta de cateter	X		Ox, Cef, E, Cipro, Gen, P	+++
UFPEDA 1046	Secreção traqueal	X		Ox, Cef, E, Clind, Cipro, Gen, P	+++

Tabela 5 – Dados clínicos, perfil de resistência fenotípica e formação de biofilme dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*.

(conclusão)

Registros	Sítio de infecção	Hospital	Ambulatório	Perfil de resistência fenotípica	Formação de biofilme
UFPEDA 1047	Pericárdio	X		Ox, Cef, E, Clind, Cipro, Gen, P	+++
UFPEDA 1048	Secreção de ferida	X		Ox, Cef, E, Clind, Cipro, P	+++
UFPEDA 1049	Fragmento de tendão	X		Ox, Cef, E, Clind, Cipro, P	+++
UFPEDA 1050	Secreção orotraqueal		X	E, D+, P	+++
UFPEDA 1051	Aspirado traqueal		X	Ox, Cef, E, Clind, Cipro, Gen, SXT, Tet, P	++
UFPEDA 1052	Secreção orotraqueal		X	E, D+, P	+++
UFPEDA 1053	Aspirado traqueal		X	Ox, Cef, E, Clind, Cipro, Clor, P	+++
UFPEDA 1054	Conjuntiva direita		X	Cipro, P	+++
UFPEDA 1055	Secreção de furúnculo		X	Ox, Cef, E, Clind, Cipro, P	+++
UFPEDA 1056	Abscesso	X		Ox, Cef, P, Rifamp	+++
UFPEDA 1057	Sangue	X		Ox, Cef, E, Clind, Cipro, P	+++
UFPEDA 1058	Líquido torácico	X		Ox, Cef, E, Clind, Cipro, Gen, SXT, P	+++

Nota: ++ Moderadamente aderente; +++ Fortemente aderente; Ox – oxacilina; Cef – cefoxitina; E – eritromicina; D+ – teste D+; P – penicilina; Clind – clindamicina; Cipro – ciprofloxacino; Gen – gentamicina; SXT – sulfametoxazol-trimetoprima; Tet – tetraciclina; Clor – cloranfenicol; Rifam – rifampicina.

Fonte: A Autora (2022).

De acordo com o CLSI (2018), todos os isolados de *S. aureus* devem ser submetidos ao teste D. O teste D+ indica ineficiência da clindamicina *in vivo* (TALEBI et al., 2019). Avaliando simultaneamente sítio de infecção e origem, foi possível observar que dos isolados resistentes a eritromicina, três foram teste D+. Todos isolados foram ambulatoriais e obtidos de secreções do trato respiratório superior (orofaríngea ou orotraqueal).

O perfil dos isolados quanto à resistência aos antimicrobianos e alta capacidade de formação de biofilme reforça a grande preocupação no âmbito da saúde, pois pode acarretar um maior tempo de internação hospitalar, além de falha no tratamento.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS DE *Staphylococcus aureus*

As concentrações de DNA nas amostras extraídas variaram de 10 ng/μL (amostra UFPEDA 1040) a 1.050 ng/μL (amostra UFPEDA 1044) como pode ser evidenciada na tabela 6.

Tabela 6 – Concentração do DNA (ng/μL) nas amostras extraídas.

Nº da amostra	<i>S. aureus</i> (UFPEDA)	DNA (ng/μL)	Nº da amostra	<i>S. aureus</i> (UFPEDA)	DNA (ng/μL)
1	1039	23,0	11	1049	148,4
2	1040	11,0	12	1050	150,0
3	1041	726,3	13	1051	18,0
4	1042	23,0	14	1052	33,8
5	1043	20,0	15	1053	18,0
6	1044	1.050,0	16	1054	20,0
7	1045	211,0	17	1055	35,0
8	1046	17,0	18	1056	40,0
9	1047	14,0	19	1057	29,0
10	1048	120,0	20	1058	10,0

Fonte: A Autora (2022).

5.2.1 Gene *mecA*

A presença do gene *mecA* foi detectada em 95% dos isolados, independentemente de sua origem (hospitalar ou ambulatorial) ou sítio de infecção (Figura 15). Os isolados UFPEDA 1050 e UFPEDA 1054 não apresentaram resistência fenotipicamente, mas possuem a presença do gene *mecA*. Este fato é preocupante, pois indica que o gene não está sendo expresso por algum motivo, mas pode passar a sê-lo dependendo das condições ambientais, como a exposição a β -lactâmicos. Deste modo, passando a manifestar a resistência fenotípica. De acordo com Oliveira e Lencastre (2011), outros determinantes ainda não identificados podem atuar no controle transcricional do gene *mecA*, direta ou indiretamente, podendo afetar a expressão fenotípica da resistência aos antibióticos β -lactâmicos.

Um estudo semelhante foi realizado por Namvar et al. (2015) com amostras de *S. aureus* obtidas de pacientes com feridas de queimaduras e não queimados. Nos pacientes queimados foi observado que 80% dos isolados continham o gene *mecA*, enquanto no perfil fenotípico, apenas 67,2 % foram resistentes à oxacilina. Nas amostras obtidas das feridas de não queimados, 52,7% apresentaram o gene *mecA* e 47,3% eram fenotipicamente resistentes à oxacilina.

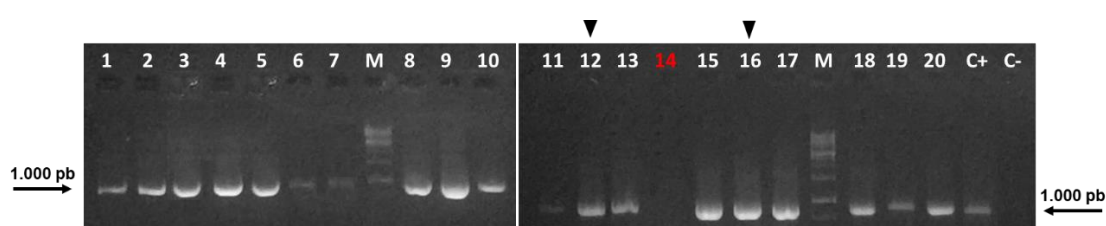
Cinquenta e oito isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* considerados oxacilina sensíveis por ensaios de susceptibilidade antimicrobiana, foram avaliados quanto a presença do gene *mecA*. Destes, 43% (25/58) foram negativos para todos os genes SCCmec investigados. No entanto, 52% (30/58) dos isolados foram positivos para o gene *mecA*. Neste estudo foi observada alta taxa de *S. aureus mecA* positivos susceptíveis à oxacilina (OS-*mecA*) tanto de origem hospitalar como ambulatorial (ANDRADE-FIGUEIREDO; LEAL-BALBINO, 2016).

No estudo acima foi observada uma taxa bem maior de ausência de fenótipo de resistência e presença do gene *mecA* do que as encontradas nos isolados clínicos avaliados, no qual foi observada uma taxa de 10% (Tabela 7).

Segundo o CLSI (2018) devem ser relatados como resistentes à oxacilina todos os isolados positivos para *mecA* ou PBP2a, bem como isolados resistentes à oxacilina devem ser reportados como resistentes aos outros β -lactâmicos, exceto

para as cefalosporinas de quinta geração com atividade anti-MRSA, como a ceftarolina.

Figura 15 – Gel representativo dos produtos de PCR do gene *mecA*. Estão destacados em vermelho os isolados negativos para o gene *mecA*, enquanto as cabeças de seta indicam os isolados sem resistência fenotípica, mas com presença do gene *mecA*.



Fonte: A Autora (2022).

5.2.2 Gene *norA*

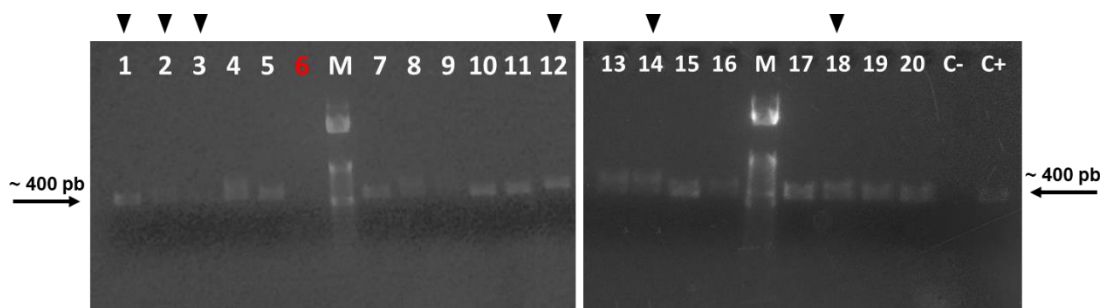
A presença do gene *norA* foi detectada em 95% dos isolados, independentemente de sua origem (hospitalar ou ambulatorial) ou sítio de infecção. Seis dos isolados não apresentaram resistência fenotipicamente, mas tinham a presença do gene. Apenas um isolado não apresentou o gene de resistência *norA*, mas apresentou resistência fenotípica (Figura 16; Tabela 7).

De acordo com Álvarez-Hernández et al. (2015), as taxas de resistência a fluoroquinolonas variam de 20% nas linhagens sensíveis à oxacilina e até 100% nas resistentes.

Os isolados do genero *Staphylococcus* inicialmente suscetíveis a fluoroquinolonas, após o início da terapia podem se tornar intermediários ou resistentes. O desenvolvimento de resistência pode ocorrer em menos de três a quatro dias (CLSI, 2018).

O fato da resistência à oxacilina se relacionar à resistência as fluoroquinolonas, e que esse antibióticos podem se tornar ineficazes no curso da antibioticoterapia, faz diminuir a opção terapêutica a esta classe de compostos.

Figura 16 – Gel representativo dos produtos de PCR do gene *norA*. Estão destacados em vermelho os isolados negativos para o gene *norA*, enquanto as cabeças de seta indicam os isolados sem resistência fenotípica, mas com presença do gene *norA*.



Fonte: A Autora (2022).

5.2.3 Gene *ermA*

A presença do gene *ermA* foi detectada em 80% dos isolados, independentemente de sua origem (hospitalar ou ambulatorial) ou sítio de infecção. Em três isolados foi observado o fenótipo MLS_{Bi} (teste D+), no entanto em um deles (UFPEDA 1050) não foi encontrado o gene *ermA*. Os fenótipos MLS_{Bc} e MS_B foram encontrados em doze e em três isolados, respectivamente. Em dois isolados (UFPEDA 1054 e UFPEDA 1056) não foi observada resistência fenotípica mesmo com a presença do gene *ermA*, enquanto o isolado UFPEDA 1055 foi resistente à eritromicina, mas não foi detectado a presença do gene *ermA* (Tabela 7; Figura 17).

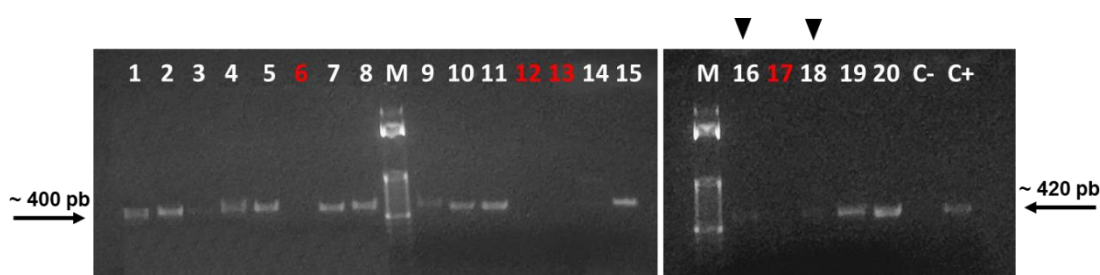
No estudo realizado por Perreira et al. (2016), o fenótipo MLS_{Bc} também foi o mais prevalente. Segundo Petinaki e Papagiannitsis (2018), o gene *ermA* é mais difundido nos isolados resistentes à metilicina, corroborando com este estudo.

Parra et al. (2016) avaliaram fenótipos de resistência à metilicina, macrolídeos e lincosamidas em cinquenta isolados clínicos de *S. aureus*. Eles verificaram uma frequência de 16% (8/50) de fenótipo MLS_{Bc} e 2% (1/50) de fenótipo MLS_{Bi}. Todos os isolados que apresentaram esses fenótipos foram resistentes à metilicina, dados semelhantes aos encontrados neste estudo.

Vários genes conferem resistência aos antibióticos MLS_B (macrolídeos-lincosamidas e estreptograminas B). No entanto, os fenótipos mais prevalentes são MLS_B (constitutivo ou induzível) associado à presença principalmente dos genes

ermA e *ermC*. Nos isolados resistentes à oxacilina ocorre uma maior difusão dos genes *ermA* enquanto nos isolados sensíveis a prevalência é do gene *ermC* (PETINAKI; PAPAGIANNITSIS, 2018; LECLERCQ, 2002). Como 95% dos isolados avaliados possuíam o gene *mecA*, só foi avaliada a presença do gene *ermA*.

Figura 17 – Gel representativo dos produtos de PCR do gene *ermA*. Estão destacados em vermelho os isolados negativos para o gene *ermA*, enquanto as cabeças de seta indicam os isolados sem resistência fenotípica, mas com presença do gene *ermA*.



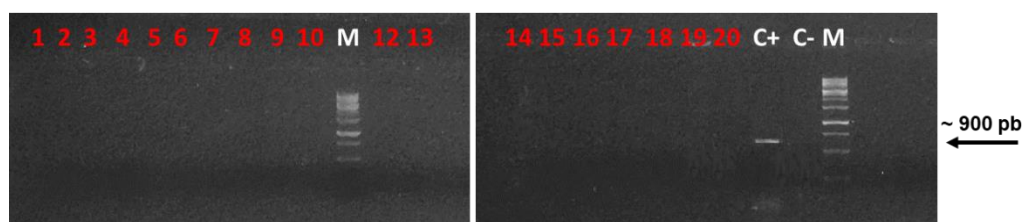
Fonte: A Autora (2022).

5.2.4 Gene *vanA*

O gene *vanA* não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas (Tabela 7, Figura 18).

Existem relatos de cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa e *S. aureus* apresentando susceptibilidade reduzida aos glicopeptídeos em diversos países, incluindo o Brasil (RIGATTI et al., 2010; ROSSI et al., 2014). Os casos mais relatados ocorreram no sudeste de Michigan (EUA), onde sete *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina (VRAS) foram notificados entre os anos de 2003-2006, ressaltando que estes casos ficaram restritos a esta localidade (TENOVER, 2008; SIEVERT et al., 2008).

Figura 18 – Gel representativo dos produtos de PCR do gene *vanA*. Estão destacados em vermelho os isolados negativos para o gene *vanA*.



Fonte: A Autora (2022).

No Brasil foi notificado um caso de paciente com infecção da corrente sanguínea causada por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e susceptível à vancomicina. Durante o curso da antibioticoterapia, este isolado tornou-se resistente à vancomicina. Os ensaios de PCR foram utilizados para detectar os genes de resistência e os autores sugeriram que o isolado MRSA adquiriu um plasmídeo *vanA* durante a terapia originado de um *Enterococcus* sp. (ROSSI et al., 2014).

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com os dados da literatura que mostram que os relatos de VRSA ainda são escassos.

Tabela 7 - Relação fenotípica /molecular dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*.

Nº da amostra	<i>S. aureus</i>	Perfil fenotípico de resistência aos antimicrobianos	Gene
1	UFPEDA 1039	Ox, E, teste D+ (fenótipo MLS _{Bi})	<i>mecA, ermA, norA</i>
2	UFPEDA 1040	Ox, E, Clind (fenótipo MLS _{Bc})	<i>mecA, ermA, norA</i>
3	UFPEDA 1041	Ox, E (fenótipo MS _B)	<i>mecA, ermA, norA</i>
4	UFPEDA 1042	Ox, Cipro, E, Clind (fenótipo MLS _{Bc})	<i>mecA, ermA, norA</i>
5	UFPEDA 1043	Ox, Cipro, E, Clind (fenótipo MLS _{Bc})	<i>mecA, ermA, norA</i>
6	UFPEDA 1044	Ox, Cipro, E (fenótipo MS _B)	<i>mecA</i>
7	UFPEDA 1045	Ox, Cipro, E, Clind (fenótipo MLS _{Bc})	<i>mecA, ermA, norA</i>
8	UFPEDA 1046	Ox, Cipro, E, Clind (fenótipo MLS _{Bc})	<i>mecA, ermA, norA</i>
9	UFPEDA 1047	Ox, Cipro, E, Clind (fenótipo MLS _{Bc})	<i>mecA, ermA, norA</i>
10	UFPEDA 1048	Ox, Cipro, E, Clind (fenótipo MLS _{Bc})	<i>mecA, ermA, norA</i>
11	UFPEDA 1049	Ox, Cipro, E, Clind (fenótipo MLS _{Bc})	<i>mecA, ermA, norA</i>
12	UFPEDA 1050	E, teste D+ (fenótipo MLS _{Bi})	<i>mecA, norA</i>
13	UFPEDA 1051	Ox, Cipro, E, Clind (fenótipo MLS _{Bc})	<i>mecA, norA</i>
14	UFPEDA 1052	E, teste D+ (fenótipo MLS _{Bi})	<i>ermA, norA</i>
15	UFPEDA 1053	Ox, Cipro, E, Clind (fenótipo MLS _{Bc})	<i>mecA, ermA, norA</i>
16	UFPEDA 1054	Cipro	<i>mecA, ermA, norA</i>
17	UFPEDA 1055	Ox, Cipro, E (fenótipo MS _B)	<i>mecA, norA</i>
18	UFPEDA 1056	Ox	<i>mecA, ermA, norA</i>
19	UFPEDA 1057	Ox, Cipro, E, Clind (fenótipo MLS _{Bc})	<i>mecA, ermA, norA</i>
20	UFPEDA 1058	Ox, Cipro, E, Clind (fenótipo MLS _{Bc})	<i>mecA, ermA, norA</i>

Nota: Ox – oxacilina; E– eritromicina; Clind – clindamicina; Cipro –ciprofloxacino; fenótipo MLS_{Bi} (resistência à eritromicina e sensibilidade ou resistência intermediária à clindamicina, teste D+); fenótipo MLS_{Bc} (resistência à eritromicina e à clindamicina); fenótipo MS_B (resistência à eritromicina e sensibilidade ou resistência intermediária à clindamicina, teste D-).

Fonte: A Autora (2022).

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS

De acordo o CLSI (2018), um microrganismo é considerado resistente à oxacilina e ciprofloxacino quando a concentração mínima inibitória desses antibióticos for ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ e para eritromicina quando a CMI for ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$. Deste modo, a resistência dos isolados clínicos avaliados frente aos fármacos padrão oxacilina e eritromicina foi de 90 % e para ciprofloxacino 75%.

Os valores de CMIs e CMBs obtidos com os derivados tiazolidínicos frente aos isolados clínicos avaliados estão listados na tabela 8. Os resultados mais satisfatórios de CMI variaram de 1 a 8 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a CMB variou de 4 a 32 $\mu\text{g/mL}$. Os derivados mais eficazes foram **2a** [5-(2,4-diclorobenzilideno)-4-tioxotiazolidina-2-ona, HRJ-1] e **2b** [5-(3,4-diclorobenzilideno)-4-tioxotiazolidina-2-ona, HRJ-2] que apresentaram CMI entre 4-16 e 1-16 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Seus respectivos pares, **1a** [5-(2,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona, Ju-296] e **1b** [5-(3,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona, Ju-298], apresentaram CMI entre 4-32 e > 128 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 8).

O derivado **2c** [5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxotiazolidina-2-ona, HRJ-11] apresentou CMI entre 4 e 32 $\mu\text{g/mL}$, enquanto seu par **1c** [5-(3-clorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona, JU-395] foi inativo, com MIC > 128 $\mu\text{g/mL}$ para todos os isolados. Resultados semelhantes foram obtidos para o derivado **2d** [5-(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-4-tioxotiazolidina-2-ona, HRJ-26], que apresentou atividade moderada, com CMI entre 16 e 64 $\mu\text{g/mL}$, enquanto seu par, o derivado **1d** [5-(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona, Ju-414] também foi inativo, com MIC > 128 $\mu\text{g/mL}$ para todos os isolados (Tabela 8).

Para o par contendo o grupo 2,3,6-triclorobenzilideno, **1e** (Ju-2222) e **2e** (HRJ-1503), ocorreu o inverso. O par tiazolidina-2,4-diona (**1e**) apresentou baixa atividade antimicrobiana, com CMI entre 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$, enquanto seu par 4-tioxotiazolidina-2-ona (**2e**) foi inativo, com CMI variando de 64 a > 128 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 8).

O par **1f** [5-(2-bromo-5-metóxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona, Ju-695] e **2f** [5-(2-bromo-5-metóxi-benzilideno)-4-tioxotiazolidina-2-ona, HRJ-53] inibiram os

isolados clínicos, no entanto, **1f** foi superior com CMI variando de 4 a 64 µg/mL enquanto **2f** variou de 16 a 128 µg/mL (Tabela 8).

Estes resultados apontam para a superioridade da atividade antimicrobiana dos derivados 4-tioxotiazolidina-2-ona em relação aos seus análogos tiazolidina-2,4-diona.

Segundo Trotsko et al. (2018a) com base na razão CMB/CMI, pode-se considerar um composto como bacteriostático quando esta razão for ≥ 8 , e bactericida quando esta razão for ≤ 4 . Deste modo, a maioria dos derivados ativos apresentaram efeito bactericida.

Silva et al. (2014) avaliaram a atividade de derivados de 5-benzilideno-tiazolidina-2,4-diona frente a *S. aureus* não-resistentes, incluindo os derivados **1a**, **1b**, **1c**, **1d** e **1f**, encontrando valores de CMI de 8 e 16 e CMB de 16 e 32 µg/mL. Os derivados **1b**, **1c** e **1d**, considerados inativos neste estudo, apresentaram atividade no estudo anterior, o que pode ser explicado pelas diferenças fenotípicas e genotípicas de resistência do *S. aureus* utilizado para avaliação.

Derivados 5-benzilideno-tiazolidina-2,4-diona foram sintetizados e avaliados quanto a sua atividade antimicrobiana, dentre os quais os derivados **1c** e **1d**, que apresentaram CMI de 1,2 µg/mL para *S. aureus* (SUCHETA et al., 2018), diferindo significativamente dos resultados desse trabalho. Paiva et al. (2019) sintetizaram e avaliaram dez derivados de 5-benzilideno-tiazolidina-2,4-diona para atividade antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 29213, incluindo o derivado **1d** (CMI de 250 µg/mL). Os autores discutiram que especialmente os derivados 4-clorobenzilideno-tiazolidina-2,4-diona e 4-nitrobenzilideno-tiazolidina-2,4-diona foram os mais ativos, com CMI de 62,5 e 31,25 µg/mL, respectivamente. Estes resultados corroboram com os encontrados neste estudo e evidenciam o potencial dos grupos clorobenzilideno na atividade antimicrobiana das tiazolidinas.

Alegaon e Alagawadi (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana de derivados 5-benzilideno-4-tioxo-tiazolidina-2-onas frente a *S. aureus* ATCC 25923 e obtiveram CMI que variaram entre 2 e 8 µg/mL para os quatro compostos mais eficazes, e observaram que a atividade desses compostos parece estar relacionada à presença dos halogênios Cl, Br e F, pois os compostos sem esses grupos apresentaram atividade reduzida para *S. aureus*. Kulkarni et al. (2020) avaliando a

capacidade de inibição antimicrobiana de novos 5-benzilideno-tiazolidina-2,4-diona verificaram que dos quatorze derivados sintetizados, nove apresentaram atividade antimicrobiana, sendo os derivados contendo os halogênios F, Cl, Br, além do grupo metóxi eram os mais ativos.

Tabela 8 – Inibição de isolados clínicos multirresistente por derivados tiazolidínicos (CMI e CMB em µg/mL). (continua)

Derivados	<i>S. aureus</i> (UFPEDA)																			
	1039		1040		1041		1042		1043		1044		1045		1046		1047		1048	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
1a	4	16	8	32	32	32	4	4	4	8	32	64	16	16	4	8	4	8	4	16
2a	4	4	4	32	8	8	2	4	4	4	8	16	4	4	4	8	4	4	4	8
1b	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
2b	2	4	4	8	4	8	4	4	1	4	4	4	4	8	4	8	4	8	4	16
1c	>128	>128	>128	>128	>128	>128	32	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
2c	16	16	32	32	16	32	16	32	8	8	32	32	16	16	16	16	16	16	16	16
1d	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
2d	64	>128	64	64	16	32	32	32	32	32	32	64	32	64	32	32	32	32	32	64
1e	64	128	32	64	32	128	64	128	32	64	64	128	16	64	64	128	64	128	32	128
2e	128	>128	64	>128	128	>128	>128	>128	>128	>128	128	>128	64	128	>128	>128	>128	>128	128	>128
1f	4	8	16	16	32	64	8	16	8	8	64	128	32	32	16	16	16	16	64	128
2f	128	>128	32	64	16	32	16	16	16	32	16	32	32	64	32	32	32	32	64	128
Ox	4	8	8	16	4	4	>128	>128	64	128	32	128	128	>128	128	>128	128	>128	4	4
E	>128	>128	>128	>128	64	>128	>128	>128	>128	>128	16	>128	>128	>128	128	>128	>128	>128	>128	>128
Cipro	0,5	1	1	1	0,5	0,5	>128	>128	128	128	64	128	128	128	64	128	128	>128	128	>128

Tabela 8 – Inibição de isolados clínicos multirresistente por derivados tiazolidínicos (CMI e CMB em µg/mL). (conclusão)

Derivados	<i>S. aureus</i> (UFPEDA)																			
	1049		1050		1051		1052		1053		1054		1055		1056		1057		1058	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
1a	4	16	8	8	16	64	16	16	8	32	32	64	8	32	8	32	8	32	4	16
2a	4	8	4	32	4	4	4	32	4	16	16	64	8	32	8	32	4	16	4	16
1b	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
2b	4	8	4	32	4	4	4	32	4	16	16	64	8	32	8	32	4	16	4	16
1c	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
2c	16	32	16	64	4	4	16	64	16	64	32	64	16	64	16	64	16	64	8	16
1d	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
2d	32	64	32	32	32	64	32	64	32	128	64	>128	64	>128	32	128	16	128	32	32
1e	32	64	32	64	16	64	64	128	64	128	32	64	64	128	64	128	32	128	32	128
2e	128	128	128	>128	64	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	64	>128
1f	8	64	8	8	32	64	16	16	8	64	128	128	8	16	64	128	16	128	8	32
2f	64	128	32	64	16	16	64	128	32	128	64	64	64	64	64	128	16	16	16	64
Ox	8	16	<0,12	<0,12	>128	>128	<0,12	<0,12	4	16	4	4	4	4	4	4	>128	>128	>128	>128
E	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	0,5	0,5	64	64	0,5	2	>128	>128	>128	>128
Cipro	128	128	<0,12	<0,12	32	64	<0,12	<0,12	128	128	128	128	4	4	<0,12	<0,12	>128	>128	>128	>128

5.4 CINÉTICA DE MORTE DE *Staphylococcus aureus* EXPOSTOS AOS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS

O efeito de fármacos antimicrobianos pode ser expresso como a taxa de morte em determinadas concentrações do fármaco por intervalo de tempo. A representação gráfica resultante é chamada de cinética de morte microbiana (SCHWALBE et al., 2007).

Os derivados tiazolidínicos **1a**, **1f**, **2a**, **2b** e **2c** foram selecionados para a cinética de morte por apresentarem os melhores resultados na CMI/CMB. Os pares correspondentes não foram avaliados pois para este teste é necessário haver inibição de crescimento, não sendo possível sua realização para os derivados inativos. O isolado clínico utilizado neste ensaio foi UFPEDA 1058 e os derivados foram avaliados em concentrações de 0,5 x CMI, 1 x CMI e 2 x CMI.

Conforme ilustrado na Figura 19A e 19C, os derivados **2a** e **2b** demonstraram valores estatisticamente constantes de absorbância em todas as concentrações durante as 24 horas analisadas, confirmando seu efeito bactericida independente das concentrações testadas. O derivado **1a** apresentou efeito bactericida nas duas maiores concentrações (CMI e 2 x CMI), enquanto na concentração sub-inibitória (0,5 x CMI) houve crescimento bacteriano no último tempo avaliado (24 horas), com valores iguais ao controle de crescimento (Figura 19B).

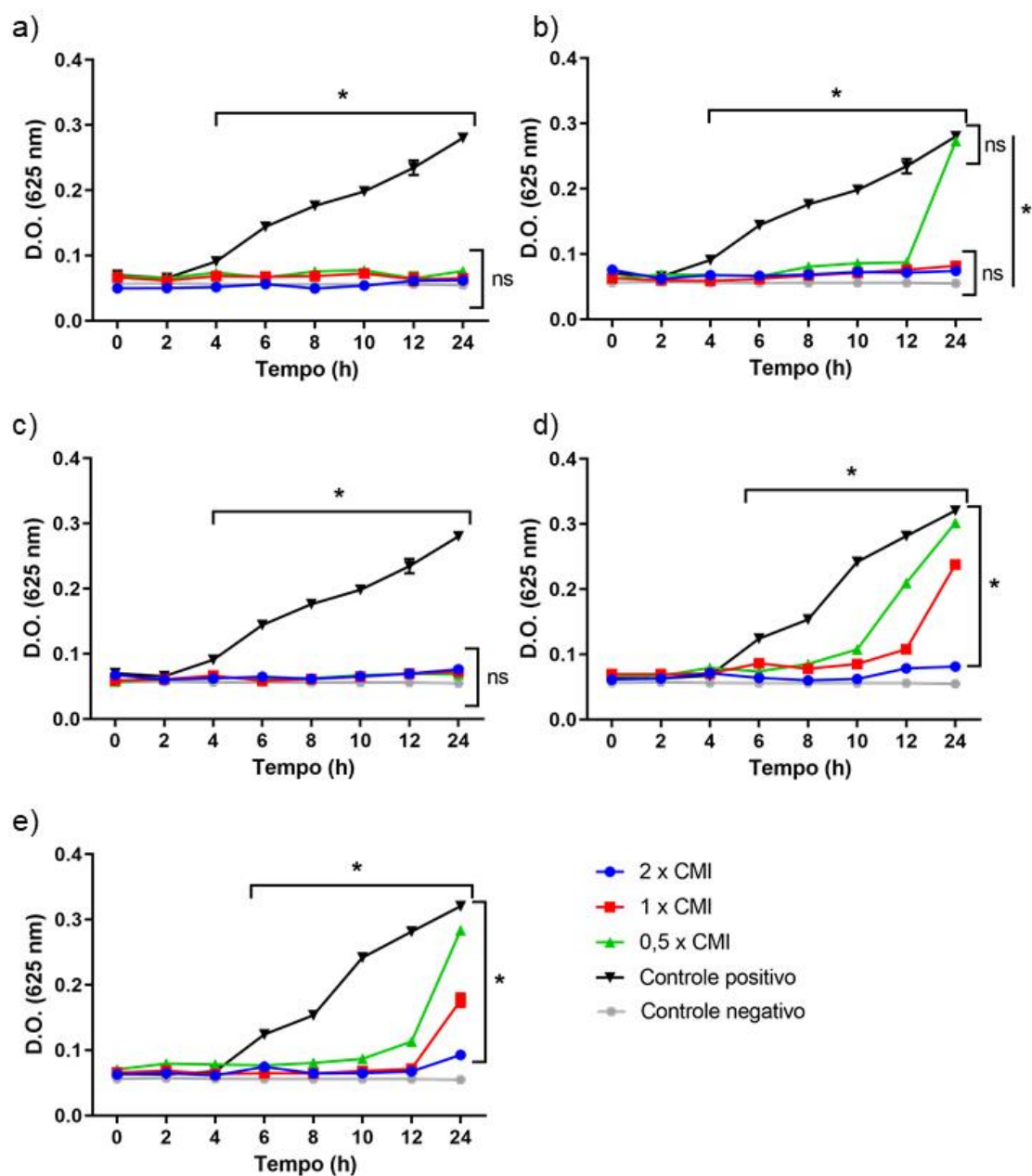
O derivado **1f** foi bactericida durante as 24 horas avaliadas somente na concentração 2 x CMI. Nas concentrações sub-inibitória e inibitória houve crescimento bacteriano a partir das 10 horas, mas ainda diferindo estatisticamente do controle positivo, indicando um efeito concentração-dependente (Figura 19D). Os resultados na cinética obtidos com os derivados tiazolidínicos corroboram com os observados na CMI e CMB onde foram observados efeito bactericida nas substâncias avaliadas.

Até o momento são escassos os trabalhos descrevendo a cinética de morte de derivados tiazolidínicos. Hu et al. (2020) descreveu a cinética de morte de um derivado tiazolidina-2,4-diona conjugado a um grupo cumarilmetileno na posição 5 frente a um isolado MRSA. A cinética foi avaliada

por 6 horas em uma única concentração de 4 x CMI, e o derivado apresentou efeito bactericida a partir da terceira hora. Khader et al. (2020) avaliou a cinética de morte de cinco novos compostos heterocíclicos anti-MRSA identificados a partir de uma triagem de larga escala em uma quimioteca com 82 mil compostos. Os compostos foram avaliados em uma única concentração de 4 x CMI durante 4 horas, todos apresentando efeito bacteriostático.

O derivado **2c** inibiu o crescimento bacteriano nas três concentrações durante as primeiras 10 horas do teste, apresentando a partir da décima segunda hora crescimento bacteriano dependente da concentração, mas ainda diferindo estatisticamente do controle positivo (Figura 19E).

Figura 19 – Cinética de morte do isolado clínico de *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 1058) após exposição aos derivados tiazolidínicos: a) **2a** [5-(2,4-diclorobenzilideno)-4-tioxotiazolidina-2-ona]; b) **1a** [5-(2,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona]; c) **2b** [5-(3,4-diclorobenzilideno)-4-tioxotiazolidina-2-ona]; d) **1f** [5-(2-bromo-5-metóxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona]; e) **2c** [5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona].



Fonte: A Autora (2022).

5.5 ATIVIDADE ANTIBIOFILME DOS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS

Os compostos tiazolidínicos que apresentaram boa atividade antimicrobiana também foram selecionados para os testes de inibição formação inicial do biofilme e do biofilme pré-formado.

5.5.1 Inibição da formação inicial do biofilme

Todos os derivados tiazolidínicos avaliados inibiram a formação inicial do biofilme nas concentrações 0,5 x CMI, CMI e 2 x CMI (Figura 20).

Os derivados **2a** e **2b** inibiram a formação inicial do biofilme nas concentrações utilizadas com percentuais de inibição de aproximadamente 83 e 89%, respectivamente. Não foi observado efeito concentração-dependente, já que as concentrações 0,5 x CMI apresentaram o mesmo efeito que as 2 x CMI (Figura 20A e C).

O derivado **1a** inibiu a formação inicial de biofilme nas concentrações inibitória e supra-inibitória, com percentuais de inibição de 84,4 e 79,4%, respectivamente (Figura 20B). Na concentração 0,5 x CMI, a inibição caiu para 65,4%. Entretanto, para o derivado **2c**, foi observado efeito concentração-dependente com inibição de 36,6, 44,6 e 76,4% nas concentrações 0,5 x CMI, CMI e 2 x CMI, respectivamente (Figura 20E).

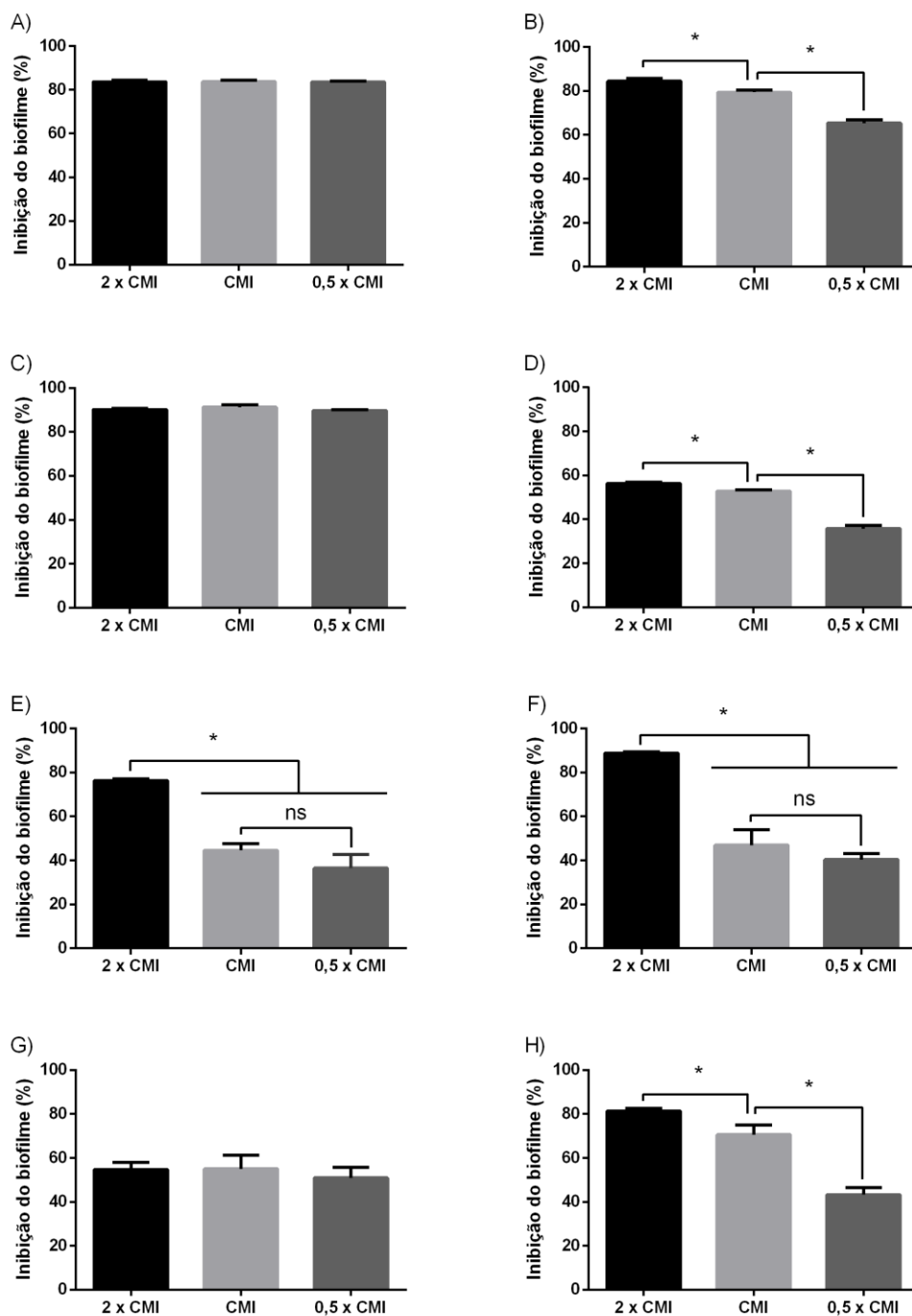
Os percentuais de inibição da formação inicial de biofilme do derivado **1f** foram semelhantes nas concentrações 2 x CMI (55,6%) e CMI (52,9%), decaindo na concentração de 0,5 x CMI (35,8%).

Avaliando os análogos **1a** e **2a**, foram observados efeitos semelhantes nas concentrações CMI e 2 x CMI, diferindo estatisticamente somente na concentração 0,5 x CMI, na qual o derivado **1a** teve efeito menor que o derivado **2a**, o que era esperado por este conter enxofre na sua estrutura.

Comparado os resultados dos derivados tiazolidínicos mais ativos (**2a** e **2b**) com fármacos padrão ciprofloxacino, eritromicina e oxacilina testados (Figura 20F, G e H, respectivamente) foi observado que os derivados tiveram efeito equivalente ao ciprofloxacino e a oxacilina na concentração 2 x CMI, mas sendo superiores em ambos os casos nas concentrações CMI e 0,5 x CMI. Em

relação à eritromicina, os derivados foram mais efetivos em todas as concentrações avaliadas. Este fato é justificado pelo fato do isolado UFPEDA 1058 apresentar resistência fenotípica e genotípica para os três fármacos.

Figura 20 - Inibição da formação inicial de biofilme dos derivados tiazolidínicos e fármacos padrão frente ao isolado UFPEDA 1058: a) **2a** [5-(2,4-diclorobenzilideno)-4-tioxotiazolidina-2-ona]; b) **1a** [5-(2,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona]; c) **2b** [5-(3,4-diclorobenzilideno)-4-tioxotiazolidina-2-ona]; d) **1f** [5-(2-bromo-5-metóxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona]; e e) **2c** [5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona]; f) ciprofloxacino; g) eritromicina; e h) oxacilina.



Fonte: A Autora (2022).

5.5.2 Inibição do biofilme formado

Para os testes de inibição do biofilme formado, as microplacas foram incubadas inicialmente por 6 horas somente com o isolado UFPEDA 1058. Após esse período, os derivados tiazolidínicos e os fármacos padrão foram adicionados em concentrações 0,5 x CMI, CMI e 2 x CMI e avaliados após 1, 5 ou 20 h de exposição.

Com 1 hora de exposição, os derivados tiazolidina-2,4-diona (**1a** e **1f**) apresentaram os melhores percentuais de inibição nas três concentrações avaliadas, variando de 29,2 a 42,5% para **1a** e 17,0 a 34,4% para **1f** (Figura 21). Por outro lado, os derivados 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (**2a**, **2b** e **2c**) apresentaram resultados inferiores que variaram de 1,82 a 18,9% na concentração 0,5 x CMI de **2b** e 2 x CMI de **2c**, respectivamente (Figura 21).

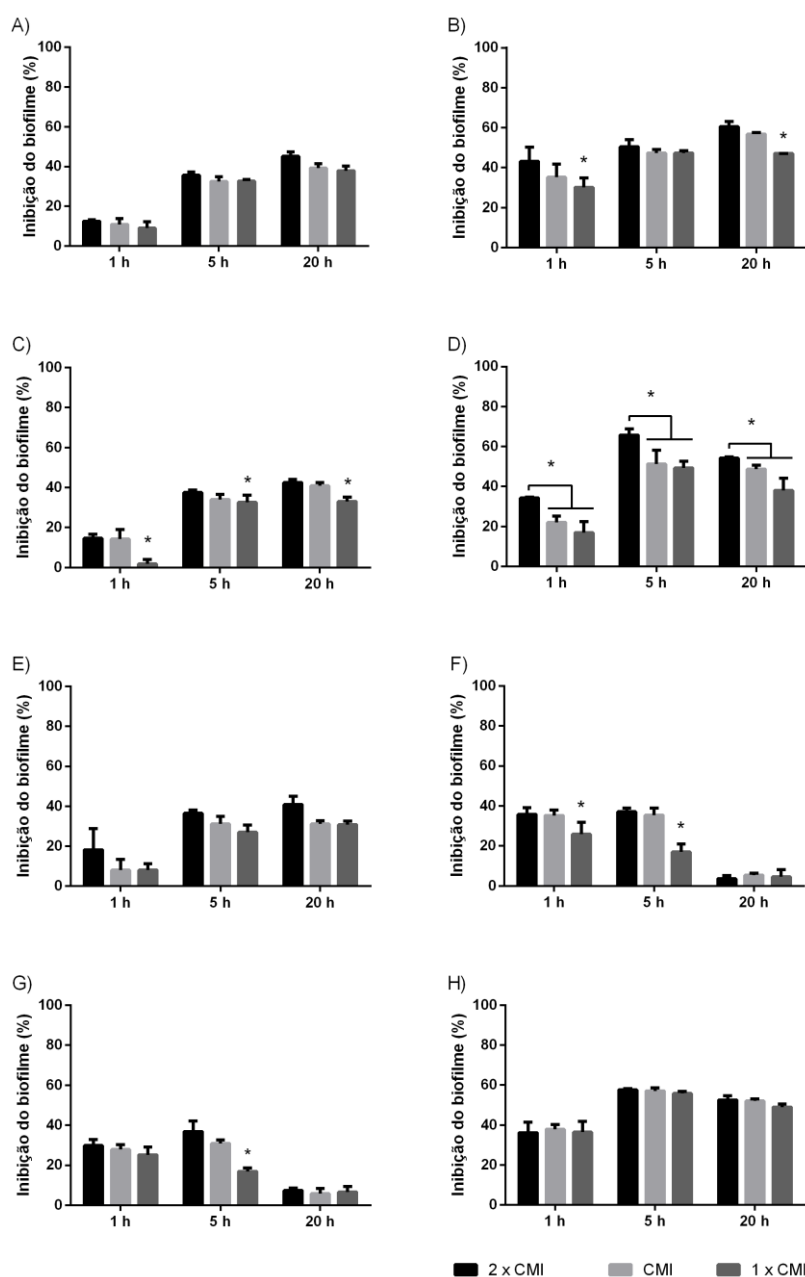
Com 5 horas de exposição, os percentuais de inibição do biofilme aumentaram em comparação a exposição de 1 hora, com os derivados tiazolidina-2,4-diona mantendo os maiores valores de inibição, com resultados superiores a 50% de inibição para os derivados **1a** (2 x CMI) e **1f** (CMI e 2 x CMI). Os derivados 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (**2a**, **2b** e **2c**) novamente apresentaram valores inferiores que variaram de 27,0 a 37,5% na concentração 0,5 x CMI de **2c** e 2 x CMI de **2b**, respectivamente (Figura 21).

Após 20 horas de exposição, os percentuais de inibição do biofilme aumentaram novamente em comparação aos tempos anteriores, repetindo a superioridade dos derivados **1a** e **1f** em relação aos demais. O derivado **1a** apresentou valores de inibição de 48,4, 58,6 e 61,5% para as concentrações 0,5 x CMI, CMI e 2 x CMI, respectivamente. O derivado **1f** apresentou valores de inibição de 38,0, 48,8 e 54,3% para as concentrações 0,5 x CMI, CMI e 2 x CMI, respectivamente (Figura 21). Todos derivados 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (**2a**, **2b** e **2c**) apresentaram valores inferiores a 50% de inibição em todas as concentrações testadas.

Os três fármacos padrão, ciprofloxacino, eritromicina e oxacilina, inibiram o biofilme formado nos tempos avaliados e nas concentrações testadas. No entanto, ocorreu uma diminuição acentuada do percentual de inibição do biofilme com 20 horas para o ciprofloxacino e eritromicina. A oxacilina não

apresentou diferença entre as concentrações avaliados dentro de cada período de exposição. Contudo, somente após 5 e 20 horas de exposição nas concentrações 0,5 x CMI, CMI e 2 x CMI é que houve inibição superior a 50% do biofilme formado (Figura 21).

Figura 21 - Inibição do biofilme formado dos derivados tiazolidínicos e fármacos padrão frente ao isolado UFPEDA 1058 após 1, 5 e 20 horas de exposição: a) **2a** [5-(2,4-diclorobenzilideno)-4-tioxotiazolidina-2-ona]; b) **1a** [5-(2,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona]; c) **2b** [5-(3,4-diclorobenzilideno)-4-tioxotiazolidina-2-ona]; d) **1f** [5-(2-bromo-5-metóxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona]; e) **2c** [5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona]; f) ciprofloxacino; g) eritromicina; e h) oxacilina.



Fonte: A Autora (2022).

Comparando a ação das inibições do biofilme formado dos derivados tiazolidina-2,4-diona com os fármacos padrão oxacilina, ciprofloxacino e eritromicina foi possível observar que os derivados **1a** e **1f** foram mais efetivos do que os fármacos padrão nos três tempos e nas três concentrações avaliadas. Nos tempos de 5 e 20 horas de exposição, todos os derivados tiazolidínicos inibiram o biofilme formado na concentração 0,5 x CMI com percentuais superiores aos do ciprofloxacino e eritromicina, e equivalentes ao percentual da oxacilina.

Dentre os poucos trabalhos encontrados na literatura descrevendo a atividade antibiofilme de derivados tiazolidínicos, só foram encontrados trabalhos determinando a concentração mínima inibitória da formação inicial do biofilme (CMIB), com somente um relato de avaliação de derivados em biofilme pré-formado.

Opperman et al. (2009) descreveram a atividade antibiofilme de quatro derivados N-aril-5-benzilideno-rodanina (2-tioxo-tiazolidina-4-ona) que não apresentaram atividade antibacteriana frente a 19 *S. aureus*, incluindo microrganismos de coleção e isolados resistentes e sensíveis a meticilina. Os derivados apresentaram concentrações mínimas inibitórias da formação inicial do biofilme (CMIB) entre 1 e 38,7 µg/mL.

Marc et al. (2019b) sintetizaram 8 híbridos de tiazolidina-2,4-diona e norfloxacino e avaliaram sua atividade antibacteriana, incluindo a atividade antibiofilme. Os derivados apresentaram concentrações mínimas inibitórias da formação inicial do biofilme (CMIB) entre 4,9 e 39,0 µg/mL frente a *S. aureus* ATCC 25923.

Abdelkhalek et al. (2016) avaliaram o potencial do derivado 5-benzilideno-rodanina substituído com um grupo 3',4'-diclorobifenilmetileno frente ao biofilme pré-formado de *S. epidermidis* resistente à meticilina em concentrações de CMI a 8 x CMI. O derivado só foi capaz de reduzir o biofilme pré-formado nas concentrações 4 x CMI e 8 x CMI, com valores de inibição de 35 e 45%, respectivamente.

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vivo* UTILIZANDO *C. elegans* COMO HOSPEDEIRO

A atividade antimicrobiana *in vivo* foi avaliada para os derivados mais ativos (**2a** e **2b**) e seus respectivos análogos (**1a** e **1b**) com base nos resultados dos ensaios anteriores. Para isso, foi utilizado o modelo de infecção em *Caenorhabditis elegans*. Modelos de triagem em larga escala utilizando organismos inteiros, como *C. elegans* ou *Galleria mellonella*, são ferramentas poderosas para descoberta de novos compostos antimicrobianos, pois são capazes de identificar compostos com atividade dependente do sistema imune do hospedeiro e eliminar compostos demasiadamente tóxicos, diferentemente dos testes tradicionais de avaliação da atividade antimicrobiana (KHADER et al., 2020).

Os nematódeos não infectados (controle *E. coli* OP50) apresentaram sobrevivência média de 90% ao final das 120 horas, enquanto os tratados com o fármaco padrão vancomicina (6 µg/mL) apresentaram sobrevivência de 80% no mesmo período. Os nematódeos infectados e tratados com o derivado **1a** nas concentrações de 1 e 4 µg/mL apresentaram curvas de sobrevivência semelhantes aos nematódeos sem tratamento, com 100% de mortalidade até 96 horas. Por outro lado, na maior concentração (16 µg/mL), 65% dos nematódeos sobreviveram a infecção após 120 horas (Figura 22A).

O derivado **1b** foi inativo nos testes anteriores, mas incluído para comparação e validação do modelo de triagem *in vivo*. Em concentrações até 32 µg/mL, o tratamento com o derivado **1b** não aumentou a sobrevivência dos nematódeos (Figura 1C). Não foi possível avaliar concentrações superiores devido ao limite de solubilidade da molécula (resultados não mostrados). Estes resultados confirmam aqueles obtidos anteriormente que mostraram que o derivado **1b** não possui atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* resistentes a múltiplos fármacos.

Os derivados 4-tioxi-tiazolidina-2-ona foram mais ativos *in vivo*, aumentando a sobrevivência dos nematódeos de maneira concentração-dependente. Os nematódeos tratados com o derivado **2a** na concentração de 1 µg/mL morreram até 96 horas, enquanto 15,8 e 85,1% dos nematódeos

tratados nas concentrações de 4 e 16 µg/mL sobreviveram até 120 horas, respectivamente (Figura 22B). Os nematódeos tratados com **2b** apresentaram taxas de sobrevivência de 6,5, 17,9 e 80,6% ao final das 120 horas nas concentrações de 1, 4 e 16 µg/mL, respectivamente (Figura 22D). Imagens representativas dos grupos de *C. elegans* após 72 horas de infecção com o isolado UFPEDA 1058 e seus respectivos tratamentos podem ser vistas na Figura 23.

Tharmalingam et al. (2019) identificaram uma série de benzimidazóis com atividade antimicrobiana e anti-virulência frente a MRSA em uma triagem em larga escala utilizando *C. elegans* como hospedeiro. Zheng et al. (2018) sintetizaram uma série de 1,3,4-oxadiazóis e avaliaram sua atividade antimicrobiana frente formas planctônicas e sésseis de *S. aureus*. Na triagem inicial utilizando *C. elegans*, os derivados 1,3,4-oxadiazóis prolongaram a sobrevivência dos nematódeos na concentração de 7,14 µg/mL. Nenhum trabalho com avaliação de derivados tiazolidínicos utilizando *C. elegans* foi encontrado na literatura, até a presente data.

Figura 22 – Curvas de sobrevivências de *Caenorhabditis elegans* infectados com o isolado UFPEDA 1058 e tratados com os derivados tiazolidínicos: a) **1a** [5-(2,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona]; b) **2a** [5-(2,4-diclorobenzilideno)-4-tioxotiazolidina-2-ona]; c) **1b** [5-(3,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona]; d) **2b** [5-(3,4-diclorobenzilideno)-4-tioxotiazolidina-2-ona].

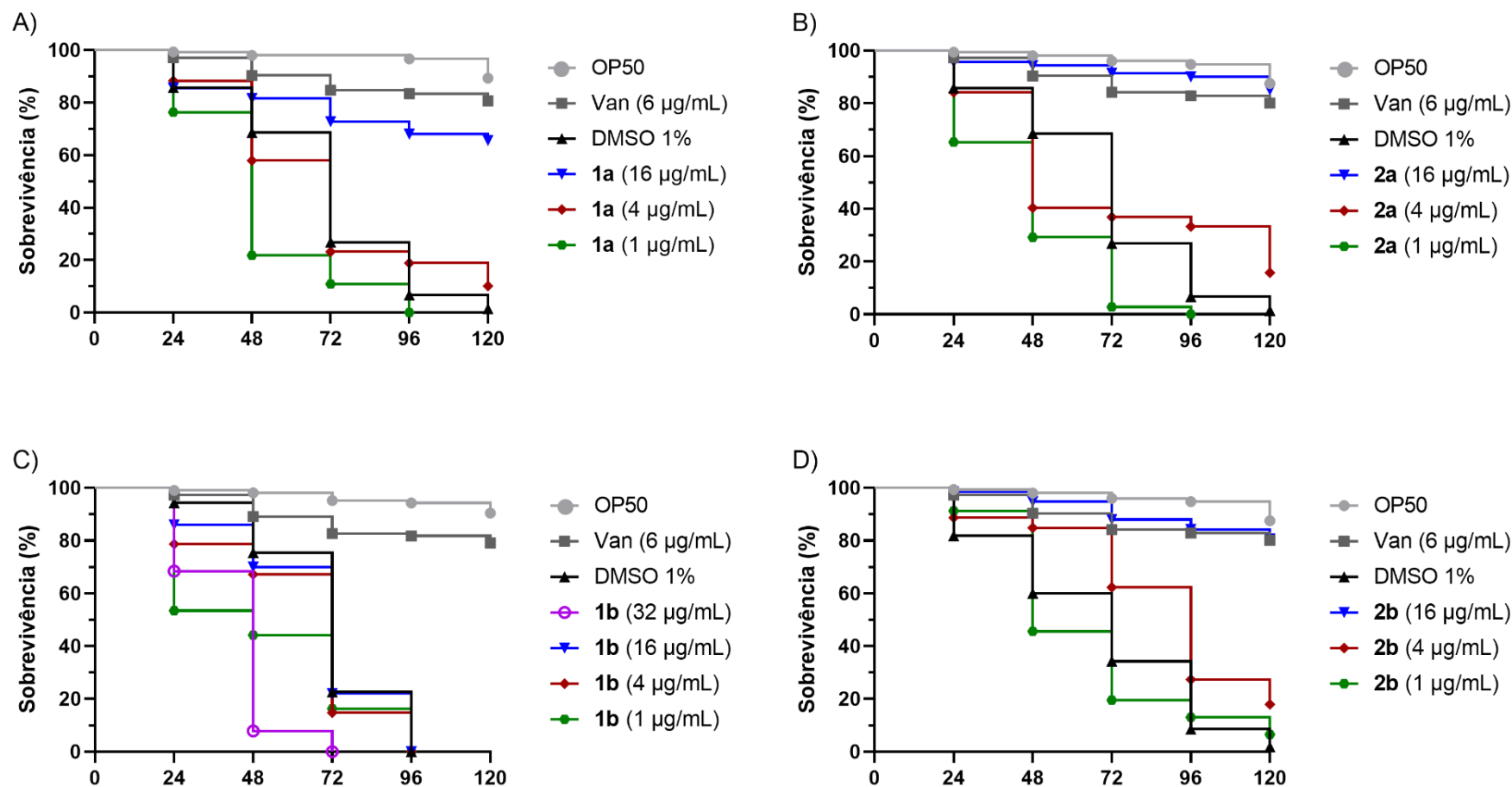
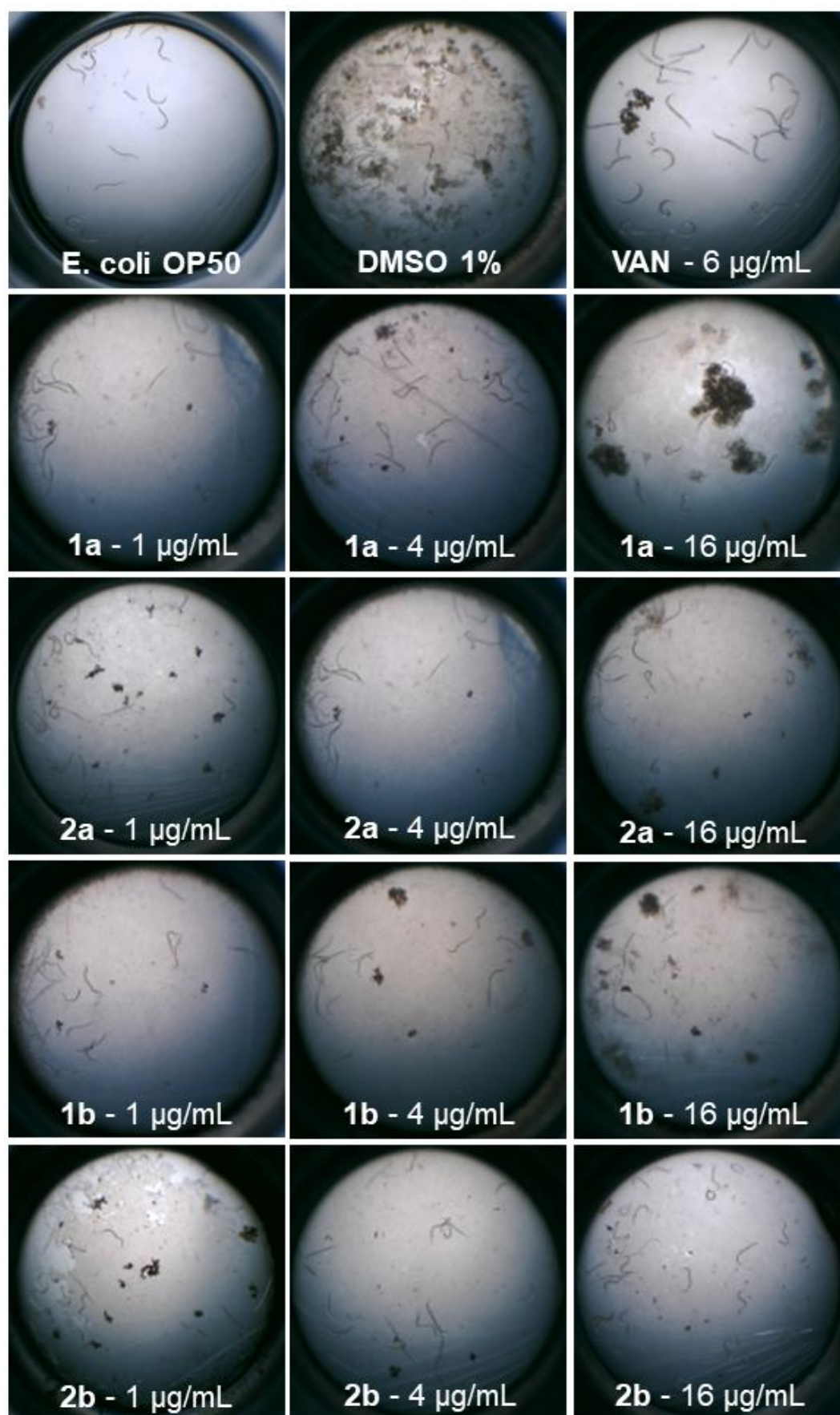


Figura 23 – Imagens representativas dos grupos de *C. elegans* após 72 horas de infecção com o isolado UFPEDA 1058 e seus respectivos tratamentos.



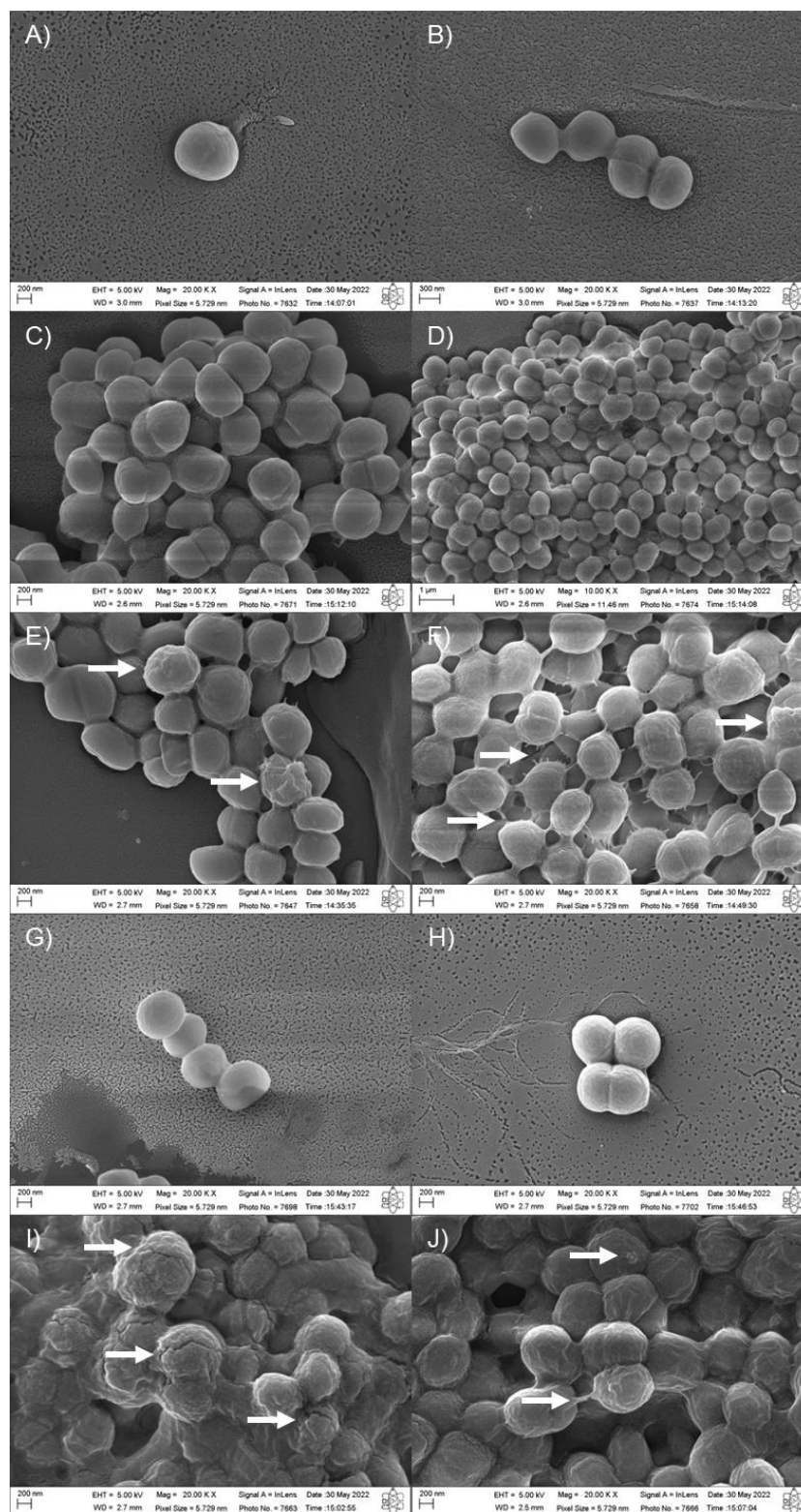
Fonte: A Autora (2022).

5.7 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Como pode ser observado na Figura 24, *S. aureus* expostos aos derivados **2a** e **2b** apresentaram protuberâncias e rachaduras na superfície celular. Além disso, as imagens indicam que a camada externa das células de *S. aureus* foi rompida, sem promover lise aparente da célula. Essas alterações podem estar associadas a inibição da síntese de peptidoglicano, e consequente desestruturação da parede celular bacteriana. Este foi um dos primeiros mecanismos de ação propostos para as tiazolidinas e que impulsionou as pesquisas desse núcleo como antimicrobiano (KAMINSKY et al., 2017). Contudo, esse mecanismo até hoje não foi demonstrado para as 4-tioxi-tiazolidina-2-onas (isorodaninas). Além dos danos evidentes na superfície celular, também foi possível observar outras alterações celulares, como alongamento e ruptura das pontes intercelulares (KLAINER; BETSCH, 1970), e diminuição do tamanho das células em relação ao grupo controle (diâmetro do controle $801,6 \pm 55,6$ nm; **2a** $727,4 \pm 63,0$ nm*; **2b** $682,6 \pm 87,4$ nm*).

A exposição aos derivados **1a** e **1b**, por sua vez, não promoveu alterações significativas na superfície de *S. aureus*, o que pode estar relacionado com sua baixa atividade antimicrobiana, no caso do derivado **1b**, ou a um mecanismo distinto que não gere danos na parede celular, no caso do derivado **1a**. Também não houve alteração no tamanho das células (diâmetro do controle $801,6 \pm 55,6$ nm; **1a** $741,9 \pm 19,5$ nm; **1b** $799,4 \pm 82,9$ nm).

Figura 24 – Aspectos morfológicos de *S. aureus* UFPEDA 1058 exposto aos derivados tiazolidínicos. A) e B) controles expostos a DMSO 1%; C) e D) **1a** [5-(2,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona]; E) e F) **2a** [5-(2,4-diclorobenzilideno)-4-tioxotiazolidina-2-ona]; G) e H) **1b** [5-(3,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona]; I) e J) **2b** 5-(3,4-diclorobenzilideno)-4-tioxotiazolidina-2-ona]. Aumento final 20kx, exceto para D) 10kx. Setas indicando alterações de superfície.



Fonte: A Autora (2022).

5.8 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO E FIBROBLASTOS

Todos os derivados tiazolidínicos em estudo foram avaliados quanto ao seu efeito citotóxico em células nucleares do sangue periférico humano (PBMC) e fibroblastos murinos da linhagem L929. Nenhum derivado testado apresentou efeito citotóxico ($CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) para PBMC. Por outro lado, para as células L929, as CI_{50} variaram de 35,2 a 74,8 $\mu\text{g/mL}$ para os derivados **2d** e **2f**, respectivamente. A comparação entre as duas séries demonstrou que os derivados tiazolidina-2,4-diona são mais citotóxicas que seus respectivos análogos 4-tioxo-tiazolidina-2-ona.

Amostras com $CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ são consideradas muito citotóxicas, com CI_{50} entre 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ como potencialmente citotóxicas, e aquelas com $CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ são consideradas não citotóxicas (GAD, 1993 apud ARAÚJO et al., 2013). Baseado neste preceito, todos os derivados foram potencialmente citotóxicos para as células L929.

Rodrigues (2017b) avaliando a citotoxicidade de derivados tiazolidínicos 5-(2-bromo-6-fluorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona e 5-(2-bromo-5-metóxibenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (**1f**) em PBMC observaram $CI_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$ não considerando ação citotóxica desses compostos, o que corrobora nosso resultado.

A citotoxicidade dos derivados 5-(4-clorobenzilideno)-3-(3,4-diclorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona e 5-(3-bromobenzilideno)-3-(4-bromobenzil)-tiazolidina-2,4-diona foi avaliada para PBMC em concentrações de até 100 μM (equivalentes a 40 e 45 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), nas quais a viabilidade celular foi maior que 90% para ambos os derivados (RÊGO et al., 2018).

O índice de seletividade (IS) é a relação entre citotoxicidade do composto para célula e sua atividade frente aos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*. O IS foi calculado a partir da razão entre a citotoxicidade para células mononucleares de sangue periférico e fibroblastos (CI_{50}) e a mediana da CMI dos derivados tiazolidínicos para os 20 isolados clínicos de *S. aureus* (Tabela 9).

Valores de IS > 10,0 são considerados seguros (DESAI et al., 2016). O único derivado que apresentou valores de IS superiores a 10 para as duas células testadas foi o **2b**. Os derivados **1a** e **2a** apresentaram valores superiores a 25 para PBMC e valores de 9,3 e 9,1 para L929, respectivamente.

Tabela 9 – Citotoxicidade e índice de seletividade dos derivados tiazolidínicos para células do sangue periférico humano (PBMC) e fibroblastos L929.

Derivados	CI ₅₀ (µg/mL)		Índice de seletividade (IS)	
	PBMC	L929	PBMC	L929
1a	> 100	36,9 ± 2,1	> 25	9,3
2a	> 100	36,2 ± 7,7	> 25	9,1
1b	> 100	37,9 ± 3,5	< 0,8	< 0,3
2b	> 100	51,2 ± 4,1	> 25	12,8
1c	> 100	36,4 ± 4,2	< 0,8	< 0,3
2c	> 100	43,5 ± 2,3	> 12,5	5,5
1d	> 100	37,3 ± 8,8	< 0,8	< 0,3
2d	> 100	35,2 ± 3,2	> 12,5	4,4
1e	> 100	44,9 ± 1,8	> 3,12	1,4
2e	> 100	73,8 ± 0,9	> 1,56	1,2
1f	> 100	59,8 ± 6,1	> 12,5	7,5
2f	> 100	74,8 ± 5,3	> 6,25	4,7

Fonte: A Autora (2022).

6. CONCLUSÕES

Todos os isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* apresentaram perfil de resistência e virulência, com a presença de pelo menos um gene de resistência e capacidade de formar biofilme.

A maioria dos derivados tiazolidínicos inibiram os isolados clínicos de *S. aureus* em algum grau, sendo mais ativos os derivados 4-tioxo-tiazolidina-2-ona **2a** e **2b**, ambos dicloro substituídos.

Na cinética de morte, os derivados **2a** e **2b** apresentaram efeito bactericida até 24 horas, enquanto os derivados **1a**, **1f** e **2c** foram bactericidas até a décima segunda hora.

Todos os derivados avaliados inibiram a formação inicial do biofilme. Esta inibição foi mais acentuada nos dois compostos com presença de enxofre na posição 4 do anel tiazolidínico.

Todos os derivados avaliados inibiram o biofilme formado, porém em percentuais inferiores àqueles observados na inibição inicial do biofilme.

Os derivados **2a** e **2b** aumentaram a sobrevivência dos nematódeos infectados com o isolado UFPEDA 1058 de maneira concentração-dependente, além de terem sido pouco citotóxicos para células mononucleares do sangue periférico humano e fibroblastos L929.

A exposição do *S. aureus* aos derivados **2a** e **2b** ocasionou alterações morfológicas na superfície externa e diminuição no tamanho das células bacterianas.

A atividade bactericida do derivado **2b** frente aos isolados clínicos com perfil resistente a múltiplos fármacos e formadores de biofilme, bem como sua capacidade de inibição de biofilme e índices de seletividade > 10 para as duas células avaliadas, colocam este derivado como excelente candidato a fármaco para o combate a esses microrganismos.

REFERÊNCIAS

- ABDELKHALEK, A.; ASHBY JR, C. R.; PATEL, A. B.; TALELE, T. T.; SELEEM, M. N. In Vitro Antibacterial Activity of Rhodanine Derivatives against Pathogenic Clinical Isolates. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, e0164227, 2016.
- ABENTE, S. I.; CARPINELLI, L. I.; GUILLÉN, R. I.; RODRÍGUEZ, F. I.; FARIÑA, N.; LASPINA, F. I.; LOPEZ, Y. Frecuencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y del factor de virulencia PVL en pacientes ambulatorios con infección de piel y partes blandas de Asunción, Paraguay. **Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.**, v. 14., p. 8–16, 2016.
- ACOSTA, A. C.; COSTA, M. M.; JUNIOR, J. W. P.; MOTA, R. A. Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*. **Med. Vet. (UFRPE)**, v. 11, n. 4, p. 252–269, 2017.
- ALEGAON, S. G.; ALAGAWADI, K. R. Microwave-Assisted Synthesis, Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Some 4-Thioxo-Thiazolidine-2-One Derivatives. **Lett. Drug Des. Discov.**, v. 8, p. 612–618, 2011.
- ALHAMEED, R. A.; ALMARHOON, Z.; BUKHARI, S. I.; EL-FAHAM, A.; LA TORRE, B. G.; ALBERICIO, F. Synthesis and Antimicrobial Activity of a New Series of Thiazolidine-2,4-diones Carboxamide and Amino Acid Derivatives. **Molecules**, v. 25, 105, 2020.
- ALMEIDA, L. C.; RODRIGUES, M. V. P.; FORTALEZA, C. M. C. B.; CINHA, M. L. R. S. Avaliação fenotípica e genotípica do perfil de resistência de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de culturas clínicas e de vigilância de um hospital de ensino brasileiro. **Colloquium Vitae**, v. 4, n. 2, p. 68–78, 2012.
- ALMEIDA, K. R. H.; SILVA, N. S.; ROCHA, I. V.; XAVIER, D. E.; LEAL, N. C.; OLIVEIRA, S. R. *Staphylococcus* spp. resistentes em hemoculturas e superfícies hospitalares e a segurança do paciente. **Rev. Epidemiol. Control. Infect.**, v. 7, n. 4, p. 260–266, 2017.
- ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, D. A.; GARZA-MAYÉN, G. S.; VÁZQUEZ-LÓPEZ, R. Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de Resistencia. **Rev. Chilena Infectol.**, v. 32, n. 5, p. 499–504, 2015.
- AMORIM-CARMO, B.; DANIELE-SILVA, A.; PARENTE, A. M. S.; FURTADO, A. A.; CARVALHO, E.; OLIVEIRA, J. W. F.; SANTOS, E. C. G.; SILVA, M. S.; SILVA, S. R. B.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; MONTEIRO, N. K.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Potent and broad-spectrum antimicrobial activity of analogs from the scorpion peptide Stigmurin. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, n. 3, 623, 2019.
- ANDRADE, C. W. Q.; SILVA, K. S. B.; SANTANA, M. M. R.; OLIVEIRA, A. V.; GUIMARÃES, M. D. & NAUTE, C. R. Etiologia e resistência de isolados bacterianos de hemoculturas da Sala de Cuidados Intermediários de um

Hospital Universitário em Pernambuco. **Res., Soc. Dev.**, v. 10, p. 7, e37510716605, 2021.

ANDRADE, E. R., CASEIRO, M. M. & GAGLIANI, L. H. Estudo da prevalência bacteriana e resistência aos antimicrobianos isolados de materiais biológicos em hospital, no município de Santos–SP–Brasil. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 14, n. 35, p. 5–26, 2017.

ANDRADE-FIGUEIREDO, M.; LEAL-BALBINO, T. C. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. **BMC Microbiol.**, v. 16, 2016.

ANTUNES, L. C. M.; FERREIRA, R. B. R.; BUCKNER, M. M. C.; FINLAY, B. B. Quorum sensing in bacterial virulence. **Microbiol.**, v. 156, p. 2271–2282, 2010.

ARATA, Y.; OSHIMA, T.; IKEDA, Y.; KIMURA, H.; SAKO, Y. OP50, a bacterial strain conventionally used as food for laboratory maintenance of *C. elegans*, is a biofilm formation defective mutant. **microPublication Biology**, e216, 2020.

ARAÚJO, L. C. C.; AGUIAR, J. S.; NAPOLEÃO, T. H.; MOTA, F. V. B.; BARROS, A. L. S.; MOURA, M. C.; CORIOLANO, M. C.; COELHO, L. C. B. B.; SILVA, T. G.; PAIVA, P. M. G. Evaluation of Cytotoxic and Anti-Inflammatory Activities of Extracts and Lectins from *Moringa oleifera* Seeds. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

ARAUJO, F. P.; TINELLI, M.; BATTISTI, A.; ERCOLI, A.; ANESI, A.; PANTOSTI, A.; MONICA MONACO, A. An outbreak of skin infections in neonates due to a *Staphylococcus aureus* strain producing the exfoliative toxin A. **Infection**, v. 46, n. 1, p. 49–54, 2017.

ASATI, V.; BHARTI, S. K. Design, synthesis and molecular modeling studies of novel Thiazolidine-2,4-dione derivatives as potential anti-cancer agents. **J. Mol. Struct.**, v. 1154, p. 406–417, 2018.

AVUPATI, V. R.; YEJELLA, R. P.; AKULA, A.; GUNTUKU, G. S.; DODDI, B. R.; VUTLA, V. R. Synthesis, characterization and biological evaluation of some novel 2,4-thiazolidinediones as potential cytotoxic, antimicrobial and antihyperglycemic agents as potent anti-HIV-1 agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 22, p. 6442–6450, 2012.

BARROS, C. A.; AGUIAR-ALVES, F.; FERNANDES, M. A.; TORBEY, A. M.; FREITAS, M. F. N.; MEDEIROS, T. R.; OLIVEIRA, A. P. S.; CARDOSO, C. A. A. Infecção invasiva por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina associado à comunidade em criança saudável. **Revista de pediatria**, v.16, 2016.

BASSO, M. E.; PULCINELL, R. S. R.; AQUINO, A. R. C.; SANTOS, K. F. Prevalência de infecções bacterianas em pacientes internados em uma

unidade de terapia intensiva (UTI). **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 48, n. 4, p. 383–388, 2016.

BATISTA, B. G.; RAUBER, J. M.; BRUSCHI, J. S.; D'AZEVEDO, P. A. Novas cefalosporinas como alternativa no tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). **Rev. Epidemiol. Control. Infect.**, v. 5, n. 2, p. 94–99, 2015.

BATISTÃO, D. W. F.; CAMPOS, P. A.; CAMILO, N. C.; ROYER, S.; ARAUJO, B. F.; NAVES, K. S. C.; MARTINS, M.; PEREIRA, M. O.; HENRIQUES, M.; GONTIJO-FILHO, P. P.; BOTELHO, C.; OLIVEIRA, R.; RIBAS, R.M. Biofilm formation of Brazilian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: prevalence of biofilm determinants and clonal profiles. **J. Med. Microbiol.**, v. 65, p. 286–297, 2016.

BEANAN, M. J.; STROME, S. Characterization of a germ-line proliferation mutation in *C. elegans*. **Development**, v. 116, p. 755–766, 1992.

BERUBE, B. J.; WARDENBURG, J. B. *Staphylococcus aureus* α -Toxin: Nearly a Century of Intrigue. **Toxins**, v. 5, p. 1140–1166, 2013.

BEZERRA FILHO, C. M.; DA SILVA, L. C. N.; DA SILVA, M. V.; LØBNER-OLESEN, A.; STRUVE, C.; KROGFELT, K. A. L.; SANTOS CORREIA, M. T.; OLIVA, M. L. V. Antimicrobial and Antivirulence Action of *Eugenia brejoensis* Essential Oil in vitro and in vivo Invertebrate Models. **Front. Microbiol.**, v. 11, p. 424, 2020.

BONDE, C. G.; GAIKWAD, N. J. Synthesis and preliminary evaluation of some pyrazine containing thiazolines and thiazolidinones as antimicrobial agents. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 12, p. 2151–2161, 2004.

BOTKA, T.; RŮŽIČKOVÁ, V.; SVOBODOVÁ, K.; PANTŮČEKA, R.; PETRÁŠ, P.; ČEJKOVÁ, D.; DOŠKAŘ, J. Two highly divergent lineages of exfoliative toxin B-encoding plasmids revealed in impetigo strains of *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 07, n. 6, p. 291–296, 2017.

BOZDAĞ-DÜNDAR, O.; OZGEN, O.; MENTESE, A.; ALTANLAR, N.; ATLI, O.; KENDIB, E.; RAHMIYE ERTANA, R. Synthesis and antimicrobial activity of some new thiazolyl thiazolidine-2, 4-dione derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 15, p. 6012–6017, 2007.

BrCAST. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility testing, 2018.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71–94, 1974.

BREVES, A.; MIRANDA, C. A. C.; FLORE, C.; FILIPPIS, I.; CLEMENTINO, M. M. Methicillin- and vancomycin- resistant *Staphylococcus aureus* in health care

workers and medical devices. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 51, n. 3, p. 143–152, 2015.

BRIXNER, B.; RENNER, J. D. P.; KRUMMENAUER, E. C. Contaminação ambiental da UTI pediátrica: fator de risco para a ocorrência de infecções oportunistas. **Rev. Epidemiol. Control. Infect.**, n. 6, v. 1, p. 24–28, 2016.

BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. **Microbiologia médica** de Jawetz, Melnick e Adelberg, 26ª edição, Rio Grande do Sul: Porto Alegre, 2014.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica** de Goodman & Gilman, 12ª edição, Rio Grande do Sul: Porto Alegre, 2012.

BUKOWSKI, M.; WŁADYKA, B.; DUBIN, A.; DUBIN, G. The Staphylococcal Exfoliative Toxins in: **Pet-to-man travelling Staphylococci**, p. 127–133, 2010.

BURNHAM, J. P.; KOLLEF, M. H. Understanding toxic shock syndrome. **Intensive Care Med.**, v. 41, n. 9, p. 1707–1710, 2015.

CACIC, M.; MOLNAR, M. Design, Synthesis and Characterization of Some Novel 3-Coumarinyl-5-aryliden-1,3-thiazolidine-2,4-diones and Their Antioxidant Activity. **Z. Naturforsch. B**, v. 66, p. 177–183, 2011.

CALCAGNOTTO, L., NESPOLO, C. R.; STEDILE, N. R. L. Resistência antimicrobiana em microrganismos isolados do trato respiratório de pacientes internados em unidade de terapia intensiva. **Revista Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 40, n. 3, p. 77–83, 2011.

CAMILO, C. J., PEDER, L. D.; SILVA, C. M. Prevalência de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente em profissionais de enfermagem. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 9, n. 2, p. 361–371, 2016.

CARACIOLO, F. B.; MACIEL, M. A. V.; SANTOS, J. B.; RABELO, M. A.; MAGALHAES, V. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolates obtained from skin and soft tissue infections of outpatients from a university hospital in Recife-PE, Brazil. **An. Bras. Dermatol.**, v. 87, n. 6, p. 857–861, 2012.

CARVALHO, A. C. P.; RIBEIRO, R. A. C.; ZAGO, S.; BONNAS, D. S. Formação e resistência do biofilme microbiano em indústrias processadoras de alimentos enciclopédia biosfera. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 30, p. 311–325, 2019.

CARVALHO, M. S. M.; ANDRADE, D. F. R.; SOUSA, A. F. L.; VALLE, A. R. M. C.; FREITAS, D. R. J.; NASCIMENTO, G. C.; ANDRADE, D.; WATANABE, E. Colonização nasal por *Staphylococcus aureus* entre estudantes de

Enfermagem: subsídios para monitorização. **Rev. Bras. Enf.**, v. 69, n. 6, p. 1046–1051, 2016.

CARVALHO, R. L. B.; BEREZIN, E. M.; MIMICA, M. J. Avaliação da presença dos genes lukS-PV e lukF-PV em cepas pediátricas de *Staphylococcus aureus*. **Arq. Med. Hosp. Fac. Cienc. Med. Santa Casa São Paulo**, v. 57, n. 2, p. 59–62, 2012.

CERCA, N.; JEFFERSON, K. K.; MAIRA-LITRAN, T.; PIER, D. B.; KELLY-QUINTOS, C.; GOLDMANN, D. A.; AZEREDO, J.; PIER, G. G. Molecular basis for preferential protective efficacy of antibodies directed to the poorly acetylated form of staphylococcal poly-N-acetyl-beta-(1-6)-glucosamine. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 3406–3413, 2007.

CHAUDHARY, B. L.; BISHT, D.; FAUJDAR, S. S. Biofilme formation and its association with antibiotic susceptibility pattern in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **J. Pure Appl. Microbiol.**, v. 15, n. 4, p. 2041–2049, 2021.

CHEN, X.; ALONZO III, F. Bacterial lipolysis of immune-activating ligands promotes evasion of innate defenses. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 116, p. 3764–3773, 2019.

CHENG, A. G.; MCADOW, M.; KIM, H. K.; BAE, T.; MISSIAKAS, D. M.; SCHNEEWIND, O. Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. **PLoS Pathog.**, v. 6, 2010.

CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, p. 547–569, 2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Wayne, PA. 28th Edition informational supplement, M100, 2018.

CORRÊA, R. S.; SILVA, M. M.; GRAMINHA, A. E.; MEIRA, C. S.; SANTOS, J. A. F.; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, M. B. P.; POELHSITZ, G. V.; CASTELLANO, E. E.; BLOCH JR, C.; COMINETTI, M. R.; BATISTA, A. A. Ruthenium (II) complexes of 1,3-thiazolidine-2-thione: Cytotoxicity against tumor cells and anti-*Trypanosoma cruzi* activity enhanced upon combination with benznidazole. **J. Inorg. Biochem.**, v. 156, p. 153–163, 2016.

COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K. J. How bacteria stick. **Sci. Am.**, v. 238, p. 86–95, 1978.

CUE, D. R.; LEI, M. G.; LEE, C. Y. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 2, 38, 2012.

DALLACORTE, T. S.; INDRAS, D. M.; TEIXEIRA, J. J. V.; PEDER, L. D.; SILVA, C. M. Prevalência e perfil de sensibilidade antimicrobiana de bactérias

isoladas de hemoculturas realizadas em hospitais particulares. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 75, p. 01–11, 2016.

DANTAS, A. V. S.; VIEIRA, L. A. O.; AMORIN, A. V. O.; SANTOS, M. S.; SOUZA, E. C.; SOUZA, L. I. O.; FIDELIS, T. A. A.; SOUZA, V. P.; LIMA, G. M. S. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina isolados de estetoscópio hospitalar. **Revista Pediatria**, v. 32, n. 2, p. 145–147, 2014.

DAVID, M. Z.; DAUM, R. S. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 23, n. 3, p. 616–687, 2010.

DE COLSA, A. *Staphylococcus aureus*: De la genómica a la clínica. Microbiología molecular para el clínico. **Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría**, v. 24, n. 95, p. 91–94, 2011.

DESAI, N. C.; SOMANI, H.; TRIVEDI, A.; BHATT, K.; NAWALE, L.; KHEDKAR, V. M.; JHA, P. C.; SARKAR, D. Synthesis, biological evaluation and molecular docking study of some novel indole and pyridine based 1,3,4-oxadiazole derivatives as potential antitubercular agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 26, p. 1776–1783, 2016.

DÍAZ, M. P. S.; SANCHEZ, A. T.; PONCE OLIVEIRA, R. M. Dermatologic emergencies. **Revista Médica del Hospital General de México**, v. 79, n.1, p. 33–39, 2016.

DUARTE, F. C.; DANIELLI, T.; RIBEIRO, M. A. G. R.; PERUGINNI, L. F.; VESPERO, E. C.; CARRAR-MARRONI, F. E.; PELISSON, M.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATA, S. F.; PERUGINI, M. R. E. Bacteremia causada por *Staphylococcus aureus*: Uma análise de quinze anos da sensibilidade a antimicrobianos em um hospital terciário do Brasil. **Rev. Epidemiol. Control. Infect.**, v. 8, n. 3, p. 232–238, 2018.

DUMITRESCU, O.; DAUWALDER, O.; BOISSET, S.; REVERDY, M-E.; TRISTAN, A.; VANDENES F. *Staphylococcus aureus* resistance to antibiotics: key points in 2010. **Med. Sci.**, v. 26, n. 11, p. 943–949, 2010.

ECHIODA-OGBOLE, N. M.; YAZA, J. A.; AMEH, J. A.; SAMUEL MAILAFIA, S.; OLABODE, O. H.; ADAH, B. J.; OKOH, G. R.; MADUIKE, S. Coagulase-Positive *Staphylococci* Isolated from Cattle in Maiduguri. **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.**, v. 7, n. 5, p. 1301–1306, 2018.

EL-ADL, K.; SAKR, H.; NASSER, M.; ALSWAH, M.; SHOMAN, F. M. A. 5-(4-Methoxybenzylidene)thiazolidine-2,4-dione-derived VEGFR-2 inhibitors: Design, synthesis, molecular docking, and anticancer evaluations. **Arch. Pharm.**, v. 353, n. 9, e2000079, 2020.

ELHENAWY, A. A.; SALAMA, A. A. A.; ALL, M. M. A.; ALOMRI, A. A.; NASSAR, H. S. Synthesis, Characterization and Discovery Novel Anti-diabetic

and Anti-hyperlipidemic Thiazolidinedione Derivatives. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.**, v. 3, p. 23–30, 2015.

EL-KASHEF, H.; BADR, G.; EL-MAALI, N. A.; SAYED, D.; MELNYK, P.; LEBEGUE, N.; EL-KHALEK, R. A. Synthesis of a novel series of (Z)-3,5-disubstituted thiazolidine-2,4-diones as promising anti-breast cancer agents. **Bioorg. Chem.**, v. 96, 103569, 2020.

EL-TAWAB, A. A. A.; EL-HOFY, F. I.; EL-EKHNAWY, K. I.; EL-SHORA, H. E. Detection of Some Virulence and Resistance Genes of *S. aureus* and *B. cereus* Isolated from Some Meat. **Products Nature and Science**, v.17, n. 2, p. 85–91, 2019.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017.

FEITOSA, A. C.; RODRIGUES, R. M.; TORRES, E. A. T.; SILVA, J. F. M. *Staphylococcus aureus* em alimentos. **Revista desafios**, v. 4, n. 4, 2017.

FENALTE, M. P.; GELATTI, L. C. Contaminação de jalecos usados pela equipe de enfermagem. **Revista Eletrônica de Ciências Humanas, Saúde e Tecnologia**, v. 1, n. 1, p. 44–49, 2012.

FERREIRA, A. M.; ANDRADE, D.; RIGOTTI, M. A.; ALMEIDA, M. T. G. *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina em superfícies de uma unidade de terapia intensiva. **Acta Paul. Enferm.**, v. 24, n. 4, p. 453–458, 2011.

FERREIRA, G. R. S.; BRITO, J. S.; PROCÓPIO, T. F.; SANTOS, N. D. L.; LIMA, B. J. R. C.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; PATRÍCIA, M. G. P.; SOARES, T.; MOURA MAIARA, C.; NAPOLEÃO, T. H. Antimicrobial potential of *Alpinia purpurata* lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity. **Microb. Pathog.**, v. 124, p. 152–162, 2018.

FOSTER, T. J. Immune evasion by staphylococci. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 948–958, 2005.

FRASER, J. D. Clarifying the mechanism of superantigen toxicity. **PLoS Biol.**, v. 9, p. 1141–1145, 2011.

FREIMAN, A.; BORSUK, D.; SASSEVILLE, D. Dermatologic emergencies. **Practice**, v. 173, p. 1317–1319, 2005.

GAD, S. C. Alternatives to in vivo studies in toxicology. In: BALLANTYNE, B.; MARRS, T. C.; SIVERSEN, T. **General and Applied Toxicology**. Macmillan Press. pp. 179–206, 1993.

GALLI, L.; VENTURINI, E.; BASSI, A.; GATTINARA, G. C.; CHIAPPINI, E.; DEFILIPPI, C.; DIOICAIUTI, A.; ESPOSITO, S.; GARAZZINO, S.; GIANNATTASIO, A.; KRZYSZTOFIK, A.; LATORRE, S.; VECCHIO, A.;

MARCHISIO, P.; CARLOTTAMONTAGNANI, C.; NICOLINI, G.; NOVELLI, A.; MARIAROSSOLINI, G.; IRIANERI, I. Common Community-acquired Bacterial Skin and Soft-tissue Infections in Children: an Intersociety Consensus on Impetigo, Abscess, and Cellulitis Treatment. **Clin. Ther.**, v. 41, n. 3, p. 532–551, 2019.

GELATTI, L. C.; SUKIENNIK, T.; BECKER, A. P.; INOUE, F. M.; CARMO, M. S.; CASTRUCCI, F. M. S.; PIGNATARI, A. C. C.; RIBEIRO, L. C.; BONAMIGO, R. R.; D'AZEVEDO, P. A. Sepsis por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina adquirida na comunidade no sul do Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 4, p. 458–460, 2009.

GONÇALVES, S. M. C. **Avaliação do potencial atividade antiviral de novos derivados tiazolidínicos**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, 2020.

GONÇALVES, A. C. N.; ANJOS, M. B.; SILVA, N. D.; CARDOZO, S. V. Incidência de infecções provocadas por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina em um hospital da zona sul do Rio De Janeiro. **Rev Saúde & Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 54–57, 2013.

GOULART, M. E. A.; PEREIRA, C. S. B.; MACHRY, L.; MORAES, S. R. *Staphylococcus aureus* isolado de swab nasal em um hospital militar. **Rev. Saúde**, v. 6, n. 1, p. 5–9, 2015.

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

GOWDRA, V. S.; MUDGAL, J.; BANSAL, P.; NAYAK, P. G.; REDDY, S. A. M.; SHENOY, G. G.; VALIATHAN, M.; CHAMALLAMUDI, M. R.; NAMPURATH, G. K. Synthesis, Characterization, and Preclinical Evaluation of New Thiazolidin-4-Ones Substituted with p-Chlorophenoxy Acetic Acid and Clofibric Acid against Insulin Resistance and Metabolic Disorder. **BioMed Res. Int.**, v. 2014, 2014.

GRISHCHUK, A. P.; BARANOV, S. N.; GORIZDRA, T. E.; KOMARITSA, I. D. Conversion of some heterocyclic oxo compounds to their thio analogs. **Zhurnal Prikladnoi Khimii.**, v. 40, p. 1389–1392, 1967.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

GUO, Y.; SONG, G.; SUN, M.; WANG, J.; WANG, Y. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. **Front. Cell Infect. Microbiol.**, v. 10, n. 107, p. 1–11, 2020.

HAAG, A. F.; BAGNOLI, F. The role of two-component signal transduction systems in *Staphylococcus aureus* virulence regulation. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 409, p. 145–198, 2016.

HANDLER, M. Z.; SCHWARTZ, R. A. Staphylococcal scalded skin syndrome: diagnosis and management in children and adults. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 28, n. 11, p. 1418–1423, 2014.

HASAN, A. R. S.; HWAID, A. H.; MAHDY, Z. H. Detection of Toxic Shock Syndrome Toxin-1 among Children Undergoing Surgical Operations. **J. Fac. Med. Baghdad**, v. 59, n. 1, p. 83–86, 2017.

HENNEKINNE, J.; DE BUYSER, M.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 36, p. 815–836, 2012.

HERRERA, F.; SANTOS, J. Genes enterotoxigénicos en cepas de *Staphylococcus* spp., aisladas a partir de queso elaborado en Pamplona – Colombia. **Revista MVZ Cordoba**, v. 20, n. 1, p. 4472–4487, 2015.

HIRAMATSU, K.; HANAKIA, H.; INOB, T.; YABUTAB, K.; OGURIC, T.; TENOVERD, F. C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 40, p. 135–136, 1997.

HODILLE, E.; ROSE, W.; DIEP, B. A.; GOUTELLE, S.; LINA, G.; DUMITRESCO, O. The role of antibiotics in modulating virulence in *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 30, n. 4, p. 887–917, 2017.

HOSOSAKA, Y.; HANAKI, H.; ENDO, H.; SUZUKI, Y.; NAKAE, T.; NAGASAWA, Z.; OTSUKA, Y.; SUNAKAWA, K. Characterization of oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. **J. Infect. Chemother.**, v. 13, p. 79–86, 2007.

HOWDEN, B. P.; DAVIES, J. K.; JOHNSON, P. D. R.; STINEAR, T. P.; GRAYSON, M. L. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection and clinical implications. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 23, p. 99–139, 2010.

HU, C.; XIONG, N.; ZHANG, Y.; RAYNER, S.; CHEN, S. Functional characterization of lipase in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 419, n. 4, p. 617–620, 2012.

HU, C. F.; ZANG, P.-L.; SUI, Y.-F.; LV, J.-S.; ANSARI, M. F.; BATTINI, N.; LI, S.; ZHOU, C.-H.; GENG, R.-X. Ethylenic conjugated coumarin thiazolidinediones as new efficient antimicrobial modulators against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Bioorg. Chem.**, v. 4, 103434, 2020.

HUSEBY, M.; SHI, K.; BROWN, C. K.; DIGRE, J.; MENGISTU, F.; SEO, K. S.; BOHACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M.; OHLENDORF, D. H.; EARHART, C. A. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 189, n. 23, p. 8719–8726, 2007.

HUSEBY, M. J.; KRUSE, A. C.; DIGRE, J.; KOHLER, P. L.; VOCKE, J. A.; MANN, E. E.; BAYLES, K. W.; BOHACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M.; OHLENDORF, D. H. Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 107, n. 32, p. 14407–14412, 2010.

HUSSAIN, F.; KHAN, Z.; JAN, M. S.; AHMAD, S.; AHMAD, A.; RASHID, U.; ULLAH, F.; AYAZ, M.; SADIQ, A. Synthesis, *in-vitro* α -glucosidase inhibition, antioxidant, *in-vivo* antidiabetic and molecular docking studies of pyrrolidine-2,5-dione and thiazolidine-2,4-dione derivatives. **Bioorg. Chem.**, v. 91, 103128, 2019.

IBBERSON C. B.; PARLET, C. P.; KWIECINSKI, J.; CROSBY, H. A.; MEYERHOLZ, D. K.; HORSWILL, A. R. Hyaluronan modulation impacts *Staphylococcus aureus* biofilm infection. **Infect. Immun.**, v. 84, n. 6, p. 1917–1929, 2016.

JADHAV, S.; SHAH, R. M.; BHAVE, M.; PALOMBO, E. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* Planktonic cells and biofilms. **Food Control.**, v. 29, p. 125–130, 2013.

JØRGENSEN, H.; MØRK, T.; HØGÅSEN, H.; RØR VIK, L. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **Journal Appl. Microbiol.**, v. 99, n. 1, p. 158–166, 2005.

JOSHI, P.; MAHAJAN, D.; CHEJARA, D. Facile synthesis and characterization of some new 5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones and their antimicrobial evaluation. **Indian J. Chem.**, v. 59, p. 710–715, 2020.

KAMINSKY, D.; KRYSHCHYSHYN, A.; LESYK, R. 5-Ene-4-thiazolidinones – An efficient tool in medicinal chemistry. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 140, p. 542–594, 2017.

KHADER, R.; THARMALINGAM, N.; MISHRA, B.; FELIX, L. O.; AUSUBEL, F. M.; KELSO, M. J.; MYLONAKIS, E. Characterization of Five Novel Anti-MRSA Compounds Identified Using a Whole-Animal *Caenorhabditis elegans*/*Galleria mellonella* Sequential-Screening Approach. **Antibiotics**, v. 9, n. 8, 449. 2020.

KIM, D. H.; FEINBAUM, R.; ALLOING, G.; EMERSON, F. E.; GARSIN, D. A.; INOUE, H.; TANAKA-HINO, M.; HISAMOTO, N.; MATSUMOTO, K.; TAN, M.W.; AUSUBEL, F. M. A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. **Science**, v. 297, p. 623–626. 2002.

KLAINER, A. S.; BETSCH, C. J. Scanning-Beam Electron Microscopy of Selected Microorganisms. **J. Infect. Dis.**, v. 121, n. 3, p. 339–343, 1970.

KLEIN, S.; HANNESSEN, J.; ZANGER, P.; HEEG, K.; BOUTIN, S.; NURJAD, D. Entry of Pantón–Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* into the hospital: prevalence and population structure in Heidelberg, Germany 2015–2018. **Scientific Reports**, v. 10, 13243, 2020.

KOBAYASHI, S. D.; MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Neutrophils and Bacterial Immune Evasion. **J. Innate Immun.**, v. 10, p. 432–441, 2018.

KONEMAN, E. W. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**, 6ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

KONG, C.; YEHYE, W. A.; ABD RAHMAN, N.; TAN, M. W.; NATHAN, S. Discovery of potential anti-infectives against *Staphylococcus aureus* using a *Caenorhabditis elegans* infection model. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 14, n. 4. 2014.

KONG, K. F.; VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 296, p.133–139, 2006.

KUBDE, V.; DANGRE (MUDEY), G.; MUDEY, A. Healthcare Setting and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Curr. Res. Rev.**, p.123–128. 2020.

KULKARNI, P. S.; KARALE, S. N.; KHANDEBHARAD, A. U.; AGRAWAL, B. R.; SARDA, S. R. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Newer Arylidene Incorporated 4-Thiazolidinones Derivatives as Potential Antimicrobial Agents. **Polycycl. Aromat. Compd.**, p. 1–14, 2020.

KUMAR, H.; DEEP, A.; MARWAHA, R. K. Design, synthesis, in silico studies and biological evaluation of 5-((E)-4-((E)-(substituted aryl/alkyl) methyl) benzylidene) thiazolidine-2,4-dione derivatives. **BMC Chemistry**, v. 14, 2020.

KUMAR, K. S.; RAO, A. L.; RAO, M. V. B. Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of novel 3- substituted-5-[(indol-3-yl) methylene]-thiazolidine-2,4- dione derivatives. **Heliyon**, v. 4, n. 9, e00807, 2018.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genet. Mol. Res.**, v. 2, p. 63–76, 2003.

LECLERCQ, R. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, p. 482–492, 2002.

LEHMAN, M. K. K.; NUXOLL, A. S.; YAMADA, K. J.; KIELIAN, T.; CARSON, S. D.; FEY, P. D. Protease-Mediated Growth of *Staphylococcus aureus* on Host Proteins Is *opp3* Dependent. **mBio**, v. 10, 2019.

LEITE, F. H. A.; SANTIAGO, P. B. G. D. S.; FROES, T. Q.; SILVA FILHO, J.; SILVA, S. G.; XIMENES, R. M.; FARIA, A. R.; BRONDANI, D. J.; ALBUQUERQUE, J. F. C.; CASTILHO, M. S. Structure-guided discovery of thiazolidine-2,4-dione derivatives as a novel class of Leishmania major pteridine reductase 1 inhibitors. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 123, p. 639–648, 2016.

LEVINE, D. P. Vancomycin: a history. **Clin. Infect. Dis.**, v. 42, p. 5–12, 2006.

LIESEN, A. P.; AQUINO, T. M.; LIMA, J. G.; FARIA, A. R.; ALVES, A. J.; GÓES, A. J. S. Métodos de Obtenção, Reatividade e Importância Biológica de 4-Tiazolidinonas. **Quim. Nova**, v. 31, p. 369–376, 2008.

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

LINARDI, V. R.; NETO, N. M. C.; ARAÚJO, P. L.; SILVA, E. F. Isolamento de *Staphylococcus aureus* MRSA entre os funcionários de um hospital geral da região leste de Minas Gerais. **Revista de Saúde Pública do SUS/MG**, v. 2, n. 20, p. 59–64, 2014.

LOPES, L. P.; PIO, D. P. M.; REINATO, L. A. F.; GASPAR, G. G.; PRADRO, M. A.; GIR, E. *Staphylococcus aureus* em profissionais de enfermagem e o perfil de suscetibilidade do microrganismo aos antimicrobianos. **Revista Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 26, n. 2, p. 1–8, 2017.

LOWY, F. D. Medical progress – *Staphylococcus aureus* infections. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, p. 520–532, 1998.

LUJÁN, D. A.; MÁLAGA, J. E. Resistencia a quinolonas en aislados clínicos de *Staphylococcus aureus*. **Perspectivas Médicas**, v. 25, n. 3, p. 48–50, 2014.

MA, Y.; ZHAO, Y.; TANG, J.; TANG, C.; CHEN, J.; LIU, J. Antimicrobial susceptibility and presence of resistance & enterotoxins/enterotoxin-likes genes in *Staphylococcus aureus* from food. **CyTA - Journal of Food**, v. 16, p. 76–84, 2018.

MACHADO, O.V.O.; PATROCÍNIO, M. C. A.; MEDEIROS, M. S.; BANDEIRA, T. J. P. G. **Antimicrobianos: revisão geral para graduandos e generalistas** – Fortaleza: EdUnichristus, 2019.

MACHADO, V.; PARDO, L.; CUELLO, D.; GIUDICE, G.; LUNA, P. C.; VARELA, G.; CAMOU, T.; SCHELOTTO, F. Presence of genes encoding enterotoxins in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from food, food establishment

surfaces and cases of foodborne diseases. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 62, e5, 2020.

MACK, D.; FISCHER, W.; KROKOTSCH, A.; LEOPOLD, K.; HARTMANN, R.; EGGE, H.; LAUFS, R. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. **J. Bacteriol.**, v. 178, p.175–183, 1996.

MAHMOUDI, H.; POURHAJIBAGHER, M.; CHINIFORUSH, N.; SOLTANIAN, A. R.; ALIKHANI, M. Y.; BAHADOR, A. Biofilm formation and antibiotic resistance in methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* isolated from burns. **J. Wound Care.**, v. 28, n. 2, 2019.

MAOR, Y.; HAGIN, M.; BELAUSOV, N.; KELLER, N.; BEN-DAVID, D.; RAHAV, G. Clinical features of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia versus those of methicillin-resistant *S. aureus* bacteremia. **J. Infect. Dis.**, v. 199, p. 619–624, 2009.

MARC, G.; ARANICIU, C.; ONIGA, S. D.; VLASE, L.; PIRNAU, A.; NADAS, G. C.; NOVAC, C. S.; MATEI, I. A.; CHIFIRIUC, M. C.; MARUTESCU, L.; ONIGA, O. Design, Synthesis and Biological Evaluation of New Piperazin-4-yl-(acetyl-thiazolidine-2,4-dione) Norfloxacin Analogues as Antimicrobial Agents. **Molecules**, v. 24, 3959. 2019b.

MARC, G.; STANA, A.; ONIGA, S. D.; PÎRNAU, A.; VLASE, L.; ONIGA, O. New Phenolic Derivatives of Thiazolidine-2,4-dione with Antioxidant and Antiradical Properties: Synthesis, Characterization, In Vitro Evaluation, and Quantum Studies. **Molecules**, v. 24, 2060, 2019a.

MARIUTTI, R. B.; TARTAGLIA, N. R.; SEYFFERT, N.; CASTRO, T. L. P.; ARNI, R. K.; AZEVEDO, V. A.; LE LOIR, Y.; NISHIFUJI, K. Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus* in: **The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus***, p. 127–139, 2017.

MARTINEZ-MARTINEZ, L. Mecanismo de Resistência a los Antimicrobianos. **Revista Médica**, 2016.

MCADOW, M.; KIM, H. K.; DeDENT, A. C.; HENDRICKX, A. P. A.; SCHNEEWIND, O.; MISSIAKAS, D. M. Preventing *Staphylococcus aureus* sepsis through the inhibition of its agglutination in blood. **PLoS Pathog.**, v. 10, 2011.

MEHLHORN, A. J.; BROWN, D. A. Safety concerns with fluoroquinolones. **Annals of Pharmacother.**, v. 41, p. 1859–1866, 2007.

MENOITA, E.; SANTOS, V.; TESTAS, C.; GOMES, C.; SANTOS, A. S. Biofilmes: conhecer a entidade. **J. Aging Innovation**, v. 1, 2012.

MIMICA, M. J.; BEREZIN, E. N. *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina: um problema emergente. **Arq. Med. Hosp. Fac. Cienc. Med. Santa Casa São Paulo.**, v. 51, n. 2, p. 52–56, 2006.

MONROE, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. **PLoS Biol.**, v. 5, n. 11, p. 307, 2007.

MONTEIRO, T.; WYSOCKA, M.; TELLEZ, E.; MONTEIRO, O.; SPENCER, L.; VEIGA, E.; MONTEIRO, S.; DE PINA, C.; GONÇALVES, D.; DE PINA, S.; CORREIA, L.; MORENO, J.; CONCEIÇÃO, T.; SOUSA, M.A.; DE LENCASTRE, H.; GRAY, L. J.; PAREEK, M.; JENKINS, D. R.; BELEZA, S.; OGGIONI, M. R.; ARAUJO, I. I. A five-year retrospective study shows increasing rates of antimicrobial drug resistance in Cabo Verde for both *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **J. Glob. Antimicrob. Resist.**, p. 483–487, 2020.

MOREIRA, A. C. M. G.; SANTOS, R. R. R.; BEDENDO, J. Prevalência e perfil de sensibilidade de *Staphylococcus aureus* isolados em pacientes e equipe de enfermagem. **Revista Ciência, Cuidado e Saúde**, v. 12, n. 3, p. 574–581, 2013.

MOURA, J. P.; PIMENTA, F. C.; HAYASHIDA, M.; CRUZ, E. D. A.; CANINI, S. R. M. S.; GIR, E. A colonização dos profissionais de enfermagem por *Staphylococcus aureus*. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 19, n. 2, p. 325–331, 2011.

MURRAY, C. J. L. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis, **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**, 6ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NAMVAR, A. E.; KHODAEI, F.; BIJARI, A.; LARI, A. R. Detection of integrons and Staphylococcal Cassette Chromosome (SCCmec) types in *Staphylococcus aureus* isolated from burn and non-burn patients. **Int. J. Health Sci.**, v. 9, n. 4, 2015.

NERI, F. S. M.; JÚNIOR, D. B. C.; FROES, T. Q.; SILVA, P. B. G.; EGITO, M. S.; MOREIRA, P. O. L.; VAROTTI, F. P.; CASTILHO, M. S.; TEIXEIRA-NETO, R. G.; ALBUQUERQUE, J. F. C.; LEITE, F. H. A. Antileishmanial activity evaluation of thiazolidine-2,4-dione against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*. **Parasitol. Res.**, v. 119, p. 2263–2274, 2020.

OGSTON, A. Micro-organisms in surgical diseases. **Brit. Med. J.**, 1881.

OLIVEIRA, A. C.; PAULA, A. O.; IQUIAPAZA, R.; GAMA, C. S. Perfil dos microrganismos associados à colonização e infecção em Terapia Intensiva. **Rev. Epidemiol. Cont. Infec.**, v. 7, n. 2, p.101–106, 2017.

OLIVEIRA, D.; BORGES, A. A.; SIMÕES, M. *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. **Toxins**, v. 10, n. 6, 252, 2018.

OLIVEIRA, D. C.; LENCASTRE, H. Methicillin-Resistance in *Staphylococcus aureus* Is Not Affected by the Overexpression in Trans of the *mecA* Gene Repressor: A Surprising Observation. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, e23287, 2011.

OLIVEIRA, G. A.; DELL'AQUILA, A. M.; MASIERO, R. L.; LEVY, C. E.; GOMES, M. S.; CUI, L.; HIRAMATSU, K.; MAMIZUKA, E. M. Isolation in Brazil of Nosocomial *Staphylococcus aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin. **Infect. Cont. Hosp. Epidemiol.**, v. 22, n. 7, p. 443–448, 2001.

OLIVEIRA, R. F. S.; SANTOS, R. S.; SANTOS, G. Q. B. B.; FARRE, A. G. M. C.; SANTANA, I. T. S.; CAVALCANTI, R. C. M. Contaminação por *Staphylococcus aureus* em celulares de profissionais da saúde em unidade de terapia intensiva. **Rev. Renome**, v. 9, n. 2, p. 98–105, 2021.

OLSON, M. E.; NYGAARD, T. K.; ACKERMANN, L.; WATKINS, R. L.; ZUREK, O. W.; PALLISTER, K. B.; GRIFFIN, S.; KIEDROWSKI, M. R.; FLACK, C. E.; KAVANAUGH, J. S.; KREISWIRTH, B. N.; HORWILL, A. L.; VOYICH, J. M. *Staphylococcus aureus* nuclease is an SaeRS-dependent virulence factor. **Am. Soc. Microbiol.**, v. 81, n. 4, p. 1316–1324, 2013.

ÖNEN-BAYRAM, F. E.; BURAN, K.; DURMAZ, I.; BERK, B.; CETIN-ATALAY, R. 3-propionyl-thiazolidine-4-carboxylic acid ethyl esters: a Family of Antiproliferative Thiazolidines. **Med. Chem. Commun.**, v. 6, p. 90–93, 2013.

OPPERMAN, T.; KWASNY, S. M.; WILLIAMS, J. D.; KHAN, A. R.; PEET, N. P.; MOIR, D. T.; BOWLIN, T. L. Aryl Rhodanines Specifically Inhibit Staphylococcal and Enterococcal Biofilm Formation. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, n. 10, p. 4357–4367. 2009.

PAIVA, R. K. C.; SILVA, J. F.; MOREIRA, H. A.; PINTO, O. G.; CAMARGO, L. T. F. M.; NAVES, P. L. F.; CAMARGO, A. J.; RIBEIRO, L.; RAMOS, L. M. Synthesis, Antimicrobial Activity and Structure-Activity Relationship of Some 5-Arylidene-thiazolidine-2,4-dione Derivatives. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 30, n. 1, p. 164–172, 2019.

PANDEY, Y.; SHARMA, P. K.; KUMAR, N.; SINGH, A. Biological Activities of Thiazolidine – A Review. **Int. J. Pharmtech Res.**, v. 3, n. 2, p. 980–985, 2011.

PARRA, G. I. M.; GIOVANETTI, M. C. Y.; HERNÁNDEZ, A. Z. Fenótipos de resistencia a meticilina, macrólidos y lincosamidas en *Staphylococcus aureus* aislados de un hospital de Valledupar, Colombia. **Rev. Cienc. Salud.**, v. 14, p. 223–230, 2016.

PARSONNET, J.; HANSMANN, M. A.; DELANEY, M. L.; MODERN, P. A.; DUBOIS, A. M.; WIELAND-ALTER, W.; WISSEMAN, K. W.; WILD, J. E.; JONES, M. B.; SEYMOUR, J. L.; ONDERDONK, A. B. Prevalence of toxic shock syndrome toxin 1-producing *Staphylococcus aureus* and the presence of antibodies to this superantigen in menstruating women. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 9, p. 4628–4634, 2005.

PARTHASARATHY, A. K.; CHOUGALE, R. A. **Antibiotic Resistant *Staphylococcus aureus***. IntechOpen Book Series, 2021.

PENA, D. R.; KOBAYASHI, C. C. B. A.; VIEIRA, J. D. G.; SADOYAMA, G. Perfil de resistência dos *Staphylococcus aureus* isolados de sangue e cateter. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 19, p. 388–396, 2014.

PERCIVAL, S. L.; MCCARTY, S. M.; LIPSKY, B. Biofilms and Wounds: An Overview of the Evidence. **Adv. Wound Care**, v. 4, n. 7, 2015.

PEREZ DE LA O, A. D.; GARCIA-ROMERO, M. T. Impétigo ampoloso. **Acta Pediatr. Mex.**, v. 38, n. 5, p. 351–354, 2017.

PEREIRA, J. N. P.; RABELO, M. A.; LIMA, J. L. C.; NETO, A. M. B.; LOPES, A.C.S.; MACIEL, M. A. V. Phenotypic and molecular characterization of resistance to macrolides, lincosamides and type B streptogramin of clinical isolates of *Staphylococcus* spp. of a University hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 20, n. 3, p. 276–281, 2016.

PETINAKI, E.; PAPAGIANNITSIS, C. Resistance of Staphylococci to Macrolides-Lincosamides-Streptogramins B (MLSB): Epidemiology and Mechanisms of Resistance. In: HEMEG, H.; OZBAK, H.; AFRIN, F. (Eds.), ***Staphylococcus Aureus***, IntechOpen, 2018.

PIAO, Y. L.; RAM SONG, A.; CHO, H. Cell-based biological evaluations of 5-(3-bromo-4-phenethoxybenzylidene) thiazolidine-2, 4-dione as promising wound healing agent. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 23, p. 2098–2103, 2015.

PRABHAKAR, Y. S.; SOLOMON, V. R.; GUPTA, M. K.; KATTI, S. B. QSAR Studies on Thiazolidines: A Biologically Privileged Scaffold. **Top. Heterocycl. Chem.**, v. 4, p. 161–249, 2006.

PRASAD, D.; KUMAR, A.; SHUKLA, P. K.; NATH, M. Design, Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Novel 2-aryl-thiazolidin-4-one Derivatives. **Org. Med. Chem. Lett.**, v. 1, n. 1, 4, 2011.

PROULX, M. K.; PALACE, S. G.; GANDRA, S.; TORRES, B.; WEIR, S.; STILES, T.; ELLISON, R. T.; GOGUEN, J. D. Reversion from Methicillin Susceptibility to Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* During Treatment of Bacteremia. **J. Infect. Dis.**, v. 213, p. 1041–1048, 2016.

RABELO, M. A.; BEZERRA NETO, A. M.; LOIBMAN, S. O.; LIMA, J. L. C.; FERREIRA, E. L.; LEAL, N. C.; MACIEL, M. A. V. The occurrence and dissemination of methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus* in samples from patients and health professionals of a university hospital in Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 47, n. 4, p. 437–446, 2014.

RABIN, N.; ZHENG, Y.; OPOKU-TEMENG, C.; DU, Y.; BONSU, E.; SINTIM, H. O. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Fut. Med. Chem.**, v. 7, n. 4, p. 493–512, 2015.

REDDY, M. U.; REDDY, M. C. S. Synthesis and Antidiabetic Evaluation of 5-(2-Methoxy-6-pentadecylbenzylidene)-3-alkyl/aryl substituted thiazolidine-2,4-dione Derivatives. **Asian J. Chem.**, v. 30, n. 6, p. 1231–1236, 2018.

RÊGO, M. J. B. M.; AZOUBEL-ANTUNES, A.; BEZERRA, M. B. C. F.; PEREIRA, C. P.; SILVA, J. C.; LINS E LINS, T. U.; SARINHO, E. S. C.; AMORIM, C. A. C.; LIMA, M. C. A.; GALDINO-PITTA, M. R.; PITTA, I. R.; PITTA, M. G. R. Ability of two new thiazolidinediones to downregulate proinflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells from children with asthma. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 54, n. 03, e00049, 2018.

REINATO, L. A. F.; PEREIRA, F. M. V.; LOPES, L. P.; PIO, D. P. M. Colonização nasal em profissionais de enfermagem de unidades especializadas em HIV/aids. **Rev. Bras. Enf.**, v. 68, n. 2, p. 320–324, 2015.

REIS, L. E.; SILVA, W.; CARVALHO, E. V.; FILHO, A. C.; BRAZ, M. R. Contaminação de telefones celulares da equipe multiprofissional em uma unidade de terapia intensiva. **Rev. Saber Dig.**, v. 8, n. 1, p. 68–83, 2015.

REKHA, S.; CHANDRASHEKHARA, S. Antioxidant activity of 5-(substituted benzylidene) thiazolidinedione derivatives. **World J. Pharm. Res.**, v. 6, p. 878–892, 2017.

RENNER, J. D. P.; CARVALHO, E. D. Microrganismos isolados de superfícies da UTI adulta em um hospital do Vale do Rio Pardo–RS. **Rev. Epidemiol. Cont. Infec.**, v. 3, n. 2, p. 40–44, 2013.

RIGATTI, F.; TIZOTTI, M. K.; HÖRNER, R.; DOMINGUES, V. O.; MARTINI, R.; MAYER, L. E.; KHUN, F. T.; FRANÇA, C. A.; COSTA, M. M. Bacteremias por *Staphylococcus* coagulase negativos oxacilina resistentes em um hospital escola na cidade de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, n. 6, 2010.

ROCCHETTI, T. T.; MARTINS, K. B.; MARTINS, P. Y. F.; OLIVEIRA, R. A.; MONDELLI, A. L.; FORTALEZA, C. M. C. B.; CUNHA, M. L. R. S. Detecção do gene *mecA* e identificação de *Staphylococcus* diretamente de garrafas de hemocultura pela reação em cadeia da polimerase multiplex. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 2, n. 2, p. 99–105, 2018.

ROCHA, R. F.; RODRIGUES, T.; MENEGATTIA, A. C. O.; BERNARDES, G. J. L.; TERENCE, H. The antidiabetic drug lobeglitazone has the potential to inhibit PTP1B activity. **Bioorg. Chem.**, v.100, 103927, 2020.

RODRIGUES, M. A. Caracterização dos SCCmec e produção de biofilme em *Staphylococcus aureus* no hospital universitário de Santa Maria. Tese de Doutorado (UFSM). 2017a.

RODRIGUES, M. A.; GINDRI, L.; SILVA, A. D.; GUERX, C. G.; SANTOS, S. O.; HÖRNER, R. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital in the South of Brazil. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 51, n. 1, p. 35–41, 2015.

RODRIGUES, M. D. R.; SANTIAGO, P. B. G. S.; MARQUES, K. M. R.; PEREIRA, V. R. A.; CASTRO, M. C. A. B.; CANTALICE, J. C. L. L.; SILVA, T. G.; ADAM, M. L.; NASCIMENTO, S. C.; 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. **Pharmacol. Rep.**, v. 70, p. 446–454, 2018.

RODRIGUES, M. V. P.; FORTALEZA, C. M. C. B.; RIBOLI, D. F. M.; ROCHA, R. S.; ROCHA, C.; CUNHA, M. L. R. S. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a burn unit from Brazil. **Burns**, v. 39, n. 6, p. 1242–1249, 2013.

RODRIGUES-SILVA, C.; MANIERO, M. G.; PERES, M. S.; GUIMARÃES, J. R. Ocorrência e degradação de quinolonas por processos oxidativos avançados. **Quim. Nova**, v. 37, n. 5, p. 868–885, 2014.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência Bacteriana** - Interpretando o Antibiógrama. São Paulo: Atheneu, 2006.

ROSSI, F.; DIAZ, L.; WOLLAM, A.; PANESSO, D.; ZHOU, Y.; RINCON, S.; NARECHANIA, A.; XING, G.; DI GIOIA, T. S.; DOI, A.; RAN, T. T.; REYES, J. Transferable Vancomycin Resistance in a Community-Associated MRSA Lineage. **N. Engl. J. Med.**, v. 370, p.1524–1531, 2014.

RUTHERFORD, S. T.; BASSLER, B. L. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.**, v. 2, 2012.

SAEED, K.; AHMAD, N.; DRYDEN, M.; CORTES, N.; MARSH, P.; SITJAR, A.; WYLLIE, S.; BOURNE, S.; HEMMING, J.; JEPPESEN, C.; GREEN, S. Oxacillin susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA), a hidden resistant mechanism among clinically significant isolates in the Wessex region/UK. **Infection**, v. 42, n. 5, p. 843–847, 2014.

SALES, L. M.; SILVA, T. M. *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente: Um Desafio Para A Saúde Pública. **Acta Biomed. Bras.**, v. 3, n. 1, 2012.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab. Press, 3^a Ed, 2001.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; MENDONÇA, M. B. O. C. Estafilococos em alimentos. **Arq. Inst. Biol.**, v. 77, n. 3, p. 545–554, 2010.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 6, p. 413–423, 2007.

SCHILCHER, K.; HORSWILL, A. R. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 84, n. 3, e00026-19, 2020.

SCHLEIFER, K. H.; BELL, J. A. *Staphylococcaceae* fam. nov. In: List of New Names and New Combinations Previously Effectively, but Not Validly, Published, Validation List, no. 132. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 60, p. 469–472, 2010.

SCHLIEVERT, P. M.; CAHILL, M. P.; HOSTAGER, B. S.; BROSNAHAN, A. J.; KLINGELHUTZ, A. J.; GOURRON, F. A.; BISHOP, G. A.; LEUNG, D. Y. M. Staphylococcal Superantigens Stimulate Epithelial Cells through CD40 to produce chemokines. **Am. Soc. Microbiol.**, v. 10, 2019.

SCHWALBE, R.; STEELE-MOORE, L.; GOODWIN, A. C. **Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols**. CRC Press. Taylor & Francis Group, 2007.

SHAIKH, F. M.; PATEL, N. P.; SANNA, G.; BUSONERA, B.; LA COLLA, P.; RAJANI, D. P. Synthesis of some new 2-amino-6-thiocyanato benzothiazole derivatives bearing 2,4-thiazolidinediones and screening of their in vitro antimicrobial, antitubercular and antiviral activities. **Med. Chem. Res.**, v. 24, p. 3129–3142, 2015.

SHARIATI, A.; DADASHI, M.; MOGHADAM, M. T.; BELKUM, A. V.; YASLIANIFARD, S.; DARBAN-SAROKHALIL, D. Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 10, 2020.

SHARMA, M.; SMITH, D.; TURNER, C. E; GAME, L.; PICHON, B.; HOPE, R.; HILL, R.; KEARNS, A.; SRISKANDAN, S. Clinical and Molecular Epidemiology of *Staphylococcal* Toxic Shock Syndrome in the United Kingdom. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 24, n. 2, p. 258–266, 2018.

SIEVERT, M. S.; RUDRICK, J. T.; PATEL, J. B.; MCDONALD, C. J.; WILKINS, M. J.; HAGEMAN, J. C. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002–2006. **J. Infect. Dis.**, v. 46, p. 668–674, 2008.

SILVA, D. M.; MENEZES, E. M. N.; SILVA, E. V.; LAMOUNIER, T. A. C. Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of ESKAPE pathogens from the Federal District, Brazil. **J. Bras. Pat. Med. Lab.**, v. 53, n. 4, p. 240–245, 2017.

SILVA, E. C. B. F.; SAMICO, T. M.; CARDOSO, R. R.; RABELO, M. A.; NETO, A. M. B.; MELO, F. L.; LOPES, A. C. S.; ACA, I. S.; MACIEL, M. A. Colonização pelo *Staphylococcus aureus* em profissionais de enfermagem de um hospital escola de Pernambuco. **Rev. Esc. Enferm. USP.**, v. 46, n. 1, p. 132–137, 2012.

SILVA, E. R.; SILVA, N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in South Easter Brazilian herds. **Can. J. Vet. Res.**, v. 69, p. 290–264, 2005.

SILVA, I. M.; SILVA FILHO, J.; SANTIAGO, P. B. G. S.; EGITO, M. S.; SOUZA, C. A.; GOUVEIA, F. L.; XIMENES, R. M.; SENA, K. X. F. R.; FARIA, A. R.; BRONDANI, D. J.; ALBUQUERQUE, J. F. C. Synthesis and Antimicrobial Activities of 5-Arylidene-thiazolidine-2,4-dione Derivatives. **BioMed Res. Int.**, v. 2014, 316082, 2014.

SILVEIRA, F. B.; BIERHALS, N. D.; ORTOLAN, S. A.; BRIXNER, B.; RENNER, J. D. P. Superfícies Inanimadas Podem Ser Fontes de Contaminação Estafilocócica em UTI? **Rev. Ensaios**, v. 24, n. 4, p. 444–448, 2020.

SILVEIRA, S. M.; JUNIOR, A. C.; SCHEUERMANN, G. N.; SECCHI, F. L.; VERRUCK, S.; KROHN, M.; VIEIRA, C. R. W. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). **Rev. Inst. Adolfo Lutz.**, v. 71, p. 471–480, 2012.

SOMASEKHAR, V.; UDAINIYA, R.; KUMAR, S. Synthesis and evaluation of Anti-proliferative Activity of novel Thiazolidine derivatives. **Int. J. Pharm. Sci. Res.**, v. 9, p. 3449–3453, 2018.

SOUSA, D. M.; SOUSA, A. F. L.; IBIAPINA, A. R. S.; QUEIROZ, A. A. F. L. N.; MOURA, M. E. B.; ARAÚJO, T. M. E. Infecção por *Staphylococcus aureus* resistente em unidades de terapia intensiva: revisão integrativa. **Rev. Enf. UFPE online**, v. 10, n. 4, p.1315–1323, 2016.

SRIVASTAVA, A. R.; BHATIA, R.; CHAWLA, P. Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of novel 3,5-disubstituted 2,4-thiazolidinediones derivatives. **Bioorg. Chem.**, v. 89, 102993, 2019.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; S`VABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J. Microbiol. Met.**, v. 40, p.175–179, 2000.

SUCHETA, S. T.; VERMA, P. K. Synthesis, SAR and in vitro therapeutic potentials of thiazolidine-2,4-diones. **Chem. Cent. J.**, v. 12, n. 1, 129, 2018.

TABOR, D. E.; YU, L.; MOK, H.; TKACZYK, C.; SELLMAN, B. R.; WU, Y.; OGANESYAN, V.; SLIDEL, T.; JAFRI, H.; MCCARTHY, M.; BRADFORD, P.; ESSER, M. T. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin is conserved among diverse hospital respiratory isolates collected from a global surveillance study and is neutralized by monoclonal antibody MEDI4893. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 60, p. 5312–5321, 2016.

TALEBI, G.; HASHEMIA, A.; GOUDARZI, H.; SHARIATI, A.; BOSTANGHADIRI, N.; SHARAH, J. Y.; ABBS, E. Survey of ermA, ermB, ermC and mecA genes among *Staphylococcus aureus* isolates isolated from patients admitted to hospitals in Tehran, Iran by PCR and sequencing. **Biomed. Res.**, v. 30, n. 2, p. 259–263, 2019.

TAMPAKAKIS, E.; OKOLI, I.; MYLONAKIS, E. A *C. elegans*-based, whole animal, in vivo screen for the identification of antifungal compounds. **Nature Protocols**, v. 3, n. 12, p. 1925–1931, 2008.

TANG, J. N.; ZHANG, R.; CHEN, J.; ZHAO, Y. Y.; TANG, C.; YUE, H.; SHI, H. Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food markets. **Ann. Microbiol.**, v. 65, p. 279–286, 2015.

TARANALLI, A. D.; THIMMAIAH, N. V.; SRINIVAS, S.; SARAVANAN, E. Anti-inflammatory, analgesic and antiulcer activity of certain thiazolidinones. **A. J. Pharm. Clin. Res.**, v. 2, p. 79–83, 2009.

TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR γ): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose, Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 51, p. 526–533, 2007.

TENOVER, F. C. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Perfect but Geographically Limited Storm? **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, p. 675–677, 2008.

THARMALINGAM, N.; KHADER, R.; FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. The Anti-virulence Efficacy of 4-(1,3-Dimethyl-2,3-Dihydro-1H-Benzimidazol-2-yl)Phenol Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Front. Microbiol.**, v. 10, 1557, 2019.

THOMER, L.; SCHNEEWIND, O.; MISSIAKAS, D. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 11, p. 343–364, 2016.

THUAN, N. T.; DUNG, D. T. M.; QUE, D. N.; DUNG, P. T. P.; VU, T. K.; HAHN, H.; HAN, B. W.; KIM, Y.; HAN, S.; NAM, N. Synthesis and bioevaluation of new 5-enzyldenethiazolidine-2,4-diones bearing benzenesulfonamide moiety. **Med. Chem. Res.**, v. 24, p. 3803–3812, 2015.

THURLOW, L. R.; HANKE, M. L.; FRITZ, T.; ANGLE, A.; ALDRICH, A.; WILLIAMS, S. H.; ENGBRETSSEN, I. L.; BAYLES, K. W.; HORSWILL, A. R.; KIELIAN, T. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage Phagocytosis and Attenuate Inflammation In Vivo. **J. Immunol.**, v. 186, p. 6585–6596, 2011.

TILEKAR, K.; UPADHYAY, N.; SCHWEIPERT, M.; HESS, J. D.; MACIAS, L. S. H.; MROWKAD, P.; MEYER-ALMESB, F.; AGUILERA, R. J.; IANCU, C. V.; CHOE, J.; RAMAA, C. S. Permuted 2,4-thiazolidinedione (TZD) analogs as GLUT inhibitors and their *in-vitro* evaluation in leukemic cells. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 154, 105512, 2020.

TOMASIC, T.; ZIDAR, N.; MUELLER, P. M.; KIKELJ, D.; MASIC, L. P. Synthesis and antibacterial activity of 5-ylidenethiazolidin-4-ones and 5-benzylidene-4,6-pyrimidinediones. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, p. 1667–1672, 2010.

TONG, S. Y, C.; DAVIS, J. S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T. L.; FOWLER JR., V. G. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clin. Microbiol. Res.**, v. 28, p. 603–661, 2015.

TROTSKO, N.; KOSIKOWSKA, U.; PANETH, A.; PLECH, T.; MALM, A.; WUJEC, M. Synthesis and Antibacterial Activity of New Thiazolidine-2,4-dione-Based Chlorophenylthiosemicarbazone Hybrids. **Molecules**, v. 23, 1023, 2018b.

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, rhodamine and 2-thiohydantoin moieties. **Saudi Pharm. J.**, v. 26, p. 568–577, 2018a.

TROTSKO, N.; PRZEKORA, A.; ZALEWSKA, J.; GINALSK, G.; PANETHA, A.; WUJEC, M. Synthesis and in vitro antiproliferative and antibacterial activity of new thiazolidine-2,4-dione derivatives. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.**, v. 33, n. 1, p.17–24, 2018c.

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Pub. Mex.**, v. 47, p. 381–387, 2005.

VERMA, A.; SARAF, S. K. 4-Thiazolidinone - A biologically active scaffold. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 43, p. 897–905, 2008.

WILKINS, A. L.; STEER, A. C.; SMEESTERS, P. R.; CURTIS, N. Toxic Shock Syndrome - the seven Rs of management and treatment. **J. Infect.**, v. 74, p. 147–152, 2017.

WU, S.; DUAN, N.; GU, H.; HAO, L.; YE, H.; GONG, W.; WANG, Z. A Review of the Methods for Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, v. 8, n. 7, p. 176–196, 2016.

YEINY, A. R.; MESSARIA, G. P.; KUTCHYNSKAYA, V. L.; MARIBEL, C. G.; SONIA, R. A.; ALFREDO, L.; GRESLEIDA, R. V.; LISETTE, S. T. Producción de Enterotoxina y Biofilm en Aislamientos Clínicos de *Staphylococcus* Resistente a Meticilina. **Kasmera**, v. 42, n. 2, p. 105–155, 2014.

YOUSSEF, A. M.; WHITE, M. S.; VILLANUEVA, E.; EL-ASHMAWY, I. M.; KLEGERIS, A. Synthesis and biological evaluation of novel pyrazolyl-2,4-thiazolidinediones as anti-inflammatory and neuroprotective agents. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 18, p. 2019–2028, 2010.

ZECCONI, A.; SCALI, F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defences in human and animal diseases. **Immunol. Lett.**, v. 150, p.12–22, 2013.

ZHAO, G.; USUI, M. L.; LIPPMAN, S. I.; JAMES, G. A.; STEWART, P. S.; FLECKMAN, P.; OLERUD, J. E. Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds. **Adv. Wound Care**, v. 2, n. 7, p. 389–399, 2013.

ZHENG, Z.; LIU, Q.; KIM, W.; THARMALINGAM, N.; FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Antimicrobial activity of 1,3,4-oxadiazole derivatives against planktonic cells and biofilm of *Staphylococcus aureus*. **Fut. Med. Chem.**, v. 10, n. 3, p. 283–296, 2018.