



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

ADJA MARIA DE MELO BATISTA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BLOQUEADORA DE DERIVADOS
TIOSEMICARBAZONAS FRENTE ÀS TOXINAS SECRETADAS PELA
BACTÉRIA *Staphylococcus aureus*: UM ESTUDO EXPERIMENTAL E
COMPUTACIONAL**

Recife
2025

ADJA MARIA DE MELO BATISTA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BLOQUEADORA DE DERIVADOS
TIOSEMICARBAZONAS FRENTE ÀS TOXINAS SECRETADAS PELA BACTÉRIA
Staphylococcus aureus: UM ESTUDO EXPERIMENTAL E COMPUTACIONAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Me. Wyndly Daniel Cardoso Gaião

Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Batista, Adja Maria de Melo.

Avaliação da atividade bloqueadora de derivados tiossemicarbazonas frente às toxinas secretadas pela bactéria *Staphylococcus aureus*: um estudo experimental e computacional / Adja Maria de Melo Batista. - Recife, 2025.

40 p. : il., tab.

Orientador(a): Wyndly Daniel Cardoso Gaião

Coorientador(a): Cláudio Gabriel Rodrigues

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2025.

Inclui referências.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Toxinas. 3. Tiossemicarbazonas. 4. Docking Molecular. 5. Hemólise. I. Gaião, Wyndly Daniel Cardoso . (Orientação). II. Rodrigues, Cláudio Gabriel. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

ADJA MARIA DE MELO BATISTA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BLOQUEADORA DE DERIVADOS
TIOSEMICARBAZONAS FRENTE ÀS TOXINAS SECRETADAS PELA BACTÉRIA
Staphylococcus aureus: UM ESTUDO EXPERIMENTAL E COMPUTACIONAL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Me. Wyndly Daniel Cardoso Gaião
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Biofísica e Radiobiologia

Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Biofísica e Radiobiologia

Prof^a. Dr^a. Dijanah Cota Machado
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Biofísica e Radiobiologia

Me. Túlio Queiroga Faustino
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Biofísica e Radiobiologia

Dedico este trabalho à minha família, tanto de sangue quanto àqueles que considero como tal. Sem o apoio inestimável de cada um de vocês, esta jornada teria sido muito mais difícil.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me dar forças e me guiar por tantos momentos tortuosos. Sem Ele, não teria a coragem necessária para concluir esta longa jornada.

Agradeço a meu orientador, Wyndly Daniel, por todo carinho e suporte desde nosso primeiro contato, por estar sempre disponível e por tão gentilmente sanar minhas dúvidas. Você foi uma parte fundamental deste trabalho.

Agradeço ao meu coorientador, Cláudio Gabriel, pela disponibilidade e paciência. Sem sua experiência, o caminho seria bem mais complicado.

À Dijanah Cota Machado, por ter acreditado em mim quando nem eu mesmo acreditava, sendo meu suporte e orientação. Por ter sido tão receptiva e calorosa desde o meu primeiro contato, seu amor pela profissão me mostrou novos caminhos.

Agradeço à minha mãe, Niedja, por estar ao meu lado desde o primeiro passo da graduação até a linha de chegada desta jornada. Por todas as manhãs na qual se levantava pela madrugada apenas para me ver sair, desejar boa sorte e me abençoar. Seu carinho e cuidado foram o meu alicerce todo esse tempo. Não chegaria até aqui sem você.

Ao meu pai, Adeildo, que sempre respeitou todas as minhas decisões e ensinou a importância de fazer escolhas difíceis. Por muito tempo neste período, nos víamos rapidamente, mesmo morando na mesma casa, porém sua alegria e cuidado sempre me deram força e serviram de exemplo. Obrigada por sempre estar disposto a fazer qualquer coisa para facilitar o meu caminho.

À minha irmã, Alanne, que mesmo me irritando em boa parte do tempo, sempre estava disponível para me ouvir e me apoiar. Nossas conversas foram essenciais para tudo isto acontecer. Obrigada por estar comigo.

Ao meu parceiro da vida, Márcio, que o destino fez questão de pôr em meu caminho. Em todos os momentos, bons ou ruins, você estava lá por mim e, independente do que o futuro nos guarda, você foi e é meu porto seguro todo esse tempo. Obrigada por ter me apoiado durante todos esses anos de doenças, perdas e estresse. Sem seu amor e suporte esse caminho seria muito mais difícil.

À Anna Beatriz, minha fita complementar. Obrigada por todo apoio, suporte, carinho, atenção e esforço, pois sei que para você não foi fácil estar presente em todos os momentos e com toda sua alegria. Após conhecer você, minha graduação ganhou

cor, e eu entendi que não era apenas algo mecânico. Obrigada por continuar a me apoiar, mesmo por caminhos tortuosos, aqui ou no Japão.

A toda a equipe do Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-Tronco — Dr. Oleg Krasilnikov (LBM-CT), Professora Dijanah, Professor Cláudio, meus amigos de trabalho Túlio Queiroga, Wyndly Daniel, Maria Isabel e Arthur van Lauter (minha fada madrinha). Obrigada por todo o carinho e suporte, pelas conversas, pelas trocas de experiências e conhecimentos. Com vocês, construí meu lugar seguro dentro da Universidade. Posso dizer que esta foi minha segunda casa durante esses anos.

A toda equipe do Laboratório Municipal Luiz Cabral de Oliveira, minha mentora Vanessa Gislayne (que suportou pacientemente todas as minhas crises de hipocondria e me apoiou nos momentos mais desafiadores), todas as biomédicas e técnicas e minhas amigas de trabalho, Cecília e Giovanna (sem vocês minha experiência seria muito menos divertida. Obrigada por serem tão ótimas amigas e ouvintes).

A toda equipe do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Barão de Lucena, pelos valiosos meses de experiências e conhecimentos, sem dúvidas, foi de grande importância para o meu crescimento profissional.

Aos meus animais de estimação, Preta e Scooby. Minha Preta, que me deixou durante o percurso, obrigada por ter sido tão forte e ter sido o meu suporte emocional por tantos anos. Scooby, que chegou como furacão, muito semelhante à sua personalidade, obrigada por ter enchido meus dias de alegria novamente.

À minha psicóloga, Nathália Silva, que me ajudou a superar e descobrir tantas coisas neste processo. Te encontrei no momento certo, sem você não teria passado por todas as crises, pânico e dúvidas de forma saudável.

Agradeço também a Elivania, Nizarelle, Maria Beatriz, e todos os amigos que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

"Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar."
Josué 1:9

BATISTA, Adja Maria de Melo. **Avaliação da atividade bloqueadora de derivados tiossemicarbazonas frente às toxinas secretadas pela bactéria *Staphylococcus aureus*: um estudo experimental e computacional**. 2025. 40 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) — Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

RESUMO

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é uma bactéria gram-positiva, patógeno oportunista, podendo desencadear em humanos diversos tipos de manifestações clínicas, desde infecções simples até doenças mais graves, sendo classificado pela Organização Mundial da Saúde como patógeno de alta prioridade no esforço global para o desenvolvimento de novos fármacos. Secreta diversas toxinas, onde as hemolisinas ganham destaque, pois auxiliam na sua patogenicidade. Com isso, esta pesquisa teve o objetivo de investigar as interações moleculares e calcular as energias de interação existentes entre os compostos tiossemicarbazonas LQIT/LT-75, LQIT/LT-78 e LQIT/LT-89 e as toxinas proteicas alfa, beta e gama-hemolisinas secretadas pela bactéria *S. aureus*, por meio de *docking* molecular e, experimentalmente, avaliar a atividade de tais derivados na inibição da hemólise induzida pelos canais iônicos da α -HL de *S. aureus*. Para as análises computacionais, por meio do *docking* molecular, foi obtido do PDB (Protein Data Bank) a estrutura cristalográfica da alfa-hemolisina (PDB ID 7AHL), beta-hemolisina (PDB ID 3I5V) e gama-hemolisina (PDB ID 3B07) de *S. aureus*. As estruturas químicas dos derivados tiossemicarbazonas LQIT/LT-75, LQIT/LT-78 e LQIT/LT-89 foram desenhadas no programa MolView. As estruturas foram submetidas à minimização de energia utilizando o programa Avogadro 1.1.1, para ser realizado os estudos de *docking* utilizando o programa DockThor, e, para análise dos resultados, foi utilizado o programa Discovery Studio Visualizer. Para avaliar a atividade anti-hemolítica dos derivados tiossemicarbazonas frente à ação da alfa-hemolisina em hemácias de coelho, foram realizados ensaios hemolíticos em microplacas de 96 poços, onde a quantificação de hemólise foi obtida de acordo com o nível de lise celular por meio de análises em um leitor de microplacas, a extensão da lise foi analisada durante 30 minutos, mensurando a absorbância de cada poço a 655 nm em intervalos de 5 minutos. O derivado LQIT/LT-78 se destacou por apresentar a maior quantidade de interações intermoleculares e a maior energia de afinidade. Seu desempenho foi superior ao dos outros derivados, especialmente em relação à região troncular das toxinas alfa-hemolisina e gama-hemolisina. Sendo importante citar também, o desempenho do composto LQIT/LT-75, na qual obteve um bom desempenho frente a região central da beta-hemolisina. Experimentalmente, observou-se que os três derivados inibiram a hemólise pela alfatoxina de maneira concentração-dependente. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os derivados nas diferentes concentrações testadas. Adicionalmente, houve um aumento do tempo necessário para a redução de 50% da viabilidade celular em todos os compostos testados. Desta forma, pode se concluir que os derivados analisados apresentaram resultados promissores como atividade bloqueadora e anti-hemolítica, porém, faz-se necessário mais estudos experimentais e computacionais para complementar a discussão e elucidação do efeito dos derivados tiossemicarbazonas frente às toxinas secretadas pela bactéria *S. aureus*.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. Toxinas. Tiossemicarbazonas. *Docking* Molecular. Hemólise.

BATISTA, Adja Maria de Melo. **Evaluation of the blocking activity of thiosemicarbazone derivatives against toxins secreted by the bacterium *Staphylococcus aureus*: an experimental and computational study.** 2025. 40 pages. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) — Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is a gram-positive bacteria, an opportunistic pathogen that can trigger different types of clinical manifestations in humans, from simple infections to more serious diseases, being classified by the World Health Organization as a high priority pathogen in the global effort to develop new drugs. It secretes several toxins, among which hemolysins stand out, as they contribute to its pathogenicity. Therefore, this research aims to investigate the molecular interactions and calculate the interaction energies existing between the thiosemicarbazone compounds LQIT/LT-75, LQIT/LT-78 and LQIT/LT-89 and the protein toxins alpha, beta and gamma-hemolysins secreted by the bacteria *S. aureus*, through molecular docking and, experimentally, evaluate the activity of thiosemicarbazone derivatives in inhibiting hemolysis induced by *S. aureus* α -HL ion channels. For computational analyses, using molecular docking, the crystallographic structure of alpha-hemolysin (PDB ID 7AHL), beta-hemolysin (PDB ID 3I5V) and gamma-hemolysin (PDB ID 3B07) from *S. aureus* was obtained from the PDB (Protein Data Bank). The chemical structures of the thiosemicarbazone derivatives LQIT/LT-75, LQIT/LT-78 and LQIT/LT-89 were designed in the MolView program. The structures were subjected to energy minimization using the Avogadro 1.1.1 program; docking studies were carried out using the DockThor program, and the Discovery Studio Visualizer program was used to analyze the results. To evaluate the antihemolytic activity of thiosemicarbazone derivatives against the action of alpha hemolysin in rabbit red blood cells, hemolytic assays were carried out in 96-well microplates, where the quantification of hemolysis was obtained according to the level of cell lysis through analyzes in a microplate reader, and the extent of lysis was analyzed for 30 minutes, measuring the absorbance of each well at 655 nm at 5 minute intervals. The derivative LQIT/LT-78 stood out for presenting the highest number of interactions and the highest affinity energy. Its performance was superior to that of the other derivatives, especially in relation to the trunclal region of the alpha-hemolysin and gamma-hemolysin toxins. It is also important to mention the performance of the compound LQIT/LT-75, which performed well against the central region of beta-hemolysin. Experimentally, it was observed that the three derivatives inhibited hemolysis by alpha-toxin in a concentration-dependent manner. No statistically significant differences were detected between the derivatives at the different concentrations tested. Additionally, there was an increase in time required for a 50% reduction in cell viability in all compounds tested. Thus, it can be concluded that the analyzed derivatives presented promising results in blocking and anti-hemolytic activity; however, further experimental and computational studies are necessary to complement the discussion and elucidate the effect of thiosemicarbazone derivatives against toxins secreted by the bacterium *S. aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. Toxins. Thiosemicarbazones. Molecular Anchoring. Hemolysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Rede de interação dos principais reguladores globais de <i>S. aureus</i>	17
Figura 2 - Estruturas cristalográficas da alfa-hemolisina, beta-hemolisina e gama-hemolisina	19
Figura 3 - Fluxo de trabalho típico do <i>docking</i> molecular	22
Figura 4 - Estruturas dos compostos tiossemicarbazona LQIT/LT-75, LQIT/LT-78 e LQIT/LT-89	23
Figura 5 - Interações intermoleculares das regiões da alfa-hemolisina com os derivados tiossemicarbazona	30
Figura 6 - Interações intermoleculares da região central da beta-hemolisina com os derivados tiossemicarbazona	31
Figura 7 - Interações intermoleculares das regiões da gama-hemolisina com os derivados tiossemicarbazona	32
Figura 8 - Inibição da hemólise induzida por α -HL durante 60 minutos na presença de tiossemicarbazonas	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.1.1 Microbiologia	15
2.1.2 Fatores de Virulência.....	16
2.1.3 Cepas resistentes	19
2.1.4 Infecções comunitárias e hospitalares.....	20
2.2 <i>Docking</i> molecular.....	21
2.3 Tiossemicarbazonas	22
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo Geral.....	25
3.2 Objetivos Específicos	25
4 METODOLOGIA.....	26
4.1 Obtenção das Tiossemicarbazonas	26
4.2 Análise <i>in silico</i>	26
4.3 Teste Hemolítico	27
4.4 Análise estatística	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
6 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é uma bactéria gram-positiva da família *Micrococcaceae*. Patógeno oportunista, essa bactéria pode desencadear em humanos diversos tipos de manifestações clínicas, desde infecções simples, como abscessos cutâneos, até doenças mais graves, como endocardite, bacteremia, sepse e síndrome do choque tóxico (Cheung *et al.*, 2004; Kebaier *et al.*, 2012; Cohen *et al.*, 2016). É considerada uma ameaça à comunidade e ao ambiente hospitalar, pois está associada, principalmente, às cepas resistentes, à alta morbimortalidade em infecções hospitalares (Kong; Neoh; Nathan, 2016) e à capacidade de formação de biofilme em tecidos vivos e em algumas superfícies abióticas (Otto, 2018), sendo classificado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como patógeno de alta prioridade no esforço global para o desenvolvimento de novos fármacos (WHO, 2024).

As cepas de *S. aureus* têm a habilidade de desenvolver, rapidamente, resistência a antibióticos, um exemplo é a cepa de *S. aureus* resistente à meticilina (antibiótico beta- lactâmico pertencente ao grupo das penicilinas) a qual é uma das principais causas de infecção hospitalar e atualmente está apresentando resistência a várias classes de antibióticos, inclusive os de última geração. A patogenicidade e a capacidade de colonização de *S. aureus* são determinadas pela ação dos seus fatores de virulência, que possuem papel importante na adesão celular, na captação de nutrientes e no combate à resposta imunológica do hospedeiro. São vários os fatores de virulência desta bactéria, nos quais se incluem enzimas e toxinas envolvidas em mecanismos que facilitam a multiplicação, disseminação e o estabelecimento da infecção estafilocócica (Cheung *et al.*, 2004; Lakhundi; Zhang, 2018).

As toxinas são proteínas secretadas por *S. aureus* na matriz extracelular e estão envolvidas no processo de penetração nos tecidos, permitindo que as bactérias invadam seu hospedeiro. As principais toxinas secretadas por *S. aureus* são as hemolisinas, leucotoxina, toxina esfoliativa, enterotoxina e toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (Kong; Neoh; Nathan, 2016).

As hemolisinas de *S. aureus* podem ser classificadas em alfa, beta, gama e delta. A alfa-hemolisina (α -HL) é a mais bem estudada dentre as hemolisinas estafilocócicas (Krasil'nikov; Ternovskii; Tashmukhamedov, 1981), solúvel em água, composta por sete monômeros de 293 aminoácidos cada (Bhakdi; Trantum-Jensen,

1991; Melo *et al.*, 2016; Song *et al.*, 1996), representa um dos fatores de patogenicidade da bactéria e é capaz de interagir com membranas biológicas e artificiais formando, através delas, vias aquosas denominadas nanoporos proteicos (Melo *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2020).

O mecanismo de ação desta hemolisina deve-se justamente à formação de poros em membranas biológicas. Além disso, a α -HL está envolvida na ativação do inflamassoma e na indução da secreção de citocinas pró-inflamatórias implicadas nos processos de necrose tecidual e inflamação (Craven *et al.*, 2009).

Diferentemente da α -HL, a beta-hemolisina (β -HL) não forma poros em membranas biológicas, porém degrada a esfingomielina e provoca lise em eritrócitos e monócitos. Contudo, embora suas células-alvo sejam conhecidas, o mecanismo de ação da toxina ainda é desconhecido. Já a gama-hemolisina (γ -HL), aparentemente, provoca danos nas membranas de leucócitos (neutrófilos, monócitos, granulócitos e macrófagos). Seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido (Kong; Neoh; Nathan, 2016).

A grande preocupação mundial é a alta incidência de infecção hospitalar e resistência a antibióticos, principalmente à classe dos beta-lactâmicos, apresentada por cepas dessa bactéria. Portanto, na tentativa de impedir a progressão da infecção, é importante buscar novos compostos que inibam as toxinas de *S. aureus*, bem como o entendimento dos mecanismos envolvidos na inibição (Rani *et al.*, 2014). Substâncias que apresentam a capacidade de inibir a atividade das hemolisinas estafilocócicas, em especial a α -HL, vêm sendo estudadas ao longo dos anos (Melo *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2019; Teixeira *et al.*, 2021).

Várias moléculas com atividade biológica possuem compostos heterocíclicos, a presença de heteroátomos na sua estrutura pode propiciar uma especificidade preferencial em sistemas biológicos. As tiossemicarbazonas, conhecidas por possuírem a fórmula geral $R_1R_2C=N-NH-C=S-NR_3R_4$ (Gaber *et al.*, 2021), são compostos de considerável interesse científico, devido às suas importantes propriedades químicas e biológicas, tais como antitumoral, antibacteriana, antiviral (Kasuga *et al.*, 2003) e antiprotozoária (Bharti *et al.*, 2002). Além disso, são muito empregadas como intermediárias na síntese orgânica de importantes heterociclos, como por exemplo os tiazóis (Tenório *et al.*, 2005) e são conhecidos por sua versatilidade em atividades biológicas (Nascimento *et al.*, 2024).

A virulência da α -HL unida ao surgimento de cepas resistentes aos antibióticos mais modernos evidencia a necessidade de mais estudos sobre novos compostos químicos que bloqueiem a ação da toxina α -HL e das outras toxinas estafilocócicas (beta-hemolisina e gama-hemolisina). Desta forma, o *docking* molecular foi utilizado para maior elucidação dos mecanismos de bloqueios presentes na interação entre hemolisinas e tiossemicarbazonas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria esférica, do grupo dos cocos gram-positivos (Santos *et al.*, 2007), presente em diversas partes do corpo humano como fossas nasais, garganta, intestinos e pele (Evangelista; Oliveira, 2015). Por ser um patógeno oportunista, esta bactéria pode desencadear em humanos diversos tipos de manifestações clínicas, desde infecções simples, como abscessos cutâneos, até doenças mais graves, como endocardite, bacteremia, sepse e síndrome do choque tóxico (Cheung *et al.*, 2004; Kebaier *et al.*, 2012; Cohen *et al.*, 2016). É um dos patógenos bacterianos mais difundidos, responsável por um número difícil de estimar de infecções de pele e, provavelmente, por centenas de milhares a milhões de infecções invasivas graves em todo o mundo a cada ano (Cheung; Bae; Otto, 2021).

Com isso, a *S. aureus* está presente tanto em infecções comunitárias quanto em infecções hospitalares, sendo as infecções mais graves ocorrendo no ambiente hospitalar, geralmente em pacientes predispostos, como aqueles com deficiências imunológicas ou submetidos a cirurgia (Piewngam; Otto, 2024). É considerada uma ameaça à comunidade e ao ambiente hospitalar, pois está associada, principalmente, às cepas resistentes, à alta morbimortalidade em infecções hospitalares (Kong; Neoh; Nathan, 2016) e à capacidade de formação de biofilme em tecidos vivos e em algumas superfícies abióticas (Otto, 2018), sendo classificado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como patógeno de alta prioridade no esforço global para o desenvolvimento de novos fármacos (WHO, 2024).

2.1.1 Microbiologia

Staphylococcus são cocos Gram e catalase-positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados. Essa bactéria pode apresentar-se em diversas formas, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente (com aspecto semelhante a um cacho de uvas) (Santos *et al.*, 2007). Por ser uma bactéria gram-positiva, *S. aureus* possui a parede celular composta por uma única membrana lipídica contendo uma espessa camada de peptidoglicano, responsável por dar rigidez à parede celular.

Além disso, possui o ácido lipoteicóico ancorado por diacilglicerol, responsável por conferir carga negativa à superfície celular (Knox; Wicken, 1973; Shockman; Barren, 1983).

Segundo Santos *et al.* (2007), as cepas de *S. aureus* crescem em meios comuns, caldo ou ágar simples, pH 7,0, à temperatura ótima de 37°C. As colônias formadas em placa, após 18-24 horas de incubação, apresentam-se arredondadas, lisas e brilhantes. A coloração dessas colônias varia desde o acinzentado até o amarelo-ouro, em que a pigmentação aumenta com o tempo de incubação prolongado, não chegando a ser formada nos casos de crescimento em condições anaeróbicas, ou na cultura em caldo. Em placas de ágar sangue, um halo de hemólise desenvolve-se em torno das colônias formadas. Outro meio importante para a identificação de *S. aureus* é o ágar manitol-sal, seletivo para essa espécie, uma vez que *S. aureus* consegue fermentar o manitol, produzindo ácido lático. Essa espécie se desenvolve também na presença de 7,5% de NaCl, que estimula a produção de coagulase, enzima que caracteriza a espécie.

2.1.2 Fatores de Virulência

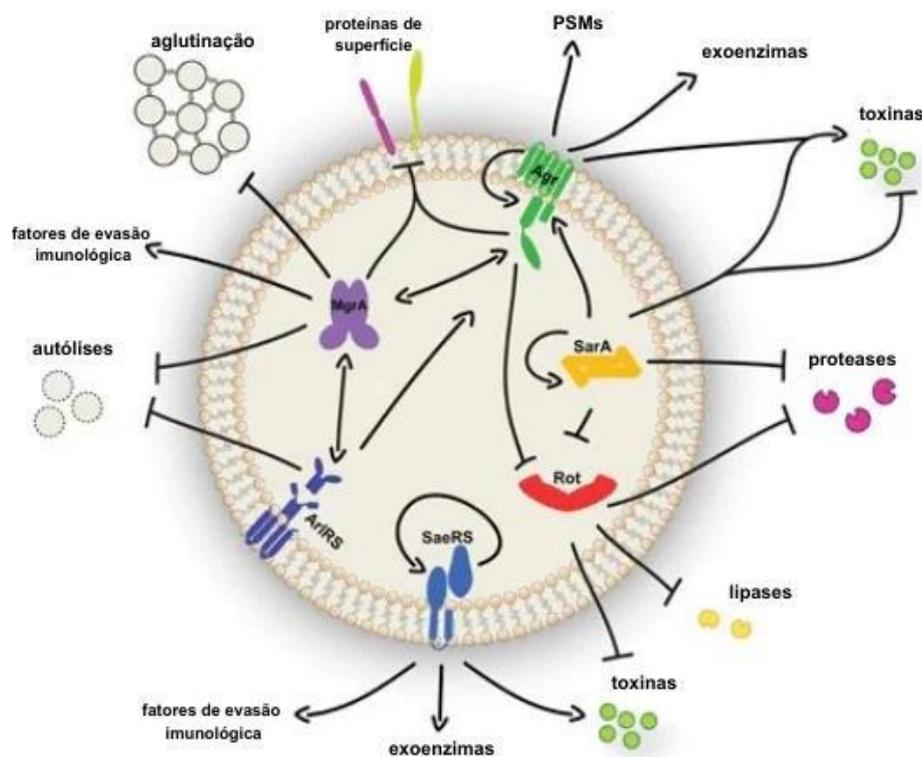
A patogenicidade e a capacidade de colonização de *S. aureus* são determinadas pela ação dos seus fatores de virulência, que possuem papel importante na adesão celular, na captação de nutrientes e no combate à resposta imunológica do hospedeiro. São vários os fatores de virulência desta bactéria, nos quais se incluem enzimas e toxinas envolvidas em mecanismos que facilitam a multiplicação, disseminação e o estabelecimento da infecção estafilocócica (Cheung *et al.*, 2004; Lakhundi; Zhang, 2018). A maioria dos isolados de *S. aureus* secreta um grupo de enzimas e citotoxinas que incluem as toxinas hemolíticas, nucleases, proteases, lipases, hialuronidase e collagenase. A principal função destas enzimas e citotoxinas seria a conversão dos tecidos dos hospedeiros em nutrientes necessários para o crescimento bacteriano (Acosta, Costa, Junior e Mota, 2018).

Para sobreviver e se adaptar a diferentes nichos ambientais, *S. aureus* desenvolveu uma intrincada rede regulatória para controlar a produção de fatores de virulência tanto de maneira temporal quanto de localização do hospedeiro. A maquinaria reguladora e os fatores de virulência são conhecidos como genes

acessórios, uma vez que não são essenciais para o crescimento normal. Esses fatores acessórios são usados para estabelecer dominância no hospedeiro e contribuir para a patogenicidade de *S. aureus*, e incluem componentes da superfície celular e proteínas liberadas diretamente no ambiente extracelular (Jenuš; Horswill, 2019).

O esquema presente na figura 1, descreve uma visão abrangente de cinco sistemas regulatórios, incluindo o sistema de detecção de quorum agr, o ArIRS e SaeRS TCS e três membros da família de proteínas SarA (SarA, Rot e MgrA). As características associadas à virulência controladas por cada regulador também são mostradas.

Figura 1. Rede de interação dos principais reguladores globais de *S. aureus*.



Fonte: adaptado de Jenuš; Horswill, 2019.

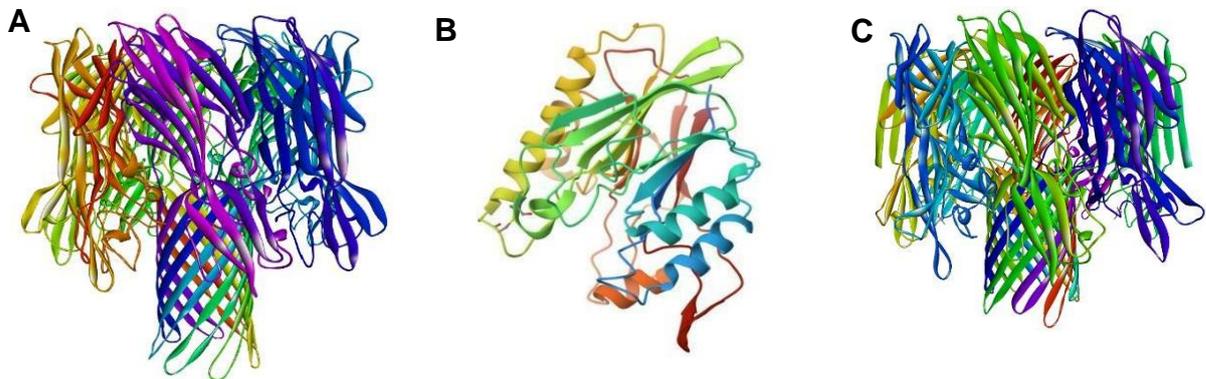
As toxinas são proteínas secretadas por *S. aureus* na matriz extracelular e estão envolvidas no processo de penetração nos tecidos, permitindo que as bactérias invadam seu hospedeiro. Por serem citolíticas, auxiliam no crescimento bacteriano por meio da aquisição de nutrientes essenciais, como o ferro, das células lisadas. As principais toxinas secretadas por *S. aureus* são as hemolisinas, leucotoxina, toxina esfoliativa, enterotoxina e toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (Kong; Neoh; Nathan, 2016).

Destacando as hemolisinas, estas podem ser classificadas em alfa, beta, gama e delta. A alfa-hemolisina (Figura 2), α -HL, é a mais bem estudada dentre as hemolisinas estafilocócicas (Krasil'nikov; Ternovskii; Tashmukhamedov, 1981), é uma toxina proteica, solúvel em água, composta por sete monômeros de 293 aminoácidos cada (Bhakdi; Tranum-Jensen, 1991; Melo *et al.*, 2016; Song *et al.*, 1996), representa um dos fatores de patogenicidade da bactéria e é capaz de interagir com membranas biológicas e artificiais formando, através delas, vias aquosas denominadas nanoporos proteicos (Melo *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2020). O mecanismo de ação desta toxina deve-se justamente à formação de poros em membranas biológicas. Além disso, a α -HL está envolvida na ativação do inflamassoma e na indução da secreção de citocinas pró-inflamatórias implicadas nos processos de necrose tecidual e inflamação (Craven *et al.*, 2009).

Eritrócitos e plaquetas apresentam uma grande sensibilidade à ação patogênica da α -HL. Esta toxina também age em células nucleadas, as quais respondem ao ataque da toxina com um amplo espectro de reações secundárias, como liberação de enzimas lisossomais e espasmo de músculo liso (Tomita, Watanabe; Yasuda, 1992). Embora a α -HL apresente, preferencialmente, toxicidade para células endoteliais, outras células, incluindo leucócitos humanos, células HeLa e células da ascite do carcinoma de Ehrlich, também se mostraram bastante sensíveis à ação dessa molécula (Thelestam; Mollby; Wadstrom, 1973; Haslinger *et al.*, 2003). Outra região suscetível à ação da α -HL de *S. aureus* é a pulmonar (Cohen *et al.*, 2016), podendo levar ao desenvolvimento de pneumonia necrotizante que, se não tratada adequadamente, progride para sepse e falência respiratória (Kebaier *et al.*, 2012; Bonesso *et al.*, 2016). Estudos recentes vêm demonstrando que a α -HL é um dos fatores críticos de patogenicidade na infecção estafilocócica e que, deste modo, o bloqueio (inibição) farmacológico da α -HL reduz a virulência da bactéria *S. aureus* (Zhang *et al.*, 2017; Johansson; Rautelin; Kaden, 2019; Tang *et al.*, 2019).

Diferentemente da α -HL, a beta-hemolisina (Figura 2), β -HL, não forma poros em membranas biológicas, porém degrada a esfingomiélinina e provoca lise em eritrócitos e monócitos. Seu mecanismo de ação está relacionado com a degradação da esfingomiélinina presente na membrana fosfolipídica (Coelho *et al.*, 2009). Já a gama-hemolisina (Figura 2), γ -HL, é um pequeno peptídeo capaz de causar lise em uma variedade de células (Burnside *et al.*, 2010), porém seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido (Kong; Neoh; Nathan, 2016).

Figura 2. Estruturas cristalográficas da (A) alfa-hemolisina, (B) beta-hemolisina e (C) gama-hemolisina.



Fonte: RCSB Protein Data Bank, 2024.

2.1.3 Cepas resistentes

Staphylococcus aureus é uma espécie bacteriana com um genoma central conservado, e sua evolução é impulsionada principalmente por mutação e transferência horizontal de genes. Elementos genéticos móveis, como bacteriófagos integrados (profagos), são um dos contribuintes mais comuns para a variação de cepa para cepa de *S. aureus* (Jenuš; Horswill, 2019). A maioria das cepas destas de *S. aureus* adquiriram um plasmídeo que codifica uma penicilinase (β -lactamase), enzima que inativa o antibiótico por hidrólise do anel β -lactâmico, logo, foi desenvolvido em laboratório um grupo de drogas resistentes a β -lactamase, como a nafcilina, oxacilina e meticilina. No entanto na década de 60 surgiram as primeiras amostras resistentes a essa nova classe de penicilinas (Lima *et al.*, 2015)

A resistência à meticilina é indicativa de resistência múltipla, que pode causar surtos em hospitais e pode ser epidêmico (Foster, 1996). A resistência à meticilina em *S. aureus* envolve um local-alvo alterado devido a uma proteína de ligação à penicilina adquirida (PBP 2a) com diminuição da afinidade com os β -lactâmicos, sendo o gene *mecA* que codifica essa proteína. Este elemento genético confere resistência à maioria dos antibióticos β -lactâmicos atualmente disponíveis. No entanto, nem todos os clones *mecA* são resistentes à meticilina, e os níveis gerais de resistência em uma população de MRSA dependem da produção eficiente de PBP 2a, que é modulada por uma variedade de fatores cromossômicos. Isso explica por que os níveis de resistência ao MRSA variam de fenotipicamente suscetíveis a altamente resistentes

(Appelbaum, 2007). Com isso, entende-se que, as cepas resistentes a metilina rapidamente se disseminaram em ambientes hospitalares, limitando, assim, a antibioticoterapia de combate às infecções por *S. aureus* aos glicopeptídios: vancomicina e teicoplanina (Santos *et al.*, 2007).

Porém, por volta dos anos 2000, o surgimento de cepas de *Staphylococcus coagulase negativa*, resistentes à vancomicina, surgiram no Japão, Brasil e Estados Unidos (Santos *et al.*, 2007), e iniciou uma escalada da resistência aos antibióticos, possivelmente por conta do uso excessivo do medicamento na antibioticoterapia.

Tendo em vista que a *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) foi classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2024) como um patógeno de elevada prioridade e sua presença já foi relatada em uma infecção comunitária (Vieira *et al.*, 2023), além do surgimento de cepas resistentes à vancomicina (VRSA) que, atualmente, é incomum (Gould, 2013), evidenciando a necessidade de mais estudos sobre novos compostos químicos que bloqueiem a ação da toxina α -HL e das outras toxinas estafilocócicas.

2.1.4 Infecções comunitárias e hospitalares

Staphylococcus aureus tem ocupado lugar de destaque na etiologia das infecções hospitalares e sua alta versatilidade em adquirir resistência aos antimicrobianos tornou-se uma preocupação mundial (Almeida *et al.*, 2009). A grande preocupação mundial é a alta incidência de infecção hospitalar e resistência a antibióticos, principalmente à classe dos beta-lactâmicos, apresentada por cepas dessa bactéria (Rani *et al.*, 2014). Além de representar um dos principais patógenos associados a infecções hospitalares, *S. aureus* é também um dos principais agentes isolados de pacientes com infecções de pele e subcutâneo adquiridas na comunidade, incluindo foliculites, impetigos, celulites e erisipelas (Gelatti *et al.*, 2009).

Tendo em vista o aumento de casos resistentes a metilina, nos últimos anos, infecções causadas por MRSA associadas ou adquiridas na comunidade (CA-MRSA) têm sido relatadas com frequência crescente em todo o mundo. Algumas características fenotípicas e genéticas são distintas entre a forma de infecção hospitalar e a comunitária, sendo a forma comunitária, susceptível à maioria dos antimicrobianos não beta-lactâmicos. Essa característica genotípica é expressa na

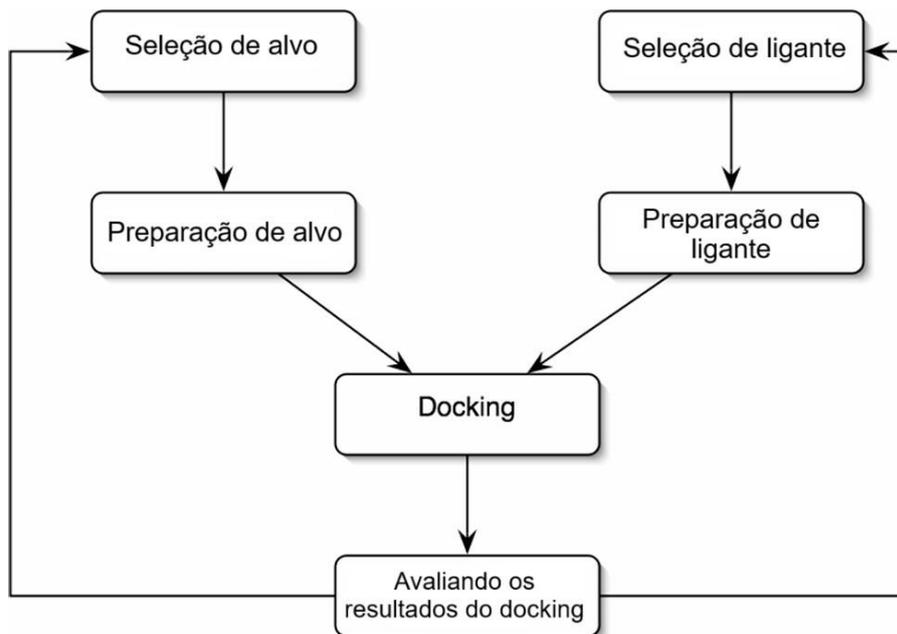
grande maioria em um antibiograma que apresenta resistência apenas ao disco de oxacilina ou cefoxitina, marcadores da resistência aos beta-lactâmicos. Enquanto a forma hospitalar, carrega o elemento genético móvel denominado cassete cromossômico estafilocócico mec (SCC*mec*) dos tipos I, II e III (Gelatti *et al.*, 2009), sendo o SCC*mec* um elemento genético móvel que carrega o gene *mecA*, enquanto os tipos garantem as diversas resistências à bactéria, tipo I — conferindo resistência à meticilina e outros beta-lactêmicos, tipo II — além da resistência à meticilina, à múltiplos antibióticos e o tipo III — inclui resistência à aminoglicosídeos e macrolídeos (Reinert, 2017).

2.2 *Docking* molecular

O *docking* molecular é um tipo de modelagem computacional, que facilita a previsão da orientação de ligação preferida de uma molécula (por exemplo, ligante) a outra (por exemplo, receptor), quando ambos interagem entre si para formar um complexo estável. As informações obtidas a partir da orientação preferida das moléculas ligadas podem ser empregadas para prever o perfil de energia (como energia livre de ligação), força e estabilidade (como afinidade de ligação e ligação constante) de complexos (Agarwal; Mehrotra, 2016).

O fluxograma da figura 3 mostra as principais etapas comuns a todos os protocolos de *docking*. As estruturas 3D para a macromolécula alvo e a molécula pequena devem primeiro ser escolhidas, e então cada estrutura deve ser preparada de acordo com os requisitos do método de *docking* que está sendo usado. Após o encaixe, os resultados devem ser analisados, selecionando os modos de ligação com as melhores pontuações (Morris; Lim-Wilby, 2008).

Figura 3. Fluxo de trabalho típico do *docking* molecular.



Fonte: adaptado de Morris; Lim-Wilby, 2008.

O encaixe envolve encontrar o(s) modo(s) de ligação mais favorável(is) de um ligante ao alvo de interesse. O modo de ligação de um ligante em relação ao receptor pode ser definido exclusivamente por suas variáveis de estado, como posição, orientação e flexibilidade (Morris; Lim-Wilby, 2008). Nos últimos anos, essa tecnologia tem sido amplamente utilizada no campo de pesquisa de design de medicamentos, o uso de banco de dados de compostos para rastrear os potenciais farmacóforos não é apenas conveniente para os pesquisadores comprarem, sintetizarem e concluírem os testes farmacológicos de acompanhamento, mas também melhora muito a eficiência e reduz o custo de pesquisa (Fan; Fu; Zhang, 2019).

2.3 Tiossemicarbazonas

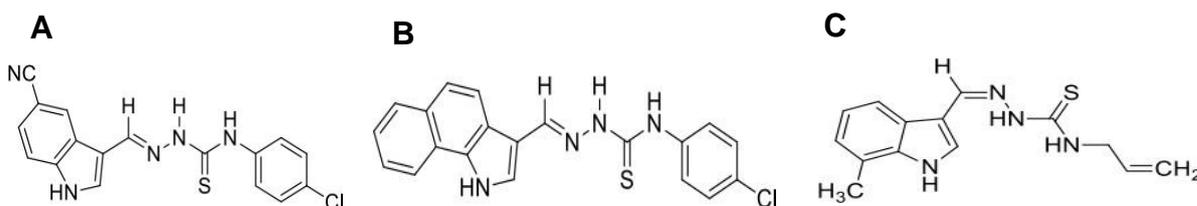
As tiossemicarbazonas, conhecidas por possuírem a fórmula geral $R_1R_2C=N-NH-C=S-NR_3R_4$ (Gaber *et al.*, 2021), são compostos de considerável interesse científico, devido às suas importantes propriedades químicas e biológicas, tais como antitumoral (Beraldo, 2004), antibacteriana, antiviral (Kasuga *et al.*, 2003) e antiprotozoária (Bharti *et al.*, 2002). Além disso, são muito empregadas como

intermediárias na síntese orgânica de importantes heterociclos, como por exemplo os tiazóis (Tenório *et al.*, 2005) e são conhecidos por sua versatilidade em atividades biológicas (Nascimento *et al.*, 2024). Em geral, as tiossemicarbazonas são obtidas por condensação da tiosemicarbazida correspondente com aldeídos ou cetonas. As tiossemicarbazonas possuem uma ampla gama de atividade biológica, dependendo do aldeído ou cetona original (Li *et al.*, 2009).

Do ponto de vista sintético, apresentam como característica principal sua versatilidade de obtenção, assim como sua vasta aplicação como intermediários de muitos núcleos importantes. Em geral, estas moléculas apresentam baixo custo de síntese, além de grande economia de átomos, uma vez que, com exceção da água que é liberada na sua síntese, todos os outros átomos dos compostos reagentes estarão presentes na molécula final. Sendo substâncias de fácil estocagem, não necessitando de armazenagem especial, nem tampouco são sensíveis à luz (Tenório *et al.*, 2005).

Nesta pesquisa, foram avaliados três derivados tiossemicarbazona: LQIT/LT-75, LQIT/LT-78 e LQIT/LT-89 (Figura 4).

Figura 4. Estruturas dos compostos tiossemicarbazona (A) LQIT/LT-75, (B) LQIT/LT-78 e (C) LQIT/LT-89.



Fonte: autoria própria, 2024.

Sendo cada composto diferenciado quimicamente, principalmente pela quantidade de anéis aromáticos e os átomos presentes nas extremidades (Tenório *et al.*, 2005). O peso molecular é essencial para o entendimento das propriedades biológicas e químicas da estrutura estudada, além de importantes para os cálculos necessários para a realização de experimentos, com isso, o peso molecular dos compostos apresentados acima são: LQIT/LT75 tendo uma massa de 354.053 g/mol, LQIT/LT78 tendo uma massa de 379.073 g/mol e LQIT/LT89 tendo uma massa de 273.112 g/mol.

Dessa forma, na tentativa de impedir a progressão da infecção, é importante buscar novos compostos que inibam as toxinas do *S. aureus*, bem como o entendimento dos mecanismos envolvidos na inibição (Rani *et al.*, 2014). Substâncias que apresentam a capacidade de inibir a atividade das hemolisinas estafilocócicas, em especial a α -HL, vêm sendo estudadas ao longo dos anos (Melo *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2019; Teixeira *et al.*, 2021). Logo, sabendo que o *S. aureus* é um dos grandes responsáveis por infecções hospitalares e que estão surgindo cepas resistentes a várias classes de antibióticos, inclusive de última geração (Lakhundi; Zhang, 2018), a proposta central desta pesquisa é a prospecção de substâncias inibidoras ou bloqueadoras das toxinas estafilocócicas alfa, beta e gama hemolisinas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar derivados tiossemicarbazona com potencial ação bloqueadora das toxinas estafilocócicas (alfa, beta e gama-hemolisinas) aplicando técnicas computacionais e laboratoriais.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenhar as estruturas químicas dos compostos LQIT/LT-75, LQIT/LT-78 e LQIT/LT-89 usando o programa MolView;
- Realizar a minimização de energia das estruturas químicas dos derivados tiossemicarbazona utilizando o programa Avogadro;
- Realizar *docking* molecular das toxinas estafilocócicas (alfa-hemolisina, beta-hemolisina e gama-hemolisina) com os derivados tiossemicarbazonas, utilizando a plataforma DockThor;
- Calcular as energias de interação e obter os modos de ligação dos derivados tiossemicarbazona com as toxinas estafilocócicas;
- Avaliar a atividade dos derivados tiossemicarbazona (LQIT/LT-75, LQIT/LT-78 e LQIT/LT-89) na inibição da hemólise induzida pelos canais iônicos da α -HL de *Staphylococcus aureus* em hemácias de coelho.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção das Tiossemicarbazonas

Os três derivados tiossemicarbazonas avaliados: N-(4-clorofenil)-2-((5-ciano-1H-indol-3-il)metileno)-N-fenilhidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-75); 2-((1H-benzo[g]indol-3-il)metileno)-N-fenilhidrazine-carbotioamida (LQIT/LT-78); e N-alil-2-((7-metil-1H-indol-3-il)metileno)-hidrazine-carbotioamida (LQIT/LT-89), foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica da UFPE.

4.2 Análise *in silico*

Para as análises computacionais, por meio do *docking* molecular, inicialmente foi obtido do PDB (Protein Data Bank) a estrutura cristalográfica da alfa-hemolisina (PDB ID 7AHL), beta-hemolisina (PDB ID 3I5V) e gama-hemolisina (PDB ID 3B07) de *S. aureus*. As estruturas químicas dos derivados tiossemicarbazonas LQIT/LT-75, LQIT/LT-78 e LQIT/LT-89 foram desenhadas no programa MolView. As estruturas foram submetidas à minimização de energia utilizando o programa Avogadro 1.1.1, aplicando o campo de força MMFF94s, para, posteriormente, serem realizados os estudos de *docking* utilizando o programa DockThor. Para os estudos, foram utilizadas coordenadas para a formação do *grid center*, que é o ponto central da análise (tabela 1). Após essas etapas, para a análise dos resultados foi utilizado o programa Discovery Studio Visualizer.

Tabela 1. Valores das coordenadas utilizadas para a formação do grid center no programa DockThor.

Toxina (Amoníácido/Posição)	Coordenadas <i>grid center</i>		
	X	Y	Z
Alfa-hemolisina (Lisina 147)	39.188	32.853	31.429
Alfa-hemolisina (Tirosina 102)	56.909	32.828	49.559
Alfa-hemolisina (Leucina 135)	15.894	32.797	7.829
Beta-hemolisina (Arginina 164)	2.489	-1.496	13.940
Gama-hemolisina (Lisina 40)	43.022	41.647	-69.91
Gama-hemolisina (Glutamato 108)	51.618	41.234	-33.832
Gama-hemolisina (Treonina 118)	51.690	41.261	-7.746

Fonte: autoria própria, 2024.

4.3 Teste Hemolítico

Para avaliar a atividade anti-hemolítica dos derivados tiossemicarbazonas frente à ação da α -HL em hemácias de coelho (obtidas comercialmente), foram realizados ensaios hemolíticos em microplacas de 96 poços, seguindo protocolo adaptado por nosso grupo (Yuldasheva *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2016). As hemácias de coelho, utilizadas neste estudo, foram obtidas comercialmente (empresa Kalifarma Agropecuária), dispensando este projeto da necessidade de parecer do Comitê de Ética Animal da UFPE. Inicialmente, foi preparada uma suspensão a 2% (p/v) de hemácias de coelho em solução tampão composta por NaCl 150mM, Tris-OH 5mM em pH 7,5. Em cada poço da microplaca de microtitulação, foram adicionados a suspensão de hemácias, a α -HL e um dos derivados-teste tiossemicarbazonas em diferentes concentrações (6,25, 12,5, 25, 50, 100 μ M). O volume final em cada poço será de 100 μ l, com concentração de hemácias a 1%, no qual o derivado-teste foi adicionado antes da α -HL nos poços-teste.

A quantificação (porcentagem) da hemólise foi obtida de acordo com o nível de lise celular por meio de análises em um espectrofotômetro (leitor de microplacas). A extensão da lise foi analisada durante 30 minutos, mensurando a absorbância de cada poço a 655 nm em intervalos de 5 minutos. Neste comprimento de onda, a hemólise causa uma diminuição da absorbância. Todas as medidas foram realizadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Os poços contendo apenas a suspensão de hemácias a 1% foram considerados controle negativo (0% hemólise), enquanto que os poços contendo apenas hemácias lisadas com Triton X-100 a 2% foram considerados controle positivo (100% hemólise). A porcentagem de hemólise nos poços contendo os derivado-teste foi calculada em relação ao controle positivo. Também foi calculado o tempo médio de lise (T50%) que indicou o tempo no qual cerca de 50% das hemácias não foram mais viáveis e foi considerado como critério da atividade hemolítica da α -HL e da atividade inibitória dos derivados tiossemicarbazonas.

4.4 Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os resultados foram expressos por média \pm desvio padrão da média e, para fins

estatísticos, foi considerada a significância mínima de 0,05 ($p < 0,05$). Os dados paramétricos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) com aplicação de pós-teste de Turkey. Os dados foram analisados estatisticamente pelo programa Origin (Pro), Version 2016. OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A plataforma DockThor apresentou as conformações possíveis dentro do espaço do grid estabelecido, e, com isso, foi enviado uma lista com as três melhores conformações do derivado na região selecionada. Logo, foram selecionadas as melhores rodadas de cada derivado com a alfa-hemolisina e montada uma tabela com as energias de interação de cada região (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de energia de interação entre os derivados tiossemicarbazona e as três regiões da α -HL.

Derivado	Energia de interação (kcal/mol)		
	Região Copal	Região Anelar	Região Troncular
LQIT/LT-75	-6,353	-7,164	-8,264
LQIT/LT-78	-6,590	-7,021	-8,722
LQIT/LT-89	-6,691	-7,477	-7,860

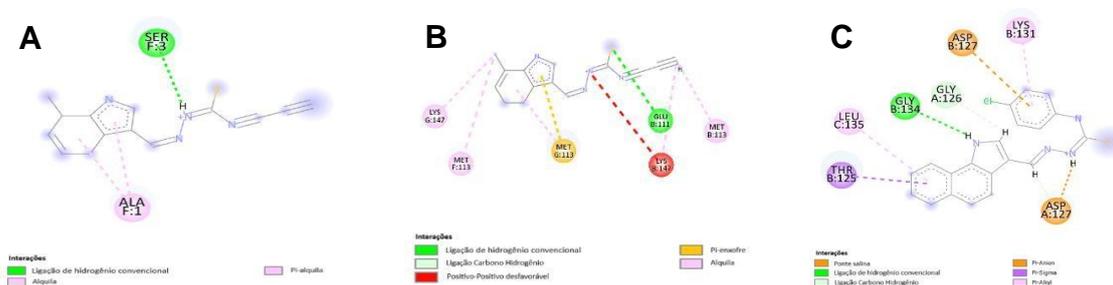
Fonte: autoria própria, 2024.

Foram analisadas as interações dos derivados tiossemicarbazona em três regiões do canal da alfa-hemolisina, sendo eles: região copal (TYR102), região anelar (LYS147) e região troncular (LEU135). Os parâmetros utilizados para a definição da conformação no *docking* molecular foram a energia total e a energia de interação (afinidade), corroborando com Teixeira *et al.* (2021), é possível observar que o modo de conexão com maior afinidade de interação possui um maior número de tipos de interação polar, logo, proporciona maior estabilidade e maior tempo de residência dentro do canal do α -HL. Com isso, também é necessário observar a quantidade de ligações que ocorrem entre receptor-ligante.

Desse modo, a melhor interação ocorreu entre derivado tiossemicarbazona LQIT/LT-78 e a região troncular, pois apresentou a menor energia de interação que chegou a -8,722 kcal/mol.

Como segundo parâmetro, foi observado a quantidade de ligações com base no diagrama 2D feito por meio do programa Discovery Studio, na qual o derivado LT-78 destacou-se com uma boa interação com o canal. Foram encontradas uma ligação de hidrogênio, duas ligações entre carbono e hidrogênio, uma ponte salina, uma ligação Pi-Sigma, duas ligações Pi-Alquila e uma ligação Pi-Ânion (Figura 5).

Figura 5. Interações intermoleculares das regiões da alfa-hemolisina com os derivados tiossemicarbazona.



Legenda: (A) Ligações químicas do derivado LT-89 com os resíduos de aminoácido da região copal (TYR102). (B) Ligações químicas do derivado LT-89 com os resíduos de aminoácido da região anelar (LYS147). (C) Ligações químicas do derivado LT-78 com os resíduos de aminoácido da região troncular (LEU135).

Fonte: autoria própria, 2024.

Na segunda etapa, foram analisadas as interações feitas pela beta-hemolisina e os derivados tiossemicarbazona e montada uma tabela com as energias de interação de cada região (Tabela 3).

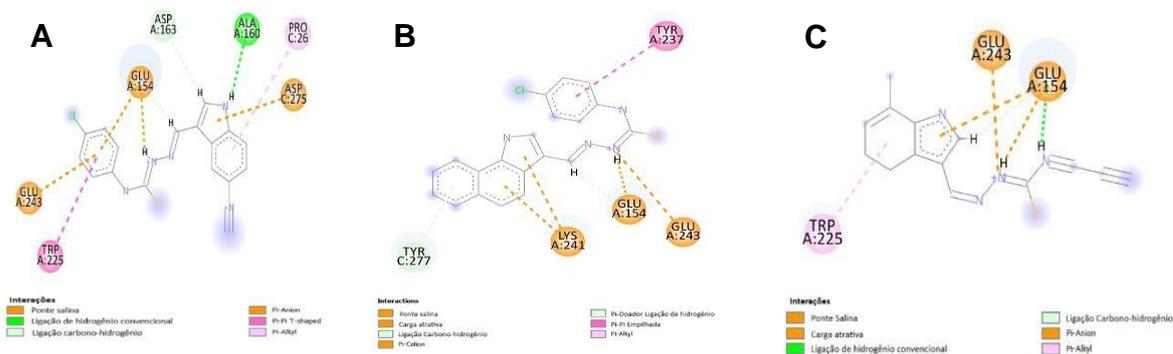
Tabela 3. Valores de energia de interação entre os derivados tiossemicarbazona e a região central da β -HL.

Derivado	Energia de interação (kcal/mol)
	Região Central
LQIT/LT-75	-8,416
LQIT/LT-78	-8,454
LQIT/LT-89	-7,259

Fonte: autoria própria, 2024.

Foram analisadas as interações dos derivados tiossemicarbazona na região central da gama-hemolisina (ARG164). Com os mesmos parâmetros utilizados na escolha da melhor interação da beta-hemolisina, a melhor interação ocorreu entre o derivado tiossemicarbazona LQIT/LT-78 e a região central, destacando-se pelo valor de energia apresentado e, principalmente, a quantidade de interações apresentadas, sendo esse segundo fator mais relevante na seleção desta rodada (figura 6). Por serem pouco estudadas, foram utilizados os mesmos parâmetros de análise da α -HL, tanto para β -HL quanto para γ -HL.

Figura 6. Interações intermoleculares da região central da beta-hemolisina com os derivados tiossemicarbazona.



Legenda: (A) Ligações químicas do derivado LT-75 com os resíduos de aminoácido da região central (ARG164). (B) Ligações químicas do derivado LT-78 com os resíduos de aminoácido da região central (ARG164). (C) Ligações químicas do derivado LT-89 com os resíduos de aminoácido da região central (ARG164).

Fonte: autoria própria, 2024.

Na terceira etapa, foram analisadas as interações feitas pela gama-hemolisina com os compostos e montada uma tabela com as energias de interação de cada região (Tabela 4).

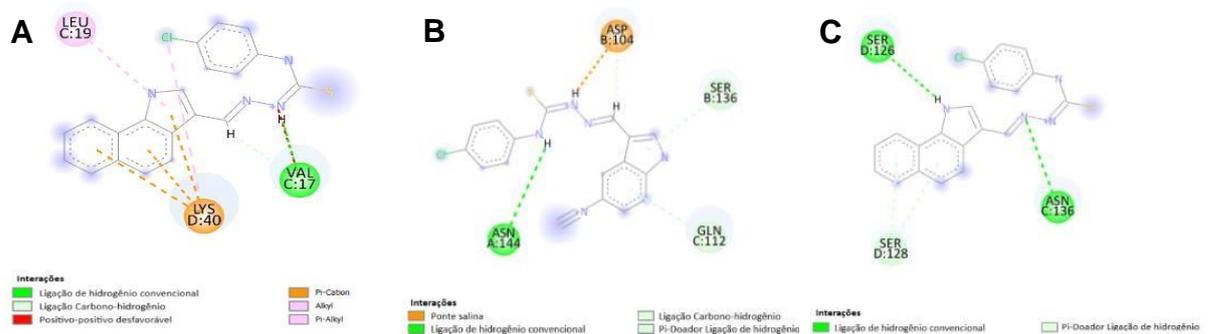
Tabela 4. Valores de energia de interação entre os derivados tiossemicarbazona e as três regiões da γ -HL.

Derivado	Energia de interação (kcal/mol)		
	Região Copal	Região Anelar	Região Troncular
LQIT/LT-75	-6,869	-7,594	-7,753
LQIT/LT-78	-7,052	-7,687	-8,195
LQIT/LT-89	-7,006	-7,664	-7,805

Fonte: autoria própria, 2024.

Foram analisadas as interações dos derivados tiossemicarbazona em três regiões do canal da gama-hemolisina, sendo elas: região copal (LYS40), região anelar (GLU108) e região troncular (TRE118). Utilizando os mesmos parâmetros iniciais, o derivado LT-78 obteve a melhor interação com a região troncular desta hemolisina, tendo em vista sua ótima energia de interação e as ligações formadas (figura 7).

Figura 7. Interações intermoleculares das regiões da gama-hemolisina com os derivados tiossemicarbazona.



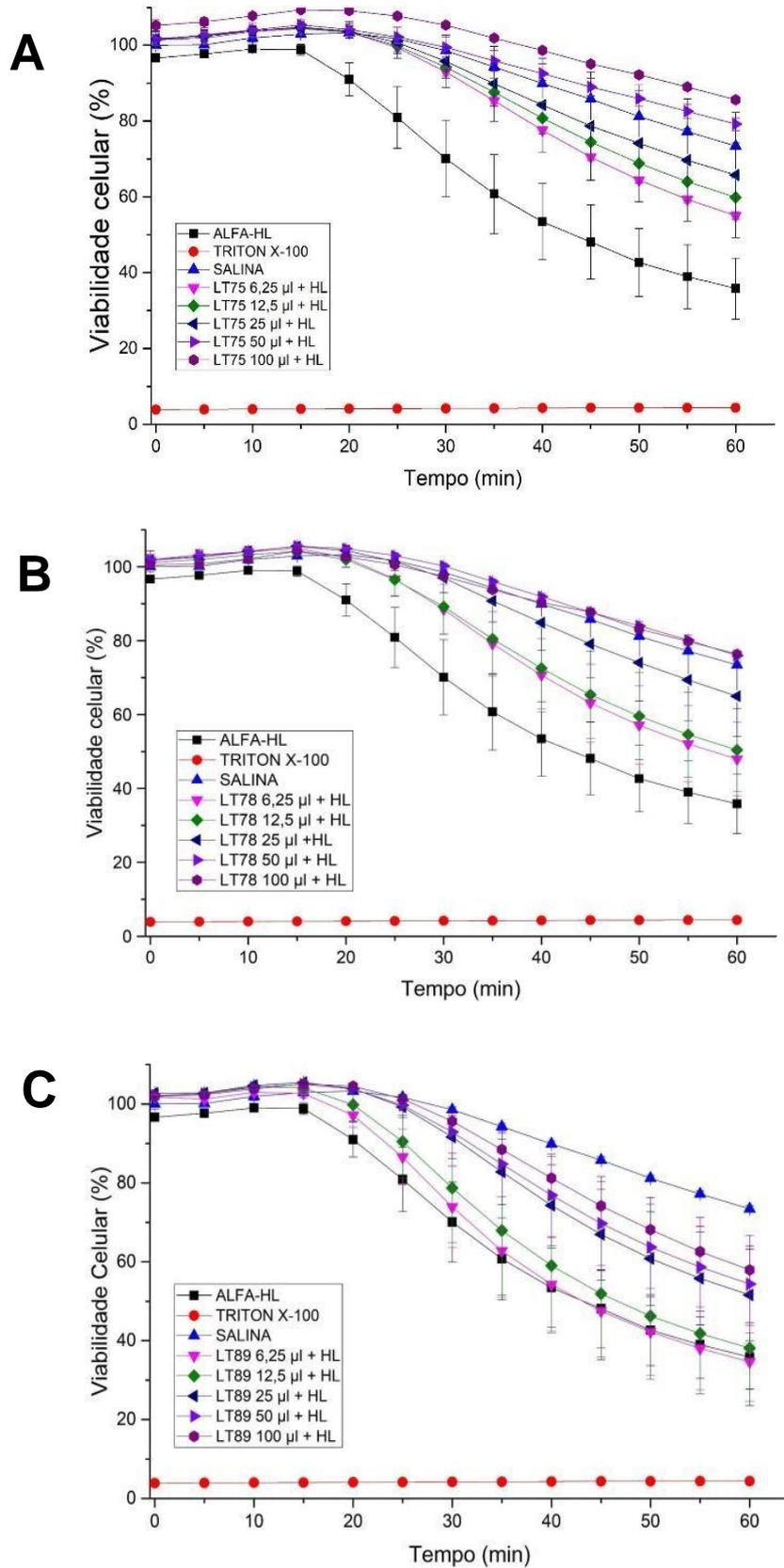
Legenda: (A) Ligações químicas do derivado LT-78 com os resíduos de aminoácido da região copal (LYS40). (B) Ligações químicas do derivado LT-75 com os resíduos de aminoácido da região anelar (GLU108). (C) Ligações químicas do derivado LT-78 com os resíduos de aminoácido da região troncular (TRE118).

Fonte: autoria própria, 2024.

A atividade hemolítica de compostos da mesma classe química já foi descartada pelo estudo de Leal *et al.* (2024). Nesse contexto, expusemos α -HL a concentrações crescentes dos compostos LT-75, 78 e 89 (figura 8). Os três derivados tiossemicarbazonas inibiram a hemólise provocada pela alfa-hemolisina de maneira concentração-dependente, mas não apresentaram diferenças estatísticas entre si nas diferentes concentrações. Todas as concentrações testadas (6,25, 12,5, 25, 50 e 100 μ M) do LT-75 e 78 proporcionaram maior viabilidade celular (efeito anti-hemolítico) em comparação com o controle positivo durante todos os tempos testados, diferentemente do LT-89 que a partir da concentração de 25 μ M foi verificada efeito anti-hemolítico.

A α -HL tem sido utilizada como um alvo promissor para o desenvolvimento de agentes bacteriostáticos no combate às infecções causadas pelo *Staphylococcus aureus* (Reddy; Sharma, 2024). Foram utilizados eritrócitos isolados de sangue de coelho em virtude da sua utilização como modelo celular para testar atividade hemolítica da α -HL (Melo *et al.*, 2016). Vale mencionar que o tempo para a redução de 50% da viabilidade celular ($T_{50\%}$) aumentou de forma expressiva na presença destes compostos. Nas maiores concentrações, 60 minutos não foram suficientes para atingir o $T_{50\%}$. Desta forma, é possível verificar não apenas uma atividade anti-hemolítica, mas também um efeito citoprotetor das tiossemicarbazonas para os eritrócitos de coelhos expostos a α -HL.

Figura 8. Inibição da hemólise induzida por α -HL durante 60 minutos na presença de tiossemicarbazonas.



Legenda: Exposição de eritrócitos a 6,25 μM (triângulos descendentes - rosa), 12,5 μM (paralelogramo - verde), 25 μM (triângulo inclinado – azul escuro), 50 μM (triângulo voltado à direita - lilás), 100 μM (hexágono - roxo) das tiossemicarbazonas LT75 (A), LT78 (B) e LT89 (C). Controle positivo Triton X-100 (círculos - vermelho), α -HL (quadrado - preto), ensaios de controle negativo NaCl (triângulo ascendente - azul). As barras mostram os valores médios de três ensaios independentes ($n=3$). As barras de erro mostram os desvios Padrão (DP).

Fonte: autoria própria, 2024.

6 CONCLUSÃO

Computacionalmente, o derivado LQIT/LT-78 foi o que teve maior destaque, tendo em vista seu desempenho superior aos demais, frente a região troncular das toxinas alfa-hemolisina e gama-hemolisina e a região central da beta-hemolisina.

Experimentalmente, os três derivados inibiram a hemólise pela alfatoxina de maneira dose-dependente, mas não houve diferenças estatísticas entre si nas diferentes concentrações, e, também, ocorreu um aumento do tempo para a redução de 50% da viabilidade celular em todos os compostos, mostrando assim uma possível atividade anti-hemolítica e efeito citoprotetor das tiossemicarbazonas para os eritrócitos de coelhos expostos a alfa-hemolisina.

Com isso, conclui-se que, os derivados analisados apresentaram resultados promissores como atividade bloqueadora e anti-hemolítica, porém, faz-se necessário mais estudos experimentais e computacionais para complementar a discussão e elucidação do efeito dos derivados tiossemicarbazona frente às toxinas secretadas pela bactéria *S. aureus*.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, Atzel Candido *et al.* Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 11, n. 4, p. 252, 2018.
- AGARWAL, Shweta; MEHROTRA, R. J. J. C. An overview of molecular docking. **JSM Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 1024-1028, 2016.
- ALMEIDA, Maria Inez *et al.* Prevalência e perfil de sensibilidade de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos clínicos de infecções hospitalares. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 9, n. 2, p. 7202-7202, 2007.
- APPELBAUM, Peter C. Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. Supplement_3, p. S165-S170, 2007.
- BERALDO, Heloisa. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Química Nova**, v. 27, p. 461-471, 2004.
- BHAKDI, S.; TRANUM-JENSEN, Jogdep. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 733-751, 1991.
- BHARTI, Neelam *et al.* Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 23, p. 3475-3478, 2002.
- BONESSO, Mariana F. *et al.* Key role of α -toxin in fatal pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* sequence type 398. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 193, n. 2, p. 217-220, 2016.
- BURNSIDE, Kellie *et al.* Regulation of hemolysin expression and virulence of *Staphylococcus aureus* by a serine/threonine kinase and phosphatase. **PloS One**, v. 5, n. 6, p. e11071, 2010.
- CHEUNG, Ambrose L. *et al.* Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 1-9, 2004.
- CHEUNG, Gordon YC; BAE, Justin S.; OTTO, Michael. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547-569, 2021.
- COELHO, Shana MO *et al.* Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 369-374, 2009.
- COHEN, Taylor S. *et al.* *Staphylococcus aureus* α toxin potentiates opportunistic bacterial lung infections. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 329, p. 329ra31-329ra31, 2016.

CRAVEN, Robin R. *et al.* *Staphylococcus aureus* α -hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells. **PloS One**, v. 4, n. 10, p. e7446, 2009.

EVANGELISTA, SÍntia de Souza; OLIVEIRA, Adriana Cristina de. *Staphylococcus aureus* metilino resistente adquirido na comunidade: um problema mundial. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 68, p. 136-143, 2015.

FAN, Jiyu; FU, Ailing; ZHANG, Le. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, v. 7, p. 83-89, 2019.

FOLETTI, Davide *et al.* Mechanism of action and in vivo efficacy of a human-derived antibody against *Staphylococcus aureus* α -hemolysin. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 10, p. 1641-1654, 2013.

FOSTER, Timothy. *Staphylococcus*. **Medical Microbiology. 4th edition**, 1996.

GABER, Ahmed *et al.* New mononuclear and binuclear Cu (II), Co (II), Ni (II), and Zn (II) thiosemicarbazone complexes with potential biological activity: antimicrobial and molecular docking study. **Molecules**, v. 26, n. 8, p. 2288, 2021.

GELATTI, Luciane Cristina *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: emerging community dissemination. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, p. 501-506, 2009.

GOULD, I. M. Treatment of bacteraemia: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, p. S17-S21, 2013.

HASLINGER, Bettina *et al.* *Staphylococcus aureus* α -toxin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cells: role of endogenous tumour necrosis factor- α and the mitochondrial death pathway. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 729-741, 2003.

JENUL, Christian; HORSWILL, Alexander R. Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 2, p. 10.1128/microbiolspec.gpp3-0031-2018, 2019.

JOHANSSON, Cecilia; RAUTELIN, Hilpi; KADEN, René. *Staphylococcus argenteus* and *Staphylococcus schweitzeri* are cytotoxic to human cells in vitro due to high expression of alpha-hemolysin Hla. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 502-510, 2019.

KASUGA, Noriko Chikaraishi *et al.* Synthesis, structural characterization and antimicrobial activities of 12 zinc (II) complexes with four thiosemicarbazone and two semicarbazone ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 96, n. 2-3, p. 298-310, 2003.

KEBAIER, Chahnaz *et al.* *Staphylococcus aureus* α -hemolysin mediates virulence in a murine model of severe pneumonia through activation of the NLRP3 inflammasome. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 5, p. 807-817, 2012.

KNOX, K. W.; WICKEN, A. J. Immunological properties of teichoic acids. **Bacteriological Reviews**, v. 37, n. 2, p. 215-257, 1973.

KONG, Cin; NEOH, Hui-min; NATHAN, Sheila. Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: a potential form of anti-virulence therapy. **Toxins**, v. 8, n. 3, p. 72, 2016.

KRASILNIKOV, O. V.; TERNOVSKIĀ, V. I.; TASHMUKHAMEDOV, B. A. Properties of conductivity channels induced in phospholipid bilayer membranes by alpha-staphylotoxin. **Biofizika**, v. 26, n. 2, p. 271-276, 1981.

LAKHUNDI, Sahreena; ZHANG, Kunyan. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 10.1128/cmr.00020-18, 2018.

LEAL, Mayse Manuele FV *et al.* Preliminary evaluation of the toxicological, antioxidant and antitumor activities promoted by the compounds 2, 4-dihydroxy-benzylidene-thiosemicarbazones an in silico, in vitro and in vivo study. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 96, n. 2, p. e20231247, 2024.

LI, Ming-Xue *et al.* Cytotoxicity and structure–activity relationships of four α -N-heterocyclic thiosemicarbazone derivatives crystal structure of 2-acetylpyrazine thiosemicarbazone. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 10, p. 2704-2706, 2009.

LIMA, Maira Ferreira Pinto *et al.* *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares–Revisão de Literatura. **Uningá Review**, v. 21, n. 1, 2015.

LIU, Jie *et al.* Structure-based discovery of a small-molecule inhibitor of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* virulence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 18, p. 5944-5959, 2020.

MELO, Maria C.A. *et al.* Inhibition of the hemolytic activity caused by *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin through isatin-Schiff copper (II) complexes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 1, p. fnv207, 2016.

MORRIS, Garrett M.; LIM-WILBY, Marguerita. Molecular docking. **Molecular Modeling of Proteins**, p. 365-382, 2008.

NASCIMENTO, Pedro Henrique do Bonfim *et al.* Preliminary evaluation of the interaction with Albumin/DNA and in vitro evaluation of the antioxidant properties promoted by thiosemicarbazones and thiazole compounds. **Scientific Electronic Archives**, v. 17, n. 3, 2024.

OTTO, Michael. Staphylococcal biofilms. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, p. 10.1128/microbiolspec.gpp3-0023-2018, 2018.

PIEWNGAM, Pipat; OTTO, Michael. *Staphylococcus aureus* colonisation and strategies for decolonisation. **The Lancet Microbe**, 2024.

RANI, Nidhi *et al.* Inhibition of pore formation by blocking the assembly of *Staphylococcus aureus* α -Hemolysin through a novel peptide inhibitor: an in Silco approach. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 20, p. 575-583, 2014.

RCSB Protein Data Bank. Estrutura cristalográfica de uma proteína. 2024.

REDDY, Roma; SHARMA, Gaurav. Inhibition of Alpha-Hemolysis toxin of *Staphylococcus aureus* through Molecular docking simulations. **ChemRxiv**. 2024.

REINERT, Cristina. Caracterização do cassete cromossômico estafilocócico mec (SCCmec) de cepas endêmicas nosocomiais de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina e vancomicina. **Dissertação de Mestrado em Análises Clínicas**. 2004.

SANTOS, André Luis dos *et al.* *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 413-423, 2007.

SHOCKMAN, Gerald D.; BARREN, John F. Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 501-527, 1983.

SONG, Langzhou *et al.* Structure of staphylococcal α -hemolysin, a heptameric transmembrane pore. **Science**, v. 274, n. 5294, p. 1859-1865, 1996.

TANG, Feng *et al.* Inhibition of alpha-hemolysin expression by resveratrol attenuates *Staphylococcus aureus* virulence. **Microbial Pathogenesis**, v. 127, p. 85-90, 2019.

TEIXEIRA, Luciana Ramos *et al.* Tamoxifen inhibits the anion channel induced by *Staphylococcus aureus* α -hemolysin: electrophysiological and docking analysis. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e13010212326-e13010212326, 2021.

TENORIO, Romulo P. *et al.* Thiosemicarbazones: preparation methods, synthetic applications and biological importance. **Quimica Nova**, v. 28, p. 1030-1037, 2005.

THELESTAM, Monica; MÖLLBY, Roland; WADSTRÖM, Torkel. Effects of staphylococcal alpha-, beta-, delta-, and gamma-hemolysins on human diploid fibroblasts and HeLa cells: evaluation of a new quantitative assay for measuring cell damage. **Infection and immunity**, v. 8, n. 6, p. 938-946, 1973.

TOMITA, T.; WATANABE, Masashi; YASUDA, T. Influence of membrane fluidity on the assembly of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin, a channel-forming protein, in liposome membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 19, p. 13391-13397, 1992.

VIEIRA, Júlia Lima *et al.* Morte por *Staphylococcus aureus* comunitário resistente à meticilina: relato de caso. **Critical Care Science**, v. 35, p. 416-420, 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO bacterial priority pathogens list, 2024: bacterial pathogens of public health importance, to guide research, development, and strategies to prevent and control antimicrobial resistance.** World Health Organization, 2024.

YULDASHEVA, L. N. *et al.* Cholesterol-dependent hemolytic activity of *Passiflora quadrangularis* leaves. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1061-1070, 2005.

ZHANG, Bing *et al.* Chalcone attenuates *Staphylococcus aureus* virulence by targeting sortase A and alpha-hemolysin. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1715, 2017.