



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RENATA PERUGINI BIASI GARBIN

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BENZOILTIOUREIAS  
EM AGENTES ETIOLÓGICOS DE SEPSE NEONATAL**

---

Londrina  
2019

RENATA PERUGINI BIASI GARBIN

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BENZOILTIOUREIAS  
EM AGENTES ETIOLÓGICOS DE SEPSE NEONATAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta

Londrina  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

B579a Biasi-Garbin, Renata Perugini.  
Atividade antimicrobiana de benzoiltioureias em agentes etiológicos de sepse neonatal / Renata Perugini Biasi-Garbin. - Londrina, 2019.  
85 f.

Orientador: Sueli Fumie Yamada Ogatta.  
Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2019.  
Inclui bibliografia.

1. Atividade antibacteriana - Tese. 2. Benzoiltiureia - Tese. 3. Biofilme - Tese. 4. *Streptococcus agalactiae* - Tese. I. Yamada Ogatta, Sueli Fumie . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 574

RENATA PERUGINI BIASI GARBIN

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BENZOILTIOUREIAS  
EM AGENTES ETIOLÓGICOS DE SEPSE NEONATAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada  
Ogatta  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Marcelle de Lima Ferreira Bispo  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Gilselena Kerbauy Lopes  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dr. Miguel Octavio Pérez Navarro  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 07 de maio de 2019.

Às pessoas mais preciosas da  
minha vida: meu amado esposo  
Vitor e minha tão esperada filha,  
Alice.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar força, saúde e sabedoria para concluir mais esta etapa da minha vida profissional.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sueli Fumie Yamada Ogatta, pela confiança e aprendizado durante todo o período do mestrado e doutorado.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucy Megumi Yamauchi Lioni pela presença constante durante a realização deste estudo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcelle de Lima Ferreira Bispo pela parceria na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares pela amizade e colaboração no desenvolvimento deste estudo.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcelle de Lima Ferreira Bispo, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gilselena Kerbauy, Dr. Miguel Octavio Pérez Navarro pelo apoio e disponibilidade.

À Profa. Dra. Márcia Regina Eches Perugini, por despertar o interesse pela Microbiologia e por ser exemplo.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

Aos colegas do laboratório NIP 5, por todos os momentos agradáveis de convivência, especialmente à Ana Elisa Belotto Morguette, Gabriella Maria Andriani e Patrícia Moraes Lopes Pereira pela amizade e auxílio na realização dos experimentos.

Aos colegas de turma, pelo companheirismo e amizade durante as disciplinas.

Agradeço carinhosamente aos meus pais, Blaura e Djauma e aos meus irmãos, Rodrigo e Guilherme, pelo esforço, compreensão e colaboração em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

Ao meu amado esposo, Vitor, pelo carinho, incentivo e apoio incondicional nesse e em todos os outros meus projetos profissionais.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho. MUITO OBRIGADA!

BIASI-GARBIN, Renata Perugini. **Atividade antimicrobiana de benzoiltioureas em agentes etiológicos de sepse neonatal**. 2019. 86 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

Sepse neonatal representa importante causa de morbidade e mortalidade em recém-nascidos e *Streptococcus agalactiae* (Estreptococo do Grupo B - EGB) continua sendo o principal agente etiológico envolvido nessa infecção. A dificuldade no diagnóstico e a emergência de isolados resistentes aos antimicrobianos comerciais representam desafio para prevenir esta infecção. Considerando as atividades biológicas descritas para compostos contendo o núcleo tiourea, o objetivo deste estudo foi sintetizar e avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de benzoiltioureas contra importantes agentes etiológicos de sepse neonatal e realizar um estudo preliminar de relação estrutura-atividade. Uma série de vinte e seis benzoiltioureas com vários substituintes alifáticos e aromáticos na porção tiourea foi apropriadamente sintetizada. Posteriormente, a substância que apresentou o melhor potencial antimicrobiano (*N*-(butilcarbamoil) benzamida, composto 5, foi modificada através da introdução de diferentes substituintes na porção benzoila, fornecendo mais três derivados. Além disso, o composto 5 foi convertido nos derivados guanidina e ureia correspondentes, com o objetivo de confirmar a importância da fração tiourea para a atividade antimicrobiana. Inicialmente, a atividade antimicrobiana dos compostos foi avaliada frente a cepas de referência de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, pelo ensaio de microdiluição em caldo, e as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas. Entre todos os derivados avaliados, os compostos alifáticos, principalmente 3, 5 e 6, foram mais ativos que os aromáticos contra todas as bactérias e leveduras utilizadas. *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 foi a espécie mais sensível, apresentando valores de CIM de 62,5 µg/mL (5), 125,0 µg/mL (6) e 500,0 µg/mL (3), indicando que, para esta espécie, a atividade antibacteriana foi sensível ao comprimento da cadeia alquílica. Além disso, a substituição isostérica de enxofre por nitrogênio ou oxigênio não produziu melhora no efeito antimicrobiano contra essa bactéria, sugerindo que o grupo tiouréia poderia ser considerado um grupo farmacóforo. Em seguida, a atividade do composto 5 foi avaliada sobre células planctônicas e sésses de isolados clínicos de EGB. O composto 5 inibiu o crescimento de todos os isolados de EGB, com valores de CIM variando de 15,6 µg/mL a 62,5 µg/mL e valores de CBM iguais a 1000,0 µg/mL para todos os isolados, indicando um efeito bacteriostático. Este resultado foi corroborado pela análise da curva de morte e microscopia eletrônica de transmissão, que mostraram que o composto 5 na CIM reduziu a população de células planctônicas em aproximadamente 4 a 6 log após 24 h de tratamento e provocou mudanças significativas na ultraestrutura de EGB após 4 horas de incubação. Com exceção de três cepas de EGB, o composto 5 na CIM diminuiu a viabilidade da maioria dos biofilmes maduros (24h) de EGB. Adicionalmente, o composto 5 apresentou toxicidade seletiva para as cepas de EGB em comparação com seu efeito sobre as células de mamíferos, HeLa e eritrócitos humanos. Estes resultados sugerem que o composto 5 apresenta potencial como protótipo para o desenvolvimento de uma nova classe de agentes antimicrobianos contra EGB.

**Palavras-chave:** Atividade antibacteriana; Benzoiltiourea; Biofilme; *Candida* spp; *Streptococcus agalactiae*.

BIASI-GARBIN, Renata Perugini. **Antimicrobial activity of benzoylthioureas towards neonatal infection pathogens.** 2019. 86 p. Thesis (Doctor's Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

Neonatal sepsis is the cause of substantial morbidity and mortality among infants and *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci - GBS) remains the most frequent causative pathogen. Difficult diagnosis and the emergency of clindamycin and erythromycin-resistant isolates represent a challenge to prevent this infection. Considering the biological activities described to compounds containing thiourea group, the aim of this study was to synthesise and evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of benzoylthioureas against a range of important etiologic agents of neonatal infections, as well as to perform a structure-activity relation study. A series of twenty-six benzoylthioureas with various aliphatic and aromatic substituents at the thiourea moiety were appropriately synthesized. Afterwards, the substance that showed the best antimicrobial potential (*N*-(butylcarbamothioyl) benzamide, compound 5, was modified through the introduction of different substituents in the benzoyl ring, furnishing more three derivatives. Besides, compound 5 was converted to the corresponding guanidine and urea derivatives with the aim to confirm the importance of the thiourea moiety for the antimicrobial activity of this class of compounds. First, antimicrobial activity of compounds was evaluated against a panel of reference strains of Gram positive and Gram negative bacteria, and yeasts by broth microdilution assays and minimal inhibitory concentrations (MICs) was determined. Among all derivatives evaluated, the aliphatic compounds, mainly 3, 5 and 6 were more active than the aromatic ones against all bacteria and yeast utilized. *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 was the most specie susceptible, exhibiting MIC values of 62.5  $\mu\text{g/mL}$  (5), 125.0  $\mu\text{g/mL}$  (6) and 500.0  $\mu\text{g/mL}$  (3), which indicates that the antimicrobial activity was sensible to the chain length. Besides, the isosteric replacement of sulfur by nitrogen or oxygen did not produce improvement in the antimicrobial effect against this bacterium, suggesting that the thiourea group could be considered a pharmacophore group. Then, the activity of compound 5 was evaluated on planktonic and sessile cells of GBS clinical isolates. Compound 5 inhibited the growth of all planktonic GBS isolates, with MIC values ranging from 15.6  $\mu\text{g/mL}$  to 62.5  $\mu\text{g/mL}$  and MBC values equal 1000.0  $\mu\text{g/mL}$  for all isolates, indicating a bacteriostatic effect. This result was corroborate by the time kill curve analysis and transmission electron microscopy, which showed that compound 5 at MIC reduced the planktonic cell population approximately by 4 to 6 log after 24 h of treatment and provoked significant changes in GBS morphology and ultrastructure after 4 hours-incubation. Except for three GBS strains, compound 5 at MIC decreased the viability of the most of GBS mature biofilms (24h). In addition, compound 5 showed selective toxicity to GBS compared to their effect on the mammalian cells HeLa and human erythrocytes. These results suggest that compound 5 presents potential as a prototype for the development of a new class of antimicrobial agents against GBS.

**Key words:** Antibacterial activity; Benzoylthiourea; Biofilm; *Candida* spp; *Streptococcus agalactiae*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACCP	<i>American College of Chest Physicians</i>
API	Antibioticoterapia profilática intraparto
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
d	Duplete
EC <sub>50</sub>	<i>Half maximal effective concentration</i>
EGB	Estreptococo do Grupo B
EOD	<i>Early-onset disease</i>
EOS	<i>Early-onset sepsis</i>
ESICM	<i>European Society of Intensive Care Medicine</i>
EV	Enterovírus
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSV	Herpes Vírus Simples
IC <sub>50</sub>	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LOD	<i>Late-onset disease</i>
LOS	<i>Late-onset sepsis</i>
m	Multiplete
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MRSE	<i>Staphylococcus epidermidis</i> resistente à meticilina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PaCO <sub>2</sub>	Pressão parcial de CO <sub>2</sub>
PCR	Proteína C reativa
p.f.	Ponto de fusão
quint	Quinteto
qSOFA	<i>Quick SOFA</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>

SCCM	<i>Society of Critical Care Medicine</i>
SCoN	<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro
SIS	<i>Surgical Infection Society</i>
sl	Simpleto longo
SNC	Sistema nervoso central
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
t	Tripleto
VRE	<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	12
2.1.1	Objetivos Específicos .....	12
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>13</b>
3.1	SEPSE .....	13
3.1.1	Sepse Neonatal .....	14
3.1.1.1	Agentes etiológicos .....	15
3.1.1.2	Diagnóstico.....	21
3.1.1.3	Controle das infecções neonatais.....	22
3.2	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM EGB .....	23
3.3	SÍNTESE QUÍMICA E O DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS .....	25
3.4	TIOUREIAS.....	30
3.4.1	Tioureias: Uma Versátil Classe de Substâncias Bioativas .....	31
3.4.1.1	Atividade antimicrobiana de tioureias .....	33
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>
<b>5</b>	<b>ARTIGO</b> .....	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>83</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas estão relacionadas a altas taxas de mortalidade entre os recém-nascidos nos primeiros 28 dias de vida. Neste período, os neonatos, especialmente os prematuros, estão mais predispostos ao desenvolvimento de infecções, principalmente devido à imaturidade do sistema imune. Além disso, são fatores contribuintes a esse maior risco a exposição a microrganismos, que pode ocorrer já no útero e durante a passagem pelo canal de parto ou em decorrência de hospitalização prolongada, procedimentos invasivos, uso de dispositivos médicos e antimicrobianos de amplo espectro (SHANE; STOLL, 2014).

Entre as principais doenças infecciosas que acometem recém-nascidos, sepsé continua representando importante causa de morbidade e mortalidade nessa população (UNICEF, 2017). Dados epidemiológicos recentes estimam que a incidência global de sepsé neonatal corresponde a 3 milhões de casos, com mortalidade entre 11% e 19% (FLEISCHMANN-STRUZEK *et al.*, 2018), variando significativamente entre as regiões geográficas devido principalmente às diferenças nas estratégias de prevenção, fatores de risco neonatal e níveis de renda (SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017).

O diagnóstico de infecções neonatais ainda é um desafio, pois geralmente é dificultado pela falta de especificidade dos sintomas, que podem ser diferentes daqueles apresentados por crianças ou adultos. Assim, na presença de fatores de risco, a profilaxia antimicrobiana empírica é geralmente utilizada para diminuir o número de infecções e, conseqüentemente, a taxa de mortalidade (FLEISCHMANN-STRUZEK *et al.*, 2018), o que coloca os antimicrobianos como a classe terapêutica mais prescrita nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (de SOUZA *et al.*, 2016). Entre as conseqüências do uso excessivo de antimicrobianos nesses ambientes está o alto índice de sepsé neonatal por patógenos multirresistentes (SILVA *et al.*, 2018) com uma taxa de mortalidade estimada de 30% (LAXMINARAYAN *et al.*, 2016).

Embora vários microrganismos possam causar infecções neonatais, *Streptococcus agalactiae* (Estreptococo do Grupo B – EGB) continua sendo o principal agente etiológico de sepsé neonatal de início precoce (*early-onset sepsis* - EOS) em todo o mundo (SEALE *et al.*, 2017; SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018; PATRAS; NIZET; 2018). Esta infecção está fortemente relacionada com a colonização vaginal materna e transmissão vertical de EGB durante o parto (VORNHAGEN; ADAMS WALDORF; RAJAGOPAL, 2017). Uma vez que o desenvolvimento de vacinas contra EGB ainda está em andamento, a administração de antibioticoterapia profilática intraparto (API) em gestantes

colonizadas é a estratégia utilizada atualmente para reduzir a transmissão vertical dessa bactéria e a incidência de EO (VERANI; MCGEE; SCHRAG, 2010).

Os beta-lactâmicos (penicilina e ampicilina) são os antibacterianos de primeira escolha para a API, e cefazolina, clindamicina ou vancomicina são utilizadas nos casos de gestantes alérgicas à penicilina com alto risco de anafilaxia (VERANI; MCGEE; SCHRAG, 2010). Embora a maioria dos isolados de EGB permaneça sensível aos beta-lactâmicos (MORGUETTE *et al.*, 2018; OTAGUIRI *et al.*, 2013), relatos de isolados com sensibilidade reduzida ou resistentes à penicilina foram descritos nos últimos anos (SEKI *et al.*, 2015; NAGANO *et al.*, 2014; KIMURA *et al.*, 2008). Por outro lado, isolados de EGB resistentes à eritromicina e clindamicina têm emergido em diferentes regiões do mundo (BOTELHO *et al.*, 2018; MORGUETTE *et al.*, 2018; GUAN *et al.*, 2018; ALHHAZMI; HURTEAU; TYRRELL, 2016; OTAGUIRI *et al.*, 2013). De fato, um documento publicado pelos *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), que classificou uma série de microrganismos de acordo com o nível de ameaça quanto à resistência aos antimicrobianos, destaca EGB resistente à clindamicina como uma espécie preocupante, indicando a necessidade de pesquisar e desenvolver novos compostos para controle das infecções causadas por esta bactéria (CDC, 2013).

Além dos mecanismos clássicos de resistência antimicrobiana observados em células planctônicas, a maioria dos agentes etiológicos de sepse neonatal apresenta capacidade de formar biofilmes nos tecidos dos hospedeiros e em dispositivos médicos, característica que contribui para o estabelecimento de infecções persistentes e falha terapêutica (SINGH *et al.*, 2017; VENKATESAN; PERUMAL; DOBLE, 2015). No caso da doença neonatal invasiva causada por EGB, a patogênese envolve, inicialmente, o estabelecimento da colonização vaginal em mulheres grávidas e a invasão de tecidos – alvos do recém-nascido, o que requer a aderência bacteriana às superfícies epiteliais, particularmente no tecido vaginal, membranas coriônicas e epitélio pulmonar dos neonatos (ROSINI; MARGARIT, 2015). Estudos já mostraram que os antimicrobianos convencionais recomendados para tratamento de infecções causadas por EGB não apresentaram atividade contra os biofilmes formados *in vitro* por esta bactéria (MORENO; TRAMPUZ; DI LUCA, 2017; RUPPEN; HEMPHILL; SENDI, 2017).

Diante desses desafios, estudos que visam a descoberta e o desenvolvimento de novas classes de compostos eficazes tanto contra células planctônicas quanto biofilmes de bactérias patogênicas são de extrema importância. Nesse sentido, assim como no início da quimioterapia antimicrobiana, a química medicinal se revela como excelente alternativa e,

atualmente, dispõe de estratégias capazes de explorar a diversidade e a versatilidade de estruturas químicas com potencial antimicrobiano.

Neste contexto, as tioureias se apresentam como uma classe de compostos orgânicos multifuncionais e importantes para a síntese de diversas moléculas com aplicações terapêuticas, podendo ser encontradas, inclusive, na estrutura química de fármacos já disponíveis no mercado farmacêutico com atividade antiviral e antibacteriana (MERTSCHENK; KNOTT; BAUER, 2013). Além disso, as propriedades antimicrobianas de novos compostos contendo o núcleo tiourea contra várias espécies de bactérias Gram positivas, Gram-negativas, fungos e micobactérias estão bem documentadas (BIELENICA *et al.*, 2018; BRITO *et al.*, 2018; BIELENICA *et al.*, 2017; VIANA *et al.*, 2017; DOLAN *et al.*, 2016; GHORAB *et al.*, 2016; STEFANSKA *et al.*, 2016a, STEFANSKA *et al.*, 2016b ; TATAR *et al.*, 2016; BIELENICA *et al.*, 2015; LU *et al.*, 2015; STEFANSKA *et al.*, 2015; SONI; NARSINGHANI; JAIN, 2014; BUKVIĆ KRAJACIC *et al.*, 2009; CUNHA *et al.*, 2007). No entanto, até o presente momento, poucas tioureas com atividade contra biofilmes microbianos têm sido relatadas (BIELENICA *et al.*, 2018; BIELENICA *et al.* 2016; BIELENICA *et al.*, 2015, STEFANSKA *et al.*, 2016; STEFANSKA *et al.*, 2015). Dentro dessa classe química, as benzoiltioureas apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento de microrganismos, com baixa toxicidade para células de mamíferos *in vitro*, sugerindo seu potencial como protótipos para o desenvolvimento de fármacos antimicrobianos (BRITO *et al.*, 2018).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo sintetizar e investigar a atividade antimicrobiana *in vitro* de substâncias contendo o grupamento tioureia contra importantes agentes etiológicos de sepse neonatal e realizar um estudo de relação estrutura-atividade da série química obtida.

#### 2.1.1 Objetivos Específicos

- Sintetizar, purificar e caracterizar substâncias contendo o grupamento tioureia através de síntese orgânica.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das benzoiltioureias sintetizadas sobre células planctônicas de agentes etiológicos de sepse neonatal.
- Realizar um estudo preliminar da relação estrutura-atividade da série química obtida.
- Avaliar a citotoxicidade das substâncias mais promissoras em células de mamíferos.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) da substância protótipo *N*-(Butilcarbamoil) Benzamida com melhor potencial antimicrobiano sobre células planctônicas de isolados clínicos de EGB.
- Avaliar o efeito de *N*-(Butilcarbamoil) Benzamida sobre a cinética de crescimento de EGB.
- Identificar as alterações ultraestruturais provocadas por *N*-(Butilcarbamoil) Benzamida sobre as células planctônicas de EGB.
- Investigar a atividade de *N*-(Butilcarbamoil) Benzamida sobre biofilmes maduros formados por EGB.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 SEPSE

A definição de sepse foi inicialmente discutida em uma conferência organizada pelo *American College of Chest Physicians (ACCP)* e *Society of Critical Care Medicine* em 1991 e publicada por Bone e colaboradores (1992). Neste documento, estabeleceu-se a visão predominante de que a sepse resultava da síndrome da resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro (SIRS) à uma infecção. SIRS se manifesta de acordo com os seguintes sinais clínicos: temperatura corporal superior a 38 °C ou menor que 36 °C; frequência cardíaca maior que 90 batimentos por minuto; hiperventilação, evidenciada por uma frequência respiratória maior que 20 incursões por minuto ou pressão arterial de CO<sub>2</sub> (PaCO<sub>2</sub>) < 32 mmHg e alterações na contagem de glóbulos brancos, com leucócitos > 12.000/mm<sup>3</sup> (leucocitose) ou < 4.000/mm<sup>3</sup> (leucopenia) ou ainda desvio à esquerda com mais de 10% de células imaturas. A sepse complicada por disfunção orgânica foi denominada sepse grave, que poderia progredir para choque séptico, definido como “hipotensão induzida pela sepse persistente apesar da ressuscitação fluídica adequada” (BONE; SIBBALD; SPRUNG, 1992).

Com os avanços nos conhecimentos sobre sepse, houve necessidade de revisão dos critérios anteriormente determinados por Bone e colaboradores (1992). Assim, em 2001, com base na experiência clínica e nas observações da fisiopatologia da doença, membros do *Society of Critical Care Medicine (SCCM)*, *European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)*, *American College of Chest Physicians*, *American Thoracic Society (ATS)* e *Surgical Infection Society (SIS)* estabeleceram novas diretrizes para compor o diagnóstico de sepse, em que novos sinais e sintomas foram incluídos, como instabilidade hemodinâmica, hipoxemia arterial, oligúria, coagulopatia e alterações na função renal, que melhor refletem a resposta clínica à infecção (LEVY *et al.*, 2003).

Após reconhecimento de limitações nessas definições iniciais, principalmente pelo fato de que SIRS poderia ser resultado de outras condições independentes de infecção, esses conceitos foram novamente atualizados em 2016 por grupos da *Society of Critical Care Medicine* e *European Society of Intensive Care Medicine*, resultando em novas definições conhecidas como Sepse – 3, protocolo atualmente aceito. De acordo com os critérios estipulados pelo Sepse-3, sepse é definida como disfunção orgânica importante, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção. A disfunção orgânica é

caracterizada por sinais designados pelo *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA). Assim, determinou-se que os critérios clínicos para reconhecimento de um paciente com sepse incluem suspeita ou documentação de infecção e detecção de dois ou mais sinais definidos pelo SOFA, sendo que esta condição estaria associada a uma mortalidade intra-hospitalar maior que 10% (SINGER *et al.*, 2016).

Da mesma maneira, essas novas diretrizes definiram choque séptico como um subconjunto da sepse em que anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas são profundas o suficiente para aumentar substancialmente a mortalidade. Choque séptico é caracterizado pelos parâmetros clínicos de sepse com hipotensão persistente, o que requer terapia com vasopressores para manutenção da pressão arterial média  $\geq 65$  mmHg e nível de lactato sérico  $> 2$  mmol/L (18 mg/dL). Essa combinação está associada a taxas de mortalidade hospitalar superiores a 40% (NAPOLITANO, 2018; SINGER *et al.*, 2016).

Com objetivo de facilitar e agilizar a identificação de pacientes adultos mais propensos a desenvolverem sepse em ambientes fora do hospital ou departamentos de emergência e enfermarias, o protocolo Sepse-3 sugere ainda a utilização de uma ferramenta de triagem mais simples, que pode ser utilizada à beira do leito, denominada *quick SOFA* (qSOFA). Neste caso, pelo menos dois dos seguintes critérios clínicos precisam ser identificados: frequência respiratória superior ou igual a 22/min, alteração do nível de consciência ou pressão arterial sistólica menor ou igual a 100 mmHg (NAPOLITANO, 2018; SINGER *et al.*, 2016).

### **3.1.1 Sepse Neonatal**

Doenças infecciosas estão relacionadas a altas taxas de mortalidade entre os recém-nascidos nos primeiros 28 dias de vida. Entre elas, sepse neonatal representa 15% de todas as mortes neste período em todo o mundo (UNICEF, 2017). Estima-se que, no Brasil, 60% da mortalidade infantil ocorra no período neonatal, sendo a sepse neonatal, uma das principais causas (ANVISA, 2017). Nos Estados Unidos, esta condição é a quinta causa de morte entre os neonatos e a sétima causa de morte durante o primeiro ano de vida (HERON, 2017).

Embora a definição de sepse inclua o isolamento de um patógeno a partir de um fluido corporal normalmente estéril, como sangue ou líquido cefalorraquidiano (LCR), associado a alterações hemodinâmicas e outras manifestações clínicas, o reconhecimento da sepse neonatal ainda é um desafio. Condições não infecciosas frequentemente se assemelham

às características clínicas da sepse, especialmente em recém-nascidos de muito baixo peso (< 1500g) e prematuros. Além disso, infecções invasivas também podem ocorrer em neonatos aparentemente assintomáticos. Portanto, a avaliação da história e fatores de risco em combinação com testes diagnósticos são usados para identificar recém-nascidos com maior probabilidade de desenvolverem sepse (SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017; SHANE, STOLL, 2014).

A infecção sistêmica em recém-nascidos apresenta duas formas distintas de manifestação clínica: sepse neonatal de início precoce (*early-onset sepsis* - EOS) e a de início tardio (*late-onset sepsis* - LOS). A sepse neonatal de início precoce se apresenta como bacteremia ou meningite e se manifesta nos primeiros sete dias de vida ou em menos de 72h em recém-nascidos de muito baixo peso, sendo geralmente adquirida antes ou durante o trabalho de parto por transmissão vertical. Por outro lado, a sepse neonatal de início tardio, que ocorre a partir da primeira semana ou até o terceiro mês de vida, está geralmente associada com prematuridade extrema e é atribuído a aquisição hospitalar ou horizontal (SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017; VOLLER; MYERS, 2016). A transmissão horizontal durante o período neonatal pode ocorrer da mãe para o recém-nascido ou a partir de outras fontes hospitalares ou comunitárias (AL-MAANI *et al.*, 2014). Embora controversa, já foi relatado também que a amamentação pode ser fonte deste tipo de infecção tardia (ZIMMERMANN; GWEE; CURTIS, 2017). Essa classificação auxilia na orientação da antibioticoterapia, já que implica em diferenças no modo de transmissão e microrganismos predominantes.

### 3.1.1.1 Agentes etiológicos

Sepse neonatal pode ser causada por bactérias, vírus e fungos, principalmente leveduras. *Streptococcus agalactiae* (estreptococo do grupo B – EGB) continua sendo responsável pela maioria das EOS em neonatos, embora a incidência dessa infecção tenha diminuído em mais de 80% com a implementação da antibioticoterapia profilática intraparto (API) (SCHRAG; VERANI, 2013). Depois de EGB, outras bactérias Gram-positivas responsáveis por sepse neonatal incluem *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Enterococcus* spp. e *Listeria monocytogenes*. Com a implementação da API, *Escherichia coli* emergiu como o segundo agente etiológico mais isolado em sepse neonatal (VILA *et al.*, 2016). Outros microrganismos Gram negativos comumente encontrados incluem *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., *Acinetobacter* sp. e

*Pseudomonas* sp. EOS e LOS podem também ser causadas por leveduras, principalmente do gênero *Candida*, e alguns vírus (SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017; VOLLER; MYER, 2016; SHAH; PADBURY, 2014).

### *Streptococcus agalactiae*

*Streptococcus agalactiae* foi primeiramente identificado como patógeno veterinário, causando mastite bovina (NOCARD; MOLLEREAU, 1887). Apenas na década de 1930, EGB foi isolado de *swabs* vaginais e foram descritos os primeiros casos de infecções fatais causadas por essa bactéria em mulheres no período pós-parto (LANCEFELD; HARE, 1935; FRY, 1938). Já na década de 70, esse microrganismo surgiu como importante causa de infecções invasivas em recém-nascidos (BAKER; GORDON; YOW, 1973) e atualmente ainda é considerado o principal agente etiológico associado à sepse no período neonatal (SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017).

EGB são cocos Gram positivos que podem ser encontrados na microbiota normal colonizando os tratos gastrointestinal e geniturinário de mulheres saudáveis (VERANI; MCGEE; SCHRAG, 2010) porém, são considerados patógenos oportunistas, podendo causar infecções graves em adultos e recém-nascidos. A colonização vaginal materna durante a gestação representa a principal via de transmissão de EGB para o neonato, uma vez que o contato pode ocorrer por infecção ascendente e consequente disseminação pelo útero, ou ainda durante o nascimento, por aspiração de líquido amniótico contaminado (VORNHAGEN; ADAMS WALDORF; RAJAGOPAL, 2017; VERANI; MCGEE; SCHRAG, 2010), resultando em infecções invasivas de início precoce. Taxas globais de colonização por EGB em mulheres grávidas revelam variações regionais significativas, sendo menores na Ásia (11%) e maiores no Caribe (35%) (RUSSELL *et al.*, 2017). No Brasil, estudos epidemiológicos recentes mostraram prevalência de 18,2% e 28,4 % em hospitais da região sul do país (MELO *et al.*, 2018; MORGUETTE *et al.*, 2018) e 26,2 % em uma maternidade do sudeste (BOTELHO *et al.*, 2018).

A colonização e a persistência em diferentes nichos dependem da capacidade de EGB em aderir às células e tecidos do hospedeiro. Essa etapa inicial facilita o processo de agregação de células bacterianas e a formação de comunidades sésseis, embebidas em uma matriz extracelular de polimérica, conhecidas como biofilmes. Biofilmes bacterianos são fatores de virulência reconhecidos, envolvidos em infecções crônicas e persistentes e que, no hospedeiro, protegem as células bacterianas da ação do sistema

imunológico (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018). Para EGB, fatores ambientais como pH baixo e a presença de plasma humano parecem ser cruciais para o controle da expressão de estruturas bacterianas associadas à superfície, como *pili* e cápsula, ambos envolvidos na formação do biofilme bacteriano (ROSINI; MARGARIT, 2015; XIA *et al.*, 2015).

#### *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa

*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCoN), incluindo isolados resistentes à meticilina, são causas frequentes de sepse de início tardio no período neonatal, principalmente em recém – nascidos de muito baixo peso (CANTEY *et al.*, 2018). Em alguns países, como a Nigéria e Nepal, *S. aureus* se destaca como o principal agente, ultrapassando EGB (MEDUGU *et al.*, 2018; YADAV *et al.*, 2018). Entre as espécies de SCoN mais comumente associadas à sepse neonatal, *Staphylococcus epidermidis* é a mais predominante, representando até 77,9% das LOS neonatal nos países desenvolvidos e 62,5% em algumas regiões em desenvolvimento (DONG; SPEER; GLASER, 2018). Além disso, trabalhos recentes relataram a emergência e disseminação de uma cepa clonal de *Staphylococcus capitis* multirresistente presente em unidades de terapia intensiva neonatal e envolvida com LOS em diversos países (BUTIN *et al.*, 2016, 2017; BEN SAID *et al.*, 2016; RASIGADE *et al.*, 2012).

#### *Enterococcus* spp.

Espécies de *Enterococcus* spp. estão entre as primeiras bactérias a colonizar o trato gastrointestinal do neonato, seja através da ingestão oral do leite materno ou do contato com a microbiota vaginal e gastrointestinal da mãe durante o parto. Paralelamente, estes microrganismos são responsáveis por aproximadamente 10% dos casos de bacteremia e sepse no período neonatal (SHANTALA *et al.*, 2014). A emergência de isolados multirresistentes, especialmente resistentes à vancomicina (VRE), em ambiente hospitalar, têm causado surtos em unidades de terapia intensiva neonatal, muitas vezes relacionados com a colonização prévia dos recém-nascidos (IOSIFIDIS *et al.*, 2013). Esta relação foi descrita em um caso de LOS causada por *Enterococcus faecalis* VRE em um recém-nascido prematuro e com baixo peso em um hospital na Índia (KAUSHAL *et al.*, 2016). Por outro lado, Shantala e colaboradores (2014) publicaram o relato de um caso fatal de EOS neonatal causada por *Enterococcus faecium* VRE, que foi isolado da corrente sanguínea de um recém-nascido com

baixo peso.

### *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* é um patógeno intracelular que pode ser transmitido por alimentos contaminados e geralmente causa infecções em indivíduos imunocomprometidos, gestantes e recém-nascidos. O principal risco associado à listeriose durante a gravidez é a transmissão da bactéria por via hematogênica para o feto através da placenta ou ainda pela ingestão de líquido amniótico contaminado. Essa infecção pode se desenvolver a qualquer momento durante a gestação e resultar em perda fetal, parto prematuro e infecções neonatais, como sepse e meningite (VÁZQUEZ-BOLAND; KRYPTOTOU; SCORTTI, 2017). Em neonatos, o maior fator de risco associado à listeriose é a prematuridade, sendo que mais de 70% dos casos ocorrem em recém-nascidos com menos de 35 semanas de gestação (GIRARD *et al.*, 2014).

Embora dados epidemiológicos de alguns países mostrem uma significativa diminuição na incidência de listeriose neonatal nos últimos anos (LEE; NEWLAND; JHAVERI, 2016; SAPUAN *et al.*, 2017), relatos da literatura publicados recentemente descrevem casos isolados de sepse neonatal precoce em que *L. monocytogenes* foi identificado a partir de culturas de líquido, sangue, secreção traqueal e *swab* periumbilical de recém-nascidos prematuros (KYLAT *et al.*, 2016).

### *Escherichia coli*

As enterobactérias, incluindo *E. coli*, são frequentemente encontradas colonizando o canal vaginal materno, podendo causar infecções intra-amnióticas e puerperais em gestantes, assim como em neonatos (GUIRAL *et al.*, 2011). *E. coli* é a segunda principal causa de EOS em neonatos, sendo responsável por cerca de 29% de todos os episódios de EOS nos Estados Unidos, com 81% dos casos ocorrendo em prematuros (STOLL *et al.*, 2011) e, entre os recém-nascidos de baixo peso, esta espécie é a causa mais frequente de EOS (SHANE, SÁNCHEZ, STOLL, 2017). Entretanto, em alguns países, esta bactéria é a principal causa de sepse neonatal (GUO *et al.*, 2019).

Alguns fatores de virulência foram especificamente identificados como fundamentais na fisiopatologia da sepse neonatal por *E. coli*. Em níveis elevados de bacteremia, *E. coli* pode atravessar a barreira hematoencefálica e causar inflamação do

sistema nervoso central (SNC), resultando em meningite neonatal. O antígeno capsular K1, presente em algumas cepas, está intimamente relacionado à meningite neonatal e é o fator de virulência mais bem descrito. Cerca de 80% das cepas de *E. coli* causadoras de meningite pertencem ao tipo capsular K1, sendo os sorotipos O18: K1 e O7: K1 os mais frequentemente encontrados. Outros fatores de virulência associados à capacidade de causar meningite neonatal incluem proteínas presentes na membrana externa (OmpA), sideróforos (genes *iroN*, *fyuA* e *iucC/iutA*), adesinas (fímbrias-P, fímbrias-S e fímbrias tipo 1) e invasinas (genes *ibeA*, *asl* e *cnf1*) (VILA *et al.*, 2016).

#### Outros microrganismos Gram negativos

Outras espécies de bacilos Gram-negativos são causas menos comuns de EOS, porém são importantes quando envolvidas com LOS, pois frequentemente apresentam característica de multirresistência e estão associados a altas taxas de mortalidade (FOLGORI *et al.*, 2017; SIMONSEN *et al.*, 2014). Trabalhos recentes mostram a emergência de isolados resistentes de *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. associados a maior taxa de mortalidade por sepse no período neonatal (JAJOO *et al.*, 2018; YUSEF *et al.*, 2018).

#### Fungos

Embora menos frequentes do que as infecções invasivas causadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, as infecções fúngicas, especialmente aquelas causadas por leveduras do gênero *Candida*, apresentam alta taxa de mortalidade no período neonatal, sendo a terceira causa mais comum de LOS em recém-nascidos de baixo peso (<1500 g) (PAMMI *et al.*, 2013).

Além do baixo peso ao nascer e prematuridade, outros fatores de risco, inerentes aos cuidados intensivos e hospitalização prolongada, também contribuem para o desenvolvimento de candidemia em recém-nascidos, tais como: utilização de cateter venoso central, uso de antimicrobianos de amplo espectro, nutrição parenteral e ventilação mecânica (WALSH *et al.*, 2019).

Estudos recentes mostram que a colonização gastrointestinal dos neonatos por leveduras do gênero *Candida*, especialmente *C. albicans* e *C. parapsilosis*, pode ocorrer inicialmente pela exposição a esses microrganismos tanto a partir de superfícies no ambiente

hospitalar quanto do leite materno (HEISEL *et al.*, 2019) e que a presença dessas espécies na microbiota intestinal facilita a disseminação e o desenvolvimento de candidíase invasiva nos recém-nascidos (HEMEDEZ *et al.*, 2019).

Embora *C. albicans* ainda seja a espécie predominante em infecções fúngicas neonatais, as espécies de *Candida* não *albicans*, especialmente *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, vêm emergindo como microrganismos importantes nas candidemias em neonatos em diversas regiões do mundo. Essa alteração na distribuição das espécies pode estar relacionada com a prévia exposição aos antifúngicos azólicos e consequente emergência tanto de isolados que apresentam resistência adquirida como daqueles naturalmente resistentes a essa classe de medicamentos (LAMOTH *et al.*, 2018).

## Virus

Entre os vírus, herpes vírus simples (HSV) e enterovírus (EV) são os mais frequentemente associados com sepse neonatal (SHANE, SÁNCHEZ, STOLL, 2017). Embora raras, as infecções neonatais por HSV são consideradas graves, com taxa de mortalidade estimada em 60% nos casos não tratados (LOOKER *et al.*, 2017). Em 85% dos casos, a exposição dos recém-nascidos ao vírus ocorre durante o parto em gestantes que apresentam infecção genital por HSV-1 ou HSV-2, os dois sorotipos mais prevalentes. A transmissão ainda pode ocorrer por meio de infecção intra-uterina (5%) ou no período pós-parto (10%) (PINNINTI; KIMBERLIN, 2018). Dados epidemiológicos recentemente publicados estimam a incidência global de herpes neonatal em cerca de dez casos por 100.000 nascidos vivos, equivalente a, aproximadamente, 14.000 casos por ano (4000 para HSV-1; 10.000 para HSV-2) (LOOKER *et al.*, 2017).

Embora o termo “sepse” seja frequentemente utilizado para descrever infecções neonatais causadas por enterovírus, os recém-nascidos acometidos geralmente apresentam uma síndrome semelhante à sepse, acompanhada de sinais clínicos compatíveis com meningite ou meningoencefalite, miocardite, hepatite e menos comumente, pneumonia (MODLIN, 2015). Morriss e colaboradores (2016) descreveram cinco casos de recém-nascidos com sepse neonatal por EV em uma unidade de terapia intensiva, em que o vírus foi detectado no líquido dos pacientes, utilizando técnicas moleculares (RT-PCR), após suspeita de sepse e resultados negativos de culturas bacterianas. Diante de situações semelhantes e utilizando a mesma metodologia diagnóstica, Ahmad e colaboradores (2013) identificaram a presença de EV em 24 % das amostras de sangue de neonatos com sinais aparentes de sepse

internados em três hospitais no Kuwait.

### 3.1.1.2 Diagnóstico

Embora o exame físico seja importante para o diagnóstico de sepse em neonatos, algumas manifestações clínicas podem ser inespecíficas e simplesmente estarem associadas à prematuridade e à adaptação fisiológica nos primeiros dias após o nascimento. Assim, atualmente, o diagnóstico de sepse neonatal é realizado a partir da combinação de sinais clínicos e métodos laboratoriais, como técnicas microbiológicas básicas para identificação de bactérias e fungos, e a dosagem de biomarcadores sanguíneos e reagentes de fase aguda (TAM; BENDEL, 2017).

De acordo com critérios nacionais estabelecidos pela ANVISA (2017), para uma infecção ser definida como infecção primária da corrente sanguínea laboratorialmente confirmada (IPCSL) deverá apresentar um dos seguintes critérios: (i) uma ou mais hemoculturas positivas por microrganismos não contaminantes da pele e que o microrganismo não esteja relacionado à infecção em outro sítio ou (ii) pelo menos um dos sinais e sintomas: instabilidade térmica, bradicardia, apneia, intolerância alimentar, piora do desconforto respiratório, intolerância à glicose, instabilidade hemodinâmica, hipoatividade/letargia juntamente com o cultivo de microrganismos contaminantes comuns da pele (*Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp., *Propionibacterium* spp., *Staphylococcus* coagulase negativa, *Streptococcus* do grupo viridans, *Aerococcus* spp. e *Micrococcus* spp) em pelo menos duas hemoculturas colhidas em dois locais diferentes, com intervalo máximo de 48 horas entre as coletas e ainda estafilococo coagulase negativo cultivado em pelo menos uma hemocultura periférica de paciente com cateter vascular central (CVC). No entanto, vários fatores, incluindo os pequenos volumes sanguíneos obtidos de neonatos, presença de bacteremia baixa ou intermitente, assim como a exposição antimicrobiana intraparto materna, podem tornar a confirmação de sepse em recém-nascidos um desafio diagnóstico (TAM; BENDEL, 2017).

Devido à falta de sensibilidade do exame físico e das dificuldades para coleta de material para a cultura microbiológica, o diagnóstico de sepse neonatal utiliza ainda marcadores laboratoriais, contagem de componentes sanguíneos, como neutrófilos e plaquetas, e a quantificação de reagentes de fase aguda como proteína C reativa (PCR) e procalcitonina. Além disso, no caso da análise de LCR, podem ser realizadas ainda a dosagem de proteínas e glicose neste material (SHANE, SÁNCHEZ, STOLL, 2017; TAM; BENDEL,

2017).

Novas ferramentas de diagnóstico vem sendo estudadas. Entre elas destacam-se a realização da cultura de sangue do cordão umbilical (MEENA *et al.*, 2015; MITHAL *et al.*, 2017), identificação de marcadores de inflamação no soro materno e técnicas moleculares (TAM; BENDEL, 2017).

### 3.1.1.3 Controle das infecções neonatais

Em 1996, o CDC dos Estados Unidos, em colaboração com associações profissionais americanas relevantes, publicou diretrizes para a prevenção da doença precoce por EGB (CDC, 1996), que foram atualizadas em 2002 (SCHRAG *et al.*, 2002) e posteriormente em 2010 (VERANI; MCGEE; SCHRAG, 2010), sendo esta última edição a que permanece vigente atualmente. Entre as medidas profiláticas, recomenda-se a cultura para a triagem de EGB para todas as mulheres grávidas entre a 35<sup>a</sup> e 37<sup>a</sup> semanas de gestação, com o objetivo de estabelecer a antibioticoterapia profilática intraparto (API) durante o trabalho de parto para todas aquelas colonizadas por esta bactéria. Além disso, a API também é recomendada para gestantes que apresentem fatores de risco como: bacteriúria por EGB em qualquer período da gestação, histórico de filho com doença invasiva por EGB, parto prematuro (< 37 semanas de gestação), ruptura das membranas por tempo superior a 18 h e febre intraparto (> 38 °C). Neste protocolo, a administração do antimicrobiano deve ser iniciada pelo menos 4 horas antes do parto, sendo que penicilina é recomendada como fármaco de primeira escolha e cefazolina ou clindamicina nos casos de gestantes alérgicas à penicilina (VERANI; MCGEE; SCHRAG, 2010). Outras estratégias incluem a profilaxia com fluconazol para neonatos com baixo peso (<1500g) e suplementação com lactoferrina e probióticos para prevenção de sepse neonatal tardia (SHANE, SÁNCHEZ, STOLL, 2017).

O tratamento de infecções neonatais pode ser dividido em terapia antimicrobiana empírica, realizada enquanto se aguarda a identificação do agente causador, ou definitiva, quando o patógeno já é conhecido. Embora seja preferível obter os resultados das culturas microbiológicas antes do início da terapia antimicrobiana, a escolha do tratamento empírico no caso das infecções neonatais pode ser realizada com base na observação das manifestações clínicas características de EOS e LOS (SHANE, SÁNCHEZ, STOLL, 2017).

Ampicilina e um aminoglicosídeo, geralmente gentamicina, são recomendados como terapia empírica para EOS, já que essa combinação de fármacos age sobre *E. coli* e tem atividade sinérgica contra EGB e *L. monocytogenes*. Embora o uso

profilático de vancomicina seja questionável, devido à emergência de isolados resistentes, este glicopeptídeo e um aminoglicosídeo podem ser usados para LOS, devido à frequência de infecções causadas por SCoN em recém-nascidos que usam dispositivos médicos. Cefalosporinas de terceira ou quarta geração são opções recomendadas se houver suspeita de meningite por bactérias Gram-negativas. Anfotericina B pode ser utilizada em recém-nascidos que apresentem fatores de risco associados a infecções fúngicas invasivas e aciclovir quando houver suspeita de HSV (VOLLER; MYER, 2016).

A terapia específica para o patógeno causador deve ser adotada o mais rapidamente possível a partir dos resultados das culturas microbiológicas e deve ser estabelecida de acordo com a espécie identificada e o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos encontrado. A duração do tratamento varia de 7 a 21 dias, dependendo do tipo de patógeno e do local de infecção (SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017).

### **3.2 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM EGB**

Os antimicrobianos são os fármacos mais prescritos em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal. Entre as diversas consequências do uso contínuo e empírico desses medicamentos, destaca-se a pressão seletiva e a consequente emergência de infecções causadas por microrganismos resistentes nesses ambientes (SCHULMAN *et al.*, 2015; de SOUZA, *et al.*, 2016). Dados epidemiológicos de cinco países que apresentam as maiores taxas globais de mortalidade neonatal mostraram que a resistência antimicrobiana é responsável por cerca de 30% de todos os casos de mortes por sepse neonatal (LAXMINARAYAN *et al.*, 2016).

Neste contexto, as autoridades em saúde, especialmente a Organização Mundial da Saúde (OMS), publicou, recentemente, uma lista em que constam 12 espécies bacterianas que representam uma ameaça para a saúde pública em termos de resistência antimicrobiana. Essas recomendações têm como objetivo direcionar e incentivar a pesquisa e o desenvolvimento de novas classes de antimicrobianos (TACCONELLI *et al.*, 2018). Seguindo esta mesma tendência, um documento recente publicado pelo CDC, uma série de microrganismos foram classificados de acordo com o nível de ameaça quanto à resistência aos antimicrobianos. Entre eles, EGB resistente à clindamicina, foi classificado entre as espécies que representam um desafio iminente quando agentes de infecções (CDC, 2013).

Como mencionado anteriormente, na API recomenda-se a utilização dos beta-lactâmicos, penicilina ou ampicilina, como fármacos de primeira escolha, já que a

maioria dos isolados de EGB ainda permanece sensível a esses antimicrobianos (VERANI; MCGEE; SCHRAG, 2010). No entanto, alguns estudos já identificaram isolados com sensibilidade reduzida à penicilina em diversos países (KIMURA *et al.*, 2008; NAGANO *et al.*, 2014; SEKI *et al.*, 2015), inclusive no Brasil (MORGUETTE *et al.*, 2018). Nestes casos, os mecanismos de resistência identificados foram mutações nos genes que codificam proteínas de ligação à penicilina PBP1, PBP2b e PBP2x, as quais participam da biossíntese da parede celular, e que apresentam menor afinidade pelos beta-lactâmicos (KIMURA *et al.*, 2008).

Clindamicina e eritromicina, fármacos das classes de lincosamidas e macrolídeos, respectivamente, são recomendadas como agentes de segunda escolha, sendo considerados a primeira alternativa para a profilaxia intraparto em gestantes alérgicas à penicilina e com alto risco de anafilaxia (VERANI; MCGEE; SCHRAG, 2010). No entanto, a resistência a esses antimicrobianos entre isolados de EGB tem sido descrita em diversos países. Estudos epidemiológicos realizados recentemente em hospitais brasileiros, mostraram taxas significativas de resistência, variando de 10,2 % a 14% para eritromicina e 2% a 10% para clindamicina (BOTELHO *et al.*, 2018; MORGUETTE *et al.*, 2018). Em outros países, as taxas de resistência de EGB à clindamicina e eritromicina são ainda mais altas e crescentes. No Canadá, foi observado um aumento de 23,6% para 43,9% de isolados resistentes a eritromicina e de 12,2% para 32,5% para clindamicina, em um período de dez anos (ALHHAZMI; HURTEAU; TYRRELL, 2016). Da mesma maneira, altas taxas foram também observadas na China, sendo que 57,4% e 51,5% dos isolados apresentaram resistência à eritromicina e clindamicina, respectivamente (GUAN *et al.*, 2018).

Espécies do gênero *Streptococcus* podem apresentar resistência aos macrolídeos e lincosamidas por dois mecanismos principais. Isolados resistentes apenas a macrolídeos apresentam o fenótipo M, expresso por bombas de efluxo codificadas pelo gene *mef(A/E)*, enquanto aqueles resistentes a ambos os antimicrobianos possuem genes *erm(A)* e/ou *erm(B)*, que codificam metilases responsáveis pela modificação pós-transcricional dos resíduos de adenina presentes no RNA ribossomal 23S, resultando no fenótipo MLSB, no qual pode ocorrer resistência cruzada a macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B. Este fenótipo pode ser constitutivo (cMLSB) ou indutivo (iMLSB), sendo que neste último caso a resistência a lincosamidas e estreptogramina B é induzida pelo macrolídeo (HAENNI; LUPO; MADEC, 2018).

O modo de crescimento em biofilmes também apresenta características fisiológicas particulares que conferem resistência à ação dos antimicrobianos. Células

incorporadas em biofilmes se associam irreversivelmente a superfícies bióticas e abióticas formando comunidades microbianas embebidas em uma matriz extracelular polimérica, composta primariamente por polissacarídeos, além de íons metálicos e outras macromoléculas como lipídeos, proteínas e DNA (SINGH *et al.*, 2017; VENKATESAN; PERUMAL; DOBLE, 2015; DONLAN, 2002).

De maneira geral, a resistência expressa por biofilmes microbianos é multifatorial e envolve diversos mecanismos como (a) difusão limitada de agentes antimicrobianos através da matriz do biofilme, (b) resistência mediada por enzima, incluindo beta-lactamases (c) níveis heterogêneos de atividade metabólica no interior do biofilme, (d) presença de células persistentes, que apresentam metabolismo reduzido e tolerância aos agentes antimicrobianos (e) adaptação genética, como expressão de genes de resistência e de enzimas de reparo e (f) expressão de bombas de efluxo (SINGH *et al.*, 2017).

Trabalhos publicados recentemente mostram a atividade reduzida de antimicrobianos convencionais sobre biofilmes formados por espécies de *Streptococcus* spp, entre elas, EGB. Fosfomicina, rifampicina, benzilpenicilina, daptomicina, gentamicina e levofloxacina foram utilizadas para tratar biofilmes formados *in vitro* por *S. agalactiae*, *S. pyogenes* e *S. oralis*. Com exceção da gentamicina, que foi capaz de erradicar completamente os biofilmes em baixas concentrações (4 a 16 mg/L), as concentrações inibitórias de todos os outros antimicrobianos foram 125 vezes maiores para células sésseis quando comparadas àquelas obtidas para células planctônicas; valores que não podem ser alcançados na prática clínica (MORENO; TRAMPUZ; DI LUCA, 2017). Ruppen e colaboradores (2017) também reportaram a atividade da gentamicina, sozinha ou como adjuvante da penicilina, contra biofilmes de EGB na concentração de 12,5 mg /L.

### 3.3 SÍNTESE QUÍMICA E O DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS

Fármacos antimicrobianos desempenham um papel importante para a saúde humana e animal, sendo utilizados tanto para o tratamento como na profilaxia de doenças infecciosas. Esta classe inclui agentes que atuam contra todos os tipos de microrganismos: bactérias (antibacterianos), fungos (antifúngicos), vírus (antivirais) e protozoários (antiprotozoários). De acordo com o processo pelo qual são elaborados, estes compostos podem ser divididos em três categorias: a) antimicrobianos de origem natural, também conhecidos como antibióticos, são aqueles produzidos por algumas espécies de bactérias, fungos, plantas e algas; b) antimicrobianos semissintéticos, que são moléculas geradas por

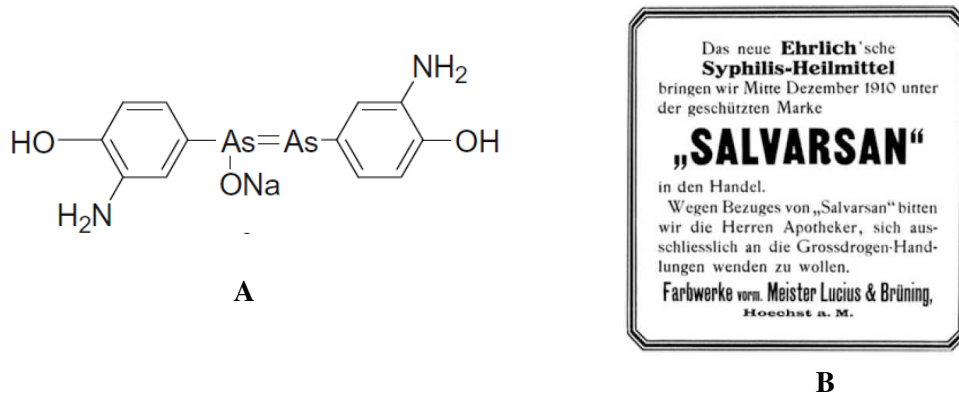
síntese química a partir de modificações em uma estrutura primária de origem natural e c) antimicrobianos sintéticos, produtos obtidos completamente através de rotas sintéticas (FRIDMAN, 2017; NEWMAN; CRAGG, 2016).

Com relação aos antibacterianos, estes ainda podem ser classificados de acordo com seu modo de ação e alvos específicos na célula bacteriana. São considerados bactericidas ou bacteriostáticos, quando capazes de matar ou inibir o crescimento das bactérias, respectivamente. Essa ação é consequência da atuação sobre determinados componentes encontrados nas células bacterianas, sobre os quais os antibacterianos podem atuar inibindo a síntese, como ocorre com a parede celular, as proteínas e os ácidos nucleicos, além de interferirem em diferentes etapas de importantes vias metabólicas, como a síntese de ácido fólico, e ainda alterarem a estrutura e função da membrana plasmática (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017).

Historicamente, o desenvolvimento, a produção em larga escala e a introdução de antimicrobianos na prática clínica, aliados à expansão do conhecimento sobre os patógenos e às melhorias nas condições de higiene, revolucionaram o tratamento e o controle das doenças infecciosas. Nos Estados Unidos, o maior declínio nas taxas de mortalidade associadas às infecções foi observado entre 1938 e 1952, período correspondente à inclusão das sulfonamidas, penicilina e estreptomicina no arsenal terapêutico (AMINOV, 2017). Dados epidemiológicos publicados recentemente pela Organização Mundial da Saúde, mostram que, de fato, no mundo todo, a mortalidade relacionada a doenças infecciosas foi superada por outras enfermidades não infecciosas, como infarto e acidente vascular encefálico (HERON, 2017), indicando o papel fundamental e a eficiência dos fármacos antimicrobianos.

A quimioterapia antimicrobiana moderna teve início com o desenvolvimento das primeiras substâncias antibacterianas por síntese química. Em busca de uma “bala mágica”, que pudesse destruir o patógeno de maneira seletiva sem prejudicar o hospedeiro, o bacteriologista alemão Paul Ehrlich, em 1910, descobriu o primeiro quimioterápico antibacteriano, chamado de *Salvarsan* (Figura 1), um derivado de arsênico, efetivo contra a sífilis. Contudo, medicamentos à base de arsênico tinham uso limitado e eram tóxicos para os hospedeiros humanos (MOHR, 2016; WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014).

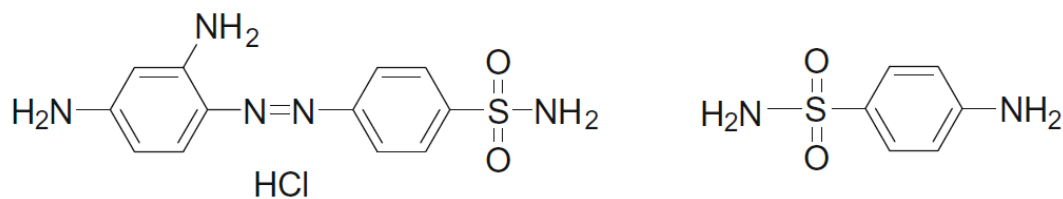
**Figura 1.** A) Estrutura química de Salvarsan; B) Folha de informação do Salvarsan.



Fonte: MOHR, 2016.

O composto que verdadeiramente revolucionou a luta da humanidade contra bactérias patogênicas foi a penicilina, descoberta em 1928, por Alexander Fleming, porém comercializada apenas na década de 40. Neste intervalo, diversos pesquisadores direcionaram seus estudos para testes de atividade antimicrobiana de compostos químicos utilizados como corantes para tecidos. A partir disso, outra importante classe de antibacterianos de origem sintética, as sulfonamidas, foi identificada e o primeiro fármaco comercializado foi conhecido como Prontosil (Figura 2) (MOHR, 2016).

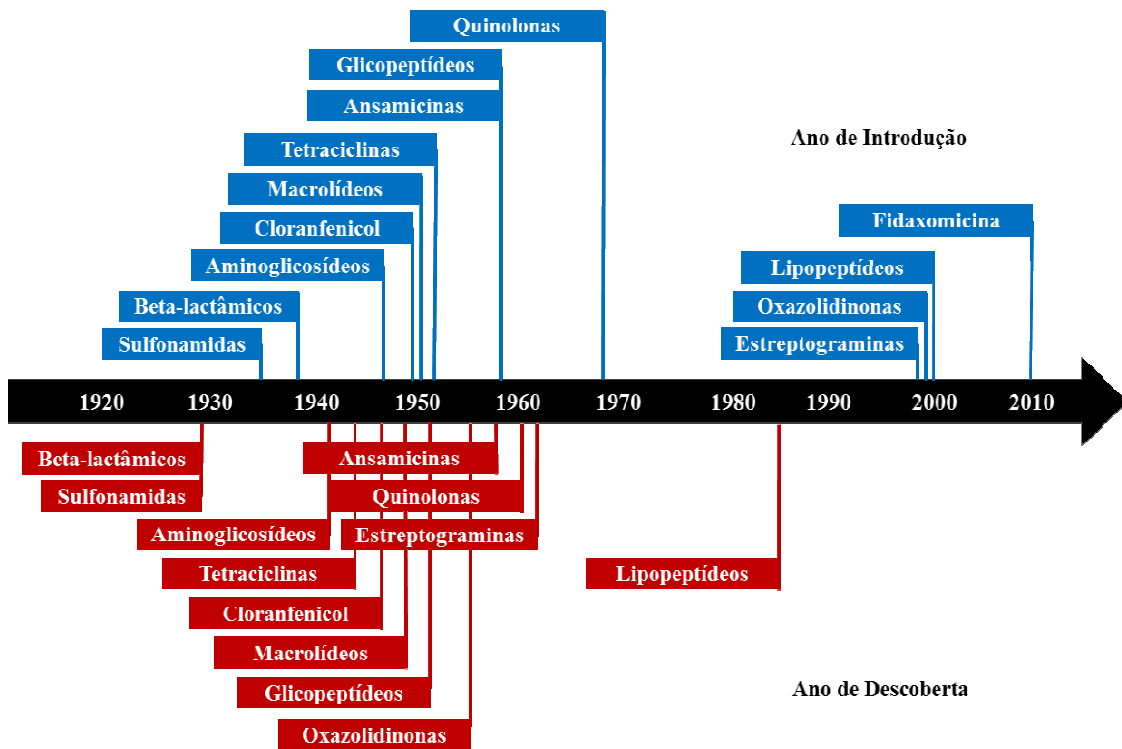
**Figura 2.** Estrutura química do pró-fármaco (A) e da forma ativa do Prontosil (B)



Fonte: MOHR, 2016.

A Segunda Guerra Mundial colocou a penicilina e a pesquisa com antimicrobianos em foco e durante as duas décadas seguintes várias classes diferentes de antimicrobianos foram descobertas (Figura 3) (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014).

**Figura 3.** Linha do tempo mostrando a evolução da descoberta dos antibacterianos.



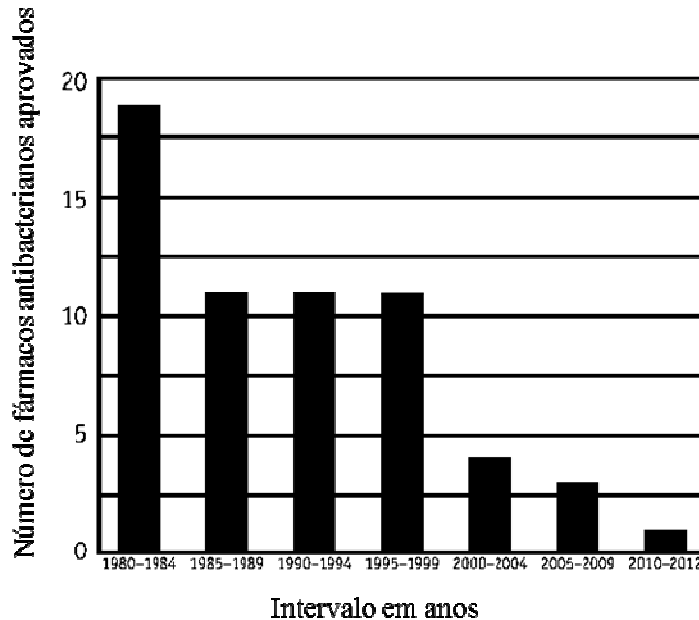
Fonte: Adaptado de Lewis, 2017.

Como mostrado na Figura 3, nota-se que o período entre as décadas de 1940 e 1970 foi a era de ouro na descoberta de novas classes de fármacos antibacterianos, em virtude, principalmente, do advento dos processos de semissíntese no período pós-guerra, além de abordagens totalmente sintéticas, que resultaram em um grande número de medicamentos aprovados para uso clínico. Entre as classes de antibacterianos sintéticos atualmente disponíveis para a terapia, pode-se citar as sulfonamidas, as quinolonas, carbapenênicos e oxazolidinonas, além de quatro outros antibacterianos totalmente sintéticos - cloranfenicol, metronidazol, trimetoprima e fosfomicina. Além dessa notável contribuição, repetidamente, a síntese química permitiu o aprimoramento das moléculas antimicrobianas com relação a aumento de potência, melhoria nos perfis de segurança e espectros estendidos de atividade, especialmente frente às bactérias que expressam mecanismos de resistência (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014).

Após o ano 2000, a busca por novos compostos foi desestimulada devido a fatores econômicos, como preços relativamente baixos dos produtos, e ainda pelo fato de os antimicrobianos apresentarem usos terapêuticos temporários. Essa falta de investimento, acoplada com o avanço da resistência antimicrobiana, transformou a produção desses

fármacos em um movimento pouco recompensador (Figura 4).

**Figura 4** - Número de novos fármacos antimicrobianos aprovados *versus* intervalo de anos.



Fonte: Adaptado de *Centers for Disease Control and Prevention* (2013).

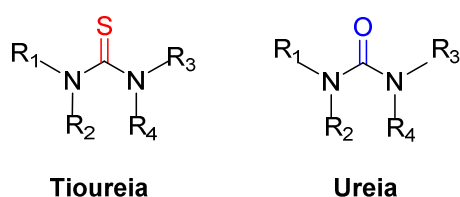
Embora a resistência aos antimicrobianos seja um processo natural na evolução dos microrganismos e já tenha sido observada logo após a descoberta da penicilina (ABRAHAM; CHAIN, 1940), esse fenômeno ainda representa uma ameaça crescente e de grande impacto para a saúde humana. Em contrapartida, poucos são os avanços científicos relacionados com a descoberta de novos alvos e de novas moléculas ativas contra bactérias multirresistentes. Com exceção dos lipopeptídeos, a maioria das classes de antimicrobianos utilizados atualmente foi descoberta antes da década de 1980 (AMINOV, 2017).

Assim, a humanidade enfrenta uma grave crise de antimicrobianos, consequência, principalmente, do excessivo uso destes fármacos e da escassez de investimentos da indústria farmacêutica na pesquisa e desenvolvimento nesta área, culminando em um cenário atual em que são alarmantes as taxas de infecções causadas por patógenos resistentes à maioria dos antimicrobianos e até mesmo daqueles para os quais já não há mais opção terapêutica disponível (GOULD; BAL, 2015; VENTOLA, 2015).

### 3.4 TIOUREIAS

Tioureias (Figura 5) representam uma classe de compostos orgânicos com fórmula geral  $(R_1R_2N)(R_3R_4N)C=S$ . Estes apresentam semelhança estrutural com ureias, exceto pela substituição do átomo de oxigênio da ureia por enxofre, o que acarreta diretamente em diferenças nas propriedades físico-químicas destes compostos (SHAKEEL *et al.*, 2016)

**Figura 5.** Representação estrutural de tioureias e ureias.

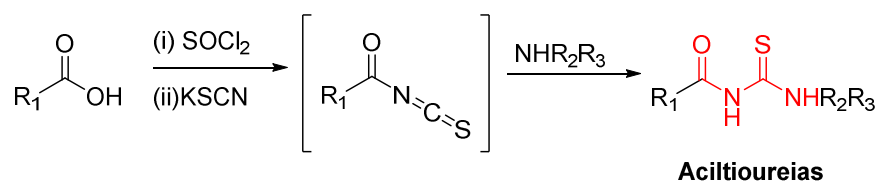


Fonte: O próprio autor.

Compostos contendo o grupo tioureia são estruturas versáteis que vêm sendo amplamente utilizadas como precursores na síntese de amidas, guanidinas e vários compostos heterocíclicos, além de poderem também ser aplicados como organocatalisadores. Por esta razão, várias são as metodologias descritas para a síntese destes compostos, sendo as mais amplamente utilizadas aquelas que envolvem a condensação de aminas primárias e secundárias com isotiocianato ou com tiofosfênio; a reação de aminas primárias com dissulfeto de carbono; e a reação a partir de cianamidas (SHAKEEL *et al.*, 2016).

A síntese de aciltioureias pode ocorrer a partir de ácidos carboxílicos, que são primeiramente convertidos para cloretos de acila, utilizando como reagente o cloreto de tionila. Na etapa seguinte, os cloretos de acila reagem com tiocianato de amônio ou de potássio em acetona, formando um isotiocianato de acila, que pode então ser tratado com aminas com diferentes substituintes para fornecer as aciltioureias de interesse (OTAZO-SÁNCHEZ *et. al.*, 2001).

**Figura 6.** Representação da via de síntese de aciltioureias a partir de ácidos carboxílicos.

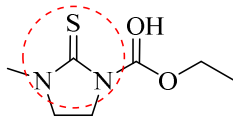


Fonte: O próprio autor.

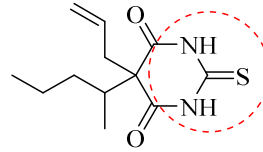
### **3.4.1 Tioureias: Uma versátil classe de substâncias bioativas**

Compostos contendo o grupamento tioureia são utilizados na prática clínica desde a década de 1970 como fármacos para o tratamento do hipertireoidismo (MANNA; ROY; MUGESH, 2013). Na química medicinal, são consideradas importantes blocos construtores para a síntese de moléculas bioativas de diversas classes terapêuticas como antimicrobianos, anestésicos e antissépticos (Figura 7) (MERTSCHENK; KNOTT; BAUER, 2013).

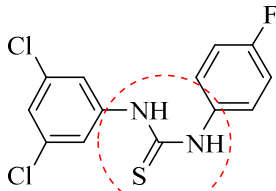
**Figura 7.** Estrutura química e atividade biológica de diferentes compostos contendo o núcleo tiourea.



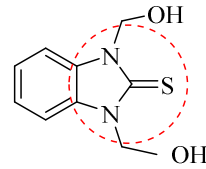
Carbimazol  
**Antitireoidiano**



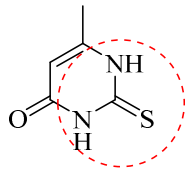
Tiamilal  
**Anestésico**



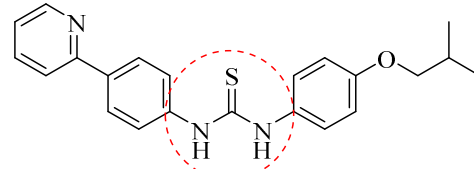
Loflucarban  
**Fungicida, agente dermatológico**



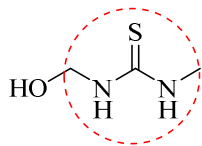
Tiabenzazolin  
**Antitireoidiano**



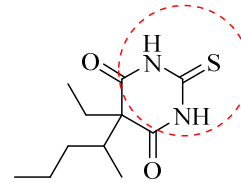
Metiltiouracila  
**Antitireoidiano**



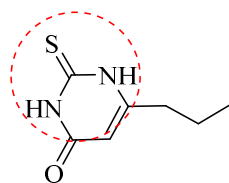
Tiocarbanidin  
**Antibacteriano**



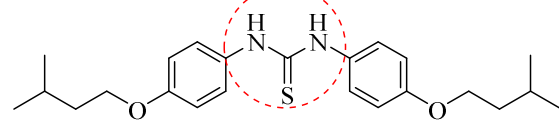
Noxitiolin  
**Antisséptico**



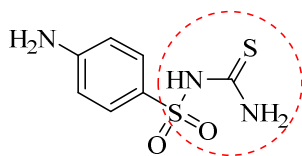
Tiopental  
**Anestésico**



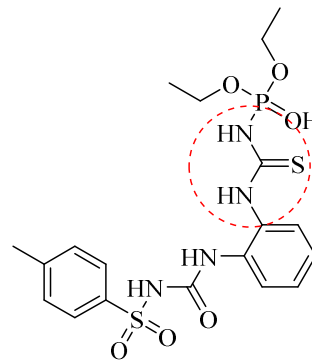
Propiltiouracila  
**Antitireoidiano**



Tiocarlide  
**Antibacteriano**



Sulfatiourea  
**Antibacteriano**



Uredofos  
**Antihelmíntico**

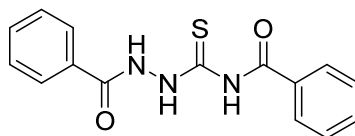
Fonte: Adaptado de MERTSCHENK; KNOTT; BAUER, 2013.

### 3.4.1.1 Atividade antimicrobiana de tioureias

A atividade antimicrobiana de compostos contendo o núcleo tioureia já foi relatada frente a diversos microrganismos, como bactérias Gram-positivas (incluindo espécies de *Streptococcus*), Gram-negativas, micobactérias, fungos, vírus e protozoários (BIELENICA *et al.*, 2018; BRITO *et al.*, 2018; BIELENICA *et al.*, 2017; VIANA *et al.*, 2017; DOLAN *et al.*, 2016; GHORAB *et al.*, 2016; STEFANSKA *et al.*, 2016a, STEFANSKA *et al.*, 2016b ; TATAR *et al.*, 2016; BIELENICA *et al.*, 2015; LU *et al.*, 2015; STEFANSKA *et al.*, 2015; SONI; NARSINGHANI; JAIN, 2014; BUKVIĆ KRAJACIC *et al.*, 2009; CUNHA *et al.*, 2007).

Neste contexto, destaca-se o trabalho de Cunha e colaboradores (2007), que prepararam duas séries de tioureias dissubstituídas, sendo a primeira formada por seis diferentes *N*-feniltioureias e a outra, por quatorze *N*-benzoiltioureias. Ambas as séries tiveram suas atividades antimicrobianas avaliadas frente a cepas de referência de bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6638, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Streptococcus mutans* ATCC 24175), Gram-negativas (*Salmonella choleraesuis* ATCC 14028, *E. coli* ATCC 94863, *Pseudomonas aeruginosa*) e fungos (*Candida albicans* ATCC 18804, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Cladosporium cladosporioides* IMI 178517). De maneira geral, os compostos mostraram melhor atividade contra bactérias Gram-positivas e fungos, sendo que os valores de concentração inibitória mínima (CIM) do composto mais ativo *N*-(2-benzoilhidrazina-1-carbonotioil)benzamida (Figura 8) variaram de 3,1 a 25 µg/mL para essas cepas. A partir dos resultados encontrados, os autores observaram ainda que as benzoiltioureias foram mais ativas em comparação às feniltioureias correspondentes.

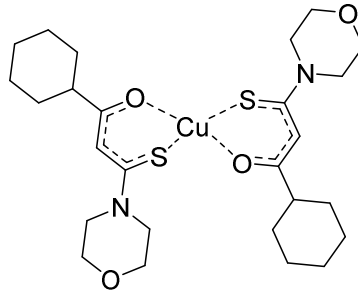
**Figura 8.** Estrutura química de *N*-(2-benzoilhidrazina-1-carbonotioil)benzamida (CUNHA *et al.*, 2007).



Fonte: O próprio autor

Em 2009, Arslan e colaboradores sintetizaram cinco tioureas contendo núcleo ciclohexil e seus respectivos complexos com níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) e cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e avaliaram suas propriedades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. pyogenes* (isolado clínico), *B. cereus* (isolado clínico), *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *E. aerogenes* (isolado clínico); *C. albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 32554, *C. tropicalis* ATCC 20336 e *C. parapsilosis* (isolado clínico). Todos os compostos inibiram o crescimento das bactérias e leveduras incluídas no estudo, com CIM variando de 50 a 400  $\mu\text{g/mL}$  e 25 a 100  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Entre as bactérias, o menor valor de CIM foi detectado para o complexo de cobre morfolínico (Figura 9) para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CIM = 50  $\mu\text{g/mL}$ ). Além disso, este mesmo composto também mostrou boa atividade antifúngica, com CIM igual a 25  $\mu\text{g/mL}$  para todas as espécies de leveduras testadas.

**Figura 9.** Estrutura química do complexo de cobre com ligante de tiourea morfolínico (ARSLAN *et al.*, 2009).

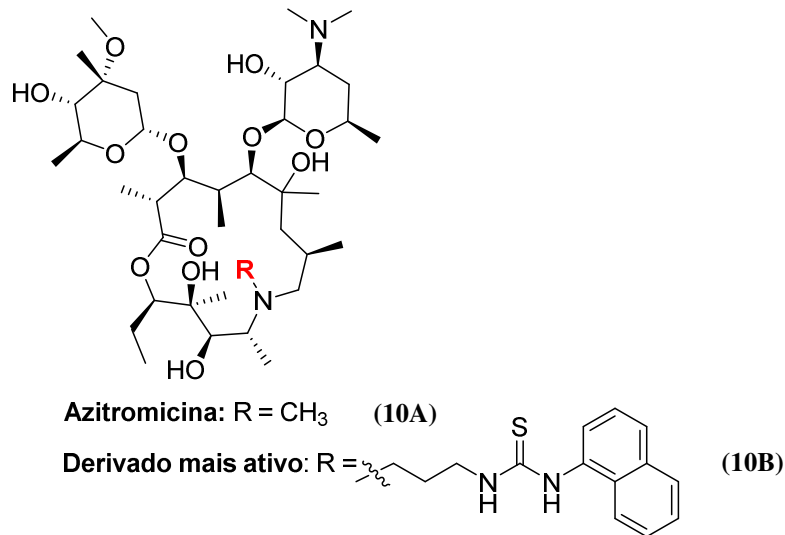


Fonte: O próprio autor.

Krajacic e colaboradores (2009) trabalharam com alterações estruturais na molécula da azitromicina (**10A**), dando origem a vários novos compostos derivados contendo os grupos ureia e tiourea. Esses foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana frente a importantes agentes etiológicos de infecções respiratórias, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, incluindo isolados sensíveis e resistentes à eritromicina, além das espécies Gram-negativas *Moraxella catarrhalis* e *Haemophilus influenzae*. Os compostos apresentaram melhores resultados frente a bactérias Gram-positivas, destacando-se a atividade do derivado de tiourea **10B** representado na Figura 10, o qual se mostrou equipotente à azitromicina contra as cepas de *S. pyogenes* e *S. pneumoniae*

resistentes aos macrolídeos (fenótipo M), apresentando valores de CIM iguais a 4  $\mu\text{g/mL}$ .

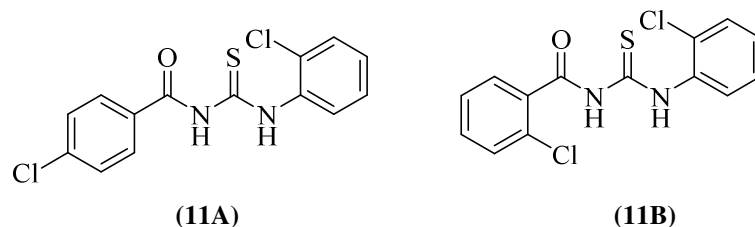
**Figura 10.** Estrutura química da Azitromicina (A) e do derivado tioureia (B) (BUKVIĆ KRAJAČIĆ *et al.*, 2009).



Fonte: O próprio autor

Dezoito tioureias, contendo o núcleo 1-aróil-3-aril, foram sintetizadas por Soni e colaboradores (2014) e testadas com relação à atividade antibacteriana utilizando *S. aureus* ATCC 6538 e *E. coli* ATCC 8739, pelo método de disco difusão. Quando comparado ao efeito produzido pela penicilina, os compostos **11A** e **11B** (Figura 11) foram mais ativos para *Staphylococcus aureus* e *E. coli*, respectivamente.

**Figura 11.** Estruturas químicas de **11A** e **11B** núcleo 1-aróil-3-aril que apresentam atividade antibacteriana em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente (SONI *et al.*, 2014).

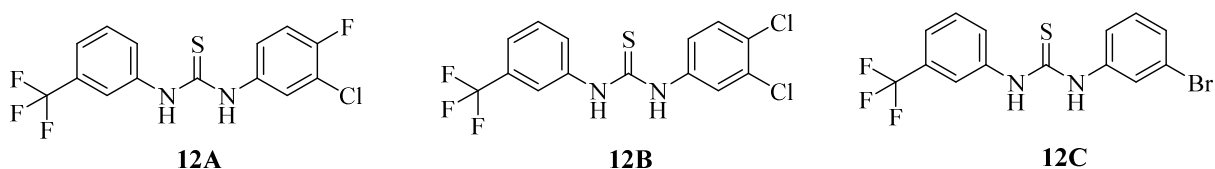


Fonte: O próprio autor

Bielenica e colaboradores (2015) sintetizaram novas tioureias contendo o núcleo 3-(trifluorometil)fenil. Os compostos **12A**, **12B** e **12C** (Figura 12) apresentaram os

melhores resultados de inibição de crescimento de células planctônicas de cepas de referência sensíveis e isolados clínicos resistentes à meticilina de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, com valores de CIM variando de 0,25 a 2  $\mu\text{g/mL}$ . As *N*-ariltioureias **12A** e **12C** também foram capazes de reduzir 70% do biofilme de *Staphylococcus epidermidis* em presença das maiores concentrações testadas (4  $\mu\text{g/mL}$  e 8  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente). Além disso, em concentrações maiores (32  $\mu\text{g/mL}$ ), esses compostos interferiram na atividade da topoisomerase IV de maneira similar ao mecanismo de ação da ciprofloxacina.

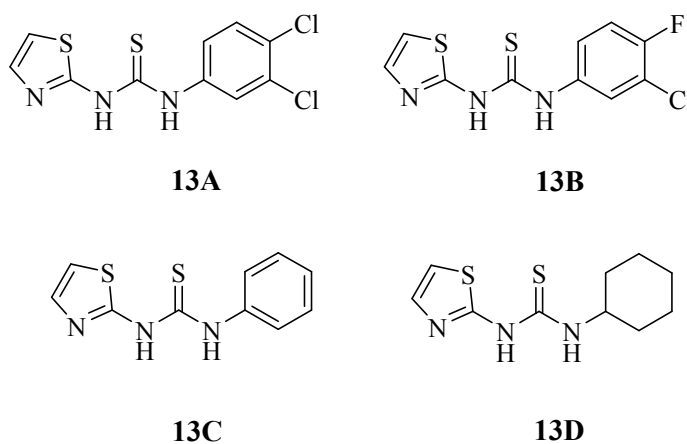
**Figura 12.** Estruturas químicas de **12A**, **12B** e **12C** contendo o núcleo 3-(trifluorometil)fenil que apresentaram atividade antibacteriana em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (Bielenica *et al.*, 2015).



Fonte: O próprio autor.

Uma série de tioureias contendo o núcleo 1,3-tiazol foi preparada por Stefanska e colaboradores (2015) com objetivo de investigar a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, *Mycobacterium tuberculosis*, além de *Candida albicans* e HIV-1. Com relação à atividade antibacteriana, testes preliminares mostraram que os compostos apresentaram melhores resultados em espécies Gram-positivas. Os compostos mais ativos, **13A** e **13B** (Figura 13), apresentaram valores de CIM variando de 2 a 8  $\mu\text{g/mL}$  para células planctônicas de isolados clínicos de *Staphylococcus epidermidis*. Além disso, foram capazes de inibir em 70% a formação de biofilme de cepas sensíveis e resistentes à meticilina desta espécie bacteriana. De maneira geral, para *M. tuberculosis*, o menor valor de CIM foi obtido para **13C** (12,5  $\mu\text{g/mL}$ ) e para *C. albicans*, todos os valores foram maiores que 64  $\mu\text{g/mL}$ . Apenas um derivado, **13D**, apresentou atividade anti - HIV-1, com  $\text{EC}_{50} = 36 \mu\text{M}$  (concentração que inibiu 50% da multiplicação viral).

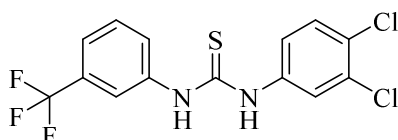
**Figura 13.** Estruturas químicas de **13A**, **13B**, **13C** e **13D** contendo o núcleo 1,3-tiazol que apresentaram atividade antimicrobiana em *Staphylococcus epidermidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans* e HIV-1 (Stefańska *et al.*, 2015).



Fonte: O próprio autor.

O mesmo grupo de pesquisadores, em 2016, sintetizou cinco tioureias dissustituídas que foram avaliadas *in vitro* quanto à capacidade de inibir o crescimento de células planctônicas e a formação de biofilme de cepas de referência e isolados clínicos resistentes de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. O derivado representado na Figura 14 mostrou atividade bactericida, com CIM variando de 0,5 a 1  $\mu\text{g/mL}$  para todos os isolados. Além disso, também foi capaz de reduzir efetivamente a formação de biofilmes em 40% a 90% na concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$ . Os autores mostraram que o efeito inibitório pode estar associado à inibição de topoisomerase IV (STEFANŠKA *et al.*, 2016).

**Figura 14.** Estrutura química do composto com melhor atividade antibacteriana em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (STEFANŠKA *et al.*, 2016).

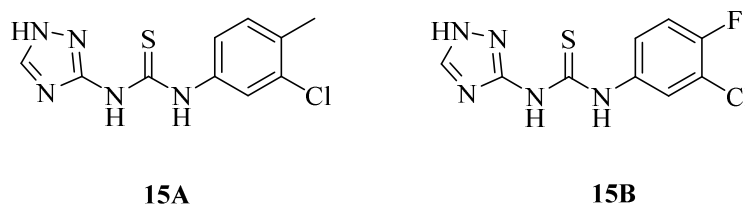


Fonte: O próprio autor.

Stekanska e colaboradores, ainda em 2016, sintetizaram 21 tioureias contendo o núcleo 1,2,4-triazol e avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro*. De acordo

com os resultados obtidos, as tioureias **15A** e **15B**, representadas na Figura 15, foram mais efetivas contra cepas de referência e isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* (MRSA) e *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) resistentes à metilina, com CIM variando de 4 a 8  $\mu\text{g/mL}$  e 4 a 16  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. O composto **15B** apresentou também atividade antibiofilme, inibindo 50% a formação de biofilmes por *Staphylococcus epidermidis* ( $\text{IC}_{50}$ ) nas concentrações entre 2 - 6  $\mu\text{g/mL}$ , valores menores do que aqueles obtidos para o fármaco de referência, ciprofloxacina.

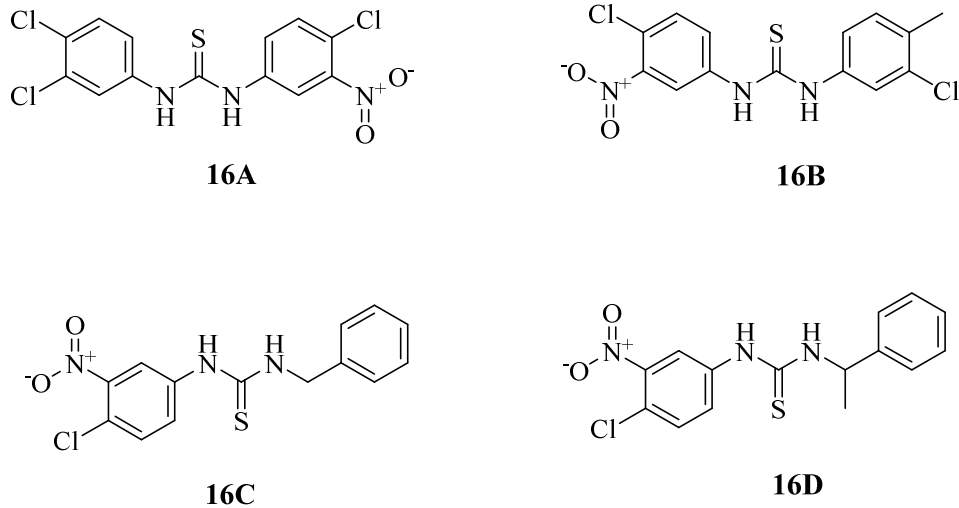
**Figura 15.** Estruturas químicas **15A** e **15B** contendo o núcleo 1,2,4-triazol que apresentaram atividade antibacteriana em *Staphylococcus aureus* (MRSA) e *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) resistentes à metilina (STEFANSKA *et al.*, 2016).



Fonte: O próprio autor.

Uma série de vinte e um novos derivados contendo a porção 4-cloro-3-nitrofeniltioureia foi sintetizada por Bielenica e colaboradores (2016) e avaliada quanto à sua atividade antimicrobiana *in vitro* contra várias espécies de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, micobactérias e *Candida* spp. Dentre os novos derivados testados, os compostos **16A** e **16B** (Figura 16) apresentaram melhor atividade contra cepas padrões de bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Micrococcus luteus*, com CIMs variando entre 0,5 - 1  $\mu\text{g/mL}$ ; e foram os agentes antibacterianos mais eficazes (CIM = 1-2  $\mu\text{g/mL}$ ) contra cepas MRSE em comparação com ciprofloxacina (CIM = 0,25-64  $\mu\text{g/mL}$ ). Ambos os compostos também mostraram atividade antibiofilme, inibindo tanto as etapas de formação quanto biofilmes maduros de *S. epidermidis*. Quanto à atividade antimicobacteriana, os derivados **16C** e **16D** (Figura 16), foram os compostos mais ativos contra cepas de *M. tuberculosis*, com CIM variando de 6,25-12,5  $\mu\text{g/mL}$ . Os compostos não foram ativos contra cepas Gram-negativas e fungos.

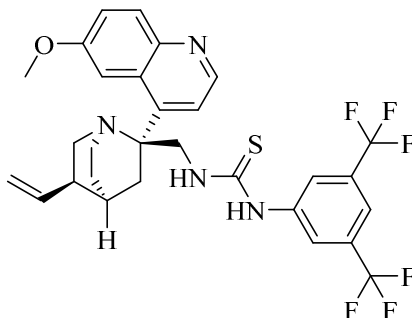
**Figura 16.** Estruturas químicas de **16A**, **16B**, **16C** e **16D** contendo a porção 4-cloro-3-nitrofeniltioureia que apresentaram atividade antibacteriana em *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus* e *Mycobacterium tuberculosis* (BIELENICA *et al.*, 2016).



Fonte: O próprio autor.

A partir da triagem da atividade antibacteriana de dez novas tioureas sintetizadas contendo o núcleo quinolínico, Dolan e colaboradores (2016) identificaram um novo composto (Figura 17). Este apresentou atividade comparável à vancomicina ( $CIM_{90} = 1,35 \mu M$ ) frente a isolados de *Staphylococcus aureus*, com  $CIM_{90} < 6,25 \mu M$  e igual a  $17,74 \mu M$  para o isolado sensível e resistente à metilina (MRSA), respectivamente. Além disso, este composto não apresentou toxicidade *in vivo* avaliada em larvas de *Galleria mellonella* em concentrações até  $1000 \mu g/mL$ .

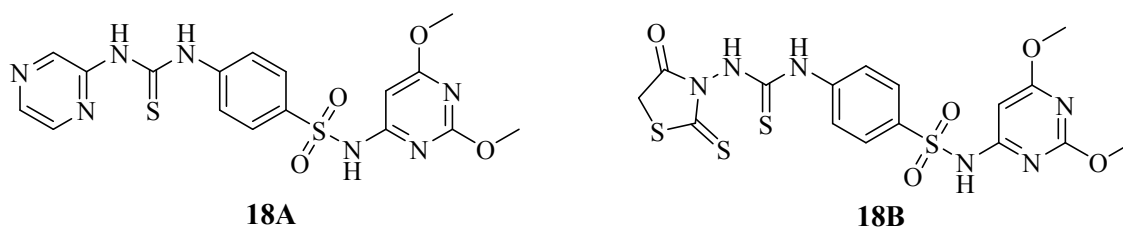
**Figura 17.** Estrutura química da tiourea contendo o núcleo quinolínico que apresentou atividade antibacteriana em *Staphylococcus aureus* (DOLAN *et al.*, 2016).



Fonte: O próprio autor.

Ghorab e colaboradores (2016) sintetizaram novas tioureias heterocíclicas contendo núcleo sulfonamida com potencial atividade antimicrobiana. Os compostos foram avaliados quanto à sua atividade antibacteriana *in vitro* em *Streptococcus pneumoniae*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, e antifúngica para *Aspergillus fumigatus* e *C. albicans*, pelo método de difusão em ágar. Com base nos resultados obtidos, os autores observaram dois compostos promissores, **18A** e **18B** (Figura 18), que apresentaram atividades melhores ou similares aos fármacos de referência (anfotericina B e ciprofloxacina), a partir da comparação entre o diâmetro dos halos de inibição formados, quando testados na concentração de 1 mg/mL.

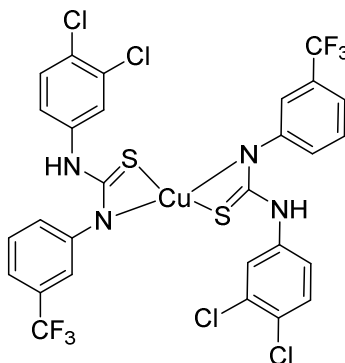
**Figura 18.** Estruturas químicas de **18A** e **18B** contendo núcleo sulfonamida que apresentaram atividade antimicrobiana (GHORAB *et al*, 2016).



Fonte: O próprio autor.

Bielenica e colaboradores (2018) sintetizaram e investigaram o potencial antimicrobiano de uma série de complexos de Cu (II) com ligantes de tioureias dissustituídas. Os compostos apresentaram atividade contra bactérias Gram-positivas, incluindo isolados clínicos de MRSA e MRSE, com CIM variando de 0,5 a 16  $\mu\text{g/mL}$  e 1 a 16  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, sendo que os menores valores foram observados para o complexo de 1-(3,4-diclorofenil)-3-[3- (trifluorometil) fenil] tioureia (Figura 19). Esse derivado também mostrou capacidade de inibir aproximadamente 100% a formação de biofilmes por essas espécies bacterianas. Além disso, os autores deste estudo também mostraram que esta molécula inibe a atividade de topoisomerase II ou DNA girase de *Staphylococcus aureus*.

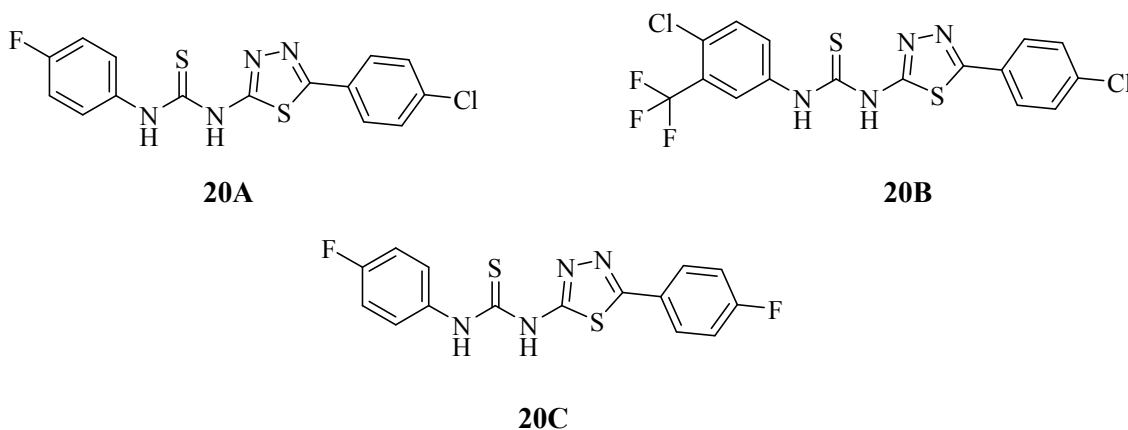
**Figura 19.** Estrutura química do complexo de cobre (II) 1-(3,4-diclorofenil)-3-[3-(trifluorometil)fenil] tiourea que apresentou atividade em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (BIELENICA *et al.*, 2018).



Fonte: O próprio autor.

Considerando as evidências científicas sobre o potencial antimicobacteriano de derivados de tiourea, Tatar e colaboradores (2016) descreveram a síntese e o efeito inibitório sobre o crescimento de *M. tuberculosis* de uma série de novas moléculas contendo dois grupos farmacofóricos em sua estrutura, sendo um deles o grupamento tiourea. Três compostos **20A**, **20B** e **20C** (Figura 20) apresentaram atividade antimicobactérias, sendo as CIMs iguais a 10,96  $\mu\text{M}$ , 11,48  $\mu\text{M}$  e 17,81  $\mu\text{M}$  respectivamente, valores comparáveis à CIM do fármaco de referência etambutol (6,12  $\mu\text{M}$  a 24,47  $\mu\text{M}$ ).

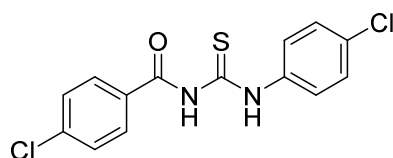
**Figura 20.** Estruturas químicas de **20A**, **20B** e **20C** com atividade em *Mycobacterium tuberculosis* (TATAR *et al.*, 2016).



Fonte: O próprio autor.

Recentemente, Brito e colaboradores (2018) avaliaram a atividade de 59 benzoiltioureas sobre o crescimento de *M. tuberculosis*. Da série estudada, a tiourea mais ativa (Figura 21) pode ser considerada um bom protótipo para ser submetido a modificações estruturais adicionais na busca de novos fármacos anti-*M. tuberculosis*, uma vez que é 1,8 vezes mais potente que o fármaco de primeira escolha, etambutol. Além disso, esta substância não apresentou citotoxicidade em células LLC-MK2 nas concentrações capazes de inibir o crescimento de *M. tuberculosis*.

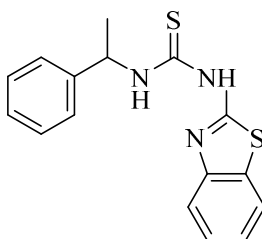
**Figura 21.** Estrutura química da tiourea que apresentou atividade em *Mycobacterium tuberculosis* (BRITO *et al.*, 2018).



Fonte: O próprio autor.

Bielenica *et al.* (2017) sintetizaram e avaliaram a atividade *in vitro* anti-HIV-1 de uma série de quinze tioureas contendo o núcleo 1,3 benzotiazol-2-il. Entre as novas estruturas obtidas, a molécula representada na Figura 22 mostrou melhor atividade anti-HIV-1, com  $EC_{50}$  igual a  $1 \mu\text{M}$ . Além disso, esse mesmo derivado apresentou capacidade de reduzir a atividade da enzima transcriptase reversa do HIV-1, com 60% e 85% de inibição em presença de  $10 \mu\text{M}$  e  $50 \mu\text{M}$ , respectivamente.

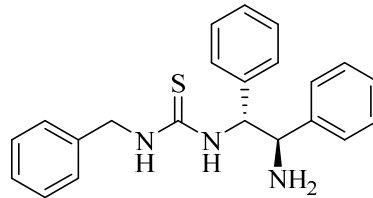
**Figura 22.** Estrutura química da tiourea contendo o núcleo 1,3 benzotiazol-2-il com atividade anti-HIV-1 (BIELENICA *et al.*, 2017).



Fonte: O próprio autor.

A atividade antiviral de derivados de tioureia também foi relatada em vírus de importância na agricultura (Lu *et al.*, 2015). Neste trabalho, os autores sintetizaram 22 substâncias contendo o grupamento tioureia a partir do composto natural harmina, um alcaloide extraído de *Peganum harmala*, e avaliaram a atividade antiviral *in vitro* e *in vivo* da série química contra o vírus do mosaico do tabaco. Os resultados mostraram que a maioria dos compostos sintetizados exibiu maior atividade antiviral do que o virucida comercial Ribavirina (500  $\mu\text{g/mL}$ ) utilizado como controle, mesmo na concentração mais baixa de 100  $\mu\text{g/mL}$ , sendo o composto mais ativo representado na Figura 23.

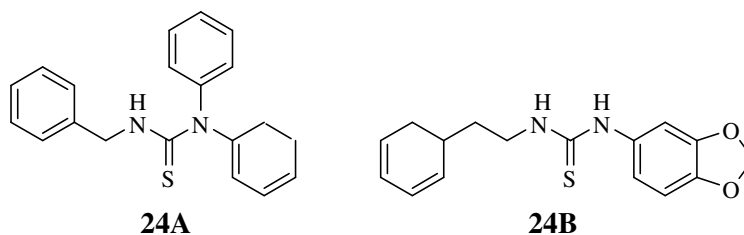
**Figura 23.** Estrutura química da tioureia com atividade contra o vírus do mosaico do tabaco (LU *et al.*, 2015).



Fonte: O próprio autor.

Recentemente, foi também relatada a atividade antiprotozoários de compostos derivados da tioureia. O trabalho de Viana e colaboradores (2017) mostrou que tioureias podem ser protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos anti-*Leishmania*. Estes autores sintetizaram uma série de 26 tioureias *N,N'*-dissubstituídas e avaliaram a atividade antiprotozoária *in vitro* em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Foi observado que dois derivados, **24A** e **24B** (Figura 24) foram mais ativos contra as formas amastigotas ( $\text{IC}_{50} = 81,4$  e  $70,0 \mu\text{M}$ , respectivamente), com baixa citotoxicidade para macrófagos. Estes compostos também inibiram o crescimento de formas promastigotas *in vitro*, interferindo no ciclo celular do parasito.

**Figura 24.** Estruturas químicas de **24A** e **24B** com atividade anti-*Leishmania* (VIANA *et al.*, 2017).



Fonte: O próprio autor.

De acordo com os relatos da literatura publicados recentemente, diferentes compostos contendo o núcleo tioureia mostraram potencial antimicrobiano significativo, com ação em importantes espécies de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos, vírus e protozoários. Com relação à atividade antibacteriana, diversas estruturas apresentaram efeito sobre cepas resistentes aos antimicrobianos atualmente utilizados na prática clínica e também sobre biofilmes formados por espécies de importância médica. Esses resultados destacam a versatilidade do grupamento tioureia, ao qual diferentes ligantes podem ser adicionados, gerando compostos com amplo espectro de atividade antimicrobiana.

#### 4 REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E.P., CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, v. 146, n. 3713, p. 837, 1940.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Critérios Diagnósticos de Infecção Associada à Assistência à Saúde – Neonatologia. Brasília, 60 p, 2017.
- AHMAD, S.; DALWAI, A.; AL-NAKIB, W. Frequency of Enterovirus Detection in Blood Samples of Neonates Admitted to Hospital With Sepsis-like Illness in Kuwait. **Journal of Medical Virology**, v. 85, p.1280–1285, 2013.
- AL-MAANI, A. *et al.* Nosocomial transmission of group B *streptococci* proven by positive environmental culture. **Oman Medical Journal**, v. 29, n. 5, p. 376–379, 2014.
- ALHHAZMI, A.; HURTEAU, D.; TYRRELL, G. J. Epidemiology of invasive group b streptococcal disease in Alberta, Canada, from 2003 to 2013. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1774–1781, 2016.
- AMINOV, R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 4–19, 2017.
- ARSLAN, H. *et al.* Antimicrobial activity of some thiourea derivatives and their nickel and copper complexes. **Molecules**, v. 14, n. 1, p. 519–527, 2009.
- BAKER, C. J. B. F., GORDON, R. C., YOW, M. D. Suppurative meningitis due to streptococci of Lancefield group B: a study of 33 infants. **J Pediatr**, v. 82, n. 4, p. 724–9, 1973.
- BEN SAID, M. *et al.* Late-onset sepsis due to *Staphylococcus capitis* ‘neonatalis’ in low-birthweight infants: a new entity? **Journal of Hospital Infection**, v. 94, p. 95-98, 2016.
- BIELENICA, A. *et al.* Synthesis, cytotoxicity and antimicrobial activity of thiourea derivatives incorporating 3-(trifluoromethyl)phenyl moiety. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 111–125, 2015.
- BIELENICA, A. *et al.* Synthesis and Antimicrobial Activity of 4-Chloro-3-

Nitrophenylthiourea Derivatives Targeting Bacterial Type II Topoisomerases. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 87, n. 6, p. 905–917, 2016.

BIELENICA, A. *et al.* New thiourea and 1,3-thiazolidin-4-one derivatives effective on the HIV-1 virus. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 90, n. 5, p. 883–891, 2017.

BIELENICA, A. *et al.* Synthesis, structural and antimicrobial studies of type II topoisomerase-targeted copper(II) complexes of 1,3-disubstituted thiourea ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 182, n. January, p. 61–70, 2018.

BONE, R. C.; SIBBALD, W. J.; SPRUNG, C. L. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1481–1483, 1992.

BOTELHO, A. C. N. *et al.* *Streptococcus agalactiae* carriage among pregnant women living in Rio de Janeiro, Brazil, over a period of eight years. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1–12, 2018.

BRITO, T.O. *et al.* Benzoylthioureas: design, synthesis and antimycobacterial evaluation. **Med Chem.**, v. 15, n. 1, 2018.

BUKVIĆ KRAJAČIĆ, M. *et al.* Novel ureas and thioureas of 15-membered azalides with antibacterial activity against key respiratory pathogens. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 3459–3470, 2009.

BUTIN, M. *et al.* Wide geographical dissemination of the multiresistant *Staphylococcus capitis* NRCS-A clone in neonatal intensive-care units. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 1, p. 46–52, 2016.

BUTIN, M. *et al.* Worldwide endemicity of a multidrug-resistant *Staphylococcus capitis* clone involved in neonatal sepsis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 538–539, 2017.

CANTEY, J. B. *et al.* Morbidity and mortality of coagulase-negative staphylococcal sepsis in very-low-birth-weight infants. **World Journal of Pediatrics**, v. 14, n. 3, p. 269–273, 2018.

Centers for Disease Control and Prevention, Antibiotic Resistance Threats in the United States. Atlanta, 2013. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.

CUNHA, S. *et al.* Antimicrobial activity and structural study of disubstituted Thiourea Derivatives. **Monatshefte fur Chemie**, v. 138, n. 5, p. 511–516, 2007.

DOLAN, N. *et al.* Synthesis, antibacterial and anti-MRSA activity, in vivo toxicity and a structure-activity relationship study of a quinoline thiourea. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 2, p. 630–635, 2016.

DONG, Y.; SPEER, C. P.; GLASER, K. Beyond sepsis: *Staphylococcus epidermidis* is an underestimated but significant contributor to neonatal morbidity. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 621–633, 2018.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis.**, v.8, n. 9, p. 881-90, Sep 2002.

FLEISCHMANN-STRUZEK, C. *et al.* The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. **Lancet Respir Med**, v. 6, p. 223-230, 2018.

FOLGORI, L. *et al.* Antimicrobial-resistant Gram-negative infections in neonates: Burden of disease and challenges in treatment. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 30, n. 3, p. 281–288, 2017.

FRIDMAN, M. Catalyst: The Role of Chemistry in Delivering the Next Antimicrobial Drugs. **Chem.**, v. 3, p. 8–14, July 2017.

FRY, R. M. Fatal infections by hemolytic streptococcus group B. **Lancet**, v.1, p. 199–201, 1938.

GHORAB, M. M. *et al.* Biological evaluation of some new N-(2,6-dimethoxypyrimidinyl) thioureido benzenesulfonamide derivatives as potential antimicrobial and anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 124, p. 299–310, 2016.

GIRARD, D. *et al.* Pregnancy-related listeriosis in France, 1984 to 2011, With a focus on 606 cases from 1999 to 2011. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 38, p. 1–8, 2014.

GOULD, I. M.; BAL, A. M. New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. **Virulence**, v. 5594, n. December, p. 185–191, 2015.

GUAN, X. *et al.* Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in infants from

urban area of South China, 2011-2014. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–8, 2018.

GUIRAL, E. *et al.* Prevalence of *Escherichia coli* among samples collected from the genital tract in pregnant and nonpregnant women: Relationship with virulence. **FEMS Microbiology Letters**, v. 314, n. 2, p. 170–173, 2011.

GUO, J. *et al.* Clinical Characteristic and Pathogen Spectrum of Neonatal Sepsis in Guangzhou City from June 2011 to June 2017. **Med Sci Monit.**, v. 29, n. 2, p. 2296-2304, Mar 2019.

HAENNI, M., LUPO, A., MADEC, J.Y. Antimicrobial Resistance in *Streptococcus* spp. **Microbiol Spectr.**, v. 6, n. 2, 2018.

HEISEL, T. *et al.* Breastmilk and NICU surfaces are potential sources of fungi for infant mycobiomas. **Fungal Genet Biol.**, v. 21, n. 128, p. 29-35, Mar 2019.

HEMEDEZ, C. *et al.* Pathology of Neonatal Non-*albicans* Candidiasis: Autopsy Study and Literature Review. **Pediatr Dev Pathol.**, v. 22, n. 2, p. 98-105, Mar-Apr 2019.

HERON, M. National Vital Statistics Report Volume 66, Number 5 November 27, 2017. v. 66, n. 5, 2015.

IOSIFIDIS, E. *et al.* Vancomycin-resistant *Enterococcus* outbreak in a neonatal intensive care unit: Epidemiology, molecular analysis and risk factors. **American Journal of Infection Control**, v. 41, n. 10, p. 857–861, 2013.

KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A.  
Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **J Anaesthesiol Clin Pharmacol.**, v. 33, n. 3, p. 300-305, Jul-Sep 2017.

TAM, P. Y.; BENDEL, C. M. Diagnostics for neonatal sepsis: Current approaches and future directions. **Pediatric Research**, v. 82, n. 4, p. 574–583, 2017.

JAJOO, M. *et al.* Alarming rates of antimicrobial resistance and fungal sepsis in outborn neonates in North India. **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, p. 1–16, 2018.

LOOKER, K.J. *et al.* First estimates of the global and regional incidence of neonatal herpes infection. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 3, p. e300–e309, 2017.

- KIMURA, K. *et al.* First molecular characterization of group B *streptococci* with reduced penicillin susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2890–2897, 2008.
- KYLAT, R. I. *et al.* Neonatal listeriosis: Uncommon or misdiagnosed? **Journal of Neonatal-Perinatal Medicine**, v. 9, n. 3, p. 313–316, 2016.
- LAMOTH *et al.* Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **J Antimicrob Chemother**, v. 73, Suppl 1: i4–i13, 2018.
- LANCEFIELD, R. C.; HARE, R. The serological differentiation of pathogenic and nonpathogenic strains of hemolytic streptococci from parturient women. **J Exp Med**, v. 61, n. 3, p. 335–49, 1935.
- LAXMINARAYAN, R. *et al.* Access to effective antimicrobials: A worldwide challenge. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 168–175, 2016.
- LEE, B.; NEWLAND, J. G.; JHAVERI, R. Reductions in neonatal listeriosis: “Collateral benefit” of Group B streptococcal prophylaxis? **Journal of Infection**, v. 72, n. 3, p. 317–323, 2016.
- LEVY, M. M. *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Intensive Care Medicine**, v. 29, n. 4, p. 530–538, 2003.
- LU, A. *et al.* Application of “hydrogen bonding interaction” in new drug development: Design, synthesis, antiviral activity, and sars of thiourea derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 5, p. 1378–1384, 2015.
- MANNA, D., ROY, G., MUGESH, G. Antithyroid drugs and their analogues: synthesis, structure, and mechanism of action. **Acc. Chem. Res**, v. 46, n. 11, p. 2706–2715, 2013.
- MEDUGU, N. *et al.* Aetiology of neonatal sepsis in Nigeria, and relevance of group b *Streptococcus*: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–16, 2018.
- MEENA, J. *et al.* Utility of cord blood culture in early onset neonatal sepsis. **Australasian Medical Journal**, v. 8, n. 8, p. 263–267, 2015.
- MELO, S. C. C. S. DE *et al.* Prevalence of *Streptococcus agalactiae* colonization in pregnant

women from the 18 th Health Region of Paraná State. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 60, n. 2, p. 2–7, 2018.

MERTSCHENK, B.; KNOTT, A.; BAUER, W. Thiourea and Thiourea Derivatives. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. V: Weinheim, Alemanha, pp. 1–15, 2013.

MITHAL, L. B. *et al.* Cord blood acute phase reactants predict early onset neonatal sepsis in preterm infants. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 2017.

MODLIN, J. F. Treatment of neonatal enterovirus infections. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 5, n. 1, p. 63–64, 2015.

MOHR, K. I. History of Antibiotics Research. **Curr Top in Microbiol Immunol**, v. 398, p. 237-272, 2016.

MORENO, M. G.; TRAMPUZ, A.; LUCA, M. DI. Synergistic antibiotic activity against planktonic and biofilm embedded *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus oralis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 11, p. 3085–3092, 2017.

MORGUETTE, A. E. B. *et al.* Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women seen at the University Hospital of Londrina , Paraná, Brazil. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 39, n.1, p. 77–84, 2018.

MORRISS, F. *et al.* Neonatal Enterovirus Infection: Case Series of Clinical Sepsis and Positive Cerebrospinal Fluid Polymerase Chain Reaction Test with Myocarditis and Cerebral White Matter Injury Complications. **American Journal of Perinatology Reports**, v. 06, n. 03, p. e344–e351, 2016.

NAGANO, N. *et al.* Penicillin-Susceptible Group B Streptococcal Clinical Isolates with Reduced Cephalosporin Susceptibility. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 9, p. 3406–3410, 2014.

NAPOLITANO, L. M. Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. **Surgical Infections**, v. 19, n. 2, p. 117–125, 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to

2014. **J Nat Prod.** v.79, n. 3, p. 629-61, Mar 2016.

NOCARD, N.; MOLLEREAU, R. Sur une mammite contagieuse des vaches laitieres. **Ann Inst Pasteur**, v.1, p. 109–26, 1887.

OTAGUIRI, E. S. *et al.* Commensal *Streptococcus agalactiae* isolated from patients seen at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil: capsular types, genotyping, antimicrobial susceptibility and virulence determinants. **BMC Microbiol.**, v. 21, n. 13, p. 297, 2013.

OTAZO-SÁNCHEZ, E. *et al.* Aroylthioureas: new organic ionophores for heavy-metal ion selective electrodes. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction 2**, p. 2211-2218, 2001.

PAMMI, M. *et al.* *Candida parapsilosis* is a Significant Neonatal Pathogen: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 32, n. 5, p. 1–23, 2013.

PATRAS, K. A.; NIZET, V. Group B streptococcal maternal colonization and neonatal disease: molecular mechanisms and preventative approaches. **Front Pediatr.**, v. 22, n. 6, p. 27, 2018.

PINNINTI, S. G.; KIMBERLIN, D. W. Neonatal herpes simplex virus infections. **Seminars in Perinatology**, v. 42, n. 3, p. 168–175, 2018.

Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. Centers for Disease Control and Prevention. **MMWR Recomm Rep**, v. 45, n. RR-7, p. 1-24, May 1996.

RASIGADE, J. P. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus capitis* with reduced vancomycin susceptibility causes late-onset sepsis in intensive care neonates. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

ROLE, T. E.; SYNTHESIS, C.; DISCOVERY, A. D. HHS Public Access. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 53, n. 34, p. 8840–8869, 2015.

ROSINI, R.; MARGARIT, I. Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. February, p. 2013–2016, 2015.

RUPPEN, C.; HEMPHILL, A.; SENDI, P. *In vitro* activity of gentamicin as an adjunct to

penicillin against biofilm group B *Streptococcus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 2, p. 444–447, 2017.

RUSSELL, N. J. *et al.* Maternal Colonization with Group B *Streptococcus* and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. Suppl 2, p. S100–S111, 2017.

SAID, M. BEN *et al.* Late-onset sepsis due to *Staphylococcus capitis* ‘neonatalis’ in low-birthweight infants: a new entity? **Journal of Hospital Infection**, v. 94, n. 1, p. 95–98, 2016.

SAPUAN, S. *et al.* Neonatal listeriosis in the UK 2004–2014. **Journal of Infection**, v. 74, n. 3, p. 236–242, 2017.

SCHRAG, S. *et al.* Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. **MMWR Recomm Rep**, v. 51, n. RR-11, p. 1–22, Aug 2002.

SCHRAG, S. J.; VERANI, J. R. Intrapartum antibiotic prophylaxis for the prevention of perinatal group B streptococcal disease: Experience in the United States and implications for a potential group B streptococcal vaccine. **Vaccine**, v. 31, n. S4, p. D20–D26, 2013.

SCHULMAN, J. *et al.* Neonatal Intensive Care Unit Antibiotic Use. **Pediatrics**, v. 135, n. 5, p. 826–833, 2015.

SEALE, A.C. *et al.* Estimates of the burden of Group B Streptococcal disease worldwide for pregnant women, stillbirths, and children. **Clin Infect Dis.**, v. 6, n. 65, p. 200–219, 2017.

SEKI, T. *et al.* High isolation rate of MDR group B *streptococci* with reduced penicillin susceptibility in Japan. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 10, p. 2725–2728, 2015.

SHABAYEK, S.; SPELLERBERG, B. Group B streptococcal colonization, molecular characteristics, and epidemiology. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAR, p. 1–14, 2018.

SHAH, B. A.; PADBURY, J. F. Neonatal sepsis an old problem with new insights. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 163–171, 2014.

SHAKEEL, A. Thiourea Derivatives in Drug Design and Medicinal Chemistry: A Short Review. **Journal of Drug Design and Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 10, 2016.

SHANE, A.L.; SÁNCHEZ, P. J.; STOLL, B. J. Neonatal sepsis. **Lancet**, v. 390, p. 1770–1780, 2017.

SHANE, A. L.; STOLL, B. J. Neonatal sepsis: Progress towards improved outcomes. **Journal of Infection**, v. 68, n. SUPPL1, p. S24–S32, 2014.

SHANTALA, G. B. *et al.* Neonatal septicaemia caused by vancomycin resistant enterococcus faecium-a case report. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 11, p. DD03–DD04, 2014.

SILVA, A.C.B. *et al.* Inadequate use of antibiotics and increase in neonatal sepsis caused by resistant bacteria related to health care assistance: a systematic review. **Braz J Infect Dis**, v. 22, n. 4, p. 328–337, 2018.

SIMONSEN, K. A. *et al.* Early-onset neonatal sepsis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 21–47, 2014.

SINGER, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801–810, 2016.

SINGH, S. *et al.* Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, n. 1, p. 53–62, 2017.

SONI, L. K.; NARSINGHANI, T.; JAIN, R. Synthesis and Antibacterial Screening of Some 1-Aroyl-3-aryl Thiourea Derivatives. **ISRN Medicinal Chemistry**, v. 2014, p. 1 - 6, 2014.

SOUZA, A. S. DE *et al.* Off-label use and harmful potential of drugs in a NICU in Brazil: A descriptive study. **BMC Pediatrics**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2016.

STEFANŚKA, J. *et al.* Antimicrobial and Anti-biofilm Activity of Thiourea Derivatives Bearing 3-amino-1H-1,2,4-triazole Scaffold. **Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 5, p. 478–488, 2016.

STEFANŚKA, J. *et al.* Antimicrobial and anti-biofilm activity of thiourea derivatives incorporating a 2-aminothiazole scaffold. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 63, n. 3, p. 225–236, 2015.

STEFANŚKA, J. *et al.* Antistaphylococcal activity of selected thiourea derivatives. **Polish**

**Journal of Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 451–460, 2016.

STOLL, B. J. *et al.* Early Onset Neonatal Sepsis: The Burden of Group B Streptococcal and *E. coli* Disease Continues. **Pediatrics**, v. 127, n. 5, p. 817–826, 2011.

TACCONELLI, E. *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318–327, 2018.

TAM, P. I.; BENDEL, C. M. Diagnostics for neonatal sepsis: current approaches and future directions. **Pediatric Research**, v. 82, n.4, p. 574 - 583, 2017.

TATAR, E. *et al.* Design, Synthesis, and Molecular Docking Studies of a Conjugated Thiadiazole–Thiourea Scaffold as Antituberculosis Agents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 4, p. 502–515, 2016.

United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation (UNIGME), ‘Levels & Trends in Child Mortality: Report 2017, Estimates Developed by the UN Inter-agency Group for Child Mortality Estimation’, United Nations Children’s Fund, New York, 2017. Available from: [https://www.unicef.org/publications/index\\_101071.html](https://www.unicef.org/publications/index_101071.html).

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; KRYPTOU, E.; SCORTTI, M. Listeria placental infection. **mBio**, v. 8, n. 3, p. 1–6, 2017.

VERANI, J.R.; MCGEE, L.; SCHRAG, S.J. Prevention of perinatal group B streptococcal disease—revised guidelines from CDC, 2010” Morbidity and Mortality Weekly Report, vol. 59, no. RR- 10, pp. 1–36, 2010. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/tr5910.pdf>

VENKATESAN, N.; PERUMAL, G.; DOBLE, M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. **Future Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 1743–1750, 2015.

VENTOLA, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis. **P&T**, v. 40, n. 4, p. 278–283, 2015.

VIANA, G. M. *et al.* Antileishmanial Thioureas: Synthesis, Biological Activity and *in Silico* Evaluations of New Promising Derivatives. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 65, n. 10, p. 911–919, 2017.

VILA, J. *et al.* *Escherichia coli*: An old friend with new tidings. **FEMS Microbiology**

**Reviews**, v. 40, n. 4, p. 437–463, 2016.

VOLLER, S. M. B.; MYERS, P. J. Neonatal Sepsis. **Clinical Pediatric Emergency Medicine**, v. 17, n. 2, p. 129–133, 2016.

VORNHAGEN, J.; ADAMS WALDORF, K. M.; RAJAGOPAL, L. Perinatal Group B Streptococcal Infections: Virulence Factors, Immunity, and Prevention Strategies. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 11, p. 919–931, 2017.

WALSH, T. J. *et al.*, Invasive Candidiasis in Infants and Children: Recent Advances in Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **J Fungi (Basel)**, v. 5, n. 1, pii: E11, Jan 2019.

WRIGHT, P. M., SEIPLE, I. B., MYERS, A. G. The Evolving Role of Chemical Synthesis in Antibacterial Drug Discovery. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 53, n. 34, p. 8840–8869, August 2014.

XIA, F. DI *et al.* Capsular polysaccharide of Group B *Streptococcus* mediates biofilm formation in the presence of human plasma. **Microbes and Infection**, v. 17, n. 1, p. 71–76, 2015.

YADAV, N. S. *et al.* Bacteriological profile of neonatal sepsis and antibiotic susceptibility pattern of isolates admitted at Kanti Children's Hospital, Kathmandu, Nepal. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 1, p. 1–6, 2018.

YUSEF, D. *et al.* Clinical characteristics and epidemiology of sepsis in the neonatal intensive care unit in the era of multi-drug resistant organisms: A retrospective review. **Pediatrics and Neonatology**, v. 59, n. 1, p. 35–41, 2018.

ZIMMERMANN, P.; GWEE, A.; CURTIS, N. The controversial role of breast milk in GBS late-onset disease. **Journal of Infection**, v. 74, p. S34–S40, 2017.

## 5 ARTIGO

**Título:** Atividade antimicrobiana de benzoiltioureias em agentes etiológicos de sepse neonatal

### RESUMO

Sepse neonatal representa importante causa de morbidade e mortalidade em recém-nascidos e *Streptococcus agalactiae* (Estreptococo do Grupo B - EGB) continua sendo o principal agente etiológico envolvido nessas infecções. Considerando as atividades biológicas já descritas para substâncias contendo o grupamento tioureia, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de tioureias em agentes etiológicos de infecções neonatais, incluindo bactérias Gram-positivas (*S. agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*), Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) e leveduras do gênero *Candida*, além de realizar um estudo de relação estrutura-atividade. Primeiramente, uma série de vinte e seis benzoiltioureias foram sintetizadas e avaliadas quanto à atividade antimicrobiana *in vitro*, por meio de ensaios de microdiluição em caldo. *N*-(butilcarbamoil) benzamida (composto 5) foi também avaliada contra cepas de EGB sensíveis e resistentes à eritromicina/clindamicina, por microdiluição em caldo, análise da curva de morte, microscopia eletrônica de transmissão e ensaio antibiofilme. Entre todos os derivados analisados, os compostos alifáticos, principalmente 3, 5 e 6 se mostraram mais ativos que os compostos aromáticos contra todos os fungos e bactérias estudados. *N*-(butilcarbamoil) benzamida inibiu o crescimento de todos os isolados de EGB, com valores de CIM variando de 15,6  $\mu\text{g/mL}$  a 62,5  $\mu\text{g/mL}$  e valores de CBM iguais a 1000  $\mu\text{g/mL}$  para todos os isolados, indicando um efeito bacteriostático. Este resultado foi corroborado pela análise da curva de morte e por microscopia eletrônica de transmissão, que mostraram que o composto 5, na CIM, reduziu a população de células planctônicas em aproximadamente 4 a 6 log após 24 horas de tratamento e provocou alterações significativas na morfologia e ultraestrutura das células de EGB após 4 horas de incubação. Com exceção de três cepas, o composto 5, na CIM, reduziu a viabilidade da maioria dos biofilmes maduros de EGB. Adicionalmente, o composto 5 apresentou toxicidade seletiva para as cepas de EGB em comparação com seu efeito sobre as células de mamíferos, HeLa e eritrócitos humanos. Os resultados sugerem que o composto 5 apresenta potencial como protótipo para o desenvolvimento de uma nova classe de agentes antimicrobianos contra EGB.

**Palavras-chave:** Atividade antibacteriana, benzoiltioureia, benzoilguanidina, benzoilureia, biofilme, *Candida* spp., *Streptococcus agalactiae*.

## ABSTRACT

Neonatal sepsis is the cause of substantial morbidity and mortality among infants and *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci - GBS) remains the most frequent causative pathogen. Considering the biological activities described to compounds containing thiourea group, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of thiourea derivatives against a range of important etiologic agents of neonatal infections, including Gram-positive bacteria (*S. agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*), Gram-negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) and *Candida*, as well as to perform a structure-activity relationship study. First, a series of twenty six benzoylthioureas were appropriately synthesized and evaluated for their *in vitro* antimicrobial activity by broth microdilution assay. *N*- (butylcarbamotioil) benzamida (compound 5) were also evaluated against erythromycin/clindamicyn susceptible and resistant GBS strains by broth microdilution assay, time kill curve analysis, transmission electron microscopy and antibiofilm assay. Among all derivatives evaluated, the aliphatic compounds, mainly 3, 5 and 6 were more active than the aromatic ones against all bacteria and yeast utilized. Compound 5 inhibited the growth of all planktonic GBS isolates, with MIC values ranging from 15.6  $\mu\text{g/mL}$  to 62.5  $\mu\text{g/mL}$  and MBC values equal 1000  $\mu\text{g/mL}$  for all isolates, indicating a bacteriostatic effect. This result was corroborate by the time kill curve analysis and transmission electron microscopy, which showed that compound 5 at MIC reduced the planktonic cell population approximately by 4 to 6 log after 24 h of treatment and provoked significant changes in GBS morphology and ultrastructure after 4 hours-incubation. Except for three GBS strains, compound 5 at MIC decreased the viability of the most of GBS mature biofilms. In addition, compound 5 showed selective toxicity to GBS compared to their effect on the mammalian cells, HeLa and human erythrocytes. These results suggest that compound 5 represent a potential new antimicrobial class against GBS.

**Keywords:** Antibacterial activity, benzoylthiourea, benzoylguanidine, benzoylurea, biofilm, *Candida* spp., *Streptococcus agalactiae*.

## 1. INTRODUÇÃO

A mortalidade infantil em crianças até 5 anos de idade continua elevada, especialmente em países de baixa e média renda (África subsaariana, Sudeste da Ásia e alguns países latino-americanos). Em 2016, aproximadamente 5,6 milhões de crianças morreram nessa faixa etária, sendo 46% no período neonatal (7.000 mortes por dia). Sepses continua sendo a principal causa de morbidade e mortalidade entre recém-nascidos em todo mundo, especialmente em prematuros (UNICEF, 2017). A incidência de sepses neonatal pode variar entre as diversas regiões geográficas e isso se deve a diferenças nas estratégias de prevenção, fatores de risco neonatal e nível de renda (SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017).

Infecções relacionadas à assistência em saúde (IRAS) em neonatos podem ser classificadas em doença neonatal de início precoce (*early-onset disease* - EOD), que se manifesta nos primeiros sete dias de vida, com maior incidência durante as primeiras 24 a 48 horas, e a de início tardio (*late-onset disease* - LOD), que ocorre a partir da primeira semana ou até o terceiro mês de vida (VERANI; MCGEE; SCHRAG, 2010). EOD está geralmente associada com a transmissão vertical dos microrganismos, que pode ocorrer antes ou durante o trabalho de parto, conduzindo a distúrbios respiratórios ou pneumonia, que frequentemente evoluem para sepses. Por outro lado, o desenvolvimento de LOD é, em geral, associado à aquisição de microrganismos a partir do ambiente, como o contato humano, fontes hospitalares ou comunidade e leite materno, sendo meningite e sepses as principais manifestações clínicas (SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017; VOLLER; MYERS, 2016).

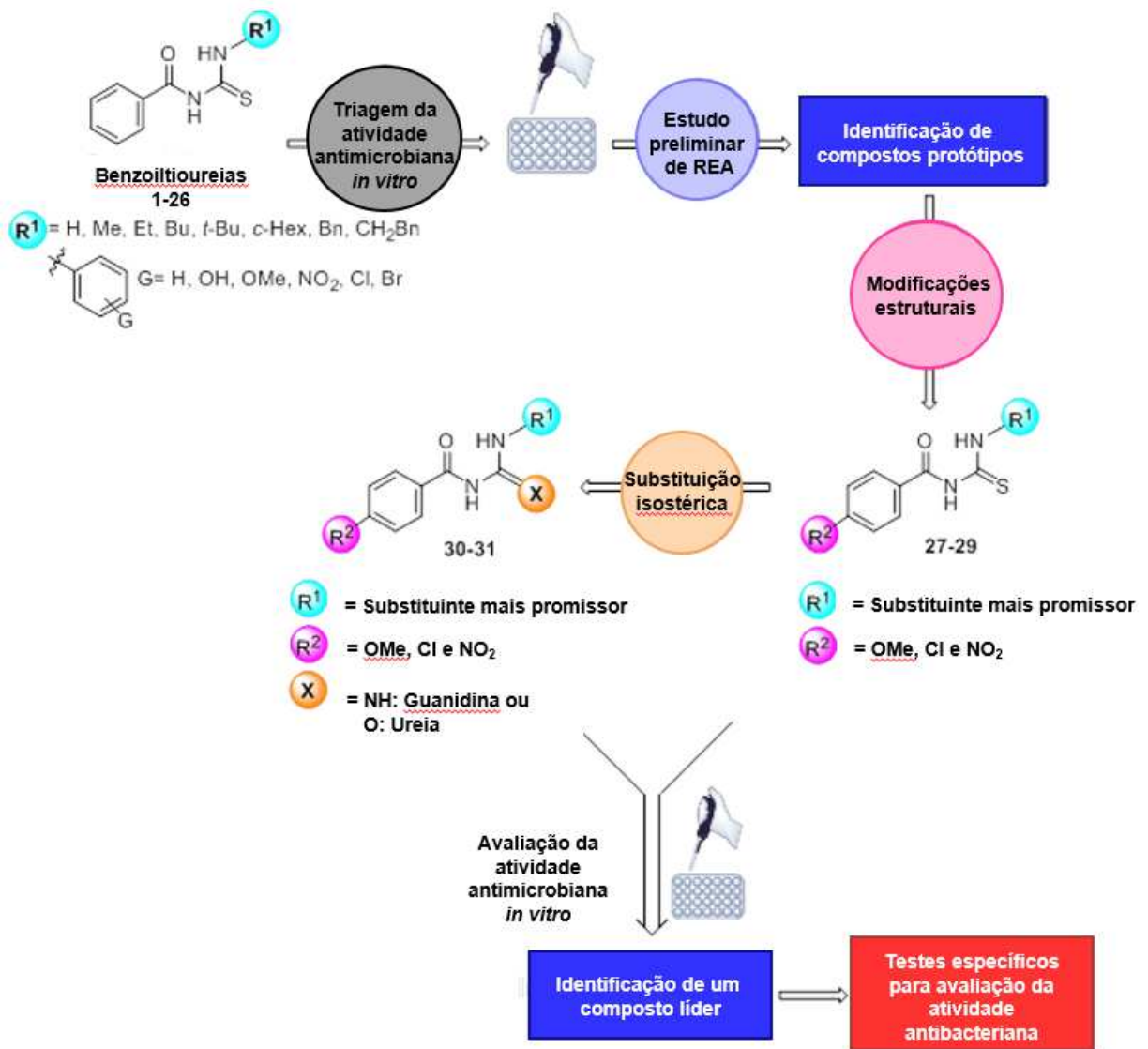
O diagnóstico de infecções neonatais é dificultado pela falta de especificidade dos sintomas, que podem ser diferentes daqueles apresentados por crianças ou adultos. Portanto, na presença de fatores de risco, o tratamento antimicrobiano empírico é geralmente utilizado para controlar infecções e conseqüentemente, as taxas de mortalidade (FLEISCHMANN-STRUZEK *et al.*, 2018). De fato, os antimicrobianos são fármacos frequentemente utilizados em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (de SOUZA *et al.*, 2016). Conseqüentemente, o uso excessivo de antimicrobianos nesses ambientes está relacionado ao maior risco de sepses neonatal por patógenos multirresistentes (SILVA *et al.*, 2018), com taxa de mortalidade estimada em 30% (LAXMINARAYAN *et al.*, 2016).

Embora a resistência bacteriana já tenha sido observada logo após a descoberta da penicilina (ABRAHAM; CHAIN, 1940), esse fenômeno representa uma ameaça crescente e de grande impacto para a saúde humana. Em contrapartida, poucos são os avanços científicos relacionados com a descoberta de novos alvos e de novas moléculas ativas contra bactérias

multirresistentes. Com exceção dos lipopeptídeos, a maioria das classes de antimicrobianos utilizados atualmente foi descoberta antes da década de 1980 (AMINOV, 2017). Portanto, a descoberta e desenvolvimento de novos antibacterianos se fazem necessárias.

Nesse contexto, compostos contendo o grupamento tioureia apresentam importante papel, uma vez que são utilizados na prática clínica desde a década de 1970 para o tratamento do hipertireoidismo (MANNA; ROY; MUGESH, 2013). Na química medicinal, as tiureias são consideradas importantes blocos construtores para a síntese de moléculas bioativas de diversas classes terapêuticas tais como antimicrobianos, anestésicos e antissépticos (MERTSCHENK; KNOTT; BAUER, 2013). Diversos estudos já mostraram a atividade antimicrobiana de diferentes tiureias contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BIELENICA *et al.*, 2018; DOLAN *et al.*, 2016; GHORAB *et al.*, 2016; STEFANSKA *et al.*, 2016a, STEFANSKA *et al.*, 2016b ; BIELENICA *et al.*, 2015; STEFANSKA *et al.*, 2015; BUKVIĆ KRAJACIC *et al.*, 2011; BUKVIĆ KRAJACIC *et al.*, 2009; CUNHA *et al.*, 2007), fungos (GHORAB *et al.*, 2016; CUNHA *et al.*, 2007), protozoários (VIANA *et al.*, 2017), vírus (BIELENICA *et al.*, 2017; LU *et al.*, 2015 ) e *Mycobacterium tuberculosis* (BRITO *et al.*, 2018; TATAR *et al.*, 2016).

Neste estudo, foi investigada a atividade antimicrobiana *in vitro* de 26 benzoiltiureias (**1-26**) contra importantes agentes etiológicos de infecções neonatais, incluindo bactérias Gram-positivas como *Streptococcus agalactiae* (Estreptococo do Grupo B – EGB), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*; Gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e leveduras do gênero *Candida*. Após a triagem inicial, um estudo preliminar de relação estrutura-atividade (REA) foi conduzido com o objetivo de identificar os pontos relevantes para a atividade antimicrobiana. Em seguida, o composto protótipo, que apresentou melhor potencial antimicrobiano, foi submetido a modificações estruturais por meio da introdução de diferentes substituintes (Cl, NO<sub>2</sub> e OMe) na posição *para* do anel benzoíla (**27-29**). Além disso, foi também verificada a importância do núcleo tioureia como grupo farmacofórico, pela substituição isostérica na estrutura do composto mais promissor, para obtenção dos compostos análogos correspondentes, guanidina (**30**) e ureia (**31**). Por fim, o composto-lider foi selecionado para estudos adicionais, a fim de explorar a atividade antimicrobiana específica (Figura 1).



**Figura 1.** Delineamento experimental para a avaliação da atividade antimicrobiana das benzoiltioureas (1-29) e análogos (30-31) contra os principais agentes etiológicos de seps neonatal.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Para triagem da atividade antimicrobiana das benzoiltioureas e seus derivados foram utilizadas, inicialmente, cepas de referência de bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*Staphylococcus aureus* sensível à meticilina - MSSA), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecium* ATCC 6569, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813), Gram negativas

(*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25969, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031) e leveduras (*Candida albicans* ATCC 26790, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 28707, *Candida krusei* ATCC 34135, *Candida glabrata* ATCC 2001) cedidas gentilmente pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade – INCQS (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil). Para este teste, as cepas bacterianas foram cultivadas em Caldo Muller – Hinton (MHB) e as leveduras em meio Sabouraud Dextrose (SD), a 37°C, por 24 horas.

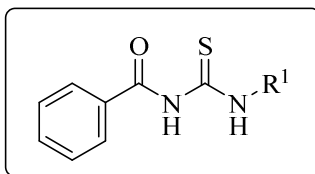
Em seguida, para a realização dos testes de caracterização da atividade antibacteriana, foram incluídos no estudo 10 isolados clínicos de *Streptococcus agalactiae* (OTAGUIRI *et al.*, 2017), pertencentes à coleção de bactérias do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. Antes da realização dos ensaios, as bactérias foram crescidas em caldo Triptona de Soja (TSB) pH 6,5, a 37°C, por 24 horas.

Antes dos experimentos, três unidades formadoras de colônia (UFC) de cada microrganismo foram transferidas para meio específico para obter uma turbidez equivalente a um padrão de 0,5 da escala de McFarland, utilizando o turbidímetro DensiCHECK™ PLUS (bioMérieux), que corresponde a aproximadamente  $1,0-2,0 \times 10^8$  UFC/mL ou  $1,0-5,0 \times 10^6$  UFC/mL para bactérias e fungos, respectivamente (suspensão microbiana padrão). Os microrganismos foram armazenados em meio específico contendo 20% de glicerol a -80°C.

## 2.2. QUÍMICA

### 2.2.1 Síntese das benzoiltioureias (1-29), da benzoilguanidina (30) e da benzoilureia (31)

Todos as benzoiltioureias (1-26, Figura 2) foram previamente sintetizadas e completamente caracterizadas utilizando técnicas espectroscópicas e espectrométricas (BRITO *et al.*, 2015).



<b>1:</b> R <sup>1</sup> =H	<b>9:</b> R <sup>1</sup> =Ph	<b>18:</b> R <sup>1</sup> =2-OMe-Ph
<b>2:</b> R <sup>1</sup> =Me	<b>10:</b> R <sup>1</sup> =2-Cl-Ph	<b>19:</b> R <sup>1</sup> =3-OMe-Ph
<b>3:</b> R <sup>1</sup> =Et	<b>11:</b> R <sup>1</sup> =3-Cl-Ph	<b>20:</b> R <sup>1</sup> =4-OMe-Ph
<b>4:</b> R <sup>1</sup> =Pr	<b>12:</b> R <sup>1</sup> =4-Cl-Ph	<b>21:</b> R <sup>1</sup> =2-NO <sub>2</sub> -Ph
<b>5:</b> R <sup>1</sup> =Bu	<b>13:</b> R <sup>1</sup> =2-Br-Ph	<b>22:</b> R <sup>1</sup> =3-NO <sub>2</sub> -Ph
<b>6:</b> R <sup>1</sup> =Hex	<b>14:</b> R <sup>1</sup> =3-Br-Ph	<b>23:</b> R <sup>1</sup> =4-NO <sub>2</sub> -Ph
<b>7:</b> R <sup>1</sup> =Bn	<b>15:</b> R <sup>1</sup> =4-Br-Ph	<b>24:</b> R <sup>1</sup> =4-Me-Ph
<b>8:</b> R <sup>1</sup> =CH <sub>2</sub> Bn	<b>16:</b> R <sup>1</sup> =3-OH-Ph	<b>25:</b> R <sup>1</sup> =4-t-Bu-Ph
	<b>17:</b> R <sup>1</sup> =4-OH-Ph	<b>26:</b> R <sup>1</sup> =4-SMe-Ph

**Figura 2.** Estrutura química das benzoiltioureas previamente sintetizadas (BRITO *et al.*, 2015).

As benzoiltioureas substituídas na posição 4 do anel benzofila (**27-29**) foram sintetizadas de acordo com a metodologia descrita anteriormente (BRITO *et al.*, 2015). Os produtos foram obtidos como sólidos amarelos pálidos com bons rendimentos (78-90%). Estes compostos foram identificados por medidas de ponto de fusão e espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H .

*N*-(butilcarbamoil)-4-clorobenzamida (**27**): Rendimento: 90%; p.f. 70-71°C; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,77 (1H, sl, NH); 8,91 (1H, sl); 7,80 (2H, d, *J* = 8,9 Hz); 6,98 (2H, d, *J* = 8,9 Hz); 3,70 (2H, m); 1,69 (2H, m); 1,46 (2H, m); 0,97 (3H, t, *J* = 7,4 Hz).

*N*-(butilcarbamoil)-4-metoxibenzamida (**28**): Rendimento: 86%; p.f. 73-74°C; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,78 (1H, sl); 8,91 (1H, sl); 7,80 (2H, d, *J* = 8,9 Hz); 6,98 (2H, d, *J* = 8,9 Hz); 3,70 (2H, m); 1,70 (2H, quint, *J* = 14,6, 7,3 Hz); 1,46 (2H, m); 0,97 (3H, t, *J* = 7,4 Hz).

*N*-(butilcarbamoil)-4-nitrobenzamida (**29**): Rendimento: 78%; p.f. 85-86°C; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,55 (1H, sl); 9,12 (1H, sl); 8,36 (2H, d, *J* = 8,9 Hz); 8,03 (2H, d, *J* = 8,9 Hz); 3,71 (2H, m); 1,71 (2H, quint, *J* = 14,6; 7,3 Hz); 1,45 (2H, m); 0,99 (3H, t, *J* = 7,4 Hz).

*N*-(*N*-butilcarbamimidoil)benzamida **30** foi preparada de acordo com o protocolo descrito por Cunha *et al.* (2006), com algumas modificações. Resumidamente, hidróxido de amônio aquoso a 40% (10 mmol), trietilamina (4 mmol), bismuto de sódio (2 mmol) e iodeto de bismuto (0,1 mmol) foram adicionados à uma solução de *N*-(butilcarbamoil) benzamida **5** (2 mmol) em 30 mL de acetonitrilo sob agitação vigorosa. A mistura reacional foi agitada durante 5 horas à temperatura ambiente. Depois, o solvente foi removido sob pressão reduzida e o sólido obtido foi suspenso em diclorometano e filtrado através de uma almofada de celite. Em seguida, a fase orgânica foi seca com MgSO<sub>2</sub> anidro e concentrada sob pressão reduzida. O produto foi então dissolvido com éter etílico / éter de petróleo (1:1 v/v) e resfriado em refrigerador durante 48 horas. Após a precipitação, o sólido resultante foi filtrado e lavado com éter de petróleo (3 x 10 mL). Rendimento: 73%; p.f. 113-114°C (Lit. p.f. 114°C [33]); RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,15 (2H, d, *J* = 7,0 Hz); 7,45-7,35 (3H, m); 1,57-1,33 (6H, m); 0,91-0,88 (3H, m).

*N*-(butilcarbamoil)benzamida **31** foi preparada de acordo com o procedimento descrito por Zade *et al.* (2012), com modificações. *N*-(butilcarbamoil)benzamida **5** (0,005 mol) foi dissolvida em 15 mL de ácido fórmico 85%. Em seguida, foram adicionados 50 mL de peróxido de hidrogênio a 30% e a mistura reacional foi agitada durante 12 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura reacional foi vertida em gelo triturado e agitada vigorosamente durante 15 minutos. O precipitado foi recolhido, seco e recristalizado a partir da mistura de hexano-acetato de etila. Rendimento: 85%; p.f. 92-93°C (Lit. p.f. 92°C (BUDESINSKY *et al.*, 1959)); RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,20 (1H, sl); 8,71 (1H, sl); 7,94 (2H, d, *J* = 7,6 Hz); 7,59 (1H, t, *J* = 7,4 Hz); 7,49 (2H, t, *J* = 7,6 Hz); 3,37 (2H, q, *J* = 12,9; 6,7 Hz); 1,60 (2H, quint, *J* = 14,9; 7,4 Hz); 1,41 (2H, m); 0,97 (3H, t, *J* = 7,3 Hz).

Para a execução dos testes biológicos, uma solução estoque dos compostos foi preparada em 10% de dimetilsulfóxido (DMSO v/v, Sigma-Aldrich, Brasil) e diluída nos meios de cultura apropriados (de acordo com o microrganismo-teste), de maneira que a concentração de DMSO não excedeu 1% nos experimentos.

### **2.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS BENZOILTIOUREIAS, DA BENZOILGUANIDINA E DA BENZOILUREIA**

O efeito inibitório dos compostos (1-31) sobre o crescimento de células planctônicas das espécies de microrganismos citadas foi determinado pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017). Diluições seriadas dos compostos (1,9  $\mu\text{g/mL}$  a 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) foram preparadas em 100  $\mu\text{L}$  de MHB e Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640, Sigma-Aldrich, Brasil) para bactérias e fungos, respectivamente, e transferidas para microplacas com 96 poços (Techno Plastic Products, Suíça). Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de microrganismos foi adicionada a cada poço, atingindo uma concentração final de  $1-5 \times 10^5$  UFC/mL para bactérias e  $0,5 - 2,5 \times 10^3$  UFC/mL para leveduras. Poços que não contiveram os compostos foram utilizados como controle positivo de crescimento e aqueles sem microrganismos foram utilizados como controle negativo do experimento. Para todos os compostos, a concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração que provocou total inibição do crescimento, verificada por leitura visual, após 24h de incubação. Compostos que apresentaram valores de CIM  $> 1000 \mu\text{g/mL}$  foram considerados inativos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata em duas ocasiões diferentes.

#### **2.4. EFEITO DA N-(BUTILCARBAMOTIOIL) BENZAMIDA (COMPOSTO 5) SOBRE CÉLULAS DE MAMÍFEROS**

A toxicidade do composto 5 foi avaliada utilizando células HeLa (*Homo sapiens cervix epithelial cells*) e eritrócitos humanos. As células HeLa foram crescidas em uma microplaca de 96 poços utilizando meio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) (GIBCO) suplementado com 10% (v/v) com soro fetal bovino, 100 IU/mL de penicilina e 100 mg/mL estreptomicina até uma densidade de  $2,5 \times 10^4$  células/poço por 24h em 5% de  $\text{CO}_2$  a 37 °C. Quando confluentes, as células não aderidas foram removidas por meio de lavagem com solução salina tamponada com fosfato 0,15 M pH 7,2 (PBS) esterilizada. O meio (100  $\mu\text{L}$ ) contendo diferentes concentrações do composto 5 (1,9  $\mu\text{g/mL}$  a 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) foi adicionado a cada poço e as placas foram incubadas por 24h. A viabilidade celular foi determinada pela redução do dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma Chemical Co., USA), de acordo com a metodologia recomendada pelo fabricante. As concentrações citotóxicas do composto 5 necessárias para inibir 50% ( $\text{CC}_{50}$ ) e 90% ( $\text{CC}_{90}$ ) das células viáveis foram calculadas por regressão linear.

O sangue humano foi coletado de doadores saudáveis, de acordo com os princípios expressos na Declaração de Helsinki redigida pela Associação Médica Mundial e,

após desfibrinação, foi diluído em solução salina glicosilada (5%). Em seguida, os eritrócitos (100  $\mu\text{L}$ ) foram incubados com diferentes concentrações do composto **5** (1,9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 3h a 37°C. Poços que não contiveram o composto foram utilizados como controle negativo e aqueles contendo 1% Triton X-100 foram considerados como controle positivo de hemólise. A porcentagem de hemólise foi calculada a partir da leitura da densidade óptica (DO) a 550 nm e comparada com a do controle positivo, usando a seguinte equação:  $(\text{DO}_{550}$  do sobrenadante tratado com o composto -  $\text{DO}_{550}$  do controle negativo /  $\text{DO}_{550}$  do controle positivo -  $\text{DO}_{550}$  do controle negativo) x 100% (OTAGUIRI *et al.*, 2017).

## **2.5. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA N-(BUTILCARBAMOTIOIL) BENZAMIDA (COMPOSTO 5) CONTRA CEPAS DE EGB**

### **2.5.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

A determinação da CIM do composto **5** sobre a cepa de referência e os isolados clínicos de EGB foi realizada da mesma maneira como citado acima, exceto para o meio de cultura, que, neste caso, foi substituído por TSB pH 6,5 (OTAGUIRI *et al.*, 2017). Para determinação da concentração bactericida mínima (CBM), após 24h de incubação, 10  $\mu\text{L}$  foram retirados de todos os poços em que não houve crescimento bacteriano visível, inoculados em ágar triptona de soja (TSA, Oxoid) contendo 5% de sangue de carneiro e as placas foram incubadas a 37°C, por 24h. A CBM foi definida como a menor concentração do composto **5** em que não houve crescimento de UFC de bactérias tratadas comparado com células não tratadas. Todos os experimentos foram determinados em triplicata e repetidos duas vezes.

### **2.5.2. Curva de Morte**

A taxa da atividade antibacteriana do composto **5** sobre células planctônicas de EGB foi obtida pela determinação da curva de morte (CLSI, 1999). Duas amostras clínicas com diferentes perfis de sensibilidade aos antimicrobianos comerciais, EGB 115 (resistente à eritromicina e clindamicina, *erm(B)*<sup>+</sup>) e EGB 121 (resistente à eritromicina, *mef(A/E)*<sup>+</sup>), além de *S. agalactiae* ATCC 13813, foram selecionadas para este ensaio. Os cultivos bacterianos crescidos em TSB pH 6,5 a 37°C por 24h foram ajustados até uma densidade celular igual a 1-

$5 \times 10^5$  UFC/mL e tratados com uma solução do composto **5** de concentração igual à respectiva CIM. Amostras controles foram preparadas na ausência da substância. A cada intervalo de tempo regular (0, 1, 2, 4, 8, 10, 12 e 24h), alíquotas (20  $\mu$ L) dos tubos tratados foram retiradas, diluídas serialmente (1:10) e 10  $\mu$ L foram transferidos para placas de TSA suplementado com sangue de carneiro a 5% (MILES; MISRA; IRWIN, 1938). As contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) foram determinadas após incubação a 37°C por 24 horas e os dados foram calculados e plotados como  $\log_{10}$  UFC/mL *versus* tempo (horas).

### **2.5.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

As alterações morfológicas e ultraestruturais induzidas pelo composto **5** sobre as células planctônicas de *S. agalactiae* ATCC 13813 foram analisadas por MET. As células planctônicas foram tratadas com a CIM (62,5  $\mu$ g/mL) do composto **5** por 4 horas e fixadas por 2 horas, em temperatura ambiente, com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4. A pós-fixação foi realizada em tampão cacodilato contendo 1% de tetróxido de ósmio, 0,8% de ferrocianeto de potássio e 5 mM de  $\text{CaCl}_2$  por 1 hora à temperatura ambiente. As células foram desidratadas em acetona e embebidas em resina Epon. Cortes ultrafinos foram obtidos utilizando ultramicrótomo Leica, corados com acetato de uranila 5% e analisados em microscópio eletrônico JEOL JEM-1400.

### **2.5.4. Atividade Antibacteriana do Composto 5 sobre Biofilmes Maduros de EGB**

Os biofilmes maduros de EGB foram primeiramente formados em placas de microtitulação de poliestireno de fundo plano contendo 96 poços (Techno Plastic Products, Suíça), usando 20  $\mu$ L da suspensão bacteriana padrão, em um modelo estático, a 37°C de acordo com Otaguiri *et al.*, (2017). Após a formação do biofilme (24h), o meio de cultura foi aspirado e as células sésseis foram gentilmente lavadas com PBS antes da adição de TSB fresco (200  $\mu$ L), contendo diferentes concentrações do composto **5** (7,9  $\mu$ g/mL a 1000  $\mu$ g/mL), e as placas foram incubadas por mais 24 horas. Os controles incluíram poços onde o composto **5** não foi adicionado e poços sem biofilme. A atividade metabólica dos biofilmes tratados e não tratados foi determinada pelo ensaio de redução do 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil)-5-(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazólio (XTT). Uma alíquota de 200  $\mu$ L contendo 0,5 mg/mL de XTT, 1 mM de menadiona (Sigma-Aldrich, EUA) foi adicionada a cada poço e as placas foram incubadas no escuro a 37°C por 90 minutos. Os sobrenadantes foram

transferidos para uma nova placa de microtitulação e a densidade óptica (DO) foi medida a 490 nm, utilizando um leitor de placas de microtitulação (Synergy™ HT, BioTek) (OTAGUIRI *et al.*, 2017). Os experimentos foram realizados em quintuplicata e em duas ocasiões diferentes. Os dados foram expressos como redução percentual da viabilidade das células sésseis em comparação com os poços de controle livres de compostos.

## 2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando o software GRAPHPAD PRISM versão 6.0 (GRAPHPAD Software, San Diego, CA). Para os estudos de redução do biofilme e toxicidade em células de mamíferos, a significância dos valores obtidos foi avaliada por one-way ANOVA e teste de Dunnett's para múltiplas comparações. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos em todos os casos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. ESPÉCIES MICROBIANAS ASSOCIADAS COM INFECÇÕES NEONATAIS EXIBEM DIFERENTES PERFIS DE SENSIBILIDADE ÀS BENZOILTIOUREIAS (1-29) E SEUS DERIVADOS

Tioureia, um composto organosulfúrico, tem sido amplamente utilizado como bloco construtor para o desenvolvimento de várias moléculas com diferentes propriedades biológicas. De fato, a presença de átomos de nitrogênio viabiliza a introdução de diversos substituintes no núcleo tioureia. Com relação à atividade antimicrobiana, Cunha *et al.*, (2007) descreveram o efeito inibitório de tioureias 1-(benzoil)-3-(substituídas) no crescimento de células planctônicas de bactérias Gram-positivas e fungos. Em um estudo anterior conduzido pelo nosso grupo de pesquisa, também foi relatada a síntese de novas benzoiltioureias e seus efeitos antimicrobianos contra *Mycobacterium tuberculosis*, o agente etiológico da tuberculose. A adição de substituintes bromo, cloro e *t*-Bu na posição *para* no anel benzeno mostrou ser crucial na atividade antimicobacteriana e biocompatibilidade com células de mamíferos LLC-MK2 (BRITO *et al.*, 2018).

Neste estudo, diversas cepas de referência de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e espécies de *Candida* associadas a infecção neonatal foram utilizadas para a triagem inicial da atividade antimicrobiana de 26 benzoiltioureias (1-26). Entre elas, quatro derivados (3, 5, 6 e 16) apresentaram valores de CIM inferiores a 1000 µg/mL contra ao menos uma cepa de referência e os resultados estão apresentados na Tabela 1. A partir desses

resultados, foi possível observar que a presença de um grupo aromático ligado ao nitrogênio da tioureia não apresentou efeito positivo na atividade antimicrobiana dessa classe de compostos, visto que o derivado **16** apresentou valores de CIM > 1000  $\mu\text{g/mL}$  para todas as cepas, exceto para *C. parapsilosis* ATCC 22019. Os derivados alifáticos (**3**, **5** e **6**) inibiram o crescimento de EGB, *C. albicans* e *C. tropicalis*, e o composto **5** apresentou valores de CIM duas vezes menores para as cepas de referência, quando comparado a **3** ou **6**, o que indica um melhor potencial antimicrobiano para esse composto. Ademais, os menores valores de CIM para os compostos **5** (62,5  $\mu\text{g/mL}$ ), **6** (125  $\mu\text{g/mL}$ ) e **3** (500  $\mu\text{g/mL}$ ) foram detectados para EGB, indicando que, para essa espécie, a atividade antibacteriana foi sensível ao comprimento da cadeia, uma vez que os valores de CIM decresceram quando grupos etil (**3**) ou hexil (**6**) foram ligados ao nitrogênio do grupamento tioureia comparados ao grupo butil (**5**). O composto **5** também inibiu o crescimento da cepa de *E. faecium* com CIM = 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

Devido à atividade mais promissora apresentada pelo composto **5**, compostos contendo um grupo butil fixado ao nitrogênio da tioureia e diferentes substituintes (Cl, NO<sub>2</sub> e OMe) ligados à posição *para* do anel benzofila (**27-29**) foram sintetizados e avaliados contra todas as cepas, visando analisar a influência das características eletroeletrônicas distintas sobre a atividade antimicrobiana dessa classe de substâncias. Todos esses derivados apresentaram valores de CIM superiores ao composto **5**, o que mostra que a substituição nessa posição é crítica para a atividade antibacteriana frente a EGB, independente dos efeitos estéricos eletrônicos dos substituintes. Além disso, a substituição isostérica do enxofre (**5**) por nitrogênio (**30**) ou oxigênio (**31**) não potencializa o efeito antimicrobiano contra EGB, sugerindo que o núcleo tioureia pode ser considerado como o grupo farmacofórico. Exceto o derivado guanidina **30**, que mostrou baixa atividade contra *E. coli* ATCC 25922 e *K. pneumoniae* ATCC 10031 (CIM = 500  $\mu\text{g/mL}$ ), nenhum desses compostos (**27-29**, **31**) inibiu o crescimento de outras espécies Gram-negativas, com CIM >1000  $\mu\text{g/mL}$ .

Com relação às espécies fúngicas, foi observada fraca atividade dos compostos **3**, **5**, **6**, **16**, **27-31** (CIM = 1000  $\mu\text{g/mL}$  para todos os compostos) sobre o crescimento de *C. parapsilosis*. Além do composto **5**, que inibiu o crescimento de *C. albicans* e *C. tropicalis* (CIM = 250  $\mu\text{g/mL}$  para ambas as espécies), o composto **3** também apresentou efeito inibitório no crescimento das cepas de referência de *C. krusei* e *C. glabrata* (CIM = 500  $\mu\text{g/mL}$  para ambas as espécies). Além disso, o derivado guanidina **30** exibiu valores de CIM iguais a 250  $\mu\text{g/mL}$  para *C. tropicalis* e 500  $\mu\text{g/mL}$  para *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* (Tabela 1).

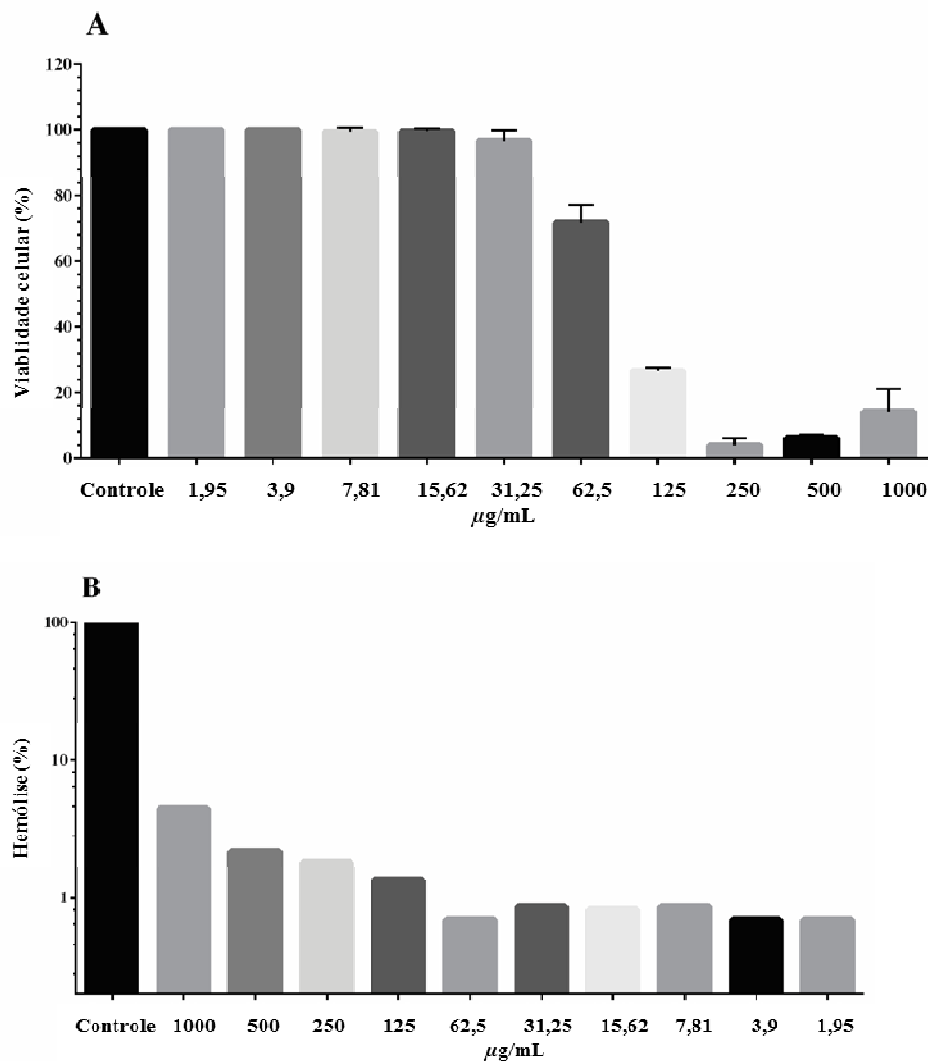
**Tabela 1:** Concentração inibitória mínima (CIM) das benzoiltioureas (**3**, **5**, **6**, **16**, **27-29**), benzoilguanidina (**30**) e benzoilureia (**31**) em células planctônicas de agentes etiológicos de infecção neonatal.

Microrganismos	Compostos CIM* ( $\mu\text{g/mL}$ )								
	<b>3</b> X=S R <sup>1</sup> =Et R <sup>2</sup> =H	<b>5</b> X=S R <sup>1</sup> =Bu R <sup>2</sup> =H	<b>6</b> X=S R <sup>1</sup> =Hex R <sup>2</sup> =H	<b>16</b> X=S R <sup>1</sup> =3-OH-Ph R <sup>2</sup> =H	<b>27</b> X=S R <sup>1</sup> =Bu R <sup>2</sup> =Cl	<b>28</b> X=S R <sup>1</sup> =Bu R <sup>2</sup> =OMe	<b>29</b> X=S R <sup>1</sup> =Bu R <sup>2</sup> =NO <sub>2</sub>	<b>30</b> X=NH R <sup>1</sup> =Bu R <sup>2</sup> =H	<b>31</b> X=O R <sup>1</sup> =Bu R <sup>2</sup> =H
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813	500	62,5	125	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	250	> 1000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	1000	> 1000
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6569	> 1000	1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	1000	> 1000
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	500	> 1000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	500	> 1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	500	250	500	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	500	500
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	500
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 28707	500	250	1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	250	> 1000
<i>Candida krusei</i> ATCC 34135	500	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	500	500
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	500	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	500	500

\*A CIM dos compostos foi determinada pelo método de microdiluição em caldo de acordo com as recomendações do CLSI (2017). Compostos com CIM > 1000  $\mu\text{g/mL}$  foram considerados inativos.

### **3.2. COMPOSTO 5 EXIBE TOXICIDADE SELETIVA PARA CEPAS DE EGB COMPARADO COM SEU EFEITO SOBRE A ATIVIDADE METABÓLICA DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS**

Para investigar a segurança do composto **5** em células de mamíferos, a viabilidade das células HeLa e dos eritrócitos humanos foi avaliada após incubação com o composto nas concentrações antibacterianas. Nas CIMs obtidas contra os isolados de EGB (15,6  $\mu\text{g/mL}$ , 31,2  $\mu\text{g/mL}$  e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ), 99,5 %, 96,6 % e 71,7% das células HeLa permaneceram viáveis (Figura 3A). As concentrações citotóxicas do composto **5** para 50% (CC<sub>50</sub>) e 90% (CC<sub>90</sub>) das células de mamíferos foram determinadas após 24h de incubação e corresponderam a 83,8  $\mu\text{g/mL}$  e 153,7  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, e o valor de IS (CC<sub>90</sub>/CIM) resultou em 2,45, indicando que o composto **5** apresenta toxicidade seletiva contra as células bacterianas. Por outro lado, após 3h de incubação, o composto **5** não causou hemólise significativa dos eritrócitos humanos em todas as concentrações testadas (Figura 3B).



**Figura 3. Efeito do composto 5 sobre células de mamíferos.** (A) As células HeLa foram tratadas com diferentes concentrações do composto 5 (1,9 – 1000 µg/mL) por 24h. A viabilidade celular foi determinada pelo método de redução do MTT de acordo com as recomendações do fabricante. (B) Eritrócitos de sangue humano foram incubados com diferentes concentrações do composto 5 (1,9 – 1000 µg/mL) por 3h a 37 °C. A atividade hemolítica foi determinada por leitura da densidade óptica a 550 nm.

### 3.3. COMPOSTO 5 EXIBE EFEITO BACTERIOSTÁTICO EM CEPAS DE EGB SENSÍVEIS E RESISTENTES À ERITROMICINA/CLINDAMICINA

A partir dos resultados da triagem da atividade antimicrobiana dos derivados de tioureia, o composto 5 foi considerado o mais ativo contra *S. agalactiae* ATCC 13813 (Tabela 1), sem apresentar efeitos tóxicos sobre as células de mamíferos (Figura 3). Embora muitos

microrganismos sejam responsáveis por infecções neonatais, EGB continua sendo o principal agente etiológico de EOD em todo o mundo (PATRAS; NIZET, 2018; SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018; SEALE *et al.*, 2017; SCHRAG *et al.*, 2016). EODs causadas por EGB estão relacionadas com a colonização vaginal materna e transmissão aos neonatos durante o nascimento pelo canal vaginal (MELIN, 2011). Considerando que as vacinas contra EGB seguem em desenvolvimento, a administração da antibioticoterapia profilática intraparto (API) em gestantes colonizadas, com o objetivo de reduzir a transmissão vertical da bactéria, é a estratégia atual utilizada para reduzir as taxas de EOD (VERANI; MCGEE; SCHRAG, 2010). Os beta-lactâmicos (penicilina e ampicilina) são os antibacterianos de primeira escolha para a API e a cefazolina, clindamicina ou vancomicina são utilizados em gestantes alérgicas à penicilina com alto risco de anafilaxia (VERANI; MCGEE; SCHRAG, 2010). Em geral, a maioria dos isolados de EGB permanece sensível aos betalactâmicos (TEATERO *et al.*, 2017; OTAGUIRI *et al.*, 2013) entretanto, isolados com sensibilidade reduzida ou mesmo resistentes a esses antibacterianos têm sido relatados (KIMURA *et al.*, 2013). Por outro lado, altos índices de resistência à eritromicina e clindamicina têm sido reportados em diferentes países (TEATERO *et al.*, 2017; OTAGUIRI *et al.*, 2013). O documento publicado pelos *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos, classificou uma série de microrganismos de acordo com o nível de ameaça quanto à resistência antimicrobiana. Entre eles, EGBs resistentes à clindamicina foram considerados bactérias preocupantes (CDC, 2013), indicando a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de novos compostos para controle das infecções causadas por essa espécie.

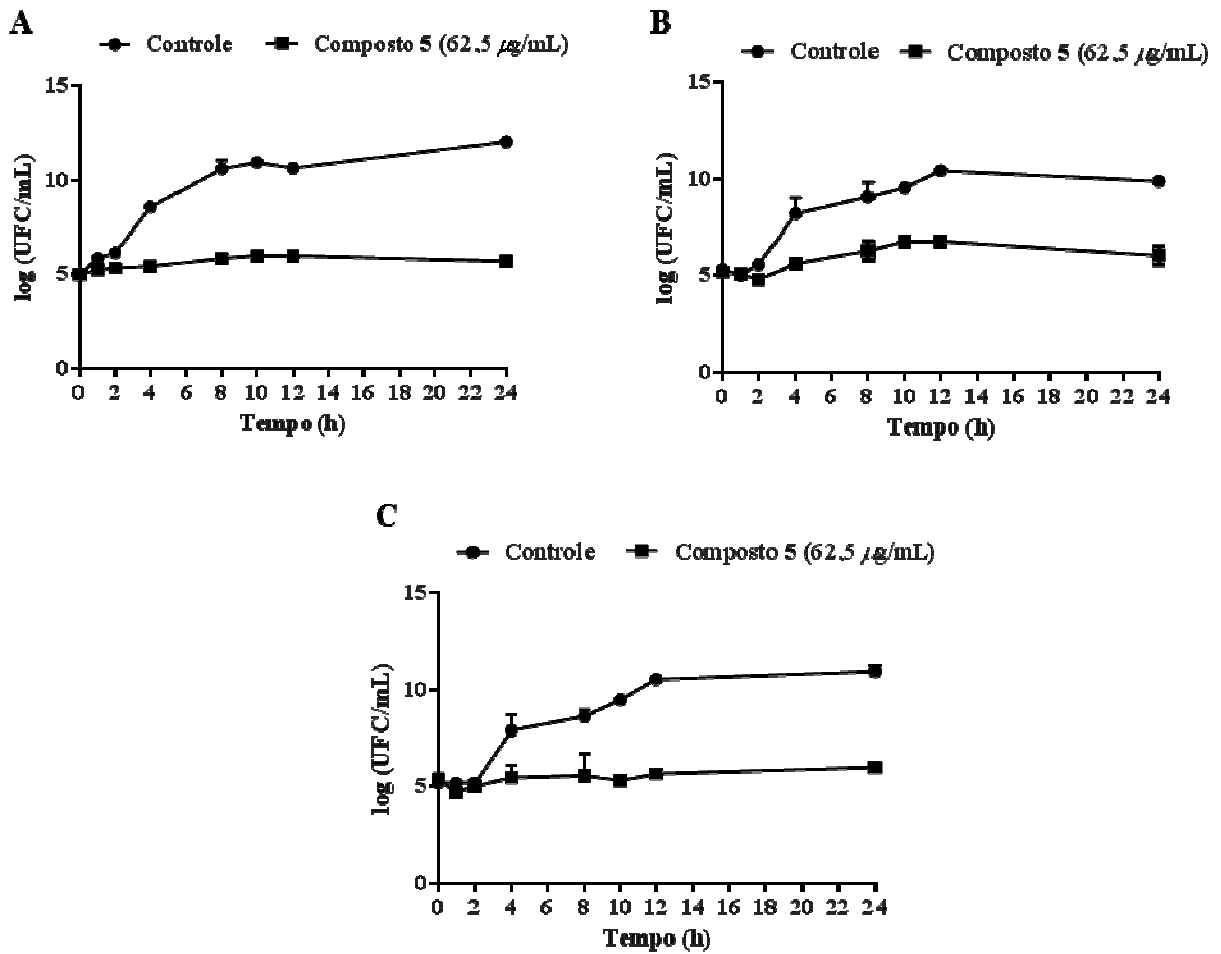
Neste contexto, a partir dos resultados obtidos na triagem inicial da atividade antimicrobiana, o composto **5** e EGB foram selecionados para estudos mais aprofundados. Assim, para corroborar a atividade antibacteriana frente a EGB, a CIM desse composto foi determinada para isolados clínicos de EGB, incluindo aqueles resistentes à clindamicina e/ou eritromicina, com diferentes mecanismos de resistência. O composto **5** inibiu o crescimento de todos os isolados de EGB, com valores de CIM variando de 15,6  $\mu\text{g/mL}$  a 62,5  $\mu\text{g/mL}$  e valores de CBM iguais a 1000  $\mu\text{g/mL}$  para todos os isolados, indicando efeito bacteriostático (Tabela 2). Não houve diferença significativa nos valores de CIM e CBM entre os isolados sensíveis e resistentes à eritromicina e clindamicina ( $p > 0.05$ ), entretanto, EGB 115 (resistente à eritromicina e clindamicina, *erm(B)*<sup>+</sup>), EGB 121 (resistente à eritromicina, *mef(A/E)*<sup>+</sup>) e *S. agalactiae* ATCC 13813 (sensível à eritromicina e clindamicina) foram selecionados para avaliação da cinética de morte.

**Tabela 2.** Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) do composto **5** contra células planctônicas de isolados clínicos de *Streptococcus agalactiae*.

Isolados	Marcador de resistência*	DA	E	Composto 5	
		<sup>a</sup> CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	<sup>a</sup> CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	<sup>a</sup> CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	<sup>b</sup> CBM ( $\mu\text{g/mL}$ )
ATCC 13813	-	0,125	0,125	62,5	1000
50	-	0,250	0,250	62,5	1000
72	-	0,250	0,125	62,5	1000
80	-	0,125	0,250	15,6	1000
89	-	0,125	0,250	62,5	1000
46	<i>mef</i> (A/E)	0,250	64	62,5	1000
121	<i>mef</i> (A/E)	0,125	16	62,5	1000
109	<i>erm</i> (A)	0,125	8	62,5	1000
114	<i>erm</i> (A)	0,125	>64	31,2	1000
66	<i>erm</i> (B)	>64	>64	62,5	1000
115	<i>erm</i> (B)	>64	>64	62,5	1000

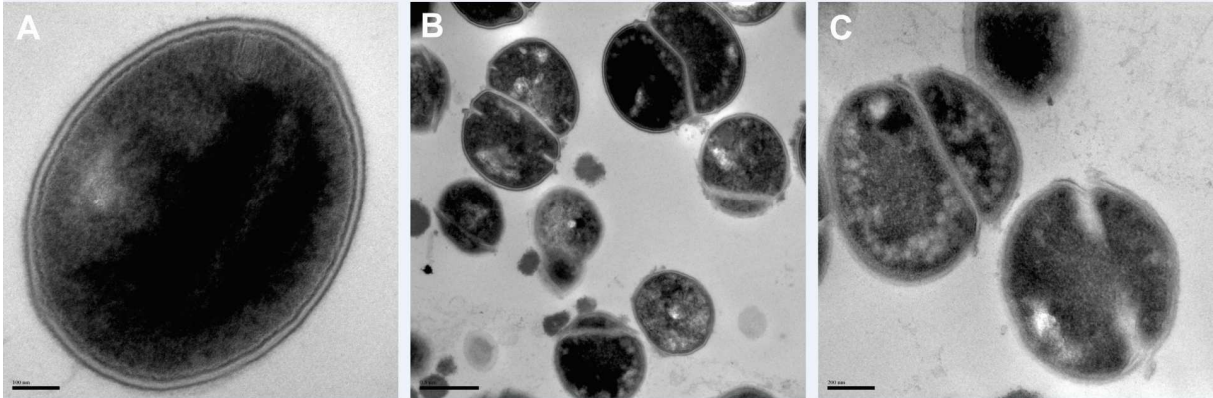
<sup>a</sup>Concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos que resultou na total inibição do crescimento das células planctônicas, observada visualmente, de acordo com o protocolo de microdiluição em caldo estabelecido pelo CLSI (2017). <sup>b</sup>Concentração bactericida mínima (CBM) do composto 5. E: eritromicina; DA: clindamicina; - Ausência de genes de resistência. Genes *erm* e *mef* que codificam metilases responsáveis pela modificação pós-transcricional dos resíduos de adenina presentes no RNA ribossomal 23S e bombas de efluxo, respectivamente. \*Otaguiri *et al.*, 2013.

O composto **5**, na CIM, inibiu o crescimento de células planctônicas de todos os isolados de EGB. Em geral, uma redução de 4 a 6  $\log_{10}$  na contagem das UFCs ( $P < 0,05$ ) foi observada nas células EGB tratadas, comparadas com células não tratadas, após 24 horas de incubação (Figura 4), corroborando o efeito bacteriostático do composto **5**.



**Figura 4: Atividade bacteriostática do composto 5 contra isolados de EGB sensíveis e resistentes.** Curva de morte da cepa de referência *S. agalactiae* ATCC 13813 (A), EGB 115 - *erm* B (B) e EGB 121 - *mef* A/E (C) na presença do composto 5. As bactérias foram incubadas com o composto 5 em CIM (62,5 µg/mL) por 24h a 37 °C e as UFC foram determinadas em intervalos de tempo específicos.

O composto 5 induziu alterações morfológicas e ultraestruturais nas células planctônicas de *S. agalactiae* ATCC 13813 (Figura 5). As células do controle não tratado apresentaram morfologia esférica típica, parece celular compacta e densidade eletrônica regular (Figura 5A). O composto 5 na CIM (62,5 µg/mL) provocou alterações significantivas na morfologia e ultraestrutura de EGB após 4 horas de incubação. Foi observada deformação de parede celular, diminuição na densidade eletrônica do citoplasma e formação assimétrica do septo de divisão celular (Figura 5B e 5C).



**Figura 5.** Efeito do composto **5** sobre células planctônicas de *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 após 4 horas de tratamento, observado por microscopia eletrônica de transmissão.

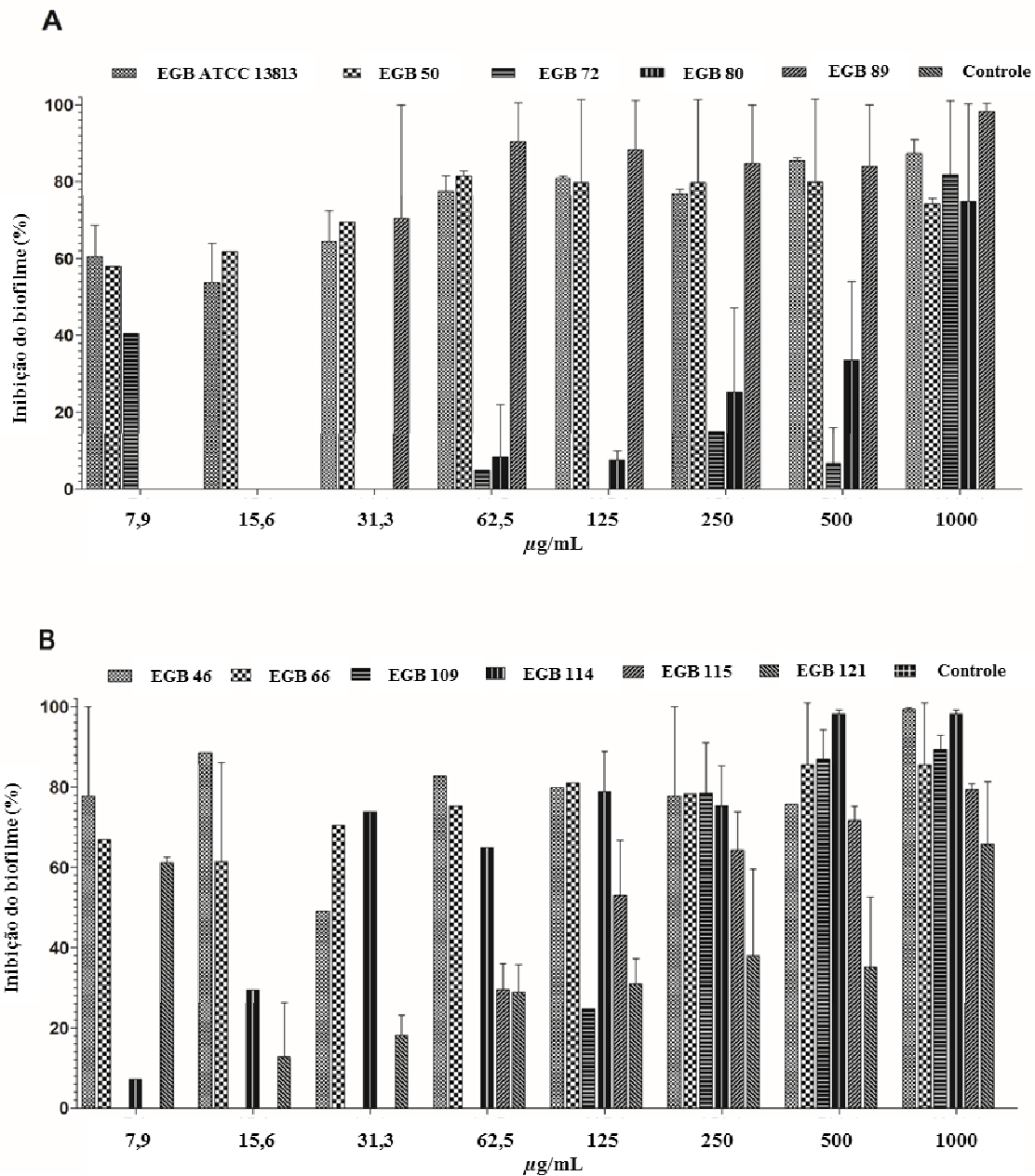
(A) Célula não tratada apresenta morfologia esférica característica, parede celular compacta com densidade eletrônica normal; (B e C) Células tratadas com 62,5 µg/mL (CIM) do composto **5** apresentam deformação de parede celular, diminuição na densidade eletrônica do citoplasma e formação assimétrica do septo de divisão celular.

#### **3.4. COMPOSTO 5 INIBE A ATIVIDADE METABÓLICA DE BIOFILMES MADUROS FORMADOS POR EGB**

Os microrganismos são predominantemente encontrados como células sésseis, aderidas a superfícies e embebidas em uma matriz extracelular polimérica durante a colonização ou infecção em tecidos hospedeiros (DONLAN; COSTERTON, 2002). Esse modo de crescimento, conhecido como biofilme, confere aos microrganismos células menos sensíveis aos antimicrobianos e às defesas do hospedeiro, promovendo proteção contra condições ambientais adversas e favorecendo a colonização/infecção persistente (HARDY *et al.*, 2017; ROSINI; MARGARIT, 2015). Consequentemente, a maioria dos agentes antimicrobianos disponíveis para o controle de infecções não apresenta atividade antibiofilme (VENKATESAN; PERUMAL; DOBLE, 2015).

Neste estudo, o composto **5** exibiu efeito inibitório significativo ( $p < 0,05$ ) em biofilmes maduros (24 horas) formados por todos os isolados de EGB (Figura 6). Houve redução significativa da atividade metabólica das células sésseis nos biofilmes maduros formados por *S. agalactiae* ATCC 13813, EGB 46, EGB 50, EGB 66 e EGB 114 em todas as concentrações testadas (7,9 µg/mL a 1000 µg/mL). Com exceção de EGB 72, EGB 80 e EGB 109, os valores de CIM e 2 x CIM diminuíram a viabilidade do biofilme maduro formado por todos os outros isolados de EGB. A maior média de porcentagem de inibição na CIM e 2 x CIM foi detectado para EGB 89 (90% e 88%, respectivamente) e as menores, para EGB 115

(29.5% e 53%) e EGB 121 (28.8% e 31%).



**Figura 6. Atividade do composto 5 em biofilmes maduros formados por *Streptococcus agalactiae*.** Atividade inibitória do composto 5 analisada pelo ensaio de redução do XTT sobre biofilmes maduros formados por isolados sensíveis (A) e resistentes (B) à eritromicina e clindamicina.

Outros autores também reportaram a atividade antibiofilme de derivados de tiourea, prevenindo a formação de biofilme em superfícies abióticas. Derivados de tiourea contendo o núcleo 3-amino-1*H*-1,2,4-triazol inibiram a formação de biofilme de *S. epidermidis* sensíveis e resistentes à meticilina em superfícies de poliestireno (STEFANSKA *et al.*, 2016). De maneira similar, o complexo de cobre II da 3,4-diclorofeniltiourea inibiu a formação de

biofilme de *S. aureus* e *S. epidermidis* na mesma superfície abiótica (BIELENICA *et al.*, 2018). Por outro lado, o cloridrato de (S) -3,4-diclorobenzilisotioureia foi capaz de inibir a formação de biofilme por *P. aeruginosa* em superfície de polietileno (BONEZ *et al.*, 2017).

#### 4. CONCLUSÃO

Este estudo reportou a síntese de uma série de benzoiltioureias (**1-29**) e seus derivados, benzoilguanidina (**30**) e benzoilureia (**31**) e os efeitos destes compostos sobre o crescimento de células planctônicas de diferentes espécies microbianas. Os resultados mostraram que os derivados de benzoiltioureias (**3, 5, 6, 16, 27-29**), benzoilguanidina (**30**) e benzoilureia (**31**) apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica contra células planctônicas de pelo menos uma espécie microbiana testada. Comparado com o efeito na viabilidade de células de mamíferos, a benzoiltioureia *N*- (butilcarbamoil) benzamida (composto **5**) exibiu atividade bacteriostática e antibiofilme seletiva frente às cepas de EGB, incluindo isolados clínicos resistentes à eritromicina e/ou clindamicina. Estes resultados sugerem que o composto **5** apresenta potencial como protótipo para o desenvolvimento de uma nova classe de agentes antimicrobianos contra o EGB.

#### REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E.P., CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, v. 146, n. 3713, p. 837, 1940.

AMINOV, R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. **Biochem Pharmacol**, 133, p. 4-19, 06 2017.

BIELENICA, A.; DRZEWIECKA-ANTONIK, A.; REJMAK, P.; STEFAŃSKA, J. *et al.* Synthesis, structural and antimicrobial studies of type II topoisomerase-targeted copper(II) complexes of 1,3-disubstituted thiourea ligands. **J Inorg Biochem**, 182, p. 61-70, 2018.

BIELENICA, A.; SANNA, G.; MADEDDU, S.; STRUGA, M. *et al.* New thiourea and 1,3-thiazolidin-4-one derivatives effective on the HIV-1 virus. **Chem Biol Drug Des**, 90, n. 5, p. 883-891, 2017.

BIELENICA, A.; STEFAŃSKA, J.; STEPIEŃ, K.; NAPIÓRKOWSKA, A. *et al.* Synthesis, cytotoxicity and antimicrobial activity of thiourea derivatives incorporating 3-(trifluoromethyl)phenyl moiety. **Eur J Med Chem**, 101, p. 111-125, 2015.

BONEZ, P. C. *et al.* Anti-biofilm activity of A22 ((S-3,4-dichlorobenzyl) isothiourea hydrochloride) against *Pseudomonas aeruginosa*: Influence on biofilm formation, motility and bioadhesion. **Microb Pathog.**, 111, p. 6-13, 2017.

BUDESINSKY, Z. *et al.* Synthetic antidiabetics. I. Derivatives of urea, thiourea, and guanidine. **Cesko-Slovenska Farmacie**, 8, p. 129-135, 1959.

BUKVIĆ KRAJACIĆ, M.; NOVAK, P.; DUMIĆ, M.; CINDRIĆ, M. *et al.* Novel ureas and thioureas of 15-membered azalides with antibacterial activity against key respiratory pathogens. **Eur J Med Chem**, 44, n. 9, p. 3459-3470, 2009.

BUKVIĆ KRAJAČIĆ, M.; DUMIĆ, M.; NOVAK, P.; CINDRIĆ, M. *et al.* Discovery of novel ureas and thioureas of 3-decladinosyl-3-hydroxy 15-membered azalides active against efflux-mediated resistant *Streptococcus pneumoniae*. **Bioorg Med Chem Lett**, 21, n. 2, p. 853-856, 2011.

BRITO, T.O. *et al.* Benzoylthioureas: design, synthesis and antimycobacterial evaluation. **Med Chem.**, v. 15, n. 1, 2018.

BRITO, T. O. *et al.* Design, syntheses and evaluation of benzoylthioureas as urease inhibitors of agricultural interest. **RSC Adv.**, v. 5, p. 44507 – 44515, 2015.

Centers for Disease Control and Prevention, (2013) Antibiotic Resistance Threats in the United States. Atlanta: CDC. 114p.

Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fourth Informational Supplement. Document M100, 27<sup>th</sup> ed., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA: CLSI, 2017.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: Approved guideline. Document M26-A, Clinical and Laboratory

Standards Institute, Wayne, PA, 1999.

CUNHA, S. *et al.* Antimicrobial activity and structural study of disubstituted Thiourea Derivatives. **Monatshefte fur Chemie**, v. 138, n. 5, p. 511–516, 2007.

CUNHA, S.; RODRIGUES Jr., M. T. The first bismuth(III)-catalyzed guanylation of thioureas. **Tetrahedron Letters**, v. 47, n. 39, p. 6955-6956, 2006.

DE SOUZA, A. S.; DOS SANTOS, D. B.; REY, L. C.; MEDEIROS, M. G. *et al.* Off-label use and harmful potential of drugs in a NICU in Brazil: A descriptive study. **BMC Pediatr**, 16, p. 13, 2016.

DOLAN, N.; GAVIN, D. P.; ESHWIK, A.; KAVANAGH, K. *et al.* Synthesis, antibacterial and anti-MRSA activity, in vivo toxicity and a structure-activity relationship study of a quinoline thiourea. **Bioorg Med Chem Lett**, 26, n. 2, p. 630-635, 2016.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis.**, v.8, n. 9, p. 881-90, 2002.

FLEISCHMANN-STRUZEK, C. *et al.* The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. **Lancet Respir Med**, v. 6, p. 223-230, 2018.

GHORAB, M. M. *et al.* Biological evaluation of some new N-(2,6-dimethoxypyrimidinyl) thioureido benzenesulfonamide derivatives as potential antimicrobial and anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 124, p. 299–310, 2016.

HARDY, L. *et al.* Bacterial biofilms in the vagina. **Res Microbiol.**, v. 168, n. 9-10, p. 1743 – 1750, 2017.

KIMURA, K. *et al.* Active screening of group B *streptococci* with reduced penicillin susceptibility and altered serotype distribution isolated from pregnant women in Kobe, Japan. **Jpn J Infect Dis.**, v. 66, n. 2, p. 158-160, 2013.

LAXMINARAYAN, R.; MATSOSO, P.; PANT, S.; BROWER, C. *et al.* Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. **Lancet**, 387, n. 10014, p. 168-175, 2016.

LU, A.; WANG, Z.; ZHOU, Z.; CHEN, J. *et al.* Application of "hydrogen bonding interaction" in new drug development: design, synthesis, antiviral activity, and SARs of

thiourea derivatives. **J Agric Food Chem**, 63, n. 5, p. 1378-1384, 2015.

MANNA, D., ROY, G., MUGESH, G. Antithyroid drugs and their analogues: synthesis, structure, and mechanism of action. **Acc. Chem. Res.**, v. 46, n. 11, p. 2706–2715, 2013.

MERTSCHENK, B.; KNOTT, A.; BAUER, W. Thiourea and Thiourea Derivatives. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. V: Weinheim, Alemanha, pp. 1–15, 2013.

MILES, A. A.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **J Hyg (Lond)**. v. 38, n. 6, p. 732-49, 1938.

MELIN, P. Neonatal group B streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies. **Clin Microbiol Infect.**, v. 17, n. 9, p. 1294-1303, 2011.

OTAGUIRI, E. S. *et al.* Commensal *Streptococcus agalactiae* isolated from patients seen at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil: capsular types, genotyping, antimicrobial susceptibility and virulence determinants. **BMC Microbiol.**, v. 21, n. 13, p. 297, 2013.

OTAGUIRI, E. S. *et al.* Antibacterial Combination of Oleoresin from *Copaifera multijuga* Hayne and Biogenic Silver Nanoparticles Towards *Streptococcus agalactiae*. **Curr Pharm Biotechnol.**, v. 18, n. 2, p. 177-190, 2017.

PATRAS, K. A.; NIZET, V. Group B streptococcal maternal colonization and neonatal disease: molecular mechanisms and preventative approaches. **Front Pediatr.**, v. 22, n. 6, p. 27, 2018.

ROSINI, R.; MARGARIT, I. Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. February, p. 2013–2016, 2015.

SCOTT, F. L. Studies in the pyrazole series. VIII. Aminolysis of some 3,5-dimethyl-1-acylguanylpurazoles. **J. Org. Chem.** v. 22, n. 12, p. 1568-1575, 1957.

SEALE, A.C. *et al.* Estimates of the burden of Group B Streptococcal disease worldwide for pregnant women, stillbirths, and children. **Clin Infect Dis.**, v. 6, n. 65, p. 200-219, 2017.

SHABAYEK, S.; SPELLERBERG, B. Group B streptococcal colonization, molecular characteristics, and epidemiology. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAR, p. 1–14, 2018.

SHAH, B. A.; PADBURY, J. F. Neonatal sepsis: an old problem with new insights. **Virulence**, 5, n. 1, p. 170-178, 2014.

SHANE, A. L.; SÁNCHEZ, P. J.; STOLL, B. J. Neonatal sepsis. **Lancet**, 390, n. 10104, p. 1770-1780, 2017.

SILVA, A.C.B. *et al.* Inadequate use of antibiotics and increase in neonatal sepsis caused by resistant bacteria related to health care assistance: a systematic review. **Braz J Infect Dis**, v. 22, n. 4, p. 328–337, 2018.

STEFANSKA, J.; NOWICKA, G.; STRUGA, M.; SZULCZYK, D. *et al.* Antimicrobial and anti-biofilm activity of thiourea derivatives incorporating a 2-aminothiazole scaffold. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, 63, n. 3, p. 225-236, 2015.

STEFAŃSKA, J.; STEPIEŃ, K.; BIELENICA, A.; WRZOSEK, M. *et al.* Antistaphylococcal Activity of Selected Thiourea Derivatives. **Pol J Microbiol**, 65, n. 4, p. 451-460, 2016.

STEFAŃSKA, J. *et al.* Antimicrobial and Anti-biofilm Activity of Thiourea Derivatives Bearing 3-amino-1H-1,2,4-triazole Scaffold. **Med Chem.**, v. 12, n. 5, p.478-488, 2016.

SCHRAG, S. J.; VERANI, J. R. Intrapartum antibiotic prophylaxis for the prevention of perinatal group B streptococcal disease: Experience in the United States and implications for a potential group B streptococcal vaccine. **Vaccine**, v. 31, n. S4, p. D20–D26, 2013.

SCHRAG, S. J. *et al.* Epidemiology of Invasive Early-Onset Neonatal Sepsis, 2005 to 2014. **Pediatrics.**, v. 138, n .6, p. e20162013, 2016.

TATAR, E. *et al.* Design, Synthesis, and Molecular Docking Studies of a Conjugated

Thiadiazole–Thiourea Scaffold as Antituberculosis Agents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 4, p. 502–515, 2016.

TEATERO, S. *et al.*. Serotype Distribution, Population Structure, and Antimicrobial Resistance of Group B Streptococcus Strains Recovered from Colonized Pregnant Women. **J Clin Microbiol.**, v. 55, n. 2, p. 412-422, 2017.

United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation (UNIGME), ‘Levels & Trends in Child Mortality: Report 2017, Estimates Developed by the UN Inter-agency Group for Child Mortality Estimation’, United Nations Children’s Fund, New York, 2017. Available from: [https://www.unicef.org/publications/index\\_101071.html](https://www.unicef.org/publications/index_101071.html).

VERANI, J.R.; MCGEE, L.; SCHRAG, S.J. Prevention of perinatal group B streptococcal disease—revised guidelines from CDC, 2010” Morbidity and Mortality Weekly Report, vol. 59, no. RR- 10, pp. 1–36, 2010. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr5910.pdf>

VENKATESAN, N.; PERUMAL, G.; DOBLE, M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. **Future Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 1743–1750, 2015.

VIANA, G. M. *et al.* Antileishmanial Thioureas: Synthesis, Biological Activity and *in Silico* Evaluations of New Promising Derivatives. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 65, n. 10, p. 911–919, 2017.

VOLLER, S. M. B.; MYERS, P. J. Neonatal Sepsis. **Clinical Pediatric Emergency Medicine**, v. 17, n. 2, p. 129–133, 2016.

ZADE, C. M. *et al.* Design and development of novel insect growth regulators: synthesis, characterization and effect of benzoyl thymyl thioureas and ureas on total haemocyte count of *Dysdercus koenigii*. **J Environ Sci Health B.**, v. 47, n. 2, p.136-143, 2012.

## 6 CONCLUSÃO

- Os resultados da triagem inicial mostraram que, entre as 26 novas moléculas sintetizadas, as benzoiltioureas (**3**, **5**, **6**, **16**, **27-29**), a guanidina (**30**) e a ureia (**31**) apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica (CIM < 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) contra células planctônicas de pelo menos uma espécie microbiana testada.
- A partir do estudo da relação estrutura-atividade da série química obtida, foi possível observar que a presença de um grupo aromático ligado ao nitrogênio da tiourea não apresentou efeito positivo sobre a atividade antimicrobiana dessa classe de compostos. Entre os derivados alifáticos, o composto **5** (*N*-(butilcarbamoil) benzamida) mostrou melhor potencial antimicrobiano para *S. agalactiae* ATCC 13813, sugerindo, inclusive, que o grupamento tiourea pode ser considerado um grupo farmacóforo. Além disso, a maioria dos compostos não apresentou atividade contra as cepas de bactérias Gram negativas testadas. Com relação à atividade antifúngica, apenas as benzoiltioureas **3** e **5**, e a guanidina **30** foram consideradas ativas contra as espécies de leveduras.
- O composto **5** apresentou toxicidade seletiva para as cepas de EGB em comparação com seu efeito sobre as células de mamíferos, HeLa e eritrócitos humanos.
- O composto **5** exibiu efeito bacteriostático sobre as células planctônicas e também atividade antibiofilme sobre as cepas de EGB, incluindo isolados clínicos resistentes à eritromicina e clindamicina.
- Estes resultados sugerem que a benzoiltiourea **5** apresenta potencial como protótipo para o desenvolvimento de uma nova classe de agentes antimicrobianos contra EGB, com toxicidade seletiva, podendo ser utilizada na preparação de formulações tópicas aplicadas na profilaxia da colonização vaginal materna.