

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

Sara de Lima Marion

**REDIRECIONAMENTO DE DEXAMETASONA E DICLOFENACO  
E EFEITO SINÉRGICO COM ÁCIDO NALIDÍXICO, CIPROFLOXACINO  
E VANCOMICINA FRENTE A *ENTEROCOCCUS* spp.**

Santa Maria, RS  
2022

**Sara de Lima Marion**

**REDIRECIONAMENTO DE DEXAMETASONA E DICLOFENACO E EFEITO SINÉRGICO COM ÁCIDO NALIDÍXICO, CIPROFLOXACINO E VANCOMICINA FRENTE A *ENTEROCOCCUS* spp.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêutica**.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosmari Hörner

Santa Maria, RS  
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Marion, Sara

REDIRECIONAMENTO DE DEXAMETASONA E DICLOFENACO E EFEITO SINÉRGICO COM ÁCIDO NALIDÍXICO, CIPROFLOXACINO E VANCOMICINA FRENTE A ENTEROCOCCUS spp. / Sara Marion.- 2022.

45 f.; 30 cm

Orientador: Rosmari Horner

Coorientador: Aline Joana Rolinha Wohlmuth Alves dos Santos

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2022

1. Atividade antibacteriana 2. Atividade antibacteriana 3. Dexametasona 4. Diclofenaco 5. Sinergismo I. Horner, Rosmari II. Rolinha Wohlmuth Alves dos Santos, Aline Joana III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

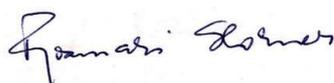
Declaro, SARA MARION, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

**Sara de Lima Marion**

**REDIRECIONAMENTO DE DEXAMETASONA E DICLOFENACO E EFEITO  
SINÉRGICO COM ÁCIDO NALIDÍXICO, CIPROFLOXACINO E  
VANCOMICINA FRENTE A *ENTEROCOCCUS* spp.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêutica.

Aprovada em 23 de março de 2022.



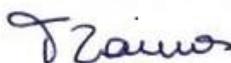
---

**Rosmari Hörner, Doutora (UFSM)  
(Orientadora)  
(Videoconferencia)**



---

**Aline Joana Rolinha Wohlmuth Alves dos Santos, Doutora  
(UFPel)(Videoconferencia)**



---

**Daniela Fernandes Ramos, Doutora  
(FURG)(Videoconferencia)**

Santa Maria, RS 2022

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde, sabedoria e persistência para seguir em frente, por sempre estar comigo, me mostrando que seus planos são sempre os maiores e melhores.

Aos meus pais, Mirian, João Miguel e paidrasto Fabiano, vó Ari e vó Ana, agradeço por toda ajuda, por abdicarem muitas vezes dos seus desejos para realizarem os meus sonhos, pelo incentivo, compreensão e apoio. Aos meus irmãos Francisco e Antônio por serem um dos motivos de eu querer sempre ser melhor.

A minha orientadora, Rosmari Hörner, um agradecimento em especial. Obrigada por abrir as portas do Lab para mim, por todas as oportunidades e incentivos, pela confiança e por toda a sabedoria concedida. Obrigada por estar presente em todos os momentos, até quando a pandemia nos restringia, desde as reuniões no meet até os momentos de experimento em bancada, onde a senhora não mediu esforços para me ajudar. Obrigada mais uma vez por ser compreensiva, humana e incentivar o meu crescimento.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bacteriologia, pelo companheirismo, ensinamentos, auxílios, incentivos e amizade. Em especial, minha colega e amiga Marissa, por me ajudar em todos os momentos, por compartilhar frustrações e sonhos e por todo o companheirismo. Sempre serei grata pela tua amizade.

Ao meu namorado Juliano e minha filha de quatro patas Enola Maria, pela compreensão, amor, carinho, incentivo, força e companheirismo.

A Universidade Federal de Santa Maria, pela possibilidade de realizar diversos sonhos ao longo destes anos.

Ao Hospital Universitário de Santa Maria e aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas, que possibilitaram a realização deste trabalho através da cedência das amostras clínicas.

A CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria, pelo suporte financeiro e pela oportunidade de desenvolver e concretizar este estudo.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma foram essenciais para a realização deste trabalho.

## RESUMO

### REDIRECIONAMENTO DE DEXAMETASONA E DICLOFENACO E EFEITO SINÉRGICO COM ÁCIDO NALIDÍXICO, CIPROFLOXACINO E VANCOMICINA FRENTE A *ENTEROCOCCUS* spp.

AUTORA: Sara de Lima Marion  
ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup>. Rosmari Hörner

A disseminação de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos (MDR) tem comprometido o arsenal terapêutico disponível. Assim esses patógenos MDR tornaram-se um problema de saúde públicas acarretando altas taxas de morbimortalidade. Como forma de incentivar a busca de novos medicamentos eficazes, a Organização Mundial da Saúde publicou um relatório evidenciando a redução da descoberta de novos antibióticos. Nele o patógeno *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina, comum em infecções hospitalares, foi considerado agente de prioridade alta, necessitando urgentemente do desenvolvimento de novos fármacos ativos. Dessa maneira, a comunidade científica vem buscando por estratégias na identificação de novos antibióticos efetivos. O reposicionamento de medicamentos surgiu como alternativa promissora uma vez que ele é considerado como processo que visa a reutilização de fármacos em doenças que não a de origem da sua indicação. Ele ganhou a atenção da comunidade científica pelas vantagens em comparação com o método tradicional de desenvolvimento de substâncias ativas: redução de tempo e custos no processo. Por isso no presente estudo objetivou-se analisar a atividade antibacteriana dos fármacos anti-inflamatórios dexametasona e diclofenaco e a interação sinérgica com os antibióticos ácido nalidíxico, ciprofloxacino e vancomicina frente a cepas bacterianas de isolados clínicos de *Enterococcus faecium* e *faecalis* e cepas padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC). Para avaliar a atividade antibacteriana dos fármacos foi realizado a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A interação com os antibacterianos foi avaliada pelo método *checkerboard* e calculado o índice de concentração inibitória fracionada (FICI). Quando testada isoladamente, a dexametasona apresentou CIM que variou em 512 e 1024  $\mu\text{g mL}^{-1}$  frente aos isolados clínicos e cepas ATCC. O diclofenaco também ficou nessa variação, mas para as duas cepas ATCC a CIM foi de 2048  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Esses dois medicamentos apresentaram, de modo geral, CIM maior aos dos antibióticos sozinhos. Porém, quando utilizados em conjunto com cada um dos antibióticos, apresentaram reduções relevantes na CIM de ambos os medicamentos em conjunto. A dexametasona reduziu em até 2048 vezes a CIM quando combinada com qualquer um dos três antibióticos. O diclofenaco reduziu em até 2048 vezes a CIM quando combinado com a vancomicina e em até 1024 vezes com ácido nalidíxico ou ciprofloxacino. A concentração da CIM do ácido nalidíxico e vancomicina quando utilizados em combinação com dexametasona ou diclofenaco reduziu em até 64 vezes a sua concentração de CIM. Esses dois anti-inflamatórios, quando combinados com ciprofloxacino, a concentração do antibiótico chegou a uma redução de até 128 vezes. Os resultados obtidos nos permitem sugerir que os dois anti-inflamatórios deste estudo apresentam atividade promissora no reposicionamento frente às bactérias Gram-positivas MDR do gênero *Enterococcus*.

**Palavras chaves:** Atividade antibacteriana. Reposicionamento de drogas. Dexametasona. Diclofenaco. Sinergismo.

## ABSTRACT

### **REDIRECTION OF DEXAMETHASONE AND DICLOFENAC AND SYNERGISTIC EFFECT WITH NALIDIXIC ACID, CIPROFLOXACIN AND AGAINST FRONT OF *ENTEROCOCCUS* spp.**

AUTHOR: Sara de Lima Marion

ADVISER: Dr<sup>a</sup>. Rosmari Hörner

The spread of multi-antibiotic resistant bacteria (MDR) has compromised the available therapeutic arsenal. Thus these MDR pathogens have become a public health problem resulting in high morbidity and mortality rates. As a way to encourage the search for new effective drugs, World Health Organization published a report showing the reduction of the discovery of new antibiotics. In it the pathogen vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*, common in hospital infections, was considered a high priority agent, urgently needing the development of new active drugs. Thus, the scientific community has been looking for strategies in the identification of new effective antibiotics. The repositioning of medicines has emerged as a promising alternative since it is considered as a process aimed at the reuse of drugs diseases other than that of origin of their indication. It has gained the attention of the scientific community for the advantages compared to the traditional method of developing active substances: reduction of time and costs in the process. Therefore, the present study aimed, through the manuscript, analyze the antibacterial activity of drugs anti-inflammatory dexamethasone and diclofenac and possible synergistic interaction with standard: nalidixic acid, ciprofloxacin and vancomycin against bacterial strains of clinical isolates of *Enterococcus faecium* and *faecalis* and American Type Culture Collection (ATCC) standard strains. To evaluate the antibacterial activity of the drugs, the minimum inhibitory concentration (MIC) was performed. The interaction with antibacterials was evaluated by the checkerboard method and the fractional inhibitory concentration index (FICI) was calculated to define synergism. When tested alone, dexamethasone presented MIC that varied in 512 and 1024  $\mu\text{g mL}^{-1}$  compared to clinical isolates and ATCC strains. Diclofenac also obtained this variation, however for the two strains ATCC showed a MIC of 2048  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . These drugs are candidates for redirection despite generally presenting higher MIC compared to antibiotics alone, when used in conjunction with each of the antibiotics, they presented relevant reductions in the MIC of both drugs together. Dexamethasone reduced the MIC by up to 2048 times when combined with any of the three antibiotics, diclofenac reduced the MIC by up to 2048 times if used in conjunction with vancomycin and up to 1024 times in combination with nalidixic acid or ciprofloxacin. The concentration of MIC of nalidixic acid and vancomycin when used in combination with dexamethasone or diclofenac reduced its concentration of MIC by up to 64 times. When these drugs tests were used combined with ciprofloxacin, the concentration of the antibiotic was reduced by up to 128 times. Thus, the use of non-antibiotics with antimicrobials aiming at synergism is an alternative for the treatment of serious infections due to the advantages presented. However, further studies are still needed to elucidate the mechanisms of action of these drugs as well as in vivo studies.

**Keywords:** Antibacterial activity; Repositioning; Dexamethasone; Diclofenac; Synergism

## **LISTA DE FIGURAS**

### **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **2.3 DEXAMETASONA**

Figura 1 - Estrutura molecular do medicamento dexametasona.....16

#### **2.4 DICLOFENACO**

Figura 2 - Estrutura molecular do medicamento diclofenaco.....18

## LISTA DE TABELAS

### 3. PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

#### 3.1 MANUSCRITO

Tabela 1 – Características de resistência aos antimicrobianos (método de automação VITEK) dos isolados clínicos coletados em janeiro de 2019 a janeiro de 2020 e cepas padrão utilizadas neste estudo.....	33
Tabela 2 – Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) de ácido nalidíxico, dexametasona e diclofenaco sozinhos, CIM da combinação (teste <i>checkboard</i> ) entre ácido nalidíxico/dexametasona e ácido nalidíxico/diclofenaco frente a isolados clínicos multirresistentes (MDR) e cepas ATCC, índice de concentração inibitória fracionada (FICI) e interação.....	34
Tabela 3 – Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) de ciprofloxacino, dexametasona e diclofenaco sozinhos, CIM da combinação (teste <i>checkboard</i> ) entre ciprofloxacino/dexametasona e ciprofloxacino/diclofenaco frente a isolados clínicos multirresistentes (MDR) e cepas ATCC, índice de concentração inibitória fracionada (FICI) e interação.....	35
Tabela 4 – Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) de vancomicina, dexametasona e diclofenaco sozinhos, CIM da combinação (teste <i>checkboard</i> ) entre vancomicina/dexametasona e vancomicina/diclofenaco frente a isolados clínicos multirresistentes (MDR) e cepas ATCC, índice de concentração inibitória fracionada (FICI) e interação.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
AINES	Anti-inflamatório não esteroideal
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FICI	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
MDR	Multidroga Resistente
mRNA	RNA mensageiro
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
VRE	Resistente a vancomicina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1	JUSTIFICATIVA.....	10
1.2	OBJETIVOS.....	13
<b>1.2.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
2.1	RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	13
2.2	REDIRECIONAMENTO E COMBINAÇÃO DE FARMÁCOS.....	15
2.4	DEXAMETASONA.....	17
2.5	DICLOFENACO.....	18
<b>3</b>	<b>PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA.....</b>	<b>20</b>
3.1	MANUSCRITO 1 – Avaliação da atividade antibacteriana de dexametasona e diclofenaco sódico e efeito sinérgico com antibióticos frente a isolados clínicos de <i>Enterococcus</i> spp.....	20
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>39</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O descobrimento dos antibacterianos trouxe para a medicina uma nova perspectiva à saúde, instaurando a “era dos antibióticos”, quando se tornou possível tratar doenças infecciosas que, até então, poderiam ser fatais (DAVIES e DAVIES, 2010). Entretanto, com o uso indiscriminado destes medicamentos, a eficácia se tornou incerta, devido a uma disseminação de patógenos resistentes, entre esses as bactérias resistentes a múltiplas drogas (MDR) (SANTOS, LA ROCCA, HÖRNER, 2016). As bactérias MDR ameaçam os tratamentos farmacológicos disponíveis no mercado farmacêutico acarretando falhas na farmacoterapia (EARS-Net, 2017), aumentando o tempo de hospitalização e, conseqüentemente, os custos e taxas de morbidade (DAVIES e DAVIES, 2010; O’NEIL, 2014).

Frente a esta situação, a *World Health Organization* publicou um relatório em 2017 onde evidencia que a descoberta e o desenvolvimento de novos antibióticos diminuíram consideravelmente, não acompanhando a mesma velocidade em que a resistência bacteriana tem avançado (WHO, 2017). Sem a ação imediata para descobrir e desenvolver novos antibióticos, projeta-se que as mortes atribuíveis a infecções resistentes chegarão a 10 milhões por ano até 2050 (O’NEILL, 2014). Assim, prevê-se a era pós antibiótica, de onde emerge a necessidade por novos medicamentos que apresentem ação antibacteriana satisfatória (HADERA et al., 2018; KALAIVANI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015).

O redirecionamento ou reposicionamento de fármacos, surgiu como alternativa mais “rápida” a essa busca (ZHENG, SUN e SIMEONOV, 2018). Essa prática é definida como a utilização de medicamentos já aprovados e bem estabelecidos na clínica para o tratamento de doenças diferentes da sua indicação de origem (ASHBURN e THOR, 2004; SERAFIN e HÖRNER, 2018). Possui vantagens como administração mais segura nos pacientes devido a sua toxicidade já conhecida (HADERA et al., 2018; SERAFIN e HÖRNER, 2018), e tem um menor custo se comparado com a descoberta de novas drogas pelo método tradicional (MEHNDIRATTA et al., 2016). Esse processo recebe aprovação pelas agências reguladoras, como a *Food and Drug Administration* (FDA), o que não ocorre com o uso *off label* que refere-se a administração sem aprovação e indicação pela bula (WHO, 2014; JIN e WONG, 2014).

Uma segunda estratégia no tratamento frente a infecções bacterianas, é o emprego combinado de dois ou mais fármacos que apresentem efeito sinérgico. Essa combinação tende a aumentar o espectro dos antibióticos e reduzir o desenvolvimento de resistência (ZHENG,

SUN e SIMEONOV, 2018). Estima-se que assim as bactérias MDR podem ser sensibilizadas novamente, combinando antibióticos com não-antibióticos (CHAN et al., 2017).

Medicamentos com efeitos anti-inflamatórios são utilizados para uma variedade de doenças. Os anti-inflamatórios não esteroides (AINES) possuem propriedades de reduzir a inflamação, dor e febre, mas também vêm sendo relatados como candidatos potenciais para o redirecionamento pelo seu efeito sinérgico com antibióticos (CHAN et al., 2017; YIN et al., 2014; ANNADURAI et al., 1998). O diclofenaco sódico já teve sua atividade relatada frente a bactérias Gram-positivas (ALEM, et al., 2004; MAZUMDAR, et al., 2019; RIORDAN, et al., 2011; SALEM, et al., 2013). Mas estudos disponíveis são limitados quanto ao mecanismo de ação pelo qual atuam e de seus efeitos combinados com antibióticos (CHAN et al., 2017; YIN et al., 2014).

Os corticoides são outra classe de medicamentos com atividade anti-inflamatória utilizada para diversas doenças, entre elas, algumas doenças infecciosas (ROSEN, 2019). Dentre os corticoides, a dexametasona é um fármaco que tem sido alvo de estudo para o redirecionamento de doenças emergentes como a infecção por SARS-CoV-2 (VOHRA, 2021) e já foi descrita na literatura com propriedades microbicidas contra *Streptococcus milleri*, *Aspergillus flavus* e *fumigatus* (NEHER, 2008).

Assim, esse estudo apresentou o redirecionamento de medicamentos não-antibióticos para o tratamento de doenças bacterianas causadas por *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina, bem como as principais vantagens desse método alternativo na descoberta de drogas. Além disso avaliou-se a interação desses medicamentos, dexametasona e diclofenaco, com antibióticos padrões, ácido nalidíxico, ciprofloxacino e vancomicina e os benefícios dessa utilização.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Dessa forma, em razão do aumento das bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos aliados à dificuldade e fraco interesse da indústria farmacêutica na produção de novos antibióticos efetivos, necessita-se urgentemente de abordagens alternativas para esta problemática de saúde pública global. Sendo assim, uma alternativa é a utilização de medicamentos redirecionados como os AINEs e corticoides. Alguns desses não-antibióticos já demonstraram atividade antibacteriana em estudos anteriores por diminuírem principalmente a produção de mediadores pró inflamatórios. Supõe-se que eles possam ter ações terapêuticas contra bactérias MDR (PRADO, et al, 2010; ALEM, et al 2004; OLIVEIRA, et al 2019).

Dessa forma, o presente estudo composto pela avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* da dexametasona e diclofenaco sódico injetáveis e a avaliação de suas interações com antibacterianos ácido nalidíxico, ciprofloxacino e vancomicina frente a cepas bacterianas de isolados clínicos de MDR de *Enterococcus faecium* e *faecalis* e cepas padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC).

## 1.2 OBJETIVO

### 1.2.1 Objetivo geral

Determinar a atividade antibacteriana *in vitro* de medicamentos anti-inflamatórios candidatos ao redirecionamento e o efeito sinérgico com os antimicrobianos ácido nalidíxico, ciprofloxacino e vancomicina.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a atividade antibacteriana da dexametasona e diclofenaco de sódio, frente a cepas bacterianas padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos de MDR de *Enterococcus faecium* e *faecalis* provenientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM);
- b) Avaliar o efeito sinérgico entre dexametasona e diclofenaco sódico com antibióticos, tais como ácido nalidíxico, ciprofloxacino e vancomicina frente as cepas descritas anteriormente.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA

No século XX, iniciou-se uma busca por tratamentos eficazes no combate às infecções. Assim, 50 anos mais tarde introduziam-se no mercado os antibióticos, com a proposta de cura das doenças infecciosas (DAVIES e DAVIES, 2010). Entretanto, essa classe de medicamentos demonstrou ser altamente suscetível à perda da eficácia e o desenvolvimento dessa resistência vêm comprometendo a terapêutica, uma vez que é provável

que se desenvolva resistência a todo e qualquer tipo de antibiótico (HUTCHINGS, TRUMAN e WILKINSON, 2019).

Algumas das principais razões do estabelecimento dessa resistência são as mutações em microrganismos e a pressão seletiva (NADEEM, et al., 2020). Doses acima do necessário e o uso indiscriminado também favorecem sua ocorrência (AKOVA, 2016). Dessa forma, os clones resistentes resultantes são disseminados em todo o mundo. Fato que ocorre rapidamente, através da transmissão genética interespecífica, deficiência em saneamento básico nas comunidades e falta de protocolos de esterilização em hospitais (NADEEM, et al., 2020).

Segundo os relatórios anuais do *European Center for Disease Prevention and Control* (2017) os patógenos resistentes são responsáveis por uma alta taxa de infecções, acarretando falhas nas terapias medicamentosas disponíveis no mercado farmacêutico (EARS-Net, 2017). Isso gera um aumento nos custos de tratamento e maiores taxas de mortalidade (AKOVA, 2016). Por isso, em 2017, a Organização Mundial da Saúde classificou os patógenos em níveis de prioridade para o desenvolvimento de novos antibióticos, entre esses, o *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina, considerado agente de prioridade alta (WHO, 2017).

O gênero *Enterococcus* spp. é constituído por patógenos Gram-positivos oportunistas comuns em infecções hospitalares, sendo que suas principais espécies causadoras de doenças humanas são *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. As infecções mais comuns causadas por eles são bacteremia, endocardite, infecções do trato urinário, infecções de feridas cirúrgicas, infecções intra-abdominais e intrapélvicas, tratadas com a combinação de um aminoglicosídeo e ampicilina ou vancomicina que atuam na parede celular (RAZA, T., et al., 2018).

Esse gênero, há mais de 30 anos, desenvolveu resistência à vancomicina (VRE), e nas duas últimas décadas as infecções atribuíveis ao VRE tornaram-se mais alarmantes devido a sua alta taxa de mortalidade (BEGANOVIC, et al., 2018; RAZA, T., et al., 2018). Devido ao tratamento limitado que se encontra disponível para o combate das infecções ocasionadas por VRE, há necessidade urgente de novas estratégias que combatam a virulência desses patógenos.

Atualmente o cenário pandêmico ocasionado pela Covid-19 pode contribuir para maiores desafios no tratamento de doenças infecciosas por bactérias resistentes a múltiplas drogas. A utilização de antimicrobianos aumentou consideravelmente, assim como seu uso inadequado, , dessa forma isso pode estar alimentando o surgimento de resistência

antimicrobiana. Estudos sugerem que pacientes hospitalizados devido à infecção por Covid-19 podem sofrer coinfeção por bactérias MDR, entretanto a maior parte dos pacientes são tratados com antimicrobianos, mesmo quando não ocorre essa coinfeção (RANA, et al., 2021; COX, et al., 2020). Em conjunto, a pandemia tem afetado negativamente as pesquisas para o desenvolvimento de antimicrobianos para doenças infecciosas (UKUHOR, 2021).

## 2.2 REDIRECIONAMENTO E COMBINAÇÃO DE FÁRMACOS

O desenvolvimento de um novo composto que tenha sucesso na terapia e introdução na clínica não é um processo simples. A indústria farmacêutica tem enfrentado alguns desafios para que isso ocorra, tais como tempo elevado para realização de todos os estudos e testes, gerando altas despesas e, ainda assim, com risco de obter altas taxas de reprovação (YADAV e TALWAR, 2019). Dessa forma, as empresas farmacêuticas não conseguem manter o equilíbrio entre a produção de fármacos e o aumento dos custos em pesquisa e desenvolvimento (LANDERS, 2004).

Logo, os pesquisadores viram a necessidade de buscar por alternativas mais rápidas e de menor custo (OTTO et al., 2019). O redirecionamento ou reposicionamento de fármacos foi descrito por Ashburn e Thor, em 2004, pela primeira vez. Esse termo foi definido como o processo de encontrar uma nova indicação a um fármaco já aprovado clinicamente ou para fármacos que tiveram suas farmacoterapias abandonadas (ASHBURN e THOR, 2004).

Desde então, o reposicionamento se tornou uma estratégia inovadora, com segurança e eficácia já comprovadas, sendo que faz uso de drogas já aprovadas pelas instituições que regulamentam os medicamentos (MEHNDIRATTA, et al., 2016). Esse método necessita de investimentos de menores valores: em torno de 8,4 milhões de dólares no reposicionamento contra 41,3 milhões de dólares no desenvolvimento tradicional de novas drogas (ASHBURN e THOR, 2004). Um dos motivos desse menor custo é que enquanto as novas drogas precisam de ensaios clínicos de toxicologia e segurança, algumas drogas redirecionadas necessitam passar apenas por ensaio de eficácia para a nova indicação. Isso ocorre devido ao fármaco já ter suas características previamente conhecidas como sua estrutura química, estabilidade, dados de síntese e fabricação, parâmetros farmacocinéticos, biodisponibilidade, segurança e toxicologia, uma vez que ela já é utilizada ou já foi uma terapia clínica (GAJDÁCS e SPENGLER, 2019; NOSENGO, 2016; HADERA et al., 2018; SERAFIN e HÖRNER, 2018).

Outro fato importante é que existe uma taxa relevante de fracasso no desenvolvimento tradicional de novos fármacos; cerca de 30% deles não passam nos testes, não podendo ser

utilizados na clínica (JIN e WONG, 2014). Dessa maneira, o reposicionamento garante tempo e economia de capital (MEHNDIRATTA, et al., 2016). Assim, o redirecionamento pode oferecer opções mais rápidas de tratamento (JIN e WONG, 2014).

Há vários estudos de drogas redirecionadas que exibiram atividade antimicrobiana. Entre eles estão drogas pertencentes a diferentes categorias farmacológicas, como anti-histamínicos, anti-hipertensivos, antipsicóticos e agentes anti-inflamatórios (CHAN et al., 2017; MUNOZ-BELLIDO; MUNOZ-CRIADO; GARCIA-RODRIGUES, 2000; PALIT; MANDAL; MANDAL, 2013; RAMPELOTTO et al., 2018; SERAFIN e HÖRNER, 2018). Além disso, os efeitos sinérgicos entre não-antibióticos combinados com antibióticos podem ter muito valor na clínica, pois além de diminuir a dose a ser utilizada, induzindo menor geração de resistência (KAUR, 2016; ZHENG, SUN e SIMEONOV, 2018).

A terapia através da combinação de fármacos é bem utilizada no tratamento de doenças infecciosas (GONZÁLES et al., 2015). Na década de 90 foi desenvolvida a combinação de drogas para a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e hoje são utilizados coquetéis com três a quatro drogas, sendo que o FDA também aprovou doses fixas de combinações (ABRAMOWICZ, et al., 2015). Já no cenário antimicrobiano, em 2015, o FDA aprovou a utilização do avibactam e ceftazidima como combinação no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes à ceftazidima. (ZHANEL, et al., 2013). Desde então, pesquisadores estudam a combinação sinérgica entre um fármaco antibacteriano padrão e um medicamento não-antibiótico, no combate de microrganismos MDR (SERAFIN et al., 2020; FOLETTO et al., 2020; FOLETTO et al., 2021; ROSA, 2021).

As combinações sinérgicas proporcionam algumas vantagens aos tratamentos. Entre elas está a redução das concentrações necessárias de cada fármaco na combinação. Isso possibilita a aplicação clínica de medicamentos que são insuficientes como únicos ativos nos tratamentos (CSERMELY, et al., 2005). Essas combinações também são eficazes quando ocorre o efeito sinérgico por diferentes mecanismos de ação, como por exemplo, a combinação de estreptomicina-penicilina (PLOTZ et al., 1962). Nesse âmbito de antimicrobianos, as combinações podem aumentar o espectro de antibióticos, sendo eficazes em infecções graves, onde o tratamento é crítico (ZILBERBERG et al., 2014). Além disso, elas também podem reduzir o desenvolvimento de resistência aos antibióticos (ZHENG, SUN e SIMEONOV, 2018).

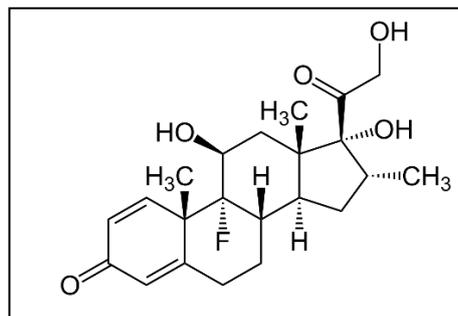
Atualmente tanto o redirecionamento e/ou combinação de drogas tornou-se uma opção útil para superar o problema da fraca atividade de fármacos quando utilizados individualmente, como também, no tratamento de infecções graves (EJIM, et al., 2011;

CHAN, et al., 2017; ZHENG, et al., 2018). Algumas combinações de fármacos não-antibióticos com antibióticos têm demonstrado um aumento da atividade antimicrobiana *in vitro*, como por exemplo, nos estudos de Chan e colaboradores (2017) e Munoz-Bellido, Munoz-Criado e García-Rodrigues (2000), Rampelotto e colaboradores (2018) e Serafin e colaboradores (2020). Portanto a terapia de combinação de drogas com um efeito sinérgico pode aumentar as taxas de sucesso do reposicionamento de drogas (WEI, 2017).

### 2.3 DEXAMETASONA

A dexametasona é fármaco da classe dos medicamentos corticoides. Ela é um potente anti-inflamatório, imunomodulador e possui propriedades antineoplásicas. Utilizada no tratamento de várias condições como distúrbios dermatológicos, gastrointestinais e hematológicos/oncológicos; algumas doenças infecciosas; transplante de órgão e doença renal, respiratória e reumatológica. Em alguns casos, como exacerbações agudas de asma, corticoides são utilizados de forma oral num curto intervalo de tempo (RICE, J. B., 2017; ROSEN, 2019; RHEN e CIDLOWSKI, 2005). Na Figura 1 pode-se verificar a estrutura molecular da dexametasona.

Figura 1 – Estrutura molecular do medicamento dexametasona (nome IUPAC: (8S, 9R, 10S, 11S, 13S, 14S, 16R,17R)-9-fluoro-11,17-dihidroxi-17-(2-hidroxiacetil)-10,13,16-trimetil-6,7,8,11,12,14,15,16-octa-hidrociclopenta[a]fenantren-3-ona)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Esse fármaco encontra-se comercialmente disponível na forma oral como comprimido e elixir, também como solução nasal, creme dermatológico, colírio e injetável na forma de fosfato dissódico de dexametasona. Possui meia vida longa e influencia a distribuição de células sanguíneas por meio da inibição da expressão de citocinas (REMMELTS, et al., 2012; CROUZET, E, et al., 2018), reduz de maneira drástica o número de linfócitos T, eleva de

maneira acentuada o número de neutrófilos, além de causar uma redução acentuada dos linfócitos B, células natural killer e monócitos (DHABHAR, et al., 1996).

No tratamento de processo inflamatório, age por dois mecanismos, um de ação lenta que envolve a difusão de moléculas de corticosteroides através da membrana celular e ligação aos receptores citosólicos GR- $\alpha$  e GR- $\beta$ , que transportam o fármaco para o núcleo, onde ocorre a ligação às seqüências de ácido desoxirribonucleico (DNA) específicas promovendo a expressão de RNA mensageiro (mRNA) e síntese subsequente de proteínas anti-inflamatórias (AL-DAJANI, 2017; AHMED et al., 2018; ALMEIDA, et al., 2018; TROIANO, G., 2018). Ela também é responsável por se ligar a receptores de membrana celular, resultando na formação de segundos mensageiros, como adenosina monofosfato cíclica (cAMP) ou proteína cinases, que inibem a expressão de fosfolipase-A2 e enzimas COX-2 (KOÇER, et al. 2014; AFKAN, et al. 2018; ROCHA-NETO, 2017).

Atualmente a dexametasona tem sido alvo de estudo para redirecionamento frente a doenças emergentes como a infecção pelo vírus SARS-CoV-2 (VOHRA, 2021) e já foi descrita na literatura com propriedades microbicidas frente a fungos e bactérias (NEHER, 2008). Devido a ser comumente usada em conjunto com antibióticos no tratamento de infecções, Neher et al., demonstrou essa atividade bactericida da dexametasona frente a *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* e *Streptococcus milleri* através da determinação do tempo de morte desses agentes (NEHER, et al., 2008). Segundo esses autores, é provável que esses efeitos tenham contribuído para os resultados positivos dos corticosteroides no tratamento da otite externa, em estudos anteriores (EMGARD e HELLSTRO, 2005; EMGARD, P.; HELLSTRO).

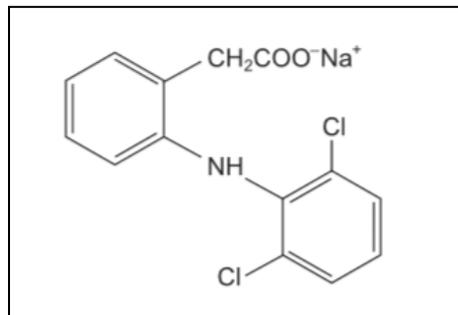
O mecanismo de ação pelo qual ela atua como microbicida não foi elucidado, entretanto acredita-se que o corticosteroide se liga a um alvo específico assim como outro antibiótico. A localização desse alvo não foi especificada até o momento, mas autores sugerem que possa ser na parede celular ou membrana citoplasmática, bem como na maquinaria de transcrição e tradução dos microrganismos (NEHER, et al., 2008). Por esses motivos e, por possuir grande eficácia como anti-inflamatório, a dexametasona é considerada um potencial fármaco para o redirecionamento.

## 2.4 DICLOFENACO

O diclofenaco é um medicamento da classe dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) que pertence à classe do ácido fenilacético e tem sua utilização no tratamento da dor

desde 1970 (ALTMAN et al., 2015). Em 2013, foi considerado por McGettigan e colaboradores como o AINE mais prescrito no mundo, uma vez que em 2012 nos EUA ele obteve mais de 10 milhões de prescrições (MCGETTIGAN; HENRY, 2013). O diclofenaco encontra-se disponível comercialmente como comprimidos revestidos, solução tópica e solução e pomada oftálmicas, na forma de dois sais, sódio e potássio, onde o sal de sódio é o mais prescrito devido à sua maior solubilidade (ALTMAN et al., 2015). Na Figura 2 pode-se verificar a estrutura molecular do diclofenaco.

Figura 1 – Estrutura molecular do medicamento diclofenaco sódico (nome IUPAC: ácido 2-[2-(2,6dicloroanilino)fenil]acético)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Igualmente aos outros AINEs, o diclofenaco exerce seus efeitos através da inibição da síntese de prostaglandinas pelo bloqueio da ciclo-oxigenase-1 (COX-1) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2). Entretanto ele inibe a enzima COX- 2 com maior potência do que COX-1 (ALTMAN et al., 2015). Seus efeitos adversos são problemas gastrointestinais, renais, cardiovasculares, como ataque cardíaco e acidente vascular cerebral (AGUILAR-LIRA, et al., 2017).

Apesar dos anti-inflamatórios serem utilizados na clínica para o tratamento da dor e inflamação, na literatura já existem relatos quanto a outras possíveis atividades biológicas, como a antibacteriana. No estudo de Wang e colaboradores, a aspirina demonstrou atividade antibacteriana, frente a cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Helicobacter pylori* e, ainda, foi capaz de melhorar a susceptibilidade de cepas de *H. pylori* frente aos antimicrobianos (WANG, 2003). O celecoxibe também aumentou significativamente a suscetibilidade de antibióticos frente a bactérias quando utilizado junto à ampicilina, kanamicina, cloranfenicol e ciprofloxacino, e teve efeito inibidor significativo frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (YIN, et al. 2014). Entretanto, são limitados os estudos que esclarecem o mecanismo pelo qual se dá essa ação antimicrobiana dos AINES. Em 2014, um estudo sugeriu que a atividade antibacteriana do carprofeno, responsável por inibir o crescimento de *Escherichia coli*, foi

através da ligação da sua molécula ao DNA da polimerase III b. Com a alteração na subunidade, ele inibiu a replicação e reparo do DNA dessa cepa (CHAN, 2017).

O diclofenaco também já teve sua atividade antibacteriana investigada na literatura. Mazumdar e colaboradores (2009) sugerem que ele foi eficiente *in vitro* contra *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Mycobacterium spp.*. Os autores demonstraram sua atividade antibacteriana contra cepas de *Escherichia coli* hospitalares a partir de 5 µg/mL (MAZUMDAR, et al., 2009).

Contra outras doenças o diclofenaco obteve sucesso quando administrado na dose máxima permitida em humanos, sendo avaliado contra listeriose murina, tuberculose e salmonelose, nos estudos de Dutta e colaboradores (2008), onde a dose de 50 µg/mL apresentou efeito inibitório e o efeito bactericida em *Listeria monocytogenes* foi observado na dose de 100 µg/mL (DUTTA, et al., 2008).

Sobre a concentração do diclofenaco para o efeito antibacteriano, existem divergências entre os estudos *in vitro* disponíveis na literatura. O mesmo já apresentou inibição frente a cerca de 397 cepas bacterianas, na concentração de 50-100 µg/mL (ANNADURAI, et al., 1998). Posteriormente, Padma e Yalavarthy (2015) relataram inibição frente a cepas de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhi* em concentrações menores, 25 µg/mL.

Também já foi sugerido que esse fármaco fosse usado em conjunto com antimicrobianos como amoxicilina e gentamicina, por Salem et al. (2013), frente a cepas de *Enterococcus faecalis*. Além disso, outro estudo demonstrou efeito antibacteriano significativo em sinergismo com aminoglicosídeos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (ANNADURAI, et al., 2002). Assim são esperados novos estudos e futuras aplicações médicas que avaliem o diclofenaco como um candidato para tratar infecções bacterianas.

### **3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA**

#### **3.1 MANUSCRITO**

O manuscrito foi submetido ao “World Journal of Microbiology and Biotechnology”, classificado de acordo com o Qualis Capes como periódico B2.



### **Avaliação da atividade antibacteriana de dexametasona e diclofenaco sódico e efeito sinérgico com antibióticos frente a isolados clínicos de *Enterococcus* spp.**

#### **Resumo**

*Enterococcus* spp., são bactérias comumente envolvidas em infecções no ambiente hospitalar devido a sua multirresistência aos agentes antimicrobianos, sendo envolvidas com altos índices de morbimortalidade. O reduzido arsenal de antibióticos eficazes no tratamento desse microrganismo tem impulsionado a pesquisa por métodos alternativos. O reposicionamento de fármacos apresentou-se como uma alternativa promissora na descoberta de medicamentos efetivos frente a este tipo de infecções bacterianas, devido a suas características de rapidez de desenvolvimento e pequenos custos, comparado ao método tradicional de desenvolvimento de fármacos. O objetivo desse estudo foi investigar a atividade antibacteriana dos anti-inflamatórios dexametasona e diclofenaco sódico injetáveis determinando a concentração inibitória mínima (CIM) frente a cepas bacterianas padrão de referência *American Type Culture Collection* e isolados clínicos de *Enterococcus* spp. e sua interação sinérgica com os antibacterianos ácido nalidíxico, ciprofloxacino e vancomicina utilizando o método *checkerboard* e a determinação do índice de concentração inibitória fracionada (FICI). Isoladamente, tanto a dexametasona como o diclofenaco apresentaram valores de CIM menores do que o antimicrobiano ácido nalidíxico. Ciprofloxacino e vancomicina sozinhos apresentaram menor valor de CIM que os medicamentos testes. A combinação dos medicamentos testes com os antibióticos, frente a quase todas as cepas bacterianas testadas evidenciaram sinergia pelo cálculo do FICI. A combinação de dexametasona e/ou diclofenaco reduziu em até 64 vezes a concentração de CIM do ácido nalidíxico e vancomicina e com ciprofloxacino sua concentração foi reduzida em até 128 vezes. Os resultados obtidos nesse estudo da sinergia dos dois anti-inflamatórios em sua forma injetável com os três antibióticos permitem sugerir estas combinações de medicamentos como alternativa promissora para o tratamento de infecções graves de *Enterococcus* spp em pacientes hospitalizados nas unidades críticas, e sua indicação como fármacos candidatos a reposicionamento.

**Keywords:** Atividade antibacteriana; Reposicionamento; Dexametasona; Diclofenaco; Sinergismo

## Introdução

O descobrimento dos antibacterianos trouxe para a medicina uma nova perspectiva a saúde, possibilitando o tratamento de doenças infecciosas (O'Connell et al. 2013). Embora impactante, essa classe de medicamentos demonstrou ser altamente suscetível à perda da eficácia devido ao surgimento das bactérias resistentes a múltiplas drogas (MDR), as quais constituem desafio para os clínicos e instituições de saúde (Laxminaravan et al. 2013; Santos et al. 2016).

O aumento dos microrganismos MDR levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a classificar os patógenos em níveis de prioridade para o desenvolvimento de novos antibióticos. *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina (VRE) foram considerados agentes de prioridade alta (WHO, 2017).

*Enterococcus* são bactérias Gram-positivas, patógenos oportunistas comuns em infecções hospitalares. As espécies mais envolvidas em infecções em humano são *E. faecalis* e *Enterococcus faecium* (Taskeen et al. 2018). Esse gênero ocupa a terceira posição em infecções nosocomiais, causando 14% das infecções hospitalares relacionadas a assistência a (IRAS) nos Estados Unidos. Dos *E. faecium* isolados em hospitais, 80% são resistentes a vancomicina (VRE) (Weiner 2016). Nas duas últimas décadas, as infecções atribuídas ao VRE tornaram-se mais alarmantes em razão da sua alta taxa de mortalidade (Beganovic et al. 2018; Taskeen et al. 2018). Devido ao tratamento limitado que se encontra disponível para o combate das infecções ocasionadas por esses organismos, há necessidade urgente de novas estratégias para combatê-los.

Simultaneamente a esse cenário, a indústria farmacêutica não tem demonstrado interesse no desenvolvimento de novas drogas antibacterianas. Uma explicação disso são o tempo e valores onerosos necessários, além das dificuldades frente aos rígidos padrões para a sua aprovação exigidos pelas instituições reguladoras (Spellberg et al. 2016; MoreheadandScarborough 2018). Somado a isso estão as baixas taxas de sucessos (cerca de 2,01%) no desenvolvimento dos antimicrobianos. Esses fatores desencorajadores fazem com que muitas delas diminuam, cada vez mais seus investimentos em pesquisas de novos antibióticos, fato este intensificado desde o início dos anos 2000 (Yeu et al. 2015).

Esse fato desencadeou a busca por métodos alternativos. O reposicionamento de fármacos, reutilização ou resgate de medicamentos já aprovados e em uso clínico para o tratamento das infecções bacterianas surgiu como método promissor pois medicamentos não antibióticos apresentavam atividade similar aos antibióticos, e passavam a ter uma nova indicação de uso terapêutico diferente da sua de origem (Ashburnand Thor 2004; SerafinandHörner 2018; Gelosa et al. 2020; Rastelli et al. 2020). O reposicionamento também minimiza a realização dos ensaios clínicos uma vez que esses medicamentos já foram testados em humanos e dados detalhados sobre sua farmacologia, farmacodinâmica, formulação e dose estão disponíveis na literatura (Ashburnand Thor 2004).

Utilizando este método é possível disponibilizar um medicamento reposicionado para o uso na clínica dentro de 3 a 12 anos com um custo estimado de US\$ 40 a 80 milhões enquanto o método tradicional pode custar US\$ 2 a 3 bilhões dedicando de 13 a 15 anos na pesquisa de um novo medicamento (Yella et al. 2018). Atualmente, o reposicionamento é

considerado um método alternativo para a rápida identificação de novos agentes terapêuticos para o tratamento de infecções por bactérias MDR, outras doenças infecciosas e virais emergentes, como a COVID-19 (Zheng et al. 2018).

Muitos medicamentos têm sido alvo na pesquisa para o reposicionamento. Fármacos de diferentes categorias demonstraram atividade antibacteriana, entre elas anti-histamínicos, anti-hipertensivos, antipsicóticos e agentes anti-inflamatórios (Chan et al. 2017; Mandal et al., 2010; Rampelotto et al. 2018). O diclofenaco é um medicamento da classe dos anti-inflamatórios não esteroides (AINES), utilizado na clínica para uma variedade de doenças pois possui propriedades de reduzir a inflamação, dor e febre. Estudos atuais relatam sua potencialidade no redirecionamento pelo seu efeito sinérgico com antibióticos (Chan et al. 2017; Yin et al. 2014).

Os corticoides são outra classe de medicamentos anti-inflamatórios utilizada para diversas doenças, entre elas, algumas doenças infecciosas (Rosen, 2019). Dentro desses, a dexametasona é um fármaco que tem sido alvo de estudo para o redirecionamento de doenças emergentes como a infecção pelo vírus SARS-CoV-2 (Vohra, 2021) e já foi descrita na literatura com propriedades microbicidas frente a fungos e bactérias (Neher, 2008).

Este estudo avaliou a atividade antibacteriana *in vitro* dos medicamentos injetáveis dexametasona e diclofenaco sódico isoladamente e em combinação com os antibacterianos ácido nalidíxico, ciprofloxacino e vancomicina como candidatos ao reposicionamento. Os medicamentos foram avaliados frente a duas cepas padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC) e 34 isolados clínicos MDR de *E. faecium* e *E. faecalis*. O método da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi utilizado para a avaliação da atividade antibacteriana e na investigação do potencial sinérgico foram utilizados o de método *Checkerboard* e a determinação dos índices de concentração inibitória fracionada (FICI) dos medicamentos.

## **Materiais e métodos**

### **Medicamentos usados**

Para a obtenção da solução estoque foram utilizadas soluções injetáveis de dexametasona (Indústria Química Farmacêutica Farmace, Barbalha, CE, Brasil) e diclofenaco sódico (União Química Farmacêutica Nacional SA, São Paulo, SP, Brasil) diluídas em água ultrapura estéril na concentração de 2048  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 8192  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. A solução estoque do antibacteriano ácido nalidíxico (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) foi realizada através da dissolução com hidróxido de sódio 1molar até a concentração de 8192  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ciprofloxacino (Cimed Indústria de medicines Ltda, Pouso Alegre, MG, Brazil) em metanol obtendo concentração de 2048  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e vancomicina (Teuto Brasileiro S/A, Anápolis /GO/BR) dissolvida em água ultrapura estéril na concentração de 2048  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### **Avaliação da atividade antibacteriana**

#### **Cepas bacterianas**

A avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada frente duas cepas padrão ATCC e 34 isolados clínicos de *Enterococcus* spp., resistentes a vancomicina, os quais foram

isolados de pacientes de um hospital universitário, coletados no período de janeiro de 2019 a janeiro de 2020. As duas cepas padrão ATCC testadas foram *E. faecalis* ATCC 29212 (sensível à vancomicina) e *E. faecalis* ATCC 51299 (resistente à vancomicina). Os 34 isolados clínicos MDR foram identificados usando um sistema automatizado Vitek® 2 (Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, França) e incluem uma cepa de *E. faecalis* e 33 de *E. faecium*. Na tabela 1, ilustramos o perfil de resistência antibacteriana das cepas padrão ATCC e dos isolados clínicos MDR utilizados nesse estudo.

O critério de inclusão para isolados clínicos foi resistência a um ou mais antimicrobianos pertencentes a três ou mais categorias testadas, caracterizando-as como cepas MDR (Mulani et al. 2019). Todas as cepas padrão ATCC e isolados clínicos MDR foram armazenados em *Tryptic Soy Broth* (TSB) contendo 15% de glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

A determinação da CIM foi realizada utilizando o método de microdiluição em caldo, baseado nos documentos M100-S26 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2012) e ISO 20776-1:2019 (ISO/TC 212, 2019). Para a análise do crescimento bacteriano, o inóculo foi preparado em solução salina estéril, com concentração da suspensão bacteriana de acordo com a escala McFarland 0,5, ou seja,  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL). Em microplacas de 96 poços contendo caldo Mueller Hinton, os medicamentos (concentrações variaram de 1 a  $4096 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e inóculo bacteriano foram incubados em triplicata a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Após a incubação, a CIM foi determinada por leitura visual, como a menor concentração onde não houve crescimento bacteriano visível. Para controle e comparação, foi determinada a CIM do ácido nalidíxico, ciprofloxacino e vancomicina.

#### Determinação da interação pelo método *Checkerboard*

Para a determinação da interação dos medicamentos dexametasona e diclofenaco sódico em combinação com ácido nalidíxico, ciprofloxacino e vancomicina foi utilizado o método de *checker board* (Lorian, 1986). Cada medicamento (dexametasona e diclofenaco sódico) foi testado com cada um dos antimicrobianos por vez. Para isso, foram preparadas soluções subinibitórias dos medicamentos testes e antimicrobianos a partir dos valores obtidos na CIM. Assim, primeiro  $100 \mu\text{L}$  de meio Mueller Hinton foram adicionados a cada orifício da microplaca estéril de 96 poços com fundo em forma de U e mais  $50 \mu\text{L}$  do mesmo meio nos poços da primeira coluna da placa. Após foi adicionado nos primeiros poços verticais (colunas) da placa  $50 \mu\text{L}$  da concentração estoque de um dos três medicamentos antimicrobianos, que foram diluídos 7 vezes de forma decrescente. Quando terminada as diluições dos antimicrobianos, nos poços horizontais foram adicionadas 7 diluições dos medicamentos dexametasona e diclofenaco sódico preparadas anteriormente com diferentes concentrações que variaram de  $0,5$  a  $16 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $1$  a  $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Por último, a cada orifício foram adicionados  $50 \mu\text{L}$  do inóculo bacteriano. As placas foram incubadas a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24h e posteriormente foi realizada a leitura visual. A CIM da combinação foi determinada como a menor concentração dos dois medicamentos em combinação (medicamento teste e antimicrobiano) capaz de inibir o crescimento do

microrganismo). Essa concentração foi utilizada para calcular o índice de concentração inibitória fracionada (FICI).

#### Determinação do FICI

A análise da interação dos medicamentos dexametasona/ácido nalidíxico, dexametasona/ciprofloxacino, dexametasona/vancomicina, diclofenaco sódico/ácido nalidíxico, diclofenaco sódico/ciprofloxacino e diclofenaco sódico/vancomicina, foi analisada através do cálculo do índice de concentração inibitória fracionada (FICI) a partir da fórmula apresentada a seguir. Foi utilizada a seguinte interpretação: "sinérgico" ( $FICI \leq 0,5$ ), "sem interação" ( $FICI > 0,5$  e  $\leq 4,0$ ) e "antagônico" ( $FICI > 4,0$ ) (Odds, 2003; Konaté et al. 2012).

$$FICI \text{ do agente A} = \frac{\text{CIM do agente A em combinação}}{\text{CIM do agente A sozinho}}$$

$$FICI \text{ do agente B} = \frac{\text{CIM do agente B em combinação}}{\text{CIM do agente B sozinho}}$$

$$\Sigma FICI = FICI \text{ do agente A} + FICI \text{ do agente B}$$

#### Conceitos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sendo registrado sob o número 050859. O registro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados (SisGen) foi registrado sob o número AE78E18—UFSM.

#### Resultados

Na tabela 2, estão apresentados os resultados de MIC obtidos para o antibiótico ácido nalidíxico e os medicamentos dexametasona e diclofenaco sódico separadamente. Isoladamente o ácido nalidíxico apresentou valores de MIC que variaram na faixa de 32 a 2048  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para os 33 isolados clínicos MDR de *Enterococcus* e valor de MIC=2048  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *E. faecalis* ATCC 51299 e MIC=4096  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *E. faecalis* ATCC 29212. Tanto a dexametasona quanto o diclofenaco apresentaram MIC=256 a 1024  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para os isolados MDR. Para as cepas ATCC *E. faecalis* 51299 e *E. faecalis* 29212, a dexametasona apresentou os valores de MIC=512  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 1024  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente e o diclofenaco apresentou MIC=2048  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para ambas.

Os medicamentos testes apresentaram valores de MIC para as cepas MDR menores se comparado com o ácido nalidíxico que obteve concentração inibitória igual ou maior que 1024  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (16 cepas MIC=1024  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 14 cepas MIC=2048  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A dexametasona

exibiu MIC=512  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para a maior parte das cepas (20 cepas) assim como o diclofenaco (19 cepas). A dexametasona também apresentou atividade antibacteriana mais significativa que esse antibiótico frente as duas cepas padrão ATCC.

Ainda na tabela 2, apresentamos os resultados obtidos de MIC quando testados o antibiótico em combinação com a dexametasona e diclofenaco assim como o cálculo do FICI, demonstrando haver interação entre os medicamentos. Quando analisada a combinação de ácido nalidíxico com dexametasona foi possível observar uma redução significativa na MIC do antibiótico de até 64 vezes e para a dexametasona em até 2048 vezes em comparação quando utilizada sozinha, onde o MIC chegou a concentração de 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Essa interação foi evidenciada pelo cálculo do FICI, onde frente as 33 cepas MDR e as duas cepas ATCC a combinação foi sinérgica, sendo que somente para uma cepa foi considerado sem interação. A combinação de ácido nalidíxico e diclofenaco também apresentou redução de até 64 vezes do valor de MIC do antibiótico e o MIC do diclofenaco chegou a até 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , reduzindo em até 1024 vezes a concentração da MIC. O cálculo do FICI demonstrou que essa combinação é menos efetiva se comparada a dexametasona, uma vez que apresentou sinergia frente a 31 cepas MDR, uma combinação antagônica (FICI=4,00195) e duas combinações que não obteve interação (FICI=0,50391 e FICI=1,00195). Frente as duas cepas ATCC a interação foi sinérgica.

A tabela 3 apresenta a MIC do antibiótico ciprofloxacino e dos medicamentos dexametasona e diclofenaco, assim como os valores de MIC para a combinação dos medicamentos com antibiótico e a interação pelo resultado do cálculo do FICI. O antibiótico ciprofloxacino sozinho teve valores de MIC=32 a 1024  $\mu\text{g mL}^{-1}$  frente as cepas de *Enterococcus* MDR e MIC=256  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *E. faecalis* ATCC 51299 (VRE) e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *E. faecalis* ATCC 29212. Quando combinado com dexametasona e diclofenaco, o antibiótico mostrou redução máxima de 128 vezes no valor de MIC obtendo concentração de até 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  frente a cepa *E. faecalis* ATCC 51299, enquanto a dexametasona reduziu em até 2048 vezes e o diclofenaco em até 1024 vezes.

Pelo cálculo do FICI a combinação ciprofloxacino/dexametasona foi sinérgica frente a 32 cepas de *Enterococcus* MDR e uma cepa de ATCC (*E. faecalis* ATCC 51299), não houve interação frente a três cepas MDR e no *E. faecalis* ATCC 29212houve interação antagônica. Como já comentado, a dexametasona sozinha frente a 21 cepas obteve MIC =512  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 14 cepas MIC=1024  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e uma cepa MIC=256  $\mu\text{g mL}^{-1}$  tanto para as MDR assim como ATCC, demonstrando que sua atividade antibacteriana mais significativa seria por meio da combinação com ciprofloxacino. Esse mesmo resultado foi observado para o diclofenaco, que sozinho obteve valores altos de CIM, mas quando em combinação com o ciprofloxacino tiveram interações sinérgicas frente a 33 cepas MDR e *E. faecalis* ATCC 51299, uma cepa MDR não obteve interação e para *E. faecalis* ATCC 29212 foi considerado antagônico.

A tabela 4 encontram-se os resultados da MIC da vancomicina, dexametasona e diclofenaco, a combinação dessas drogas e o valor de FICI. A vancomicina apresentou valores de MIC de 128 a 1024  $\mu\text{g mL}^{-1}$  frente as cepas de *Enterococcus faecium* e *faecalis*, todos resistentes a vancomicina, o que explica os valores altos de MIC. Quando testado em combinação com dexametasona e diclofenaco, reduziu os valores da MIC em até 64 vezes frente aos isolados clínicos MDR, enquanto para cepa padrão ATCC *Enterococcus faecalis* 29212 resistente a vancomicina não obteve redução. Os medicamentos dexametasona e

diclofenaco apresentaram redução de até 2048 vezes. A cepa padrão resistente à vancomicina (*Enterococcus faecalis* 29212), pelo cálculo do FICI demonstrou ter interação antagônica quando utilizada em conjunto com ambos os medicamentos, dexametasona e diclofenaco. A cepa *E. faecalis* ATCC 51299 sensível a vancomicina, foi considerado sinérgica somente na combinação com dexametasona/vancomicina, já na combinação com o diclofenaco apresentou antagonismo. Frente as 34 cepas de isolados clínicos de *Enterococcus* resistentes a vancomicina ambas as combinações foram consideradas sinérgicas pelo cálculo do FICI.

## Discussão

Já é bem consolidado que pacientes com infecções bacterianas sofrem de sintomas como dor e febre, e por isso é recomendado o uso de antibióticos, assim como antipiréticos e analgésicos. Dessa forma, medicamentos com ação anti-inflamatória são comumente administrados em conjunto com a terapia antimicrobiana (El-Sayed et al. 2020).

A dexametasona injetável apresentou resultados promissores frente as bactérias Gram-positivas *E. faecium* e *E. faecalis*. Neher et al. relataram sua atividade bactericida frente a outra Gram-positiva o *Streptococcus milleri*, e os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus* através da determinação do tempo de morte desses agentes (Neher et al. 2008). Outro estudo relata ser esta atividade dos medicamentos pertencentes a mesma classe que a dexametasona (corticoides) frente a otite externa (Emgard et al. 2005).

A dexametasona apresentou valor de MIC menor que o antibiótico ácido nalidíxico. A combinação de dexametasona com os três antibióticos testados, ácido nalidíxico, ciprofloxacino e vancomicina, foram promissoras pois reduziram consideravelmente a concentração dos antibióticos e do próprio medicamento.

Não foram efetuados ensaios para elucidação do mecanismo de ação da atividade antibacteriana pela qual a dexametasona age. Podemos atribuir essa ação seja devida a sua ligação a um alvo específico, assim como ocorre os demais antibióticos. A localização desse alvo não foi especificada até o momento, mas Neher e colaboradores sugeriram que possa ser na parede celular ou membrana citoplasmática, ou na transcrição e tradução dos microrganismos (Neher et al. 2008). Essa hipótese é viável uma vez que estes medicamentos têm a capacidade de interagir com diferentes alvos, os quais conferem novas aplicações farmacêuticas (Vogt and Mestres 2010; Gelosa et al. 2020).

Referente a atividade antibacteriana do anti-inflamatório diclofenaco de sódio injetável frente às bactérias Gram-positivas, Salem Milani e colaboradores (2013) demonstraram que o diclofenaco apresentou atividade antibacteriana frente a *E. faecalis*. Entretanto seus resultados diferem do nosso no valor de MIC, uma vez que frente às 10 cepas de *E. faecalis* apresentou MIC de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Salem et al. 2013). Também está citada sua ação antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* (Riordan 2011; Mazumdar et al. 2009). Outro estudo descreve sua atividade frente às seguintes bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhi* (PadmaandYalavarthy 2015; Mazumdar et al. 2009).

Zhang e colaboradores (2021) descreveram que em doses consideradas altas o diclofenaco foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicilina (MRSA). Segundo esses pesquisadores ele não induz mutações a drogas com respeito a

resistência aos antimicrobianos, após passagem contínua. Já em baixas doses, o medicamento poderia ressensibilizar as bactérias aos  $\beta$  – lactâmicos e inibir a formação de biofilme, o que ajuda a contornar a resistência aos medicamentos e melhorar a eficácia antibacteriana dos antibióticos convencionais (Zhang et al. 2021).

Além da atividade promissora do diclofenaco sozinho, sua combinação com os antibióticos testados nesse estudo, apresentou sinergismo com concentrações menores. Já em 2002, um estudo demonstrou efeito antibacteriano significativo com sinergismo adicionado aos aminoglicosídeos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Annadurai, et al., 2002). Mais tarde, Dutta e colaboradores (2007) também relataram o sinergismo de diclofenaco com outras drogas antimicrobianas como a estreptomicina (Dutta, et al., 2007). Em 2020, Mohammed utilizou diclofenaco 4 mg/ml em combinação com ciprofloxacino e levofloxacino frente a cepas de *Acinetobacter baumannii* e obteve interação sinérgica onde o diclofenaco apresentou suscetibilidade com *A. baumannii* resistentes a múltiplas drogas (Mohammed et al. 2020).

Devido a utilização comumente dos AINES juntamente com antimicrobianos, alguns mecanismos são sugeridos na literatura como alteração da hidrofobicidade na superfície dos patógenos, alterando a expressão do fator de virulência, influenciando na produção de biofilme, afetando a motilidade e o metabolismo, interagindo com o transporte e assim conferindo suscetibilidade (Pino-Otín 2017; Oliveira et al. 2019; Mandell et al. 2002; El-Mowafy et al. 2014; Wang et al. 2003; Varma et al. 2019).

A combinação de drogas tem sido utilizada frequentemente utilizada e recomendada no tratamento de algumas doenças, entre elas as doenças infecciosas por apresentar vantagens sobre a monoterapia, como por exemplo, o aumento do espectro de antibióticos abrangendo um maior número de patógenos e a redução no desenvolvimento da resistência bacteriana (Vazquez-Grande and Kumar 2015; Levin, 2002; Mahamate, et al., 2007; Aldeyab et al. 2008). Como constatamos nesse estudo, as combinações de dois medicamentos podem levar a um efeito sinérgico, pela união de diferentes mecanismos de ação.

Devido as vantagens já descritas, o reposicionamento de fármacos correspondeu a um terço das aprovações de “novos medicamentos” na última década (Bellera, 2020). Historicamente a indústria farmacêutica não tem interesse em reposicionar medicamentos antigos sem patente. Entretanto, esse método de reposicionamento para o tratamento de doenças infecciosas já tem se beneficiado do apoio financeiro de governos e fundações, bem como das colaborações entre instituições acadêmicas (Zheng et al. 2018). Essa alternativa gera atualmente cerca de 25% do rendimento anual da indústria farmacêutica, uma vez que esse processo recebe já recebeu aprovação pelas agências reguladoras, como a *Food and Drug Administration* e Agência Europeia de Medicamentos (EMA) o que não ocorre com o uso *off label* (Naylor et al 2015; Jin and Wong 2014).

Os resultados obtidos nesse estudo ratificam a atividade antibacteriana promissora da dexametasona e diclofenaco injetáveis frente a isolados clínicos de *Enterococcus* spp. MDR e com vantagem quando utilizado em combinação com os antibióticos ácido nalidíxico, ciprofloxacino e vancomicina devido ao sinergismo constatado.

## Contribuições dos autores

SLM contribuiu na concepção e delineamento do estudo, aquisição dos dados, análise e interpretação dos dados, redação e revisão crítica do manuscrito. MBS auxiliou na concepção, análise, interpretação dos dados e revisão crítica do manuscrito. ADM e BRP realizaram a coleta de amostras clínicas, isolamento de cepas e aquisição de dados. VSF e TR participaram da revisão crítica do manuscrito. RH participou da concepção e desenho experimental, análise e interpretação dos dados e revisão crítica do manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o artigo final.

## Financiamento

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES) sob a bolsa 001.

## Disponibilidade do código

Os conjuntos de dados gerados durante e/ou analisados durante o estudo atual estão disponíveis com o autor correspondente mediante solicitação razoável.

## Conformidade com os padrões éticos

Conflito de interesses:

Os autores declaram não ter conflito de interesse.

## Referências:

Aldeyab MA, Monnet DL, López-Lozano JM, Hughes CM, Scott MG, Kearney MP, et al. (2008) Modelling the impact of antibiotic use and infection control practices on the incidence of hospital – acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a time-series analysis. *J Antimicrob Chemother* 62(3):593-600.

Annadurai S, Basu S, Ray S, Dastidar SG, Chakrabarty NA (1998) Antibacterial activity of the antiinflammatory agente diclofenac sodium. *Indian J Exp Biol* 36(1):86-90.

Ashburn TT, Thor KB (2004) Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat RevDrugDiscov* 3:673–683

Beganovic M, Luther MK, Rice LB, Arias CA, Rybak MJ, LaPlante KL. (2018) A review of combination antimicrobial therapy for *Enterococcus faecalis* blood stream infections and infective endocarditis. *Clin Infect Dis.* 64: 303-309

Chan EWL, Yee ZY, Raja I, Yap JKY, Synergistic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on antibacterial activity of cefuroxime and chloramphenicol Against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Glob Antimicrob Resist*, v. 10p. 70-74, 2017.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2012) M07-A9 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 9th edn. Wayne: CLSI document. ISBN: 1-56238-785-5. [https://clsi.org/media/1632/m07a10\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1632/m07a10_sample.pdf)

- Dutta NK, Mazumdar K, Seok SH, Park JH (2008) The anti-inflammatory drug Diclofenac retains anti-listerial activity in vivo. *Lett Appl Microbiol* 47(2):106-11.
- El-Mowafy SA, El Galil KHA, El-Messery SM, Shaaban MI (2014) Aspirin is an efficient inhibitor of quorum sensing, virulence and toxins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis* 74: 25-32
- El-Sayed Ahmed MAE, Zhong LL, Shen C, Yang Y, Doi Y, Tian GB. (2020) Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). *Emerg Microbes Infect.* 9(1):868-885
- Emgård P, Hellström S, Holm S (2005) External otitis caused by infection with *Pseudomonas aeruginosa* or *Candida albicans* cured by use of a topical group III steroid, without any antibiotics. *Acta Otolaryngol.* 125(4):346-52
- Gelosa P, Castiglioni L, Camera M, Sironi L (2020) Drug repurposing in cardiovascular diseases: opportunity or hopeless dream? *Biochem Pharmacol* 177:113894
- ISO/TC 212. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. ISO 20776-1:2019. Geneva, Suíça: ISO; 2019
- JIN G, Wong STC (2014) Toward better drug repositioning: prioritizing and integrating existing methods into efficient pipelines. *Drug Discov Today* 19(5): 637-644
- Konaté K, Mavoungou JF, Lepengué AN, Aworet-Samveny RR, Hilou A, Souza A et al (2012) Antibacterial activity against  $\beta$ -lactamase producing Methicillin and Ampicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 11:18
- Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, et al (2013) Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.* (13): 1057-1098
- Levin BR (2002) Models for the spread of resistant pathogens. *Neth J Med* 60: 58-64
- Lorian V (2005) *Antibiotics in laboratory medicine*, 5th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 365–441
- Mahamat A, MacKenzie FM, Brooker K, Monnet DL, Daures JP, Gould IM (2007) Impact of infection control interventions and antibiotic use on hospital MRSA: a multivariate interrupted time-series analysis. *Int J Antimicrob Agents.* 2007 Aug;30(2):169-76.
- Mandal A, Sinha C, Kumar Jena A, Ghosh S, Samanta A (2010) An investigation on in vitro and in vivo antimicrobial properties of the antidepressant: amitriptyline hydrochloride. *Braz J Microbiol.* 41(3):635-45.

- Mandell GL, Coleman EJ (2002) Effect of antipyretic agents on uptake, transport, and release of antimicrobial agents by human polymorphonuclear leukocytes. *J Infectious Dis.* 185(9):1314–9. <https://doi.org/10.1086/340135>
- Mazumdar K, Dastidar SG, Park JH, Dutta NK. (2009) The anti-inflammatory non-antibiotic help compound diclofenac: a antibacterial drug target. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 28(8):881-91
- Mohammed MA, Ahmed MT, Anwer BE, Aboshanab KM, Aboulwafa MM (2020) Propranolol, chlorpromazine and diclofenac restore susceptibility of extensively drug-resistant (XDR)-*Acinetobacter baumannii* to fluoroquinolones. *PLoS One* 26;15(8):e0238195.
- Morehead MS, Scarbrough C (2018) Emergence of global antibiotic resistance. *Prim Care Clin Ofce Pract* 45(3):467-484
- Naylor S, Kauppi DM, Schonfeld JP (2015) Therapeutic drug repurposing, repositioning and rescue: Part II: Business review. *Drug Discovery World* 16(2):57–72.
- Neher A, Arnitz R, Gstöttner M, Schäfer D, KrössEM, Nagl M (2008) Antimicrobial activity of dexamethasone and its combination with N-chlorotaurine. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008134(6):615-20
- O'Connell KM, Hodgkinson JT, Sore HF, Welch M, Salmond GP, Spring DR (2013) Combating multidrug-resistant bacteria: current strategies for the Discovery of novel antibacterials. *Angew Chem Int Ed Engl* 52(41):10706-33
- Odds FC (2003) Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J Antimicrob Chemoth* 52(1):1
- Oliveira IM, Borges A, Borges F, Simões M (2019) Repurposing ibuprofen to control *Staphylococcus aureus* biofilms. *Eur Journal Med Chem* 166:197–05
- Padma R, Yalavarthy PD (2015) Screening of Diclofenac for Antibacterial activity Against Pathogenic Microorganisms. *IJAPBC.* 4(3): 554-2015
- Pino-Otín MR, Muñoz S, Val J, Navarro E (2017) Effects of 18 pharmaceuticals on the physiological diversity of edaphic microorganisms. *Sci Total Environ* 595:441–50
- Salem-Milani A, Balaei-Gajan E, Rahimi S, Moosavi Z, Abdollahi A, Zakeri-Milani P, Bolourian M, (2013) Antibacterial Effect of Diclofenac Sodium on *Enterococcus faecalis*. *Journal of dentistry* 10(1): 16–22.
- Santos SO, La Rocca SM, Hörner R (2016) Colistin resistance in non-fermenting Gram-negative bacilli in a university hospital. *Braz J InfectDis.* 20(6): 64-650
- Serafin MB, Hörner R (2018) Drug repositioning, a new alternative in infectious diseases. *Braz J InfectDis* 22:252–256
- Spellberg B, Srinivasan A, Chambers HF (2016) New societal approaches to empowering antibiotics stewardship. *JAMA* 315(12):1229–1230

Rampelotto RF, Lorenzoni VV, Silva DC, Moraes GA, Serafin MB, Tizotti MK, et al. (2018) Synergistic antibacterial effect of statins with the complex {[1-(4-bromophenyl)-3-phenyltriazene N3-oxide- $\kappa^2$  N1, O4](dimethylbenzylamine- $\kappa^2$  C1, N4)palladium(II)}. *Braz J PharmSci.* 54(2):e17369

Rastelli G, Pellati F, Pinzi L, Gamberini MC (2020) Repositioning natural products in drug discovery. *Molecules* 25(5):1154

Riordan JT, Dupre JM, Cantore-Matyi SA, Kumar-Singh A, Song Y, Zaman S, Horan S, Helal NS, Nagarajan V, Elasri MO, Wilkinson BJ, Gustafson JE. (2011) Alterations in the transcriptome and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of diclofenac. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 30(10):1-11.

Rosen CM. (2019) Corticosteroids. *Pediatr Rev.* 40(10):546-548

Varma GY, Kummari G, Paik P, Kalle AM (2019) Celecoxib potentiates antibiotic uptake by altering membrane potential and permeability in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 74(12):3462–72

Vazquez-Grande G, Kumar A (2015) Optimizing antimicrobial therapy of sepsis and septic shock: focus on antibiotic combination therapy. *Semin Respir Crit Care Med* 36(1):154–166

Vogt I, Mestres J (2010) Drug-Target Networks. *Mol Inform* 29:10–14

Vohra M, Sharma AR, Satyamoorthy K, Rai OS (2021) Pharmacogenomic considerations for repurposing of dexamethasone as a potential drug against SARS-CoV-2 infection. *Per Med.* 18(4):389-398

Wang W, Wong W, Dailidienė D, Berg D, Gu Q, Lai K, et al (2003) Aspirin inhibits the growth of *Helicobacter pylori* and enhances its susceptibility to antimicrobial agents. *Gut* 52(4):490–5

Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, Edwards JR, Sievert DM 2016

Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 37(11):1288–1301.

World Health Organization (2017) Global priority list of antibiotic resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. World Health Organization, Geneva. <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>

Taskeen, Andleeb, Saadia, Ullah, Sidra R, Jamal, Muhsin, Mehmood, Khalid and Ali, Muhammad. "Isolation and Characterization of a Phage to Control Vancomycin Resistant *Enterococcus faecium*" *Open Life Sciences* 13(1): 553-560

- Talevi A, Bellera CL (2019) Challenges and opportunities with drug repurposing: finding strategies to find alternative uses of therapeutics. *Exp. Opin. Drug Discov.* 15(4):397-401
- Yella, S. Yaddanapudi, Y. Wang, A. Jegga, (2018) Mudança de tendências no reposicionamento computacional de medicamentos, *Produtos farmacêuticos* 11:57
- Yeu Y, Yoon Y, Park S (2015) Protein localization vector propagation: a method for improving accuracy of drug repositioning. *Mol Biosyst* 11(7):2096–2102
- Yin Z, Wang Y, Whittell LR, Jergic S, Liu M, Harry E, et al (2014) DNA replication is the target for the antibacterial effects of non steroidal anti-inflammatory drugs. *ChemBiol*, 21:481-487
- Zhang S, Qu X, Tang H, Wang Y, Yang H, Yuan W, Yue B (2021) Diclofenac Resensitizes Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* to  $\beta$ -Lactams and Prevents Implant Infections. *Adv Sci (Weinh)* 3;8(13):2100681.
- Zheng W, Sun W, Simeonov A (2018) Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. *Br J Pharmacol* 175(2):181–191

Tabela 1- Características de resistência aos antimicrobianos (método de automação VITEK ®) dos isolados clínicos coletados em janeiro de 2019 a janeiro de 2020 e cepas padrão utilizadas neste estudo

Cepas	Origem clínica	Antibiótico sensível	Antibiótico resistente	Identificação de fenótipos
<i>Enterococcus faecalis</i> 1	Tecido	Amp, Lzd, Dap, Tgc, Nit	Gen, Str, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 2	Swab retal	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lvx, Ery, Clin, Tec, Van, Sxt	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 3	Tecido	Amp, Lzd, Dap, Tgc, Nit	Gen, Str, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 4	Swab retal	Lzd, Tgc	Amp, Gen, Str, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 5	Urina	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 6	Swab retal	Str, Lzd, Tgc	Amp, Gen, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 7	Fluído de secreção	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 8	Swab retal	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 9	Fezes	Gen, Str, Lzd, Tgc, Nit	Amp, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 10	Sangue	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 11	Biópsia de membro inferior	Str, Lzd, Tgc	Amp, Gen, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 12	Urina	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lvx, Ery, Clin, Tec, Van, Sxt	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 13	Urina	Gen, Str, Lzd, Tgc, Nit	Amp, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 14	Swab retal	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 15	Swab retal	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 16	Swab retal	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 17	Swab retal	Str, Lzd, Tgc	Amp, Gen, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 18	Líquido abdominal	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 19	Swab retal	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 20	Urina	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 21	Swab retal	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 22	Urina	Gen, Lzd, Tgc	Amp, Str, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 23	Urina	Str, Lzd, Tgc	Amp, Gen, Lvx, Ery, Tec, Van, Nit	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 24	Swab retal	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 25	Urina	Gen, Lzd, Tgc	Amp, Str, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 26	Swab retal	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 27	Swab retal	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 28	Urina	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 29	Swab retal	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lvx, Ery, Tec, Van, Nit	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 30	Fezes	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 31	Urina	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 32	Urina	Str, Lzd, Tgc	Amp, Gen, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 33	Swab retal	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lvx, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecium</i> 34	Swab retal	Gen, Str, Lzd, Tgc	Amp, Lxt, Ery, Tec, Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	Fluído peritonial	-	Van	Resistência ao glicopeptídeo Van A
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Urina	-	Nenhuma	-

Ampicilina; Clin- clindamicina; Dap-daptomicina; eritromicina; Gengentamicina; Lzd-linezolid; Lvx- levofloxacina; Nit- nitrofurantoína; Estreptomicina; Sxt-trimetoprim-sulfametoxazol; Tecicoplanina; Tgc-tigeciclina; Van- vancomicina

Tabela 2 Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) de ácido nalidíxico, dexametasona e diclofenaco sozinhos, CIM da combinação (teste checkboard) entre ácido nalidíxico/dexametasona e ácido nalidíxico/diclofenaco frente a isolados clínicos multirresistentes (MDR) e cepas ATCC, índice de concentração inibitória fracionada (FICI) e interação

Cepas	CIM do ácido nalidíxico (NA)	CIM da dexametasona (DX)	Combinação DX/NA	FICI e interação	CIM do diclofenaco (DC)	Combinação DC/NA	FICI e interação
<i>E. faecalis</i> 1	1024	1024	1/256	0,25(S)	1024	2/128	0,12(S)
<i>E. faecium</i> 2	256	512	4/64	0,26(S)	512	8/64	0,26(S)
<i>E. faecium</i> 3	2048	512	0,5/64	0,03(S)	512	1/128	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 4	1024	512	0,5/64	0,06(S)	512	1/16	0,02(S)
<i>E. faecium</i> 5	2048	512	1/64	0,03(S)	512	2/64	0,03(S)
<i>E. faecium</i> 6	2048	1024	0,5/128	0,06(S)	1024	1/64	0,03(S)
<i>E. faecium</i> 7	256	512	1/16	0,06(S)	512	2/128	0,51(NI)
<i>E. faecium</i> 8	2048	1024	2/128	0,06(S)	1024	1/256	0,12(S)
<i>E. faecium</i> 9	1024	256	4/64	0,08(S)	256	8/64	0,10(S)
<i>E. faecium</i> 10	1024	1024	0,5/32	0,03(S)	1024	1/128	0,12(S)
<i>E. faecium</i> 11	1024	512	0,5/16	0,01(S)	512	1/16	0,02(S)
<i>E. faecium</i> 12	1024	512	0,5/64	0,06(S)	512	1/64	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 13	32	512	0,5/32	1,01 (I)	512	1/128	4,01(A)
<i>E. faecium</i> 14	1024	512	0,5/64	0,06(S)	512	1/128	0,12(S)
<i>E. faecium</i> 15	2048	512	0,5 /32	0,01(S)	512	1/64	0,03(S)
<i>E. faecium</i> 16	2048	512	0,5/256	0,12(S)	512	1/128	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 17	128	512	0,5/128	1,01(NI)	512	1/128	1,01(NI)
<i>E. faecium</i> 18	256	1024	0,5/16	0,06(S)	1024	1/64	0,25(S)
<i>E. faecium</i> 19	1024	512	0,5/128	0,12(S)	512	1/32	0,03(S)
<i>E. faecium</i> 20	1024	512	0,5/128	0,12(S)	512	1/128	0,12(S)
<i>E. faecium</i> 21	2048	512	0,5/256	0,12(S)	512	1/128	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 22	1024	1024	0,5/128	0,12(S)	1024	1/128	0,12(S)
<i>E. faecium</i> 23	1024	1024	0,5/128	0,12(S)	1024	1/128	0,12(S)
<i>E. faecium</i> 24	2048	1024	0,5/128	0,06(S)	1024	1/128	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 25	1024	1024	0,5/256	0,25(S)	1024	1/128	0,12(S)
<i>E. faecium</i> 26	1024	1024	0,5/256	0,25(S)	1024	1/128	0,12(S)
<i>E. faecium</i> 27	2048	1024	0,5/32	0,02(S)	1024	1/128	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 28	1024	512	0,5/32	0,03(S)	512	1/16	0,02(S)
<i>E. faecium</i> 29	2048	512	0,5/256	0,12(S)	512	1/256	0,12(S)
<i>E. faecium</i> 30	2048	512	0,5/256	0,12(S)	512	1/256	0,12(S)
<i>E. faecium</i> 31	2048	512	0,5/256	0,12(S)	512	1/256	0,12(S)
<i>E. faecium</i> 32	2048	512	0,5/256	0,12(S)	512	1/256	0,12(S)

<i>E. faecium</i> 33	1024	1024	0,5/128	0,12(S)	1024	1/64	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 34	1024	1024	0,5/16	0,01(S)	1024	1/64	0,06(S)
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	2048	512	4/256	0,13(S)	2048	8/128	0,07(S)
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	4096	1024	0,5/256	0,06(S)	2048	1/256	0,06(S)

A interação pode ser interpretada como sinérgica (S) (FICI  $\leq$  0,5), sem interação (NI) (FICI  $>$  0,5 e  $\leq$  4,0) e antagônica (A) (FICI  $>$  4,0). As CIM são expressas em  $\mu\text{g mL}^{-1}$

Tabela 3 Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) de ciprofloxacino, dexametasona e diclofenaco sozinhos, CIM da combinação (teste checkboard) entre ciprofloxacino/dexametasona e ciprofloxacino/diclofenaco frente a isolados clínicos multirresistentes (MDR) e cepas ATCC, índice de concentração inibitória fracionada (FICI) e interação

Cepas	CIM ciprofloxacino (CIP)	CIM dexametasona (DX)	Combinação DX/CIP	FICI e interação	CIM diclofenaco (DC)	Combinação DC/CIP	FICI e interação
<i>E. faecalis</i> 1	256	1024	1/4	0,02(S)	1024	2/16	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 2	128	512	4/32	0,26(S)	512	8/32	0,26(S)
<i>E. faecium</i> 3	64	512	0,5/16	0,25(S)	512	1/16	0,25(S)
<i>E. faecium</i> 4	256	512	0,5/16	0,06(S)	512	1/8	0,03(S)
<i>E. faecium</i> 5	512	512	1/16	0,03(S)	512	16/8	0,05(S)
<i>E. faecium</i> 6	512	1024	0,5/16	0,03(S)	1024	1/32	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 7	256	512	1/8	0,03(S)	512	2/16	0,07(S)
<i>E. faecium</i> 8	256	1024	16/32	0,14(S)	1024	2/16	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 9	256	256	4/32	0,14(S)	256	8/32	0,16(S)
<i>E. faecium</i> 10	1024	1024	0,5/16	0,02(S)	1024	1/32	0,03(S)
<i>E. faecium</i> 11	256	512	0,5/16	0,06(S)	512	2/16	0,07(S)
<i>E. faecium</i> 12	64	512	0,5/32	0,51(NI)	512	1/32	0,51(NI)
<i>E. faecium</i> 13	32	512	0,5/4	0,51(NI)	512	1/4	0,13(S)
<i>E. faecium</i> 14	128	512	0,5/16	0,13(S)	512	1/16	0,13(S)
<i>E. faecium</i> 15	64	512	0,5/16	0,25(S)	512	1/16	0,25(S)
<i>E. faecium</i> 16	64	512	0,5/16	0,25(S)	512	1/8	0,13(S)
<i>E. faecium</i> 17	128	512	0,5/16	0,06(S)	512	1/8	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 18	256	1024	0,5/8	0,06(S)	1024	1/16	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 19	512	512	0,5/16	0,03(S)	512	1/16	0,03(S)
<i>E. faecium</i> 20	64	512	0,5/16	0,25(S)	512	1/16	0,25(S)
<i>E. faecium</i> 21	512	512	0,5/16	0,03(S)	512	1/16	0,03(S)
<i>E. faecium</i> 22	128	1024	0,5/16	0,12(S)	1024	1/8	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 23	256	1024	0,5/16	0,06(S)	1024	1/8	0,03(S)
<i>E. faecium</i> 24	256	1024	0,5/16	0,06(S)	1024	1/16	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 25	128	1024	0,5/16	0,12(S)	1024	1/16	0,13(S)

<i>E. faecium</i> 26	256	1024	0,5/16	0,06(S)	1024	4/8	0,04(S)
<i>E. faecium</i> 27	128	1024	0,5/16	0,12(S)	1024	1/16	0,13(S)
<i>E. faecium</i> 28	128	512	0,5/16	0,13(S)	512	1/8	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 29	128	512	0,5/16	0,13(S)	512	1/16	0,13(S)
<i>E. faecium</i> 30	256	512	0,5/32	0,13(S)	512	1/16	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 31	128	512	2/32	0,25(S)	512	1/16	0,13(S)
<i>E. faecium</i> 32	128	512	0,5/32	0,25(S)	512	1/32	0,25(S)
<i>E. faecium</i> 33	128	1024	0,5/16	0,12(S)	1024	1/16	0,13(S)
<i>E. faecium</i> 34	128	1024	0,5/128	1,01(NI)	1024	1/16	0,13(S)
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	256	512	4/2	0,015(S)	2048	8/2	0,01 (S)
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	2	1024	0,5/8	4,00(A)	2048	1/8	4,01(A)

A interação pode ser interpretada como sinérgica (S) (FICI  $\leq$  0,5), sem interação (NI) (FICI  $>$  0,5 e  $\leq$  4,0) e antagonista (A) (FICI  $>$  4,0). As CIM são expressas em  $\mu\text{g mL}^{-1}$

Tabela 4 Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) de vancomicina, dexametasona e diclofenaco sozinhos, CIM da combinação (teste checkboard) entre vancomicina/dexametasona e vancomicina/diclofenaco frente a isolados clínicos multirresistentes (MDR) e cepas ATCC, índice de concentração inibitória fracionada (FICI) e interação

Cepas	CIM vancomicina (VA)	CIM dexametasona (DX)	Combinação DX/VA	FICI e interação	CIM diclofenaco (DC)	Combinação DC/VA	FICI e interação
<i>E. faecalis</i> 1	1024	1024	1/16	0,01(S)	1024	2/16	0,02(S)
<i>E. faecium</i> 2	256	512	4/32	0,13(S)	512	8/32	0,14(S)
<i>E. faecium</i> 3	1024	512	0,5/16	0,02(S)	512	1/32	0,03(S)
<i>E. faecium</i> 4	512	512	0,5/16	0,03(S)	512	1/32	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 5	512	512	1/8	0,02(S)	512	2/16	0,04(S)
<i>E. faecium</i> 6	1024	1024	0,5/128	0,12(S)	1024	2/32	0,03(S)
<i>E. faecium</i> 7	256	512	1/16	0,06(S)	512	2/8	0,04(S)
<i>E. faecium</i> 8	256	1024	2/16	0,06(S)	1024	1/32	0,13(S)
<i>E. faecium</i> 9	128	256	4/32	0,27(S)	256	8/8	0,09(S)
<i>E. faecium</i> 10	256	1024	0,5/16	0,06(S)	1024	1/64	0,25(S)
<i>E. faecium</i> 11	256	512	0,5/32	0,13(S)	512	1/16	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 12	512	512	0,5/32	0,06(S)	512	64/64	0,25(S)
<i>E. faecium</i> 13	1024	512	0,5/32	0,03(S)	512	1/32	0,03(S)
<i>E. faecium</i> 14	512	512	0,5/32	0,06(S)	512	1/16	0,03(S)
<i>E. faecium</i> 15	256	512	0,5/32	0,13(S)	512	1/32	0,13(S)
<i>E. faecium</i> 16	1024	512	0,5/64	0,06(S)	512	1/32	0,03(S)
<i>E. faecium</i> 17	256	512	0,5/32	0,13(S)	512	1/64	0,25(S)
<i>E. faecium</i> 18	1024	1024	0,5/16	0,02(S)	1024	1/16	0,11(S)
<i>E. faecium</i> 19	256	512	8/32	0,14(S)	512	1/32	0,13(S)

<i>E. faecium</i> 20	1024	512	0,5/32	0,03(S)	512	1/64	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 21	512	512	0,5/32	0,06(S)	512	1/32	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 22	256	1024	0,5/64	0,25(S)	1024	1/32	0,13(S)
<i>E. faecium</i> 23	512	1024	0,5/64	0,13(S)	1024	1/128	0,25(S)
<i>E. faecium</i> 24	256	1024	0,5/32	0,13(S)	1024	1/64	0,25(S)
<i>E. faecium</i> 25	1024	1024	0,5/32	0,03(S)	1024	1/64	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 26	512	1024	8/32	0,07(S)	1024	1/64	0,13(S)
<i>E. faecium</i> 27	256	1024	0,5/16	0,06(S)	1024	1/32	0,13(S)
<i>E. faecium</i> 28	256	512	0,5/8	0,03(S)	512	1/8	0,03(S)
<i>E. faecium</i> 29	256	512	4/32	0,13(S)	512	1/64	0,25(S)
<i>E. faecium</i> 30	256	512	0,5/64	0,25(S)	512	2/16	0,07(S)
<i>E. faecium</i> 31	256	512	0,5/64	0,25(S)	512	1/64	0,25(S)
<i>E. faecium</i> 32	128	512	2/32	0,25(S)	512	2/32	0,25(S)
<i>E. faecium</i> 33	1024	1024	0,5/64	0,06(S)	1024	1/64	0,06(S)
<i>E. faecium</i> 34	1024	1024	0,5/64	0,06(S)	1024	1/64	0,06(S)
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	256	512	4/2	0,01(S)	2048	8/128	0,50(A)
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1	1024	0,5/32	32,00(A)	2048	1/32	32,00(A)

A interação pode ser interpretada como sinérgica (S) ( $FICI \leq 0,5$ ), sem interação (NI) ( $FICI > 0,5$  e  $\leq 4,0$ ) e antagônica (A) ( $FICI > 4,0$ ). As CIM são expressas em  $\mu\text{g mL}^{-1}$

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho foram evidenciadas as vantagens que o método de redirecionamento de fármacos possui quando comparado com o método tradicional de desenvolvimento de uma nova droga, o que ganhou ainda maior importância frente ao cenário pandêmico da Covid-19. No manuscrito intitulado “Avaliação da atividade antibacteriana de dexametasona e diclofenaco sódico e efeito sinérgico com antibióticos frente a isolados clínicos de *Enterococcus* spp.”, foi relatado que a dexametasona e diclofenaco injetáveis apresentaram atividade antibacteriana frente as cepas de *Enterococcus* spp. padrão ATCC e isolados clínicos MDR testados. Esse fato ratifica o que foi demonstrado em outros estudos, embora ainda haja divergência na concentração dos medicamentos não antibióticos capazes de apresentar o efeito antibacteriano.

Quando esses medicamentos foram utilizados em conjunto com os antimicrobianos padrões ácido nalidíxico, ciprofloxacino e vancomicina foi possível observar uma redução considerável da concentração inibitória mínima nas concentrações tanto do medicamento não antibiótico como dos antimicrobianos ensaiados neste estudo. O resultado foi o sinergismo frente a maior parte dos isolados e cepas ATCC para as seis combinações. Esses resultados estão de acordo com outros estudos que afirmam ser a associação de não-antibióticos com antibacterianos vantajosa, pois aumentam a atividade antibacteriana dos compostos diminuindo sua dose. Estas características revertem na diminuição do surgimento da resistência bacteriana, além de tornarem-se alternativas viáveis para o tratamento de infecções bacterianas hospitalares graves de pacientes internados em unidades críticas, pois esses medicamentos já se encontram em uso clínico (BROWN, 2015).

Os resultados desse estudo demonstram que o redirecionamento de fármacos é uma alternativa promissora no tratamento de infecções bacterianas provocadas por microrganismos MDR, principalmente quando há a associação de não-antibióticos com antibacterianos.

## REFERÊNCIAS

ABRAMOWICZ, M. et al. A 4-drug combination (Viekira Pak) for hepatitis. **C. JAMA**, v. 313, p. 1857–1858, 2015.

AFKAN S., et al. Clinical Evaluation of Dexamethasone Pills on Side Effects of Mandibular Third Molars Surgery. **Journal of Research in Medical and Dental Science**, n. 1, v. 6, p. 98-106, 2018.

AGUILAR-LIRA, G.Y. et al. Artificial neural network for the voltamperometric quantification of diclofenac in presence of other nonsteroidal antiinflammatory drugs and some commercial excipients, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 801, p. 527-535, 2017.

AHMED, M. E. Z., et al. Comparative Clinical Study of Local Submucosal Corticosteroid Versus Diclofenac Sodium Injections Before Odontectomy of Mandibular Impacted Third Molar. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, n. 1, v. 4, p. 19-24, 2018.

AKOVA, M. Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. **Virulence**. n. 3, v. 7, p. 252-266, 2016.

ALEM, M.A.S.; DOUGLAS, L.J. Effects of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms and planktonic cells of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 41–47, 2004.

AL-DAJANI, M. Can preoperative intramuscular singledose dexamethasone improve patient-centered outcomes following third molar surgery? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, n. 8, v. 75, p. 1616-26, 2017.

ALMEIDA, R. A.C., et al. Efficacy of corticosteroids versus placebo in impacted third molar surgery: systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, n. 1, v. 48, p. 18-31, 2018.

ALTMAN R., et al., Development: Evolution of Diclofenac Products Using Pharmaceutical Technology. **Evolution of Diclofenac Drug Products**, 2015.

ANNADURAI, S., et al. Antibacterial activity of the antiinflammatory agent Diclofenac sodium. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 36, p. 86–90 1998.

ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 673- 683, 2004.

BEGANOVIC, M., et al. A review of combination antimicrobial therapy for *Enterococcus faecalis* blood stream infections and infective endocarditis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, p. 303-309, 2018.

BROWN, D. Antibiotic Resistance Breakers: Can Repurposed Drugs Fill the Antibiotic Discovery Void? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 12, p. 821-232, 2015.

CHAN EWL, et al. Synergistic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on antibacterial activity of cefuroxime and chloramphenicol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 10p. 70-74, 2017.

COX, M.J., et al. Co-infections: potentially lethal and unexplored in COVID-19. **The Lancet Microbe**, n. 1, v. 1, p. e11, 2020.

CROUZET, E., et al. Immunosuppression by a subconjunctival implant releasing dexamethasone in a rabbit model of penetrating keratoplasty. **British Journal of Ophthalmology**, v. 102, p. 692-699, 2018.

CSERMELY, P. et al., The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, p. 178–182, 2015.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, n. 3, v. 74, p. 417 - 33, 2010.

DUTTA, N. K. et al. Anti-inflammatory drug diclofenac retains anti-listerial activity in vivo. **Letters in Applied Microbiology**, n. 2, v. 47, p. 106-111, 2008.

EJIM, L. et al. Coombes B. K., Mike Tyers M. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. **Nature Chemical Biology**, v. 7, p. 348-350, 2011.

EMGARD, P.; HELLSTRO, M. S. A group III steroid solution without antibiotic components: an effective cure for external otitis. **The Journal of Laryngology & Otology**, n. 5, v. 119, p. 342-347, 2005.

EMGARD, P.; HELLSTRO, M. S. External otitis caused by infection with *Pseudomonas aeruginosa* or *Candida albicans* cured by use of a topical group III steroid, without any antibiotics. **Acta Otorrinolaringologica**, n. 4, v. 125, p. 346-352, 2005.

European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), 2017.

FOLETTTO, V. S., et al. Repositioning of fluoxetine and paroxetine: study of potential antibacterial activity and its combination with ciprofloxacin. **Medicinal Chemistry Research**, v. 29, p. 556-553, 2020.

FOLETTTO, V. S., et al. Repositioning of antidepressant drugs and synergistic effect with ciprofloxacin against multidrug-resistant bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. n. 3, v. 19, p. 37-53, 2021.

GAJDÁCS, M., SPENGLER G. The Role of Drug Repurposing in the Development of Novel Antimicrobial Drugs: Non-Antibiotic Pharmacological Agents as Quorum Sensing-Inhibitors. **Antibiotics (Basel)**, n. 4, v. 8, p. 270, 2019.

GONZÁLES, P. R., et al. Synergistic, collaterally sensitive  $\beta$ -lactam combinations suppress resistance in MRSA. **Nature Chemical Biology**, v. 11, p. 855-61, 2015.

HADERA, M., et al. Study on Antimicrobial Potential of Selected Non-antibiotics and its Interaction with Conventional Antibiotics. **UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2018.

HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72-80, 2019.

JIN, G., Wong S. Toward better drug repositioning: prioritizing and integrating existing methods into efficient pipelines. **Drug Discovery Today**, v. 19, p. 637–644, 2014.

KALAIVANI, P. et al. DNA, protein binding, cytotoxicity, cellular uptake and antibacterial activities of new palladium(II) complexes of thiosemicarbazone ligands: effects of substitution on biological activity. **Metallomics**, v. 4, n. 1, p.101-113, 2012.

KAUR, I. Novel Strategies to Combat Antimicrobial Resistance. **Journal of Infectious Diseases and Therapy**, v. 4, n. 4, 2016.

KOÇER, G., et al., Effect of the route of administration of methylprednisolone on oedema and trismus in impacted lower third molar surgery. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, n. 5, v. 43, p. 639-643, 2014.

MAZUMDAR, K. et al. The anti-inflammatory nonantibiotic helper compound diclofenac: an antibacterial drug. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, n. 8, v. 28, p. 81-91, 2009.

MCGETTIGAN P.; HENRY, D. Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs that elevate cardiovascular risk: an examination of sales and essential medicines lists in low-, middle-, and high-income countries. **PLoS Medicine**, n. 2, v. 10, e.1001388, 2013.

MEHNDIRATTA, M. M. et al. Drug repositioning, **International Journal of Epilepsy**, v. 3, p. 91–94, 2016.

MUNOZ-BELLIDO, J. L.; MUNOZ-CRIADO, S.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, J.A. Antimicrobial activity of psychotropic drugs Selective serotonin reuptake inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, p. 177-180, 2000.

NADEEM, S. F. Et al. Antimicrobial resistance: more than 70 years of war between humans and bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, n. 5, v. 46, p. 578-599, 2020.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Determining Bactericidal Activity of antimicrobial agents. Approved Guideline M26-A. Wayne, USA: NCCLS; 1999.

NEHER, A. Antimicrobial Activity of Dexamethasone and Its Combination With N-Chlorotaurine. **Archives of Head and Neck Surgery**, n. 6, v. 134, p. 615-620, 2008.

NOSENGO, N. Can you teach old drugs new tricks?. **Nature**, v. 534, p. 314-316, 2016.

OLIVEIRA, A. C.; OLIVEIRA DE PAULA, A.; ROCHA, R.F. Costs of antimicrobial treatment in patients with infection. **Avances en enfermería**, n. 3, v. 33, p. 352-361, 2015.

OLIVEIRA, I. M., et al. Repurposing ibuprofen to control *Staphylococcus aureus* biofilms. **European Journal of Medicinal Chemistry**, n. 15, v. 166, p. 197-205, 2019.

O'NEILL. Securing new Drugs for Future Generations: The Pipeline of Antibiotics. **The Review on Antimicrobial Resistance**, p. 151-153, 2015.

OTTO, R. G., et al. An alternative strategy for combination therapy: Interactions between polymyxin B and non-antibiotics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, p. 34-39, 2019.

PADMA, R.; YALAVARTHY, P.D. Screening of Diclofenac for Antibacterial activity against Pathogenic Microorganisms. **IJAPBC**. n. 3, v. 4, p. 554-55, 2015.

PALIT, P.; MANDAL, S. C.; MANDAL, N.B. Reuse of old, Existing, Marketed Non-antibiotic Drugs as Antimicrobial Agents: a New Emerging Therapeutic Approach. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. **Formatex**, 2013.

PLOTZ, P. H.; DAVIS, B. D. Synergism between streptomycin and penicillin – a proposed mechanism. **Science**, v. 135, p. 1067-1068, 1962.

PRADO, G. et al., Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* strains and effects of human serum albumin, ibuprofen, N - acetyl- L-cysteine, amoxicillin, erythromycin, and levofloxacin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 67, p. 311-318, 2010.

RAMPELOTTO, R. F. et al. Synergistic antibacterial effect of statins with the complex {[1-(4-bromophenyl)-3-phenyltriazene N3-oxide-κ2 N1, O4] (dimethylbenzylamine-κ2 C1, N4)palladium(II)}. **Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 2, p. e17369, 2018.

RANA, M. S., et al. Potential impact of COVID-19 pandemic on escalating antimicrobial resistance in Pakistan. **Journal of Infection**, n. 3, v. 83, p. e12-e13, 2021.

RAZA, T., et al., Vancomycin resistant Enterococci: A brief review. **Journal Of Pakistan Medical Association**, n. 5, v. 68, p. 768-772, 2018.

REMMELTS, H. H. F., et al. Addition of Vitamin D Status to Prognostic Scores Improves the Prediction of Outcome in Community-Acquired Pneumonia. **Clinical Infectious Diseases**, n. 11, v. 55, p. 1488-1494, 2012.

RHEN, T., CIDLOWSKI, J. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. **The New England Journal of Medicine**, n. 16, v. 353, p. 1711-23, 2005.

RICE, J. B., et al. Long-term Systemic Corticosteroid Exposure: A Systematic Literature Review. **Clinical Therapeutics**, n. 11, v. 39, p. 2216-2229, 2017.

- ROCHA-NETO, A. M., et al. Application of Dexamethasone in the Masseter Muscle During the Surgical Removal of Lower Third Molars. **Journal of Craniofacial Surgery**, n. 1, v. 28, p. e43-e47, 2017.
- ROSEN, C. M. CORTICOSTEROIDS. **Pediatrics In Review**, n. 10, v. 40, p. 546-548, 2019.
- ROSA, T. F., et al. Repurposing of escitalopram oxalate and clonazepam in combination with ciprofloxacin and sulfamethoxazole/trimethoprim for treatment of multidrug-resistant microorganisms and evaluation of the cleavage capacity of plasmid DNA. **Canadian Journal of Microbiology**, 2021.
- SALEM, M. et. al. Antibacterial Effect of Diclofenac Sodium on Enterococcus faecalis, **Journal of Dentistry**, n. 1, v. 10, 2013.
- SANTOS, S.O.; LA ROCCA, S.M.; HÖRNER, R. Colistin resistance in non-fermenting Gram-negative bacilli in a university hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, n. 6, v. 20, p. 64-650, 2016.
- SERAFIN, M. B.; HÖRNER, R. Drug repositioning, a new alternative in infectious Diseases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, n. 3, v. 22, p. 252-256, abr., 2018.
- TROIANO, G., et al. Comparison of Two Routes of Administration of Dexamethasone to Reduce the Postoperative Sequelae After Third Molar Surgery: A Systematic Review and Meta-Analysis. **The Open Dentistry Journal**, v. 12, p. 181–8, 2018.
- UKUHOR, H. O. The interrelationships between antimicrobial resistance, COVID-19, past, and future pandemics. **Journal of Infection and Public Health**, n. 1, v. 14, p. 53-60, 2021.
- VOHRA, M., et al. Pharmacogenomic considerations for repurposing of dexamethasone as a potential drug against SARS-CoV-2 infection. **Personalized Medicine**, n. 4, v. 18, p. 389-398, 2021.
- WHO/CDC/ICBDSR. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva: World Health Organization; 2017.
- YADAV, V.; TALWAR, P. Repositioning of fluoroquinolones from antibiotic to anti-cancer agents: An underestimated truth. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 934-946, 2019.
- YIN, Z. et al. DNA replication is the target for the antibacterial effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Chemical Biology**, v. 21, p. 481-487, 2014.
- WANG, W. H. et al. Aspirin inhibits the growth of Helicobacter pylori and enhances its susceptibility to antimicrobial agents. **Gut**, v. 52, p. 490-495, 2003.
- ZHANEL, G. et al. Ceftazidime–avibactam: a novel cephalosporin /betalactamasen inhibitor combination. **Drugs**, v. 73, p. 159-177, 2013.

ZHENG, W.; SUN, W.; SIMEONOV, A. Drug repurposing screens and synergistic drug combinations for infectious diseases. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, p. 181-191, 2018.

ZILBERBERG, M. D., et al. Multi-drug resistance, inappropriate initial antibiotic therapy and mortality in Gram-negative severe sepsis and septic shock: a retrospective cohort study. **Critical Care Medicine**, n. 6, v. 18, p. 596, 2014.

