

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CITOTÓXICA DE
COMPOSTOS DE TIOSSULFONATOS**

Pedro Henrique Flores da Cruz

Pedro Henrique Flores da Cruz

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CITOTÓXICA DE
COMPOSTOS DE TIOSSULFONATOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas para obtenção do título de Mestre em Ciências (bioquímica e bioprospecção).

Orientadora: Dra. Janice Luehring Giongo

Coorientador: Dr. Rodrigo de Almeida Vaucher

Pelotas, 2025

Ficha catalográfica

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

C955a Cruz, Pedro Henrique Flores da

Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica de compostos de tiosulfonatos [recurso eletrônico] / Pedro Henrique Flores da Cruz ; Janice Luehring Glongo, orientadora ; Rodrigo de Almeida Vaucher, coorientador. — Pelotas, 2025.
98 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2025.

1. Tiosulfonatos. 2. Antimicrobianos sintéticos. 3. Resistência bacteriana. 4. Isolados clínicos multiresistentes. 5. Citotoxicidade. I. Glongo, Janice Luehring, orient. II. Vaucher, Rodrigo de Almeida, coorient. III. Título.

CDD 615.19

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Ficha de aprovação

Pedro Henrique Flores da Cruz

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CITOTÓXICA DE COMPOSTOS DE TIOSSULFONATOS

Dissertação aprovada como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas.

Data de Defesa: 04/07/2025

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr^a. Janice Luehring Giongo- UFRGS

.....
Prof. Dr. Rafael Lund- UFPel



Documento assinado digitalmente
CLOVIS MOREIRA JUNIOR
Data: 18/07/2025 16:10:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

.....
Prof. Dr. Clóvis Moreira Junior- UFPel

Resumo

CRUZ, Pedro Henrique Flores da. Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica de compostos de tiosulfonatos. Orientadora: Dra Janice Luehring Giongo. 2025. 99f. Dissertação (mestrado em Bioquímica e Bioprospecção)- Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2025.

A resistência bacteriana representa um dos principais desafios da saúde pública global, impulsionando a busca por novas moléculas com atividade antimicrobiana. Neste trabalho, sete tiosulfonatos sintéticos foram sintetizados, caracterizados por técnicas espectroscópicas (RMN de ^1H e ^{13}C , EMAR), e avaliados quanto às suas atividades antibacteriana e citotóxica. As moléculas 4-MBMT, 4-MBET e 4-MBAT destacaram-se pelos melhores resultados nos ensaios de disco de difusão, MIC e MBC, inibindo cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo isolados clínicos multirresistentes (*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*). Os valores de MIC variaram de 0,093 a 0,744 mg/mL, enquanto as MBCs confirmaram o efeito bactericida. O ensaio de curva de morte demonstrou ação rápida e eficiente, eliminando colônias bacterianas em até 6 horas nas maiores concentrações testadas. Para avaliar a segurança biológica, foram realizados ensaios hemolíticos e de citotoxicidade (MTT e vermelho neutro). Os tiosulfonatos não apresentaram hemólise significativa em nenhuma das concentrações testadas, indicando baixa toxicidade frente a hemácias. No ensaio de MTT, os valores de IC_{50} foram de 0,0784 mg/mL (4-MBAT), 0,0218 mg/mL (4-MBET) e 0,0207 mg/mL (4-MBMT), enquanto no ensaio de captação do vermelho neutro os valores encontrados foram de 0,097 mg/mL, 0,022 mg/mL e 0,0075 mg/mL, respectivamente. Apesar da citotoxicidade ocorrer em concentrações próximas às antimicrobianas, os compostos demonstraram potencial relevante como candidatos a novos agentes terapêuticos, especialmente frente à crise da resistência bacteriana. Este estudo é pioneiro na aplicação do ensaio do vermelho neutro para a classe dos tiosulfonatos e destaca a importância de estratégias de formulação para mitigar a toxicidade observada in vitro. Os resultados obtidos reforçam a

relevância desses compostos como estruturas promissoras na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos.

Palavras-chave: tiosulfonatos, antimicrobianos sintéticos, resistência bacteriana, isolados clínicos multiresistentes, citotoxicidade.

Abstract

CRUZ, Pedro Henrique Flores da. *Evaluation of the antibacterial and cytotoxic activity of thiosulfonate compounds.* 2025. 99 f. Dissertation (Master's in Biochemistry and Bioprospecting) – Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2025. Advisor: Dr. Janice Luehring Giongo.

Bacterial resistance is one of the most pressing challenges in global public health, driving the search for new molecules with antimicrobial potential. In this study, seven synthetic thiosulfonates were synthesized, structurally characterized by spectroscopic techniques (^1H and ^{13}C NMR, HRMS), and evaluated for their antibacterial and cytotoxic activities. The compounds 4-MBMT, 4-MBET, and 4-MBAT showed the most promising results in disk diffusion, MIC, and MBC assays, effectively inhibiting both Gram-positive and Gram-negative bacterial strains, including multidrug-resistant clinical isolates (*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, and *A. baumannii*). MIC values ranged from 0.093 to 0.744 mg/mL, and MBC data confirmed the bactericidal effect. Time-kill assays demonstrated rapid and efficient bacterial elimination, with complete colony reduction within 6 hours at the highest tested concentrations. To assess biological safety, hemolysis and cytotoxicity assays (MTT and neutral red uptake) were performed. None of the compounds caused significant hemolysis at any concentration, indicating low toxicity toward erythrocytes. In MTT assays, the IC_{50} values were 0.0784 mg/mL (4-MBAT), 0.0218 mg/mL (4-MBET), and 0.0207 mg/mL (4-MBMT). In the neutral red assay, the IC_{50} values were 0.097 mg/mL, 0.022 mg/mL, and 0.0075 mg/mL, respectively. Although cytotoxicity was observed at concentrations close to those required for antimicrobial activity, the findings support the potential of these molecules as candidates for therapeutic development, especially in the context of increasing bacterial resistance. This study is the first to report the use of the neutral red assay in the evaluation of thiosulfonates and emphasizes the need for formulation strategies to reduce cytotoxicity. The results highlight thiosulfonates as promising structures for the development of new antimicrobial agents.

Keywords: Thiosulfonates; Synthetic antimicrobials; Bacterial resistance; Multidrug-resistant clinical isolates; Cytotoxicity.

Lista de Figuras

Figura 1 - Classificação de necessidade de novos antimicrobianos	19
Figura 2 - Mecanismo ESKAPE de resistência a antibióticos.	22
Figura 3 - Descoberta e Introdução de antimicrobianos	26
Figura 4 - Grupos de antibióticos em função do seu mecanismo de ação.....	27
Figura 5 - Mecanismo de ação de antimicrobianos que afetam a parede celular	28
Figura 6 - Mecanismo dos antimicrobianos que afetam membranas.....	30
Figura 7 - Mecanismo das fluoroquinolonas	31
Figura 8 - Mecanismo de ação das tetraciclinas.....	32
Figura 9 - Mecanismo de ação aminoglicosídeos.....	33
Figura 10 - Mecanismos de ação dos MLSB	34
Figura 11 - Mecanismo de ação das sulfas e do trimetoprim.....	35
Figura 12 - Tioissulfinato (A esquerda) Tioissulfonato (A direita)	40

Lista de abreviaturas

BM	Banco Mundial
DHFR	Di-Hidrofolato Redutase
DHPPP	7,8-Di-Hidro-6-Hidroximetilpterina Pirofosfato
DHPS	Di-Hidropteroato Sintase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ESBL	Beta-Lactamases de Espectro Estendido
EU	União Européia
FDA	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos
FMI	Fundo Monetário Internacional
FMT	Transplante de Microbiota Fecal
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho
HPLC	Cromatografia de Líquida de Alta Eficiência
KPC	<i>Klebsiella</i> Produtora de Carbapenemases
LDH	Lactato Desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
MBC	Concentração Bactericida Mínima
MDR	Multidrogas Resistente
MFC	Concentração Fungicida Mínima
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MLSB	Macrolídeos, Lincosamida, Streptograminas B
MPE	Matriz Polimérica Extra Celular
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina
MS	Espectometria de Massas
MTT	Sal de Tetrazólio
NADH	Nicotina Adenina Dinucleotídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PABA	Ácido Para-Aminobenzóico

Para-CH ₃	Para metil tiosulfonato
Para-Cl	Para Cloro tiosulfonato
PBP	Proteínas de Ligação da Penicilina
PTSO	Propil-Propano-Tiosulfonato
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
USA	Estados Unidos da América
VN	Vermelho Neutro
VRE	Enterococcus Resistente a Vancomicina
XRD	Difração de Raios X
4-MBAT	4-Metil Benzeno Alila Tiosulfonato
4-MBET	4-Metil Benzeno Etil Tiosulfonato
4-MBMT	4-Metil Benzeno Metila Tiosulfonato
4-MBPT	4-Metil Benzeno Propil Tiosulfonato
4-MBSBT	4-Metil Benzeno Sec-Butil Tiosulfonato

Sumário

1. Introdução	13
2. Objetivos.	16
2.1 Objetivo Geral.	16
2.2 Objetivos Específicos.	16
3. Revisão Bibliográfica	17
3.1 Resistência Microbiana	17
3.2 Antimicrobianos.....	24
3.3 Desafios na descoberta e desenvolvimento de novos antimicrobianos	33
3.4 Tiosulfonatos.	40
3.5 Citotoxicidade.....	44
4. Manuscrito	46
5. Discussão	82
6. Conclusão	90
7. Referências	91

1.INTRODUÇÃO:

A resistência bacteriana é a capacidade das bactérias de sobreviver e se multiplicar em presença de substâncias que, normalmente, seriam letais para elas. Esse fenômeno ocorre de forma natural como parte dos mecanismos de competição e adaptação das bactérias no ambiente. No entanto, com a descoberta dos antibióticos, sua utilização indiscriminada e inadequada e a revolução médica, ocorrida principalmente, na segunda metade do século XX, as bactérias evoluíram e desenvolveram mecanismos de resistência. Isso resultou na perda de eficácia de muitos antibióticos, o que culminou na emergência de bactérias resistentes a múltiplas drogas (MDR) (HUEMER *et al.* 2020; HERNANDO-AMADO *et al.* 2019).

O problema da resistência bacteriana é um dos maiores desafios do século atual, sendo reconhecido por diversos órgãos internacionais, sendo alguns deles, o Fundo Monetário Internacional (FMI), a Organização Mundial da Saúde (OMS), O Banco Mundial (BM). Todos reforçam que, conforme apontado pela ciência atual, esse não é um problema que será resolvido apenas nas unidades de saúde, mas que exige uma abordagem integrada, que envolva as esferas humana, veterinária, ambiental, sanitária e agrícola. Entre os principais impactos da resistência bacteriana estão: o aumento da morbimortalidade, os elevados custos com tratamento e hospitalização, a redução da qualidade de vida, o aumento do risco cirúrgico (HUEMER *et al.* 2020, MURRAY *et al.* 2022).

Uma estimativa global do ano de 2019, revelou que cerca de 1,27 milhões de mortes foram causadas por infecções bacterianas resistentes (MURRAY *et al.*,2022). As espécies de bactérias responsáveis por mais óbitos nesse ano foram a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, muitas das quais apresentam resistência a um ou mais antimicrobianos (NAGHAVI, MOHSEN *et al.* 2024). De acordo com a literatura, os principais mecanismos de resistência bacteriana incluem: a capacidade de degradar o fármaco, alteração na estrutura alvo do fármaco,

alteração de permeabilidade de membrana e ou parede celular e uso ou aumento das bombas de efluxo para expelir o antimicrobiano. Além desses mecanismos, recentemente ganharam destaque a formação de biofilme e a utilização de vesículas extracelulares, que anulam as moléculas antimicrobianas, o que tem impulsionado o desenvolvimento de compostos capazes de lidar com essas condições (RATHER *et al.* 2021; JIANG *et al.* 2024).

Para lidar com a resistência bacteriana, diversas estratégias têm sido desenvolvidas, incluindo: a utilização de fármacos em combinação para efeito sinérgico, a pesquisa de moléculas vegetais com potencial antimicrobiano, a aplicação de nanotecnologia em várias formas, como nanocápsulas e nanopolímeros, o desenvolvimento biotecnológico de vacinas e o uso de bacteriófagos, além do estudo de novas moléculas sintéticas, muitas das quais incorporam enxofre (KARAKONSTANTIS *et al.* 2020; LEI *et al.* 2021; PARMANIK *et al.* 2022; BLUME *et al.* 2023; DÍAS-PUERTAS *et al.* 2023; GHOSH *et al.* 2025). As moléculas contendo enxofre que mais se destacam como antimicrobianos são os dissulfetos, os tiossulfinitos e os tiossulfonatos. Esses compostos podem ser encontrados e extraídos da natureza ou sintetizados, permitindo assim, o aprimoramento das moléculas naturais (BLUME *et al.* 2023).

O tiossulfonato é uma classe de moléculas derivadas da oxidação do átomo de enxofre ligado ao oxigênio dos tiossulfinitos. O exemplo mais conhecido dessa classe molecular é a alicina, que se origina no alho recém cortado e que possui uma gama de bioatividades, incluindo a redução do estresse oxidativo, efeito anti-inflamatório e antimicrobiano (XU *et al.* 2022). Os efeitos dessa molécula vêm sendo estudados desde a década de 60 (BLUME *et al.* 2023). Dada a promissora atividade antimicrobiana dessa classe molecular, diversas alternativas começaram a ser investigadas, como o propil-propano-tiossulfonato e a própria alicina de origem natural (XU *et al.* 2022; SORLOZANO-PUERTO *et al.* 2024), além de alternativas sintéticas, como os derivados de quinolina tiossulfonatos e os S-alquil tiossulfonatos (BLUME *et al.* 2023).

A literatura apresenta os tiosulfonatos com várias possíveis aplicações no setor agrícola, alimentício, petrolífero, industrial e farmacêutico, com um maior destaque como antifúngico (LUBENETS *et al.* 2019), além de algumas menções como antimicrobiano, inclusive sendo associados com biosurfactantes (LUBENETS *et al.* 2013; LUBENETS *et al.* 2019; FALCON-PIÑERO *et al.* 2023). No entanto, embora os estudos demonstrem o potencial desses compostos, a ausência de dados robustos sobre os perfis toxicológicos e o mecanismo de ação dos tiosulfonatos reforça a necessidade de estudos sistemáticos que avaliem não apenas sua eficácia contra microrganismos, mas também sua seletividade e segurança em relação a células humanas normais (FALCON-PIÑERO *et al.* 2023; KARKHUT *et al.* 2024). Além disso, o aumento da resistência microbiana a antimicrobianos convencionais torna urgente a busca por novas moléculas bioativas, especialmente aquelas com potencial multifuncional e aplicabilidade em diferentes setores como o farmacêutico, agrícola e alimentício (LUBENETS *et al.*, 2019).

Dessa forma, esse trabalho se justifica pela necessidade científica e estratégica de explorar compostos de tiosulfonatos sintéticos como candidatos antimicrobianos promissores, contribuindo para o avanço do conhecimento na área de química medicinal e microbiologia aplicada. A geração de dados inéditos sobre a eficácia e segurança desses compostos pode subsidiar o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas frente à crise de resistência microbiana, consolidando a relevância deste estudo.

2.OBJETIVOS:

2.1 Objetivo geral:

Caracterizar compostos de tiossulfonatos sintéticos e avaliar suas atividades antimicrobianas e de citotoxicidade.

2.2 Objetivos específicos:

- Sintetizar e caracterizar os compostos de tiossulfonatos;
- Realizar uma triagem com os compostos sintetizados de tiossulfonatos, utilizando bactérias Gram-positivas e Gram-negativas
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos sintetizados de tiossulfonatos.
- Realizar ensaios de citotoxicidade com os compostos que demonstrarem as melhores atividades contra as cepas Gram-positivas e Gram-negativas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

3.1 Resistência microbiana

A segunda metade do séc XX foi chamada de “a era dos antibióticos” e isso permitiu que a medicina tivesse grandes avanços, tornando possíveis procedimentos como transplantes e cirurgias, além de aumentar a sobrevivência pós-parto e permitir o enfrentamento de infecções (Hernando-Amado *et al.* 2019; Huemer *et al.* 2020; Murray *et al.* 2022). Entretanto, esse avanço não impediu o surgimento de diversas cepas bacterianas multirresistentes (MDR), capazes de resistir a diversos tipos de antimicrobianos. Alguns trabalhos já demonstram isso, com os números de morte no ano de 2019, variando de 700.000 até 1,47 milhões, causadas por bactérias MDR. As projeções de 20 milhões de mortes anuais no ano de 2050, custando ao mundo um valor estimado de 2,9 trilhões de dólares (UDDIN *et al.* 2021; MURRAY *et al.* 2022).

Outro ponto preocupante da crise dos antimicrobianos, está no fato de que a indústria farmacêutica vem reduzindo os investimentos em pesquisa e desenvolvimento de antibióticos, devido ao seu alto custo, um baixo retorno em consequência das políticas de quebra de patente e o desenvolvimento acelerado de resistência (Uddin *et al.*, 2021). As bactérias como todos os seres vivos, tendem a colonizar e se reproduzir, para perpetuar a espécie. Entretanto, quando essa necessidade é impedida, como por exemplo, pelos antimicrobianos, mutações tendem a ocorrer, e isso leva ao desenvolvimento de mecanismos que garantem a sobrevivência, e as tornam resistentes aos antimicrobianos (UDDIN *et al.* 2021; HUEMER *et al.* 2020).

Entre as condições que favorecem o desenvolvimento de mutações estão o uso exagerado ou inadequado de antibióticos, a falta de identificação dos patógenos que causam a infecção, o que leva a usar o fármaco errado, a automedicação, as condições precárias de saneamento e higiene e o uso exacerbado de antimicrobianos no meio agropecuário (UDDIN *et al.* 2021; SMITH *et al.* 2023). Os métodos que levam a essa resistência, são pequenas mutações nos genes, que resultam em alterações em enzimas, na parede celular ou nas membranas. Outra forma é a transferência de material genético,

que pode ocorrer através de plasmídeos e através da conjugação, em que utilizando os pílís, as bactérias trocam parte de seu material genético (LEWIS, 2020, UDDIN *et al.* 2021; SMITH *et al.* 2023).

As principais bactérias que têm utilizado desses mecanismos para desenvolver resistência e são um grande problema para a saúde, foram recentemente descritas pela OMS, em ordem de prioridade crítica para pesquisa e desenvolvimento de novas drogas. Conforme apresentado na Figura 1(OMS, 2024). A figura abaixo, que descreve a classificação de necessidade de novos antimicrobianos em relação aos grupos da OMS.

Figura 1 - Classificação de necessidade de novos antimicrobianos



Fonte: OMS, 2024.

Quando se trata de infecções nosocomiais e com alto índice de prevalência e resistência, a OMS definiu o chamado acrônimo ESKAPE, que se referem respectivamente a, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e Enterobacterales (principalmente *Enterobacter spp.* e *Escherichia coli*). Esse grupo impacta negativamente os sistemas de saúde e a economia global, pois estão frequentemente associadas a infecções nosocomiais, além de estarem bem adaptadas ao ambiente hospitalar contemporâneo, uma alta capacidade

de adquirir mecanismos de resistência e a capacidade de se reproduzirem e disseminar clones ao redor do mundo (HUEMER *et al.* 2020; MILLER *et al.* 2024; OMS *et al.* 2024).

Enterococcus faecium é uma bactéria Gram-positiva que normalmente desempenha papel comensal com uma baixa virulência. Entretanto, em ambiente hospitalar é difícil de erradicar, pois sua cepa mais preocupante é resistente a vancomicina (VRE). Na Austrália em 2017, cerca de 47% dos *E. faecium* isolados de hemocultura são VRE. Verificou-se que no mesmo ano, 14,9% das infecções causadas na União Europeia (EU) e 30% nos Estados Unidos da América (USA) foram causadas por cepas VRE. Esses surtos geralmente apresentam longa duração, cerca de 11 meses, e infecções individuais por essa bactéria envolvem um alto custo, pois necessitam de isolamento, cuidados redobrados de higiene, além da utilização de fármacos de segunda linha, com maior toxicidade, menor eficácia e custo elevado, como tigeciclina e daptomicina (HUEMER *et al.* 2020; OLIVEIRA *et al.* 2020).

Staphylococcus aureus é uma bactéria que faz parte da microbiota de diversos animais incluindo o ser humano, onde é encontrado principalmente na pele e nas narinas. As principais infecções causadas por essa bactéria variam desde infecções comunitárias até infecções hospitalares. Na comunidade as principais infecções são na pele, tecidos moles e mais raramente no trato urinário ou respiratório, quando se refere ao ambiente hospitalar, as principais infecções são endocardites, osteomielite, pneumonias e bacteremia (HUEMER *et al.* 2020; OLIVEIRA *et al.* 2020).

Atualmente, um dos maiores problemas enfrentados hoje, é a resistência dessa bactéria as penicilinas, sobretudo a semissintética meticilina. O *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) aparece no ambiente hospitalar, principalmente através da contaminação de jalecos e de objetos pessoais, além das superfícies que os profissionais têm o contato. A prevalência de MRSA nos países é variável, chegando a valores próximos a zero na Islândia e Dinamarca, valores médios de 12 a 15% na Alemanha e França, até valores próximos a 40% em Itália e Portugal. Os medicamentos que são usados como

primeira escolha são: daptomicina, linezolida e o trimetropim-sulfametoxazol. (HUEMER *et al.* 2020; OLIVEIRA *et al.* 2020).

A *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria bacilar Gram-negativa, que nos seres humanos é encontrada no intestino e nas vias respiratórias. As principais infecções são relacionadas ao trato urinário, trato respiratório e em casos mais graves infecções de corrente sanguínea e meningite. As cefalosporinas e carbapenêmicos são as opções mais comuns para tratamento, entretanto essa bactéria apresenta resistência a β -lactâmicos e ainda se mostra capaz de desenvolver carbapenemases. Devido a isso, é conhecida como *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) e a demanda por outros antibióticos torna-se essencial para conter as infecções causadas por ela. Estudos revelam que 40% das infecções causadas por *K. pneumoniae* com algum tipo de resistência resultam em óbito (OLIVEIRA *et al.* 2020; DENISSEN *et al.* 2022)

Acinetobacter baumannii é um bacilo Gram-negativo oportunista frequentemente associado a infecções nosocomiais de vários tipos, sendo as mais comuns as infecções do trato urinário e respiratório. Essa bactéria apresenta grande incidência em unidades de tratamento intensivo. O número de relatos de *A. baumannii* MDR fez com que a OMS a colocasse no grupo crítico para novos estudos e antimicrobianos. Geralmente são utilizados carbapenêmicos e polimixinas para enfrentar infecções causadas por essa bactéria, mas cada vez mais são encontradas cepas resistentes. Essa espécie consegue sobreviver tanto em ambientes secos quanto úmidos por meses, entretanto, sendo encontradas na pele humana e próximo a mucosas, o que facilita a colonização e infecção em pacientes debilitados (DENISSEN *et al.* 2022; CATALANO, *et al.* 2023).

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo e já fez parte do grupo de bactérias de prioridade crítica para novos compostos da OMS. Possui uma grande adaptabilidade e diversos mecanismos de resistência desde o aumento da expressão de porinas, produção de enzimas de inativação, até a formação de biofilmes. Essa bactéria, consegue colonizar diversos lugares desde solo e água até superfícies de materiais hospitalares e a pele humana,

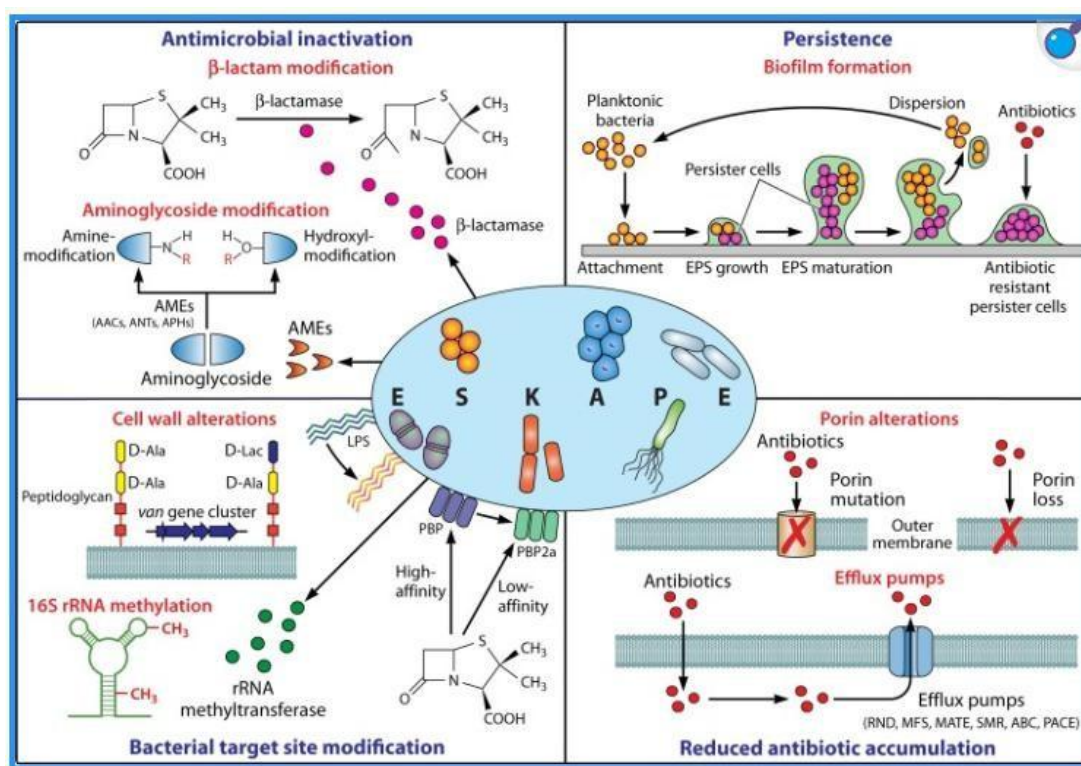
causando praticamente todos os tipos de infecções a depender do estado de saúde do paciente. No ano de 2017, houve um surto de infecções comunitárias causadas por *P. aeruginosa* devido à seca e a qualidade de água consumida. Esse fato reforça os riscos eminentes que os países menos desenvolvidos têm em relação a esses tipos de infecções. Os principais antimicrobianos utilizados para o enfrentamento dessa bactéria são os aminoglicosídeos, cefalosporinas, carbapenêmicos e fluoroquinolonas. Entretanto, alguns fármacos dessa classe são naturalmente ineficazes devida à resistência intrínseca dessa espécie e tem sido relatado a emergência de resistência adquirida mesmo entre os antibióticos eficazes, o que representa um importante sinal de alerta para a saúde pública (DENISSEN *et al.* 2020; VENKATESWARAN *et al.* 2023; CATALANO, *et al.* 2023).

As bactérias da ordem Enterobacterales constituem um grupo diverso de bacilos Gram-negativos, que habitam principalmente o trato gastrointestinal de humanos e animais. Entre os gêneros mais conhecidos estão *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella* e *Proteus*. Essas bactérias apresentam grande importância clínica devido à sua capacidade de causar infecções em diferentes sítios do corpo humano e à crescente resistência antimicrobiana que exibem, como observado em cepas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases. Infecções causadas por esse grupo de bactérias são difíceis de controlar, pois a identificação da espécie através dos testes comumente utilizados, muitas vezes não é adequado, resultando em tratamentos ineficazes (DENISSEN *et al.* 2020; VENKATESWARAN *et al.* 2023; CATALANO, *et al.* 2023).

As bactérias do grupo ESKAPE apresentam mecanismos de resistência, que podem ser intrínsecos, quando associados a características da espécie bacteriana, ou adquiridos, quando a bactéria sofre mutação ou recebe um gene que sirva para expressar um mecanismo de resistência. É importante entender esses mecanismos para desenvolver alternativas que contornem ou inviabilizem a resistência antimicrobiana (ABUSHAHEEN *et al.* 2020). Os principais mecanismos de resistência antimicrobiana são: mudança no sítio de ligação do fármaco, inativação ou destruição da molécula do antibiótico,

alterações na capacidade de permeabilidade da membrana, que evita a entrada do medicamento, bombas de efluxo que retiram as moléculas do citosol para o meio externo, e a formação de biofilmes (ABUSHAHEEN *et al.* 2020; PULINGAM *et al.* 2022; JIANG *et al.* 2024). Alguns dos mecanismos são apresentados na figura 2.

FIGURA 2 - Principais Mecanismos de resistência a antibióticos descritos em patógenos bacterianos do grupo ESKAPE.



Fonte: De Oliveira, D.; Forde, B.; Kidd, T; *et al.* 2020.

A resistência bacteriana causada por inativação de molécula é mediada por enzimas que utilizam do meio de transferência de grupos, principalmente grupos acetil, adenil e fosfato. Nessas reações, enzimas como a acetiltransferase adicionam o grupo acetil às partes mais suscetíveis da molécula dos aminoglicosídeos, modificando o sítio de ligação e impedindo seu funcionamento no combate a bactéria. Já na resistência causada pela destruição da molécula do antibiótico, isso ocorre por meio de enzimas específicas, que causam a hidrólise da molécula. O melhor exemplo são as β-lactamases, essas enzimas realizam a clivagem do anel beta-lactâmico, fazendo com que o loop β-lactâmico seja destruído e impeça a molécula de se

ligar as proteínas de ligação da penicilina (PBP) (OLIVEIRA *et al.* 2020; HUEMER *et al.* 2020; ABUSHAHEEN *et al.* 2020; UDDIN *et al.* 2021; PULINGAM *et al.* 2022).

A resistência bacteriana por meio da redução do influxo de moléculas tóxicas está associada a capacidade de permeabilidade seletiva da membrana, que permite que apenas certos tipos de moléculas penetrem. Quando as moléculas não são compatíveis com a membrana, a entrada pode ocorrer por meio de proteínas como as porinas. Bactérias, como *E.coli* e *K. pneumoniae*, possuem um número reduzido de porinas e por meio de mecanismos genéticos, podem não ter essa estrutura, o que impede o antibiótico de penetrar na célula e atingir o seu alvo. Já as bombas de efluxo, são proteínas transmembranais que atuam expulsando do interior da célula uma variedade de substâncias, como tóxicos, metabolitos excedentes e diversos antimicrobianos. O funcionamento dessas bombas é um dos principais fatores que contribuem para a resistência bacteriana, uma vez que elas podem reduzir a concentração de antibióticos no interior da célula a níveis que não são mais eficazes. *P. aeruginosa* é conhecida por possuir uma diversidade de bombas de efluxo, tornando-a uma das bactérias mais desafiadoras no tratamento de infecções MDR (OLIVEIRA *et al.* 2020; HUEMER *et al.* 2020; ABUSHAHEEN *et al.* 2020; UDDIN *et al.* 2021; PULINGAM *et al.* 2022).

A mudança no sítio de ligação alvo do fármaco acontece quando a bactéria, por meio de mutações, plasmídeos adquiridos ou por metilação, sofre alterações que resultam em mudanças estruturais. Exemplos desse fenômeno incluem mutações individuais de aminoácidos que ocorrem nas topoisomerasas II e IV, as quais impedem a ligação do ciprofloxacino, esse local é considerado crítico para resistência à quinolonas. No caso de *S. aureus*, a expressão resultante de uma mutação do gene *mecA* faz com que um tipo diferente de proteína de ligação a penicilina (PBP2) seja sintetizada nas partes mais externas da parede celular. A PBP2 tem uma afinidade baixa com os β -lactâmicos tornando essas bactérias resistentes (OLIVEIRA *et al.* 2020; HUEMER *et al.* 2020; ABUSHAHEEN *et al.* 2020; UDDIN *et al.* 2021; PULINGAM *et al.* 2022).

O biofilme desempenha um papel crucial na resistência antimicrobiana devido à sua complexa estrutura tridimensional, composta principalmente por uma matriz polissacarídica extracelular (MPE). Essa MPE forma um ambiente protetor em torno das células bacterianas, criando canais que permitem a circulação de fluidos, mas limitam a difusão de antimicrobianos até as células. Como resultado, muitos compostos antimicrobianos não conseguem penetrar de maneira eficaz no biofilme, reduzindo sua concentração efetiva e, conseqüentemente, sua capacidade de erradicar bactérias (OLIVEIRA *et al.* 2020; RATHER *et al.* 2021).

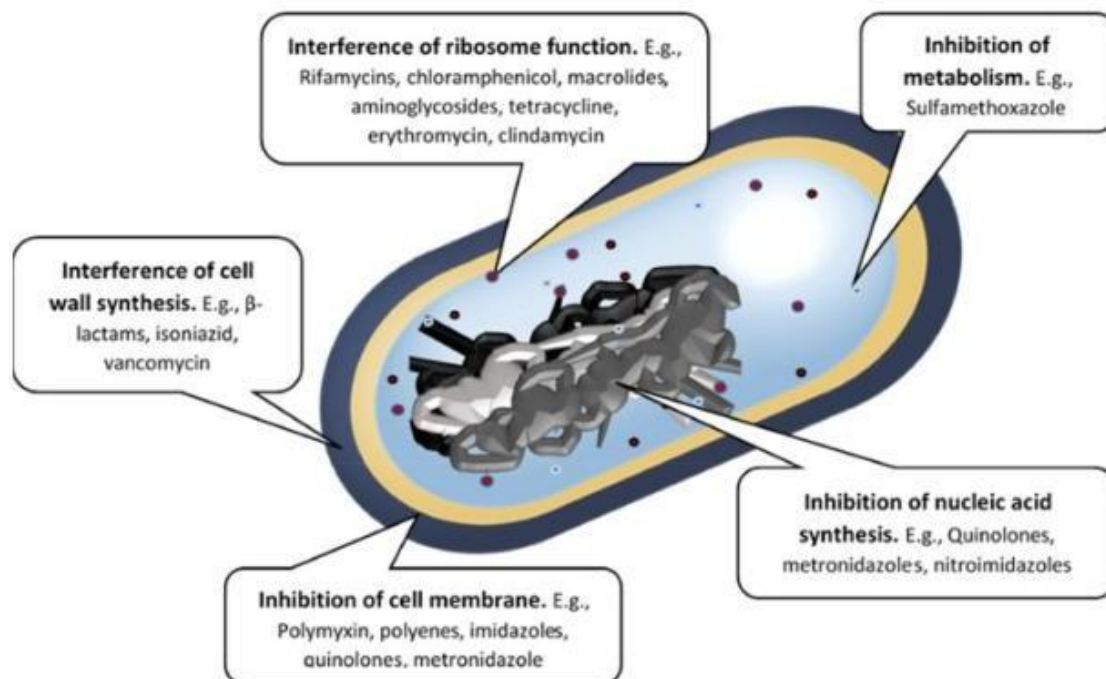
Outro elemento que ajuda nessa resistência é a forma como as células bacterianas ficam altamente compactadas, o que reduz as vias de entrada dos antimicrobianos nas células, formando uma espécie de barreira para penetração dos antimicrobianos. Além dos fatores já mencionados, também é importante ressaltar que alguns biofilmes produzem enzimas que anulam antibióticos, conseguem reduzir e limitar o crescimento e a absorção de nutrientes, além de apresentarem bombas de efluxo em alguns casos (OLIVEIRA *et al.* 2020; RATHER *et al.* 2021).

3.2 Antimicrobianos:

Em geral, observa-se que o aprofundamento do conhecimento sobre um problema tende a ampliar as opções disponíveis para sua resolução. No entanto, no caso dos antimicrobianos, ocorre o oposto: quanto mais se compreende sobre o tema, mais restritas parecem ser as alternativas terapêuticas. A descoberta da plataforma de Waksman, que resultou inicialmente na identificação da estreptomicina e impulsionou a chamada "era de ouro" da descoberta de antimicrobianos, atingiu seu auge e esgotamento na década de 1960. A partir desse período, embora o conhecimento sobre os mecanismos de resistência e sobre as estruturas das moléculas antimicrobianas tenha avançado significativamente, as inovações tornaram-se escassas. O que se observou foi a recorrente redescoberta e reutilização de classes já conhecidas, como os macrolídeos, as tetraciclínas, os aminoglicosídeos, os β -lactâmicos e os cloranfenicolís (LEWIS, 2020).

de ácidos nucleicos; alterações na síntese proteica dos ribossomos; desorganização da membrana citoplasmática; e, por último interferência que impede rotas metabólicas, como é possível ver na imagem 4 (PULINGAM *et al.* 2022).

FIGURA 4 - Grupos de antibióticos em função do seu mecanismo de ação



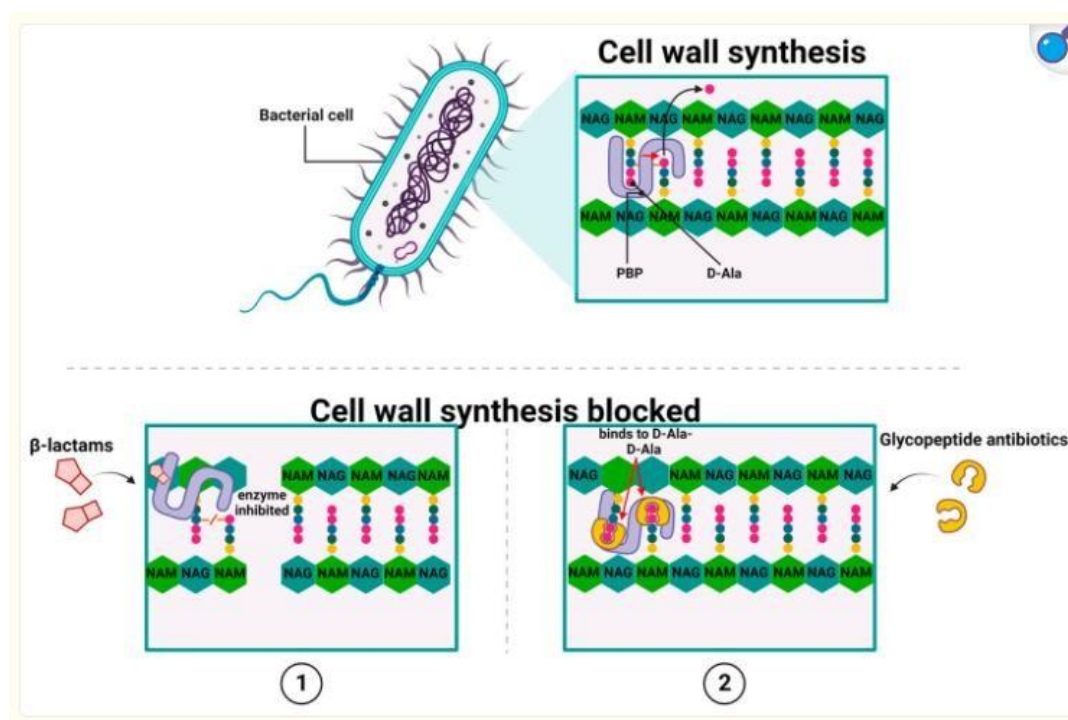
Fonte: Pulingam, T.; Parumasivam, T.; Gazzali, A.; *et al.* 2022.

Os antimicrobianos que interferem na parede celular são os β -lactâmicos e os glicopeptídeos. As bactérias possuem parede celular composta por peptídeoglicano e a espessura dessa parede varia entre 20 e 40 camadas nas Gram-positivas e de uma a três camadas nas Gram-negativas. Esses compostos impedem a formação correta da parede o que faz com que a célula bacteriana acabe sofrendo com a pressão osmótica e estourando. Como as células animais não possuem parede celular, torna essas moléculas seletivas. Os β -lactâmicos incluem diferentes classes de antimicrobianos como as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e os monobactams, todos caracterizados pela presença de uma estrutura em comum, o anel β -lactâmico. Essas classes de compostos atuam por ligação covalente irreversível às PBPs que exercem atividade D-transpeptidases e D-Carboxipeptidases fundamentais na formação das pontes cruzadas entre cadeias peptídicas dos peptídeoglicano. A inibição dessa atividade, compromete a integridade da

parede celular bacteriana, levando a lise celular (MESLEH et al., 2016; Gupta et al., 2023).

Os glicopeptídeos também agem na parede celular, e incluem medicamentos como a vancomicina, teicoplanina e a oritavancina. Os glicopeptídeos bloqueiam a síntese da parede celular ao se ligarem ao terminal D-ala-D-ala da cadeia peptídica. Essa ligação se torna estável através do seu grupo carboxila simples, amino simples e três amidas que permitem formar cinco ligações de hidrogênio com grupos do D-ala-D-ala resultando na inibição da transpeptidase. Isso impede que ocorra a reticulação do peptídeoglicano da parede celular. Conforme observado figura 5 (MESLEH et al., 2016; Gupta et al., 2023).

FIGURA 5 - Mecanismo de ação de antimicrobianos que afetam a parede celular



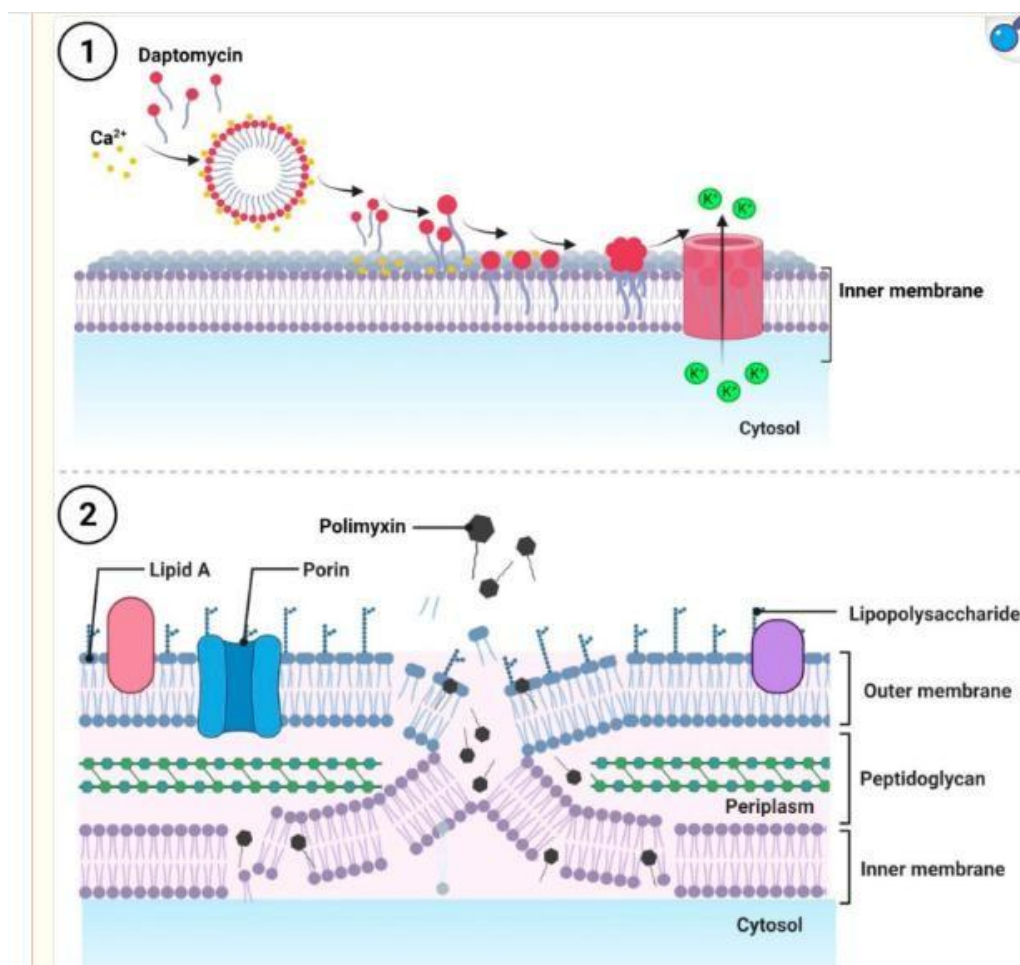
Fonte: Baran, A.; Kwiatkowska, A.; Potocki, L.; 2023.

Os antimicrobianos que agem na estrutura das membranas bacterianas são os lipopeptídeos cíclicos como a daptomicina e as polimixinas que são peptídeos catiônicos produzidos por *Paenibacillus polymyxa*. A daptomicina foi obtida pela primeira vez a partir de processo de fermentação de bactérias do

solo *Streptomyces roseosporus*, entretanto só fez sua estreia na clínica no ano de 2003. Essa molécula é um peptídeo de 13 aminoácidos ligados a uma cadeia lateral decanoil que é dependente de íons de cálcio. O complexo Ca^{2+} -daptomicina forma micelas que penetram na membrana interna e se ligam a grupos fosfatidilglicerol carregados negativamente, neutralizando-os. Na sequência, o complexo da daptomicina se insere na membrana, sofre oligomerização dependente de fosfatidilglicerol, e esses eventos levam à formação de canais da membrana, resultando no vazamento de íons e na perda da integridade da membrana, o que conduz à morte celular (MOUBARECK, 2020; YANG, WANG e ZHAO *et al.* 2024).

As polimixinas, quando descobertas, eram classificadas de A a E. Entretanto, devido à alta toxicidade apenas a polimixina B e a polimixina E são utilizadas na rotina clínica, em casos de falta de opção terapêutica, pois apresentam consideráveis riscos em função da toxicidade. As moléculas de polimixina interagem com o lipídio A, que é um constituinte do lipopolissacarídeo (LPS), e causa um desequilíbrio nos íons cálcio e magnésio, desestabilizando a membrana externa e aumentando a permeabilidade celular. Além disso, essa atividade se estende à membrana interna, levando a extravasamentos e à morte celular. Podemos ver esses mecanismos ilustrados na figura 6 (MOUBARECK, 2020; YANG, WANG e ZHAO *et al.* 2024)

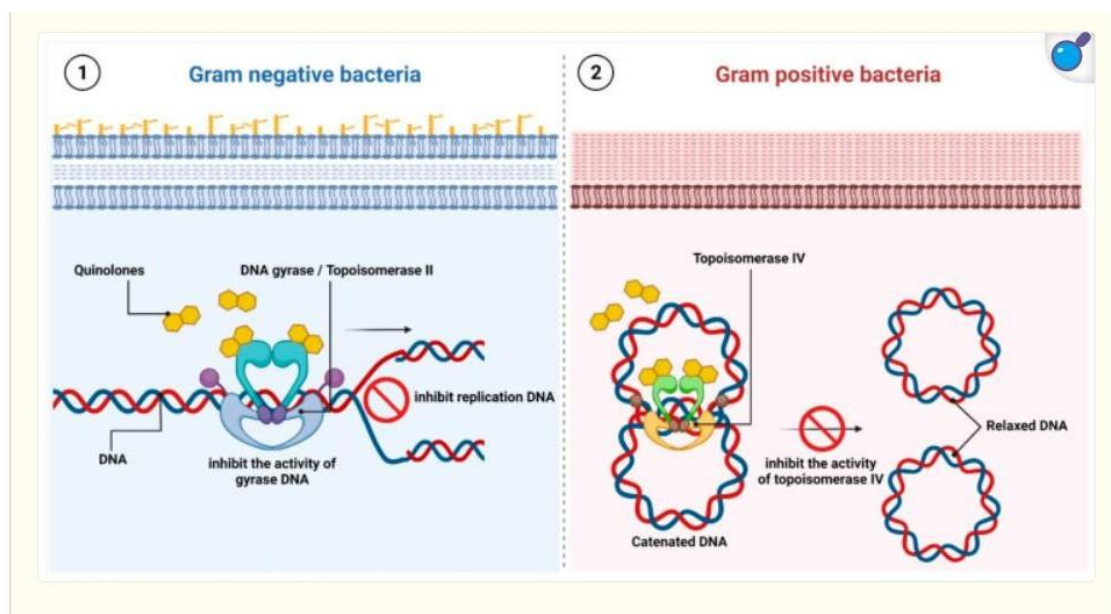
Figura 6 – Mecanismo de ação dos antimicrobianos que agem nas membranas celulares.



Fonte: Baran, A.; Kwiatkowska, A.; Potocki, L.; 2023.

Os antimicrobianos que interferem nos ácidos nucleicos bacterianos são a rifampicina e as fluoroquinolonas, que atuam respectivamente no RNA e no DNA bacteriano. A rifampicina inibe a RNA polimerase dependente do DNA bacteriano, ligando-se fortemente a essa enzima e bloqueando seu alongamento. Devido às enzimas da RNA polimerase serem estruturalmente diferentes da RNA polimerase de eucarióticos, a rifampicina possui uma toxicidade seletiva. As fluoroquinolonas bloqueiam a síntese do DNA inibindo a DNA topoisomerase II em Gram negativas e a DNA topoisomerase IV em bactérias Gram-positivas. Esse composto interfere na divisão e resselagem da dupla fita do DNA, o que impede que este realize suas funções para expressão gênica, comprometendo o metabolismo celular e levando à morte da célula. Podemos ver a atividade dessas moléculas na figura 7 (SHAPIRO, 2015; OKJIC, *et al.*, 2020).

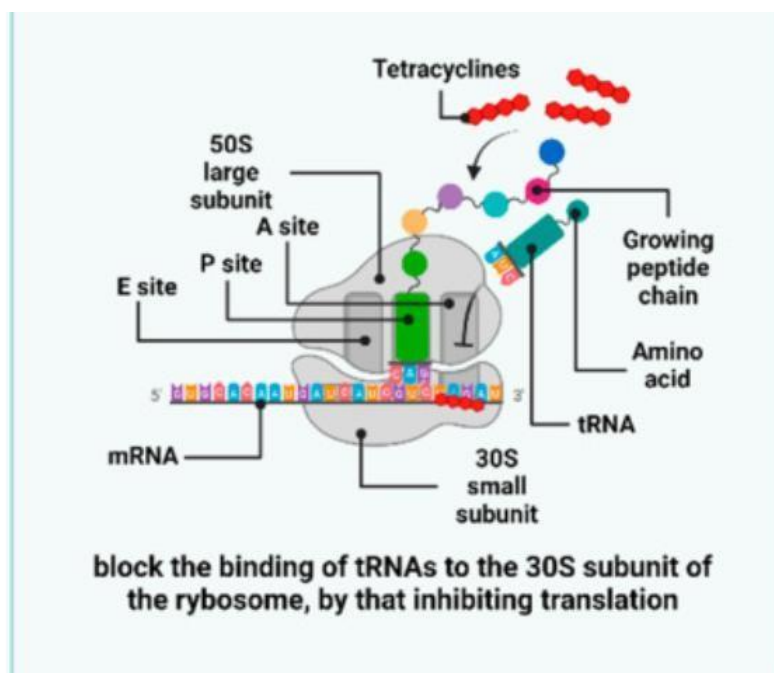
Figura 7- Mecanismo de ação das fluoroquinolonas



Fonte: Baran, A.; Kwiatkowska, A.; Potocki, L.; 2023.

Diversas classes de antimicrobianos atuam na síntese proteica bacteriana, tais como aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina, lincosamidas, streptograminas B. Uma característica interessante é que os ribossomos bacterianos são diferentes estruturalmente dos ribossomos eucarióticos, o que permite uma toxicidade seletiva. As tetraciclina possuem esse nome devido a presença de 4 anéis de hidrocarbonetos planos no seu núcleo, aos quais são anexados diversos grupos funcionais. Essa molécula se liga ao sítio 30S do ribossomo bacteriano e impede que o aminoácido transportador de amino-acil-tRNA se ligue ao sítio aceitador impedindo a síntese proteica ao interferir em funções metabólicas essenciais da bactéria, conforme demonstrado na figura 8 (BARAN *et al.* 2023; KRAWCZYK *et al.* 2024).

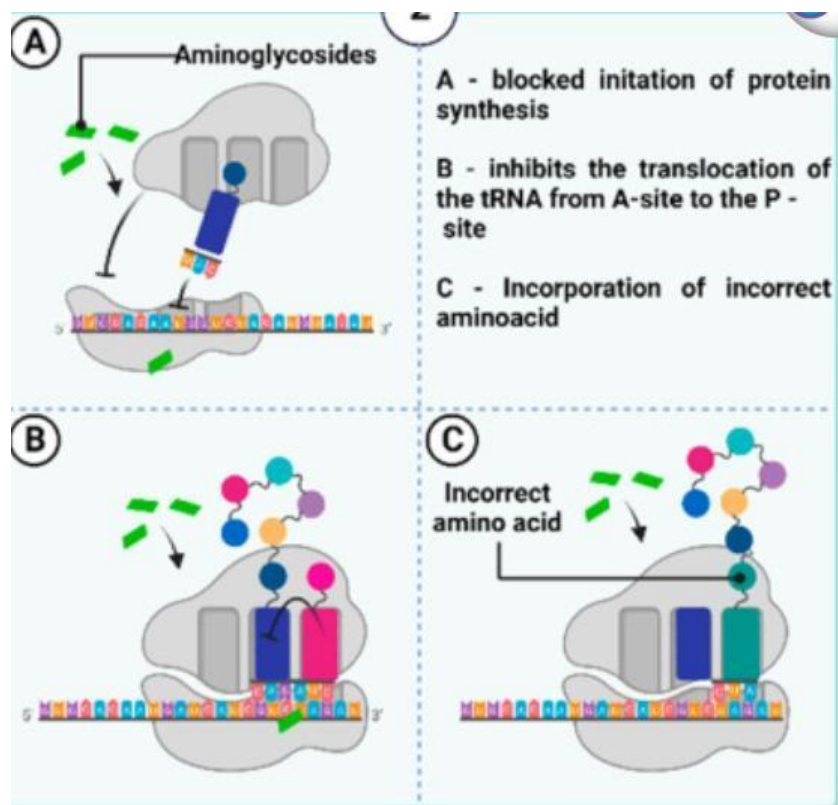
Figura 8 - Mecanismo de ação das tetraciclina



Fonte: Baran, A.; Kwiatkowska, A.; Potocki, L.; 2023.

Os aminoglicosídeos são caracterizados por possuir um anel ligado por ligação glicosídica a uma molécula de amino açúcar. As diferentes posições dos substituintes amino e hidroxila em relação a estrutura central determinam discrepâncias nas especificidades de ligação ao sítio A, no rRNA na subunidade 16s da subunidade 30s. Na maioria dos casos ocorre uma leitura errada do mRNA, o que faz com que sejam sintetizadas e incorporadas proteínas erradas na membrana celular alterando a seletividade da membrana. Isso leva a um funcionamento deficiente da célula e permite a entrada de mais antimicrobianos ao interior da bactéria, conforme observado na figura 9 (SWANEY *et al.*, 1998, CHAMPNEY e MILLER, 2002, PARAJULI, *et al.*, 2021).

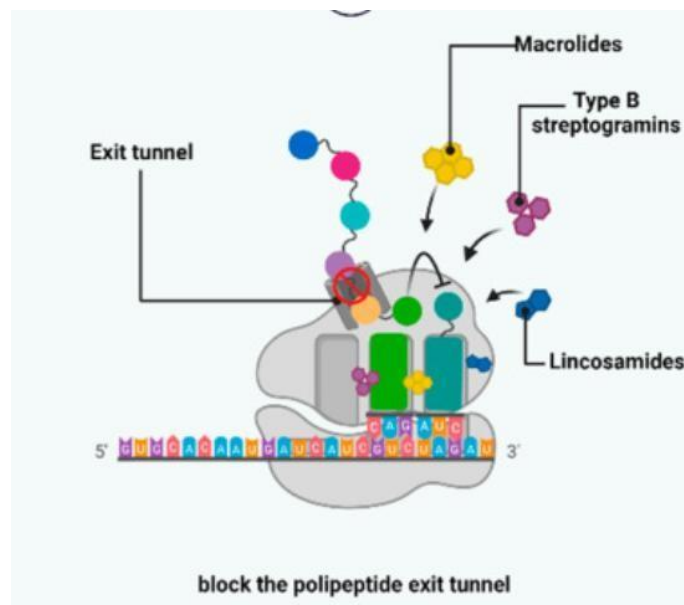
Figura 9 - Mecanismo de ação dos aminoglicosídeos



Fonte: Baran, A.; Kwiatkowska, A.; Potocki, L.; 2023.

Os macrolídeos, lincosamidas e streptograminas fazem parte do mesmo grupo conhecido como MLSB, e o mecanismo de ação das três é a inibição proteica através de interações com o complexo 50S do ribossomo bacteriano. As MLSB possuem alta afinidade pelo domínio II e V da molécula 23S do rRNA e isso leva a inibição da formação dependente de peptidiltransferase, resultando em um acúmulo de peptidil-tRna, o que impede a síntese de proteínas, pois não há peptidil-tRna livre, interrompendo assim a síntese proteica. Vemos um pouco mais dos mecanismos dessas classes da figura 10 (SWANEY *et al.*, 1998, CHAMPNEY e MILLER, 2002, PARAJULI, *et al.*, 2021).

Figura 10 - Mecanismos de ação dos MLSB

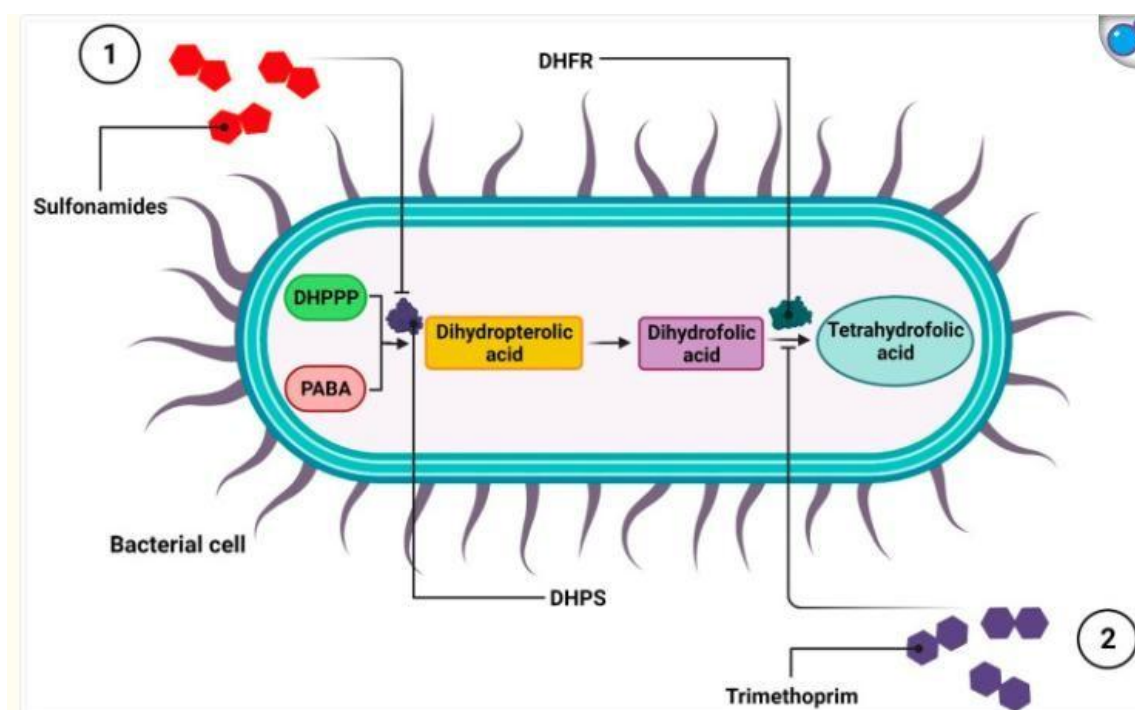


Fonte: Baran, A.; Kwiatkowska, A.; Potocki, L.; 2023.

Os antibióticos que agem interrompendo vias metabólicas são as sulfonamidas e o trimetoprim e ambos atuam inibindo a síntese do ácido fólico. Estes dois antibióticos podem ser utilizados de maneira individual ou associado devido a ocorrência de sinergismo. As sulfonamidas foram um dos primeiros antimicrobianos a ser descoberto e apresentam ação bacteriostática de amplo espectro, os medicamentos dessa classe, como a sulfadiazina, sulfatiazol, sulfanilamida, são compostos análogos do ácido para-aminobenzóico (PABA), que é necessário para síntese do folato bacteriano. As atividades antimetabólitos das sulfas, ocorrem devido a competição com o PABA pelo sítio ativo da di-hidropteroato sintase (DHPS). Essa enzima catalisa a condensação do PABA com o 7,8-di-hidro-6-hidroximetilpterina pirofosfato (DHPPP) em ácido di-hidropérico que é o precursor do ácido di-hidrofólico. Quando a sulfonamidas se liga ao receptor, não ocorre a formação do ácido di-hidrofólico o que reduz a quantidade de ácido tetra-hidrofólico metabolicamente ativo. Quando os estoques de folato são esgotados a biossíntese de purinas e pirimidinas e de alguns aminoácidos necessário para a produção de Dna e proteínas é bloqueada, inibindo assim o crescimento bacteriano (ROSANOVA *et al.*, 2016, MINATO *et al.*, 2018).

O trimetoprim age se ligando à enzima di-hidrofolato redutase (DHFR), que, em condições normais, tem a função de converter o di-hidrofolato em tetra-hidrofolato. Embora a ligação ocorra em partes diferentes, o resultado é semelhante ao das sulfonamidas. Individualmente, tanto as sulfonamidas quanto o trimetoprim são bacteriostáticos; entretanto, quando usados em associação, passam a exibir efeito bactericida (UDDIN *et al.* 2021; BARAN *et al.* 2023; HALAWA *et al.* 2024). É possível ver essas rotas de ação exemplificadas na figura 11.

Figura 11 - Mecanismo de ação das sulfas e do trimetoprim.



Fonte: Baran, A.; Kwiatkowska, A.; Potocki, L.; 2023.

3.3 Desafios na descoberta e desenvolvimento de novos antimicrobianos

A descoberta ou desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos constitui um processo altamente complexo e desafiador, dificultado por múltiplos fatores, incluindo a identificação de novas moléculas com atividade terapêutica, barreiras regulatórias rigorosas, entraves comerciais e elevados custos de pesquisa e desenvolvimento. Além disso, esse processo é caracterizado por longos períodos de investimento em tempo e recursos,

frequentemente associados a um baixo retorno financeiro, o que desestimula a participação da indústria farmacêutica (NAGHAVI *et al.*, 2024).

Recentemente, existem 27 compostos em aguardo para aprovação na FDA, com foco em combater as bactérias da OMS. Entretanto, a grande maioria são modificações de classes já existentes, o que leva a importância do uso racional de antimicrobianos e a necessidade de novas alternativas para o enfrentamento da crise da resistência antimicrobiana (GUPTA e SHARMA, 2022).

Explorar alternativas inovadoras, para o combate e prevenção de infecções é fundamental para reduzir a dependência dos antimicrobianos atuais. Entre as alternativas inovadoras, temos as vacinas, anticorpos, probióticos, bacteriófagos, peptídeos, fitoquímicos, metais, enzimas antimicrobianas. As vacinas geram uma resposta imune rápida, eficiente e específica contra o patógeno, reduzindo o uso de antibióticos e índices de mortalidade. Vacinas para coqueluche, meningite, difteria e tétano são exemplos (HOELZER *et al.* 2018; JANSEN *et al.* 2018; KIM *et al.* 2019; BHATIA, 2019).

Nos anos de 2018 e 2019 vacinas contra *Clostridium Difficile*, *S. aureus*, *Micobacterium tuberculosis* e *E. coli* resistente a carbapenêmicos entraram em ensaios clínicos, o que é um passo importante para viabilizar sua entrada no mercado (HOELZER *et al.* 2018; VETTER *et al.* 2018; BHATIA, 2019).

Os anticorpos são produzidos pelo sistema imunológico em resposta a um antígeno específico, com a função de eliminá-lo rapidamente. Ocorre por meio de diversos mecanismos, como prevenção da adesão, neutralização, fixação do complemento, opsonização por fagócitos e a toxicidade celular dependente de anticorpos. A imunização passiva por meio de Anticorpos já é utilizada como profilaxia e tratamento de doenças humanas como sarampo, varicela, hepatite (virais), tétano, antraz, botulismo, bacteremia devido a *S. aureus* (bacterianas) entre outras. Apesar de serem utilizados, apresentam limitações em relação a padronização de qualidade e quantidade de anticorpos, também apresentam riscos de reações cruzadas e interação não específica

dentro do conjunto de anticorpos (SPARROW *et al.* 2017; ZURAWSKI e MCKLENDON, 2020).

Poucos anticorpos foram aprovados para uso frente a doenças infecciosas, e a maior parte deles para doenças virais. Entretanto, para neutralização de toxinas bacterianas foram liberados para uso, o bezlotoxumab e obiltoxaximab, com o objetivo de reduzir a recorrência de infecções por *C. difficile* e o risco de morte de antraz, respectivamente. Entre os desafios encontrados por essa alternativa, estão os altos custos de produção, pois tem baixa viabilidade econômica, apresentam eficácia frente a apenas um único alvo, além da dificuldade de se conseguir pacientes para realização de ensaios clínicos devido a imprevisibilidade das infecções. Porém, recentemente, as pesquisas vêm sendo direcionadas frente aos principais agentes causadores de infecções nosocomiais, permitindo o desenvolvimento de coquetéis de anticorpos frente a essas bactérias (BUSTAMANTE-CÓRDOVA *et al.* 2018; ZURAWSKI e MCKLENDON, 2020).

O microbioma intestinal consiste em uma variedade de organismo comensais que promovem a saúde do organismo, através de metabolismo energético, digestão, funções imunes e pela regulação do eixo intestino-cérebro. Os probióticos são microrganismo vivos que administrados na quantidade adequada, trazem benefícios a saúde do hospedeiro. Os principais gêneros utilizados nesse processo são *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces*. Prébióticos, pósbióticos e simbióticos também são utilizados, de forma semelhante aos probióticos, sendo o primeiro caracterizado por ser composto de produtos não digeríveis de ocorrência natural como fibras e açúcares que agem de alimento para as bactérias comensais e estimulam seu crescimento. Os pósbióticos são subprodutos metabólicos de probióticos que trazem alguma atividade biológica ao hospedeiro, como bacteriocinas, diacetil e peróxido de hidrogênio. Os simbióticos são uma combinação entre os dois anteriores em proporções bem definidas (KERRY *et al.* 2018; LIU *et al.* 2018; MARKOWIAK e SLIZEWSKA, 2018; KIM e GLUCK, 2019).

Os principais mecanismos de ação dos probióticos são: a interferência na fixação e entrada de patógenos na mucosa intestinal, a produção de

substâncias antibacterianas como bacteriocinas e ácidos orgânicos, a destruição de toxinas produzidas por patógenos, a restauração da disbiose intestinal e a imunomodulação, induzindo citocinas protetoras como IL-10 e TGF-beta, além de suprimir citocinas pró-inflamatórias. Esses compostos têm sido utilizados atualmente para prevenir infecções intestinais por bactérias resistentes em ambientes hospitalares ou de cuidado, também são usados para prevenção de doenças comunitárias como diarreia do viajante, diarreia associada a uso de antibióticos, vaginite, sepse e dermatites, além de prevenir efeitos colaterais do tratamento quimioterápico.

Uma alternativa recente é o transplante de microbiota fecal (FMT), em que fezes contendo microrganismos comensais são introduzidas no intestino, e tem se mostrado promissor, principalmente como terapia de segunda linha para limpeza intestinal de microrganismos MDR e para prevenir sepse neonatal. Os maiores desafios encontrados por esses compostos estão na dificuldade de padronizar a quantidade exata de microrganismo necessários, além de garantir a qualidade deles. As perspectivas futuras são promissoras, principalmente como uma forma de reduzir o uso de antibióticos. Entretanto, a disponibilidade desses produtos sem receita, e a presença de diversas formulações duvidosas representam um risco para o uso, sendo necessária uma melhor regulamentação (KERRY *et al.* 2018; LIU *et al* 2018; MARKOWIAK e SLIZEWSKA, 2018; KIM e GLUCK, 2019).

Os fitoquímicos são compostos bioativos derivados de plantas e tem sido estudado pra diversas finalidades como antioxidantes, anticâncer, antimicrobiano entre outras. Os principais bioativos estudados são carotenoides, compostos organosulfurados, fitoesteróis e flavonoides. Os mecanismos de ação desses compostos frente a bactérias são diversos, alguns danificam a membrana celular bacteriana, suprimem os fatores de virulência, promovem vazamento de íons, interagem com as proteínas de membrana, inibição de enzimas, formação de toxinas e inibição da formação do biofilme bacteriano. Muitos desses compostos apresentam efeito sinérgico com antibióticos, principalmente ao modularem mecanismos de resistência

(ANBAZHAGAN *et al.* 2015; SINGH *et al.* 2017; MOHANRAJ *et al.* 2018; SINGH *et al.* 2020; SINGH *et al.* 2020).

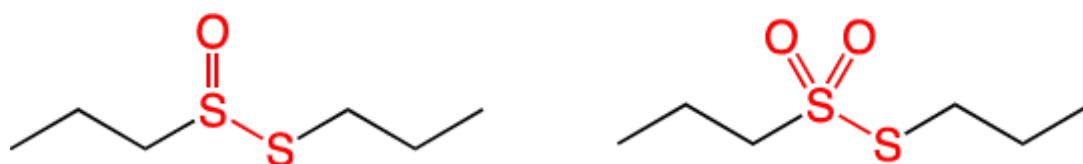
A utilizações de fitoquímicos tem como intuito prevenir as infecções, através de sua utilização em nutracêuticos. Além disso, diversos extratos vegetais de plantas como *Ocimum basilicum* (manjerição), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Allium sativum* (alho), assim como fitoquímicos como carvacrol, ácido cinâmico, eugenol e óleos essenciais, têm demonstrado boas atividades *in vitro* frente a bactérias de amplo espectro, com ou sem histórico de resistência. Os maiores desafios para a utilização desses compostos são a dificuldade em estabelecer padrões de qualidade e a falta de ensaios clínicos e metodológicos que garantam segurança e eficácia. Para garantir uma real utilização dos fitoquímicos é necessária a criação de um banco de dados abrangentes para a descoberta de novos fármacos. A Índia já possui um banco de dados com informações sobre composições químicas e possíveis usos terapêuticos, apresentando 60 fitoquímicos com potencial farmacológico. Isso gera esperança de que fitoquímicos possam se tornar uma fonte antimicrobianos eficazes, baratos e seguros (ANBAZHAGAN *et al.* 2015; SINGH *et al.* 2017; MOHANRAJ *et al.* 2018; SINGH *et al.* 2020; SINGH *et al.* 2020).

Moléculas contendo enxofre possuem um histórico de bioatividade como antimicrobianos. Tanto compostos naturais quanto sintéticos que contêm enxofre em suas estruturas são utilizados para tratar infecções. Existe uma vasta gama de compostos organosulfurados com bioatividade frente a microrganismos, sendo que a maioria deles apresenta como característica comum a presença de uma ligação enxofre-enxofre. Muitos desses compostos podem ser encontrados em plantas como alho e cebola, enquanto outros são compostos sintéticos e inclusive fazem parte da rotina clínica atual. As classes mais promissoras para novos antibióticos dentro das moléculas contendo enxofre são os dissulfetos, os tiossulfinitos e os tiossulfonatos (BLUME *et al.* 2023).

3.4 Tiossulfonatos:

Tiossulfonatos, ou ésteres de ácido tiosulfônico, geralmente apresentam a estrutura de fórmula geral $\text{RSO}_2\text{SR}'$. Esses compostos se formam a partir da oxidação do primeiro enxofre de um tiosulfinato e são análogos estruturais a substâncias encontradas no alho e na cebola. Os tiossulfonatos apresentam diversas atividades bioativas, como efeito antibacteriano e antifúngico, entre outros. Os estudos com essa classe de compostos químicos começaram na década de 60, após a descoberta do efeito antibacteriano, em derivados do alho. O mecanismo de inibição bacteriana dos tiossulfonatos deve-se à capacidade de inibir enzimas contendo tiol, por meio da oxidação de resíduos de proteínas como a cisteína e/ou a glutatona. Essas proteínas estão entre as principais do metabolismo microbiano, assim como no sistema de formação da Acetil-CoA e na RNA polimerase (Lubenets *et al.* 2019; Blume *et al.* 2023; Falcon-Piñero *et al.* 2023; Sorlózano-Puerto *et al.* 2024). Podemos ver a diferença de tiosulfinato para tiossulfonato na figura 12.

Figura 12 - Tiosulfinato (A esquerda) Tiossulfonato (A direita)



Fonte: Blume *et al.* 2023.

A síntese de tiossulfonatos envolve diversas técnicas, sendo que o primeiro método de relevância histórica foi o de Bentley, desenvolvido em 1972. Neste processo, sulfinatos de sódio e dissulfetos de alquila foram convertidos diretamente em tiossulfonatos, utilizando quantidades estequiométricas de nitrato de prata. No entanto, esse método era limitado à produção de metanossulfonatos de sódio. Com o tempo, novas abordagens foram desenvolvidas para superar essas limitações (MAMPUYS *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2022).

Em 2014, Taniguchi e colaboradores, aprimoraram a síntese ao empregar sulfinatos de sódio e catalisadores de cobre em uma atmosfera de oxigênio. Essa estratégia aumentou o rendimento na produção de tiossulfonatos, mas ainda gerava diversos resíduos, tornando-se necessário

buscar métodos mais sustentáveis. Nesse contexto, a química verde passou a ser uma prioridade para pesquisadores da área (MAMPUYS et al., 2019; WANG et al., 2022).

Em 2015, Natarajan e seu grupo, desenvolveram uma técnica mais ecológica, utilizando Oxona combinada com haletos de metal alcalino (MX, onde MX = KBr, KCl, NaBr ou NaCl). Essa combinação resultava na oxidação de dissulfetos alifáticos ou aromáticos, que continham grupos doadores ou retiradores de elétrons, formando tiosulfonatos. As vantagens desse método incluíam um tempo de reação mais curto, condições mais suaves e a eliminação do uso de reagentes tóxicos ou instáveis (NATARAJAN, 2015).

Em 2018, buscando ainda mais eficiência e sustentabilidade, Yang e colaboradores propuseram a síntese de tiosulfonatos através da oxidação eletroquímica de tióis. Esse método inovador permitiu a formação de tiosulfonatos sem a necessidade de catalisadores ou oxidantes, com condições de reação simples e suaves, em escala de gramas, sendo também mais limpo, pois não utilizava substâncias tóxicas. Além disso, o método se mostrou adequado para a síntese de tiosulfonatos bioativos (Yang *et al.*, 2018).

Em 2021, Pandey e colaboradores, avançaram ainda mais com uma estratégia sustentável, utilizando irradiação de N-hidroxí sulfonamidas sob indução de luz visível, na presença de etanol como solvente. O uso da luz azul como fonte de energia resultou em um método suave, com bom rendimento e que atende aos requisitos ecológicos da química verde (PANDEY et al., 2021).

Para a caracterização dos tiosulfonatos são utilizadas diversas técnicas com diferentes funções e mecanismos de funcionamento, sendo elas: espectroscopia no infravermelho (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (MS), difração de raios X (XRD), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), Espectroscopia UV-Vis. De maneira geral as técnicas citadas são complementares, ou seja, devem ser utilizadas em conjunto para uma caracterização completa (EVANS *et al.* 2021; METHERALL *et al.* 2023; CARVALHO *et al.* 2023).

A FTIR é uma técnica que consiste em atravessar a amostra com um feixe infravermelho, dependendo dos tipos de ligações certas frequências são absorvidas, no caso dos tiossulfonatos as frequências que demonstram as ligações S=O são na região de 1000-1300/cm, essa técnica se baseia na capacidade de grupos funcionais absorverem o feixe infravermelho com base nas vibrações das ligações químicas. A RMN analisa o ambiente químico dos átomos de H e C presentes nas moléculas, isso ocorre quando o composto é colocado em um forte campo magnético e irradiado com ondas de rádio, que interagem com o núcleo dos átomos, os sinais captados de volta revelam a estrutura molecular e como seus átomos estão conectados (EVANS *et al.* 2021; METHERALL *et al.* 2023; CARVALHO *et al.* 2023;).

A MS determina a massa molecular dos compostos, o que fornece pistas sobre a estrutura, ela é analisada através de picos, onde o pico principal indica a massa do composto e os demais ajudam a entender a composição. Essa técnica funciona ionizando e fragmentando a molécula de interesse e os fragmentos são separados com base em massa e carga elétrica. A XRD é a técnica que serve para revelar estruturas cristalinas tridimensionais, essa técnica funciona com a incidência de um raio x sobre o cristal e se espalha em padrões que são analisados para determinar a disposição dos átomos e isso permite identificar a estrutura exata de um tiossulfonato cristalino (KIND e FIEHN, 2010; MORAES, *et al.* 2024)

A HPLC é uma técnica que permite separar, identificar e quantificar os componentes de uma mistura, nessa técnica a amostra passa por uma coluna com uma fase estacionária, e cada composto é separado com base na sua interação com a fase móvel, então são analisados o tempo de retenção e a detecção por UV ou MS, essa técnica ajuda a confirmar a pureza do tiossulfonato. A espectroscopia UV-Vis é uma técnica que mede a absorção de luz ultravioleta e visível pelo composto, a amostra é irradiada com luz e certos comprimentos de onda ficam retidos de acordo com as ligações eletrônicas presentes nas moléculas. A principal função dessa técnica é monitorar a reação de síntese e a estabilidade dos tiossulfonatos. Após a caracterização

adequada, diversos tiosulfonatos podem ser testados para validar seus efeitos bioativos (MARQUES et al., 2013; Sobolewska e Biesaga, 2024).

O composto propil-propano tiosulfonato (PTSO) é atualmente o tiosulfonato mais estudado, tendo vários trabalhos que demonstram o potencial antimicrobiano dessa classe de compostos. Voltado para a área da saúde Sorlozano-Puerto, Albertuz-Crespo, Lopez-Machado *et al.* em 2018, testaram “*in vitro*” o efeito de PTSO frente a *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *P. aeruginosa* e outras bactérias de isolados clínicos de seres humanos. Os resultados obtidos na MIC para essas cepas foram de 64 mg/L, 128 mg/L e 512 mg/L respectivamente, Para *S. aureus* MRSA, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus agalactiae*, as MICs obtidas frente a essas bactérias foram 8 mg/L, 4 mg/L e 4 mg/L respectivamente. Em 2024, outro estudo feito por Sorlozano-Puerto, Cerezo-Collado, Roca-Lagrilliere, *et al.*, testou o PTSO frente a diferentes bactérias gram negativas resistentes a carbapenêmicos. Encontraram os seguintes resultados, MIC de 64 mg/L frente a *E. coli* e *E. cloacae*, 128 mg/L para *K. pneumoniae*, 32 mg/L para *A. baumannii* e o valor de 256 mg/L para *P. aeruginosa*. Esses resultados servem para ilustrar o potencial antimicrobiano da classe dos tiosulfonatos.

Falcón-Piñeiro e colaboradores, em 2023, testaram a fase gasosa de PTSO em diversos microrganismo de interesse agrícola, entre eles os fungos *Geotrichum candidum*, *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, *Phytophthora cinnamomi* e *Penicillium expansum*. Os valores de Concentração Fungicida Mínima (MFC) encontrados foram, respectivamente, 78,125 µg/mL, 39,06 µg/mL, 9,76 µg/mL, 78,125 µg/mL e 312,5 µg/mL, demonstrando a capacidade de matar diferentes espécies fúngicas. Falcon-Piñero e colaboradores, 2021, testaram a fase gasosa de PTSO frente a *Verticillium dahliae* das cepas V136I, B1235I, V1266I, encontraram as concentrações 19,53 µg/mL, 39, 06 µg/mL e 39,06 µg/mL, respectivamente, o que confirma os efeitos antifúngicos dos tiosulfonatos.

Em 2020, Nantes e colaboradores, demonstraram o potencial antitumoral do tiosulfonato S-(4-methoxyphenyl)-4 methoxybenzenesulfonothioate. O composto foi capaz de inibir a polimerização

da tubulina, além de impedir a proliferação das células tumorais, também foi capaz de induzir a parada da replicação celular na fase G2, os melhores resultados foram frente a linhagem 786-0 de carcinoma renal. Os resultados demonstraram o potencial em relação a atividade citotóxica frente a células cancerígenas.

3.5 Citotoxicidade

A citotoxicidade refere-se à capacidade de danificar células vivas, resultando em efeitos como a interrupção da síntese de proteínas e o enfraquecimento da membrana celular, o que pode levar à morte celular, seja por necrose ou apoptose. Entre os métodos mais utilizados para avaliar a citotoxicidade, destacam-se os ensaios MTT, o Ensaio do Vermelho Neutro e o teste de LDH (SKRZYDLEWSKI et al. 2022).

O ensaio de MTT, também conhecido como ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, é um teste colorimétrico descrito por Mosmann em 1983, utilizado para medir a atividade metabólica. O princípio do teste baseia-se na conversão do sal de tetrazólio amarelo solúvel em água (MTT) em cristais de formazano roxos, que são insolúveis em água, por células metabolicamente ativas. A succinato desidrogenase das mitocôndrias ativas desempenha um papel crucial nessa conversão, auxiliada pela coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), que é gerada durante a glicólise no citoplasma e a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias. Após a redução, os cristais de formazano, que são solúveis em solventes orgânicos, são dissolvidos, e a solução resultante é analisada por densidade óptica em um comprimento de onda entre 500-600 nm, utilizando um espectrofotômetro ou um leitor de microplacas. A intensidade da cor do formazano é proporcional ao número de células viáveis e metabolicamente ativas, permitindo a avaliação da toxicidade celular (BURANAAMNUAY, 2021).

Nos testes de LDH, ou teste da Lactato Desidrogenase, mede-se a quantidade dessa enzima nos meios de cultura. Como a LDH é uma enzima citoplasmática, ela é liberada em grandes quantidades apenas em situações de necrose ou apoptose celular. Neste teste, o sal de tetrazólio amarelo é convertido por NADH em corante de formazan, que é medido em um

espectrofotômetro a 492 nm. A quantidade de formazan gerada está diretamente relacionada à concentração de LDH no meio de cultura (SKRZYDLEWSKI et al. 2022).

O ensaio do vermelho neutro (VN) avalia a capacidade das células vivas de absorver o corante vermelho neutro. Este corante penetra nas células e se acumula nos lisossomos. Após a lavagem, o corante é extraído das células utilizando etanol acidificado e medido por espectrofotometria. O ensaio depende da habilidade das células em manter um gradiente de pH que permite a entrada do corante na membrana celular e sua permanência nos lisossomos; apenas células viáveis conseguem manter essa capacidade. A quantidade de corante medida é diretamente proporcional ao número de células vivas (SKRZYDLEWSKI et al. 2022).

4. MANUSCRITO:

Thiosulfonate Derivatives as Emerging Antibacterial Agents: Efficacy Against Resistant Strains and Safety Profile *In Vitro*

Pedro Henrique Flores da Cruz¹, Vithor Parada Garcia¹, Luize Garcia Blotta de Melo¹, Josiane Dias Pires¹, Evelyn Azambuja Soares², José Eduardo Vieira Fagundes², Juliano Alex Roehrs^{2**}, Ethel Antunes Wilhelm³, Rodrigo de Almeida Vaucher¹, Janice Luehring Giongo^{4*}

¹Laboratory of Biochemistry Research and Molecular Biology of Microorganisms (LaPeBBiOM), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), RS, Brazil. ²Laboratory of Synthetic, Structural, and Computational Organic Chemistry (LaQuiOSEC), Federal Institute of Education, Science and Technology of Southern Rio Grande do Sul (IFSul), Pelotas, RS, Brazil.

³Biochemical Pharmacology Research Laboratory (LaFarBio), Neurobiotechnology Research Group (GPN), Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), RS, Brazil.⁴ Faculty of Medicine (FAMED), Pharmacy Course, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), RS, Brazil.

Abstract

Bacterial resistance poses an increasing threat to global public health, demanding the development of novel therapeutic alternatives. This study aimed to synthesize, characterize, and evaluate the antibacterial and cytotoxic activities of seven synthetic thiosulfonate compounds. The compounds were tested against both Gram-positive and Gram-negative bacterial strains, including clinical isolates. Antimicrobial activity was assessed using disk diffusion, MIC/MBC determination, and time-kill assays. Among the tested molecules, 4-MBMT, 4-MBET, and 4-MBAT exhibited the lowest inhibitory and bactericidal concentrations, with rapid and effective bacterial colony reduction. Hemolysis and cytotoxicity assays (MTT and neutral red uptake) revealed low toxicity at concentrations below those required for antimicrobial effect. These findings highlight synthetic thiosulfonates as promising candidates for antimicrobial development, particularly when combined with pharmaceutical formulations designed to mitigate cytotoxicity.

Keywords: Thiosulfonates, antimicrobial resistance, MIC, cytotoxicity, time-kill assay, synthetic compounds.

1. INTRODUCTION

Microbial resistance is a phenomenon in which microorganisms develop the ability to survive and proliferate even in the presence of antimicrobial agents. This resistance is caused by several factors, the main ones being the inappropriate or excessive use of these drugs, self-medication, poor hygiene practices, and unsanitary

living conditions. The impacts are severe and far-reaching, as resistance leads to longer hospital stays, increased medical treatment costs, and higher mortality rates from infections. Moreover, resistance undermines the effectiveness of medical procedures that rely on antimicrobials, such as surgeries, chemotherapy, and organ transplants, thereby posing a serious threat to global health ¹.

Each year, it is estimated that 7.7 million people die as a result of bacterial infections, with approximately 4.95 million of these deaths linked to bacterial pathogens that are resistant to currently available antibiotics. The main bacteria associated with antimicrobial resistance (AMR) are: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Streptococcus pneumoniae* ². These microorganisms are included in the World Health Organization's (WHO) 2024 list of priority bacterial pathogens, and there is an overlap with a distinct group of pathogens known as ESKAPEE, which includes *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacterales* ³.

Given the existing resistance, the development of new antibiotics is essential for the treatment of these infections, and research involving alternative compounds is both critical and urgent. Moreover, the implementation of diagnostic methods and the accurate identification of resistant bacteria are also key components in addressing this challenge ⁴.

In this context, the search for effective and sustainable alternatives to the traditional use of antimicrobials becomes imperative. Among the emerging approaches, bioactive compounds of natural origin, such as plant extracts, essential oils⁵⁻⁷, and sulfur-containing molecules, stand out due to their distinct mechanisms of action, which are often synergistic with conventional treatments. Among these compounds,

thiosulfonates such as allicin, a sulfur-containing substance derived from garlic (*Allium sativum*), have gained prominence for their well-documented antimicrobial properties, reported since the 1960s^{8–10}. Allicin acts primarily through the oxidation of thiol groups in essential microbial proteins, directly affecting their cellular viability. In addition, studies have demonstrated its efficacy against a wide range of pathogens, including Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi, and even microbial biofilms. These characteristics make thiosulfonates promising natural antimicrobial agents, with the potential to complement or even replace conventional drugs, thereby contributing significantly to the fight against antimicrobial resistance¹⁰.

In addition to their demonstrated antimicrobial effects, thiosulfonates offer several other important advantages, including the possibility of simple, low-cost synthesis with high yields, and the production of compounds with a low level of impurities. Furthermore, green chemistry methods have already been developed for their synthesis, making these molecules even more attractive from both environmental and industrial perspectives. In light of this, the present study aims to evaluate the antibacterial potential of seven different synthetic thiosulfonates by determining their minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The efficacy of these molecules will also be assessed against various clinically relevant bacterial strains, with the goal of contributing to the development of new strategies to combat antimicrobial resistance.

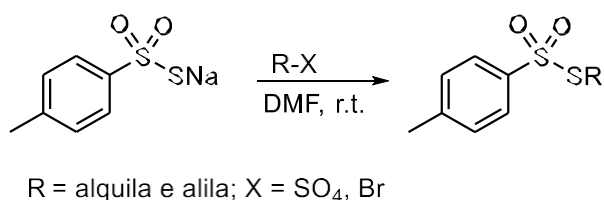
2. MATERIALS AND METHODS

2.1 General Information

The reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) using Merck silica gel 60 F254, with visualization under UV light and development using a 5%

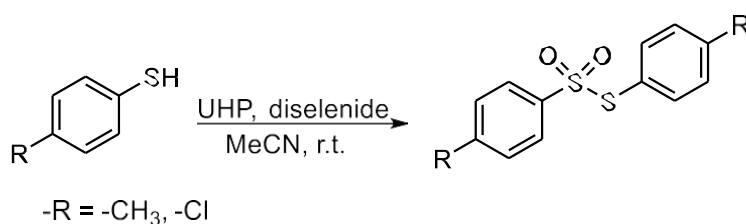
vanillin solution in 10% H₂SO₄, followed by heating. Proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectra were recorded at 400 MHz on a Bruker Avance III HD 400 spectrometer. The spectra were acquired in CDCl₃, and chemical shifts (δ) are expressed in parts per million (ppm), using tetramethylsilane (TMS) as an external reference. High-resolution mass spectra were recorded using a Shimadzu GC-MS-QP2010 and a Bruker Micro TOF-QII spectrometer, employing direct injection in positive ESI mode with sodium formate as the calibrant.

General procedure for the synthesis of non-symmetrical thiosulfonates



To a solution of sodium *p*-toluenethiosulfonate (5.0 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (5 mL, 1 M), the corresponding alkyl bromide (7.5 mmol, 1.5 equiv.) or dialkyl sulfate (5.0 mmol, 1.0 equiv.) was added via syringe. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Upon completion, the reaction was quenched with saturated aqueous NaCl (25 mL) and extracted with ethyl acetate (3 × 25 mL). The combined organic phases were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. When necessary, the crude product was purified by column chromatography on silica gel using ethyl acetate/hexane (1:20, v/v) as the eluent¹¹.

General procedure for the synthesis of symmetrical thiosulfonates



A round-bottom flask was charged with thiol (1 mmol), dibutyl diselenide (1 mol%), and MeCN (1 mL), followed by the addition of 30% aqueous H₂O₂ solution (2.5

equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 6 hours, and the reaction progress was monitored by TLC. Upon completion, the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic phase was dried over anhydrous MgSO_4 , filtered, and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography using a hexane/ethyl acetate mixture (97:03, v/v) as the eluent, affording the desired compound. All S-alkyl-*p*-toluenethiosulfonates, except for 4-MBTSSB, are known compounds and match spectral data reported in the literature ^{12,13}.

2.2 Characterization of Thiosulfonate Compounds

All synthesized thiosulfonates, 4-methylbenzenemethyl thiosulfonate (4-MBMT), 4-methylbenzeneethyl thiosulfonate (4-MBET), 4-methylbenzeneallyl thiosulfonate (4-MBAT), 4-methylbenzenesec-butyl thiosulfonate (4-MBSBT), 4-methylbenzenepropyl thiosulfonate (4-MBPT), 4-methylbenzene thiosulfonate (para- CH_3), and 4-chlorobenzene thiosulfonate (para-Cl), were characterized by ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and high-resolution mass spectrometry (HRMS). The corresponding spectral data are available in the supplementary materials.

2.3 Microorganisms

The antimicrobial activity was investigated using Gram-positive bacterial strains (*Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1026, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, and a clinical isolate of *S. aureus*) and Gram-negative strains (*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter hormaechei* ATCC 700323, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, as well as clinical isolates of *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, and *P. aeruginosa*), all obtained from the microbial collection of the Laboratory of Research in Biochemistry

and Molecular Biology of Microorganisms (LaPeBBiom). Gram-positive bacteria were cultured on nutrient agar, while Gram-negative bacteria were grown on MacConkey agar. All strains were incubated at 37 °C in a bacteriological incubator for 24 hours prior to use.

2.4 Test Solutions

For the disk diffusion and MIC/MBC experiments, individual stock solutions were prepared by dissolving 100 mg of each compound: para-Cl, para-CH₃, 4-MBSBT, 4-MBPT, 4-MBAT, 4-MBET and 4-MBMT, in 1 mL of DMSO. This resulted in a solution with a final concentration of 100 mg/mL, which was used for conducting the tests.

2.5 Disk Diffusion Assay

For initial screening, the disk diffusion assay was performed, adapted from the CLSI M100 protocol¹⁴. Bacterial suspensions of the selected strains (*Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1026, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Enterobacter hormaechei* ATCC 700323, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606) were adjusted to 0.5 on the McFarland scale and spread on sterile 15 mL Mueller-Hinton agar Petri dishes. Sterile paper disks were placed onto the agar surface, and 10 µL of each compound solution (para-Cl, para-CH₃, 4-MBSBT, 4-MBAT, 4-MBPT, 4-MBET, and 4-MBMT) was applied to the disks. Plates were incubated at 37 °C for 24 hours. After incubation, the diameters of the inhibition zones were measured.

2.6 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the broth microdilution method in 96-well plates, following the CLSI M7-A6 and M44-A2 guidelines ¹⁵, respectively. The compounds were prepared in sterile tubes, and serial dilutions were carried out from the first to the tenth well of the plate. After the serial dilutions, 10 μ L of bacterial inoculum adjusted to 0.5 on the McFarland scale was added to each well. The plates were then incubated for 24 hours at 37 °C. A negative control (medium only) and a positive control (medium plus 10 μ L of bacterial inoculum) were included. MIC was defined as the lowest compound concentration that inhibited visible microbial growth, as determined by the absence of turbidity in the wells. In some cases, dilutions beyond the tenth well were required.

The minimum bactericidal concentration (MBC) was determined by plating 1 μ L aliquots from the wells corresponding to 2 $\times$ MIC, MIC, and $\frac{1}{2}$ MIC onto Mueller-Hinton (MH) agar. The plates were incubated for 24 hours at 37 °C, and colonies were counted to assess bacterial viability. MBC was defined as the lowest concentration at which no bacterial growth was observed. In certain cases, wells corresponding to 4 $\times$, 8 $\times$, and 16 $\times$ MIC were also plated when necessary.

In addition to the aforementioned bacteria, after identifying the three most promising compounds based on MIC results against the ATCC strains, these compounds were further evaluated for their antimicrobial activity by determining the MIC and MBC against clinical isolates (CI). The clinical isolates included *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*.

2.7 Time-Kill Assay

For the time-kill assay, solutions of the compounds 4-MBMT, 4-MBET, and 4-MBAT were prepared at concentrations of 4 $\times$ MIC, 2 $\times$ MIC, and MIC, based on the

MIC results previously obtained against the tested ATCC bacterial strains. Triplicate test tubes were prepared with 1 mL of Mueller-Hinton (MH) broth and 10 μ L of bacterial inoculum, followed by the addition of 100 μ L of each compound solution. A negative control (MH broth only) and a positive control (MH broth plus bacterial inoculum without compound) were also included.

All tubes were incubated at 37 °C in a shaking incubator. At time points 0, 6, 12, 24, and 48 hours, 1 μ L samples were collected from each tube and plated onto MH agar. All agar plates were incubated at 37 °C for 24 hours. Colony counts were then performed to determine the number of colony-forming units per milliliter (CFU/mL). Any count equal to or greater than 300 CFU was recorded as 300 CFU to standardize the upper limit and facilitate graphical representation.

This experiment was conducted using the same ATCC strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* employed in the disk diffusion assay, with the objective of evaluating the efficacy of the three most promising compounds (MBMT, MBET, and MBAT) against two bacteria with different morphologies. Additionally, the MIC values obtained from the previous tests against these strains were used as reference concentrations.

2.8 Hemolytic Assay

The hemolytic assay was adapted from Ferrer et al. (2024) ¹⁶. Defibrinated sheep blood (Laborclin®) was used to prepare a 4% (v/v) erythrocyte suspension in sterile saline. This suspension was incubated with different concentrations of the compounds (4-MBMT, 4-MBET, and 4-MBAT) for 1 hour at 37 °C. Afterwards, the samples were centrifuged at 2500 RPM for 10 minutes, and the supernatants were transferred to 96-well plates and read using a microplate reader at a wavelength of 419 nm.

The percentage of hemolysis (H%) was calculated using the equation:

$$H\% = (X_{abs} \times 100) / \text{MeanAbsC}^+$$

H% is the percentage of hemolysis, *X_{abs}* is the absorbance measured in the sample well, and *MeanAbsC⁺* is the mean absorbance of the positive control wells. Hemolytic activity was considered safe in groups showing hemolysis below 40%.

2.9 MTT Cytotoxicity Assay

This assay was adapted from Ferrer et al. (2024)¹⁶, and is based on the ability of mitochondria to reduce MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), a yellow tetrazolium salt, into blue formazan crystals. Cells were incubated with the test compounds at concentrations of 0.093 mg/mL for 4-MBMT and 4-MBET, and 0.372 mg/mL for 4-MBAT. After incubation, cells were washed with PBS, and 50 µL of MTT solution (1 mg/mL) was added to each well. Plates were then incubated at 28 °C for 3 hours. Following incubation, the medium was removed and replaced with 100 µL of DMSO to solubilize the formazan crystals. Absorbance was measured at 540 nm using a microplate reader. The mitochondrial viability percentage (*V%*) was calculated using the equation:

$$V\% = (X_{abs} \times 100) / \text{MeanAbsC}^-$$

V% represents mitochondrial viability, *X_{abs}* is the absorbance value of the sample, and *MeanAbsC⁻* is the mean absorbance of the negative control wells. The positive control (C⁺) consisted of culture medium with cells only, while the negative control (C⁻) included Triton X-100 added to the culture medium and cells.

2.10 Neutral Red Uptake Assay

This assay was performed based on Ferrer et al. (2024)¹⁶, with adaptations. Cells were incubated at 36 °C for 24 hours with compound concentrations of 0.093 mg/mL for 4-MBMT and 4-MBET, and 0.372 mg/mL for 4-MBAT. After incubation, cells were washed with PBS, and 200 µL per well of neutral red (NR) solution at 40 µg/mL was

added. Plates were then incubated at 28 °C for 3 hours. After this period, cells were washed twice with PBS to remove non-incorporated dye. Then, 150 µL of acid-alcohol solution (50% ethanol, 49% distilled water, and 1% glacial acetic acid) was added to each well. The plates were read at 540 nm using a microplate reader. The same controls used in the MTT assay were applied. The percentage of cell viability was calculated using the same equation:

$$V\% = (X_{abs} \times 100) / \text{MeanAbsC-}$$

V% is the percentage of cell viability, *X_{abs}* is the absorbance of the sample, and *MeanAbsC-* is the mean absorbance of the negative controls.

2.11 Global 50% Inhibitory Concentration (Global IC₅₀)

All calculated IC₅₀ values are presented here. The global IC₅₀ was defined as the mean of the IC₅₀ values obtained from the cytotoxicity assays (MTT and Neutral Red Uptake) for the compounds 4-MBAT, 4-MBET, and 4-MBMT.

2.12 Statistical Analysis

Statistical analyses and graph plotting were performed using GraphPad Prism version 8.1®. In the hemolysis, MTT, and NR assays, one-way ANOVA was performed, and IC₅₀ values were calculated when possible using nonlinear regression. For the time-kill curves, only the mean values were presented as a function of time progression.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Thiosulfonates have a wide range of applications, including use in the agricultural, petrochemical, industrial, and pharmaceutical sectors. Numerous studies

are being conducted to further expand their applicability, including their potential use as pharmaceutical agents ¹⁶. With the growing demand for thiosulfonates, several synthetic methodologies have been developed. The first historically significant method was developed by Bentley, which involved the use of sodium sulfinates and alkyl disulfides, converting them into thiosulfonates through the application of stoichiometric amounts of silver nitrate ¹⁷.

In 2014, a synthetic methodology was developed that allowed thiosulfonate synthesis under oxygen-rich atmospheres. The following year, the first environmentally friendly synthetic routes emerged, significantly reducing waste generation and employing less toxic reagents for the synthesis of this molecular class ^{17,18}. The synthetic methodologies employed in this study demonstrated high yields, producing thiosulfonates with a high degree of purity, low production of toxic by-products, and reduced costs, thereby constituting an efficient and green synthesis approach.

The synthesis of thiosulfonate compounds involves chemical reactions that utilize sulfur precursors with other organic components, resulting in molecules with promising antimicrobial properties. Our study employed seven compounds that were produced in an accessible and scalable manner. Additionally, thiosulfonates proved to be effective against a variety of bacteria, including multi-drug resistant strains, making them an interesting alternative in the fight against infections. Their application as antimicrobial agents is quite promising, especially in contexts where new therapeutic options are needed due to the rising bacterial resistance.

3.1 Disk Diffusion

The results obtained for the analyzed compounds against Gram-positive (Gram+) and Gram-negative (Gram-) bacterial strains are presented in Table 1. It is

observed that all tested compounds exhibit antimicrobial activity that warrants further exploration.

Table 1. Zones of growth inhibition of Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Reference strain	Zone of growth inhibition (mm $\pm$ SD)						
	Para-CH ₃	Para-Cl	4-MBSBT	4-MBPT	4-MBAT	4-MBET	4-MBMT
<i>A. baumannii</i> (ATCC 19606)	10.5 $\pm$ 0.5	10.5 $\pm$ 0.5	10.5 $\pm$ 0.5	11.5 $\pm$ 1.5	20 $\pm$ 0	11.5 $\pm$ 1.5	20 $\pm$ 0
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	10.5 $\pm$ 0.5	9 $\pm$ 1	11.5 $\pm$ 1.5	9 $\pm$ 1	11.5 $\pm$ 1.5	18.5 $\pm$ 0.5	24 $\pm$ 1
<i>E. faecalis</i> (ATCC 51299)	16 $\pm$ 1	10.5 $\pm$ 0.5	21 $\pm$ 2	21 $\pm$ 1	19.5 $\pm$ 1.5	15.5 $\pm$ 0.5	14 $\pm$ 1
<i>E. hormaechei</i> (ATCC 700323)	11.5 $\pm$ 1.5	6.5 $\pm$ 0.5	10.5 $\pm$ 0.5	10.5 $\pm$ 0.5	10 $\pm$ 0	15 $\pm$ 0	15.5 $\pm$ 0.5
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 13883)	10.5 $\pm$ 0.5	9.5 $\pm$ 0.5	11 $\pm$ 1	10.5 $\pm$ 0.5	11 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1	16 $\pm$ 1
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	12 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	9.5 $\pm$ 0.5	11 $\pm$ 1	10.5 $\pm$ 0.5	9 $\pm$ 1	23 $\pm$ 1
<i>S. aureus</i> (ATCC baa 1026)	16 $\pm$ 1	14.5 $\pm$ 0.5	33.5 $\pm$ 1.5	25.5 $\pm$ 0.5	20 $\pm$ 0	21 $\pm$ 1	33 $\pm$ 1

Mean inhibition zone diameters (mm $\pm$ SD) for each compound against ATCC bacterial strains. Values represent the average of duplicate tests.

With the continuous rise in antimicrobial resistance, research on new molecules has become highly relevant. The discovery of novel compounds capable of overcoming resistance mechanisms or targeting pathways not yet exploited by current antimicrobials has never been more critical. The disk diffusion method is widely used worldwide to assess the presence of antimicrobial activity or resistance to a given agent. Therefore, disk diffusion is highly valuable in the early stages of screening for antimicrobial potential, allowing for the selection of compounds with the most promising effects.

The results from the disk diffusion assay demonstrated that all tested compounds exhibited antimicrobial potential. When analyzing the inhibition zones, it was evident that the compounds were more effective against Gram-positive bacteria. The compound 4-MBSBT showed the largest inhibition zone, measuring 33.5 mm against

Staphylococcus aureus. The best results against Gram-negative bacteria were observed for 4-MBMT, with mean inhibition zones of 24 mm for *Escherichia coli* and 23 mm for *Pseudomonas aeruginosa*. These findings are consistent with previous reports in the literature, which highlight that sulfur-containing compounds exhibit promising antimicrobial activity. Specifically, thiosulfinates and thiosulfonates with different molecular arrangements are capable of inhibiting bacterial growth^{10,19–21}.

Another important observation is that the inhibition zones obtained are very similar to those reported in studies using propyl-propane-thiosulfonate (PTSO) against agriculturally important bacteria such as *Pseudomonas savastanoi*, *Pseudomonas syringae*, and *Xanthomonas campestris*. In those studies, the inhibition zone for *Pseudomonas* species was approximately 12 mm, while for *Xanthomonas*, it was around 30 mm¹⁹. According to Turos et al., thiosulfonate compounds may inhibit bacterial growth by promoting the production of alkyl-CoA disulfides, which inhibit the β -ketoacyl-acyl-carrier protein synthase III enzyme. This enzyme is responsible for type II fatty acid synthesis, and its inhibition leads to structural problems in bacterial cell membrane formation²².

3.2 MIC and MBC

The results of the MIC and MBC tests for the seven evaluated compounds are presented in Table 2. The bacterial species used in this study were selected based on the World Health Organization's ESKAPE list, which highlights the urgent need for new molecules capable of combating these high-priority pathogens^{1–3}. Our results demonstrate the potential of these thiosulfonate-derived compounds, as all of them were able to in Table 2. Minimum inhibitory and bacterial concentrations

Strain	Para-CH ₃		Para-Cl		4-MBSBT		4-MBPT		4-MBAT		4-MBET		4-MBMT	
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>A.baumannii</i> ATCC 19606	23.815	47.63	23.805	47.61	5.954	23.815	1.488	5.954	0.186	0.372	0.372	0.744	0.093	0.186
<i>E. coli</i> ATCC 25922	11.907	23.815	23.805	47.61	1.488	1.488	0.744	1.488	0.744	0.744	0.372	0.744	0.093	0.093
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	0.372	5.954	23.805	47.61	0.186	0.372	0.093	0.093	0.186	5.954	0.186	0.372	0.093	0.186
<i>E. hormaechei</i> ATCC 700323	11.907	23.815	23.805	47.61	1.488	1.488	2.977	11.907	0.372	0.372	0.093	0.093	0.023	0.046
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	11.907	23.815	23.805	47.61	5.954	11.907	1.488	2.977	0.744	1.448	0.093	0.186	0.023	0.023
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	11.907	23.815	23.805	47.61	5.954	23.815	5.954	23.815	1.488	2.977	0.372	0.744	0.093	0.186
<i>S. aureus</i> ATCC baa 1026	0.372	0.744	23.805	47.61	0.093	0.186	0.093	0.093	0.372	0.744	0.372	0.372	0.093	0.093

The values presented are expressed in mg/mL, representing results from serial dilutions performed in duplicate.

Among the tested compounds, para-Cl exhibited the highest MIC values across all bacterial strains, with a value of 23.805 mg/mL. In contrast, para-CH₃ showed higher MIC values against Gram-negative bacteria but demonstrated promising activity against Gram-positive strains, especially against *S. aureus*, for which it showed a MIC and MBC of 0.372 and 0.744 mg/mL, respectively. The compounds 4-MBSBT and 4-MBPT also showed superior activity against Gram-positive bacteria. Both exhibited a MIC of 0.093 mg/mL against *S. aureus*.

Regarding MBC, 4-MBPT showed a value equal to its MIC, while 4-MBSBT had an MBC of 0.186 mg/mL. Additionally, 4-MBPT performed well against *E. coli* and *E. faecalis*, with MICs of 0.744 and 0.093 mg/mL, respectively. The most potent results were observed with 4-MBAT, 4-MBET, and 4-MBMT. 4-MBAT exhibited low MICs across all strains, suggesting its potential as a broad-spectrum antimicrobial agent. 4-MBET also demonstrated low MIC and MBC values against all tested bacteria, with its most notable results observed against *K. pneumoniae* and *E. hormaechei*, showing MBCs of 0.186 and 0.093 mg/mL, respectively.

The compound 4-MBMT exhibited the most potent antibacterial activity, showing the lowest MIC and MBC values among all tested strains. Its strong bacteriostatic and bactericidal effects highlight its potential as a promising antimicrobial agent, with the most significant effects also recorded against *K. pneumoniae* and *E. hormaechei*.

According to Sorlópezano-Puerto et al. (2020), thiosulfonates such as propyl-propane-thiosulfonate (PTSO) have demonstrated the ability to inhibit a wide range of bacterial strains. Studies using PTSO in the gas phase reported relatively low MICs,

including approximately 11 mg/mL for *E. coli* ATCC 25922, 18 mg/mL for *K. pneumoniae* ATCC 700603, and 10 mg/mL for *E. faecalis* ATCC 29212. In a study by D'Amico et al. (2023), PTSO tested in liquid phase showed MICs of 1.25 and 2.5 µL/mL against different *E. coli* strains isolated from rabbits.

According to Borlinghaus et al. (2021, 2014), the antimicrobial effects observed in thiosulfonates may be attributed to their ability to form covalent bonds with cysteine residues in certain proteins. This interaction leads to loss of protein function, impairing essential bacterial metabolic processes and causing structural damage to the bacterial cell, ultimately resulting in cell death^{25,26}. The results obtained in this study demonstrate that thiosulfonates possess significant antimicrobial potential, as they were capable of inhibiting bacterial growth. Moreover, it is noteworthy that, to date, no reports have been found in the literature evaluating the antimicrobial activity of these specific molecules, highlighting the novelty and originality of this research.

3.3 MIC and MBC Against Clinical Isolates

Table 4 shows the results obtained for the compounds 4-MBAT, 4-MBET, and 4-MBMT against the clinical isolates.

Table 4. Minimum inhibitory and bacterial concentrations for Clinical Isolates (CI)

Strain (CI)	4-MBAT		4-MBET		4-MBMT	
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>A. baumannii</i> (CI)	0.093	0.186	0.023	0.186	0.006	0.012
<i>E. coli</i> (CI)	0.186	0.186	0.003	0.006	0.0015	0.003
<i>K. pneumoniae</i> (CI)	0.372	0.372	0.023	0.093	0.0015	0.003
<i>P. aeruginosa</i> (CI)	0.372	0.372	0.186	0.372	0.003	0.003
<i>S. aureus</i> (CI)	0.046	0.046	0.046	0.093	0.046	0.186

The values presented are expressed in mg/mL, representing results from serial dilutions performed in duplicate.

Regarding the effect of the molecules against clinical isolates, 4-MBMT once again demonstrated superior antimicrobial activity compared to the other compounds,

showing the lowest MIC and MBC values across all tested strains. The most pronounced effects were observed against *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *P. aeruginosa*.

The second most effective compound was 4-MBET, which exhibited low MIC and MBC values against all clinical strains and demonstrated its best bactericidal activity against *E. coli*. In contrast, 4-MBAT presented higher MIC values compared to the other two compounds but showed the strongest bactericidal effect against the clinical isolate of *S. aureus*, with an MBC of 0.046 mg/mL.

These results support the conclusion that these molecules are capable of effectively inhibiting the growth of clinically relevant bacterial strains, representing a truly promising therapeutic alternative. Few studies are reporting the activity of thiosulfonates against clinical isolates and/or resistant bacteria. Sorlópezano-Puerto et al. (2018) demonstrated that PTSO exhibits MIC values ranging from 4 to 8 mg/L for *S. aureus*, 8 to 16 mg/L for *E. faecalis*, and 8 to 16 mg/L for *Streptococcus agalactiae* clinical isolates. However, significantly higher MIC values were reported for Gram-negative strains, such as *P. aeruginosa* (MIC range: 512–2048 mg/L) and members of the *Enterobacteriaceae* family (MIC: 64–128 mg/L). These findings are in agreement with the results obtained in the present study²³.

In another study, Sorlópezano-Puerto et al. (2024), evaluated the activity of PTSO against carbapenem-resistant bacterial strains. The MIC values reported ranged from 128 to 256 mg/L for *K. pneumoniae*, 64 to 256 mg/L for *E. coli* and *E. cloacae*, and 32 to 256 mg/L for *A. baumannii*. The least favorable results were observed for *P. aeruginosa*, with MIC values ranging from 256 to 2048 mg/L²⁷. Altogether, these data are consistent with the findings of our study and further support the efficacy of thiosulfonates, while also highlighting that the effective concentration may vary depending on the bacterial species tested.

The study by Karkhut et al. evaluated the antimicrobial effects of different thiosulfonates modified by the addition of fluoroalkyl groups. The modified molecules were also compared with their respective precursors and tested against *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Raoultella ornithinolytica* (DSM 7464), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), as well as clinical isolates of *P. aeruginosa*, *Pseudomonas luteola*, and *Klebsiella varicola*. For all tested bacterial strains, the fluoroalkyl-modified molecules exhibited lower antimicrobial activity compared to their precursors, indicating that the addition of fluoroalkyl groups was not beneficial for antimicrobial activity. This modification led to reduced efficacy, demonstrating that the incorporation of fluorine is not a promising strategy to enhance the antimicrobial properties of thiosulfonates²⁸.

In contrast, the molecules 4-MBAT, 4-MBET, and 4-MBMT exhibited strong antibacterial activity against both ATCC reference strains and clinical isolates. This highlights their significant potential, as they were able to inhibit the growth of clinically relevant bacteria that are frequently exposed to antimicrobial agents in routine medical practice. Given the urgent need for new compounds capable of overcoming bacterial resistance mechanisms, these findings further emphasize the relevance of this study.

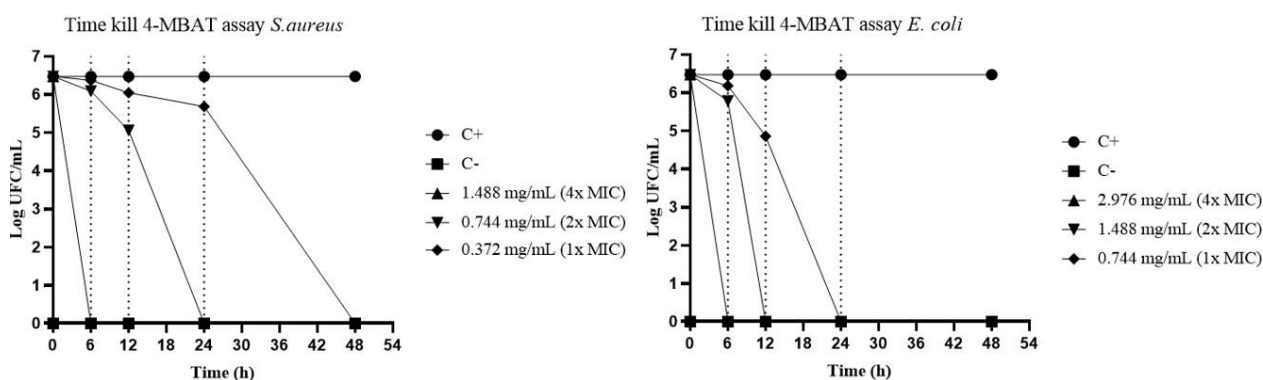
According to Vaishampayan and Grohmann (2022), some sulfur-containing compounds promote the formation of disulfide bridges that react with glutathione, forming thioxy-aldehydes. These compounds induce alterations in the cellular redox environment, leading to oxidative stress damage that ultimately results in bacterial cell death²⁹. Similarly, the study by Southam et al. highlights that the formation of disulfide bridges can cause inactivation of enzymes and metalloenzymes, resulting in substantial loss of enzymatic function. Additionally, these bridges disrupt the intracellular redox balance, contributing to bacterial cell death³⁰. Taken together, these and previous

studies provide possible explanations for the antibacterial activity observed in thiosulfonates, suggesting that more than one mechanism may be involved in this effect.

3.4 Time-Kill Assay

The time-kill assay was conducted for the compounds 4-MBAT, 4-MBET, and 4-MBMT. These compounds were tested against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1026. The results are shown in Figures 1 to 3.

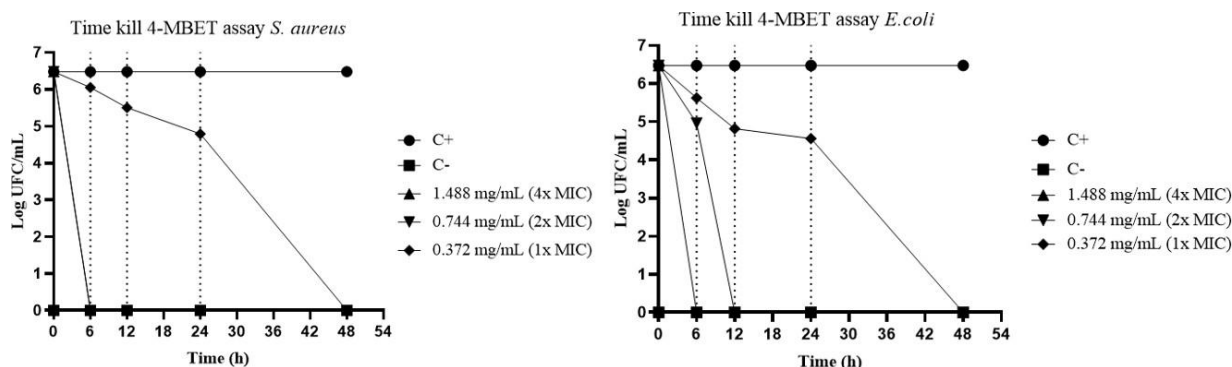
Figure 1. Time-kill assay for 4-MBAT



C⁺: Mueller-Hinton broth with bacterial inoculum; C⁻: Mueller-Hinton broth only; concentrations tested: 4× MIC, 2× MIC, and 1× MIC.

In the time-kill assay with 4-MBAT, it was observed that the highest concentration tested against both bacterial strains resulted in complete bacterial elimination within just six hours of exposure. At the 2× MIC concentration, a bactericidal effect was achieved against *S. aureus* at 24 hours, and against *E. coli* at 12 hours. These results indicate that 4-MBAT is capable of eliminating bacterial colonies in a time-dependent manner, with an inverse relationship between concentration and exposure time.

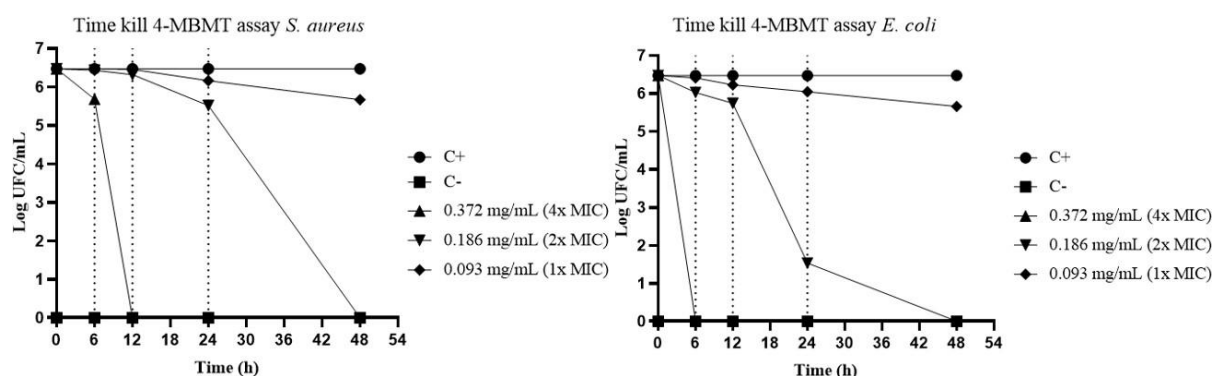
Figure 2. Time-kill assay for 4-MBET



C⁺: MH broth with bacterial inoculum; C⁻: MH broth only; concentrations tested: 4× MIC, 2× MIC, and MIC.

The concentration used for the compound 4-MBET against *E. coli* and *S. aureus* corresponded to the MIC values previously determined. For *S. aureus*, the two highest concentrations required only 6 hours of exposure to completely eliminate the bacterial colonies; however, at the MIC concentration, 48 hours were needed to reduce the bacterial population to zero. Regarding *E. coli*, the highest concentration tested was sufficient to eliminate all bacterial colonies within 6 hours. 4-MBET proved capable of inhibiting bacterial colonies at all tested concentrations, once again demonstrating the potential of thiosulfonates as antimicrobial agents.

Figure 3. Time-kill assay for 4-MBMT



C⁺: MH broth with bacterial inoculum; C⁻: MH broth only; concentrations tested: 4× MIC, 2× MIC, and MIC.

The compound 4-MBMT demonstrated bactericidal activity against *E. coli* at the highest tested concentration within 6 hours. At 2× MIC, the colonies were completely

eliminated after 48 hours, whereas at the lowest concentration, the compound was only able to reduce the number of colonies, indicating that this concentration was merely inhibitory. The same pattern was observed at the lowest concentration against *S. aureus*.

In recent literature, the time-kill assay has primarily been employed to evaluate improvements in antibacterial effects resulting from synergistic combinations of substances. Furthermore, unlike the present study, it is frequently applied to bacterial strains with established resistance profiles. Huang et al. (2024) performed the time-kill assay against multidrug-resistant *Escherichia coli*, testing a combination of colistin and flavomycin. At a concentration of 16 µg/mL flavomycin combined with 4 µg/mL colistin, bacterial colonies were completely eradicated within just 4 hours. At lower concentrations (8 µg/mL flavomycin + 2 µg/mL colistin), only a reduction in bacterial colonies was observed within the first 4 hours, followed by bacterial regrowth afterward³¹.

In the study by Tong et al. (2023), the addition of garlic oil at concentrations of 256–512 µg/mL combined with cefquinome at concentrations of 64, 512, and 1024 µg/mL was evaluated. At the highest concentrations, complete inhibition of *ESBL E. coli* strains isolated from feline feces in China was achieved within 6 to 8 hours³².

Evaluating the thiosulfonate PTSO as a potential antimicrobial growth promoter for animals, Ruiz et al. (2010) conducted a time-kill assay against *E. coli* and *Salmonella typhimurium* using PTSO at a concentration of 100 ppm. Their results showed that within 5 hours of exposure, bacterial cells were completely eliminated. Furthermore, they demonstrated that over time, bacterial viability progressively decreased until complete eradication was achieved, confirming the antimicrobial potential of PTSO³³. These findings are consistent with the results of the present study, which demonstrate that at bactericidal concentrations, thiosulfonate compounds exhibit

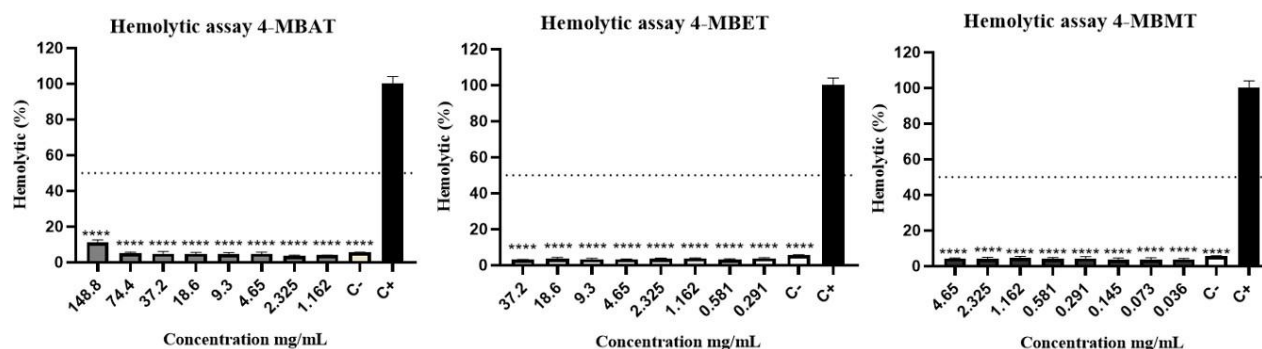
a rapid antimicrobial effect, capable of inhibiting bacterial growth within as little as 6 hours in some cases.

It is also noteworthy that Ruiz et al. tested the effect of PTSO only against Gram-negative bacteria, while our study evaluated the effect against bacteria with different morphologies, including both Gram-positive and Gram-negative strains. Nevertheless, similar results were observed for both bacterial types. Additionally, it is important to highlight that, to date, the time-kill assay has been applied to thiosulfonates only by Ruiz et al. and by our research group.

3.5 Hemolytic Assay:

Both the hemolytic assay and the cytotoxicity assays were performed only for the most promising compounds: 4-MBAT, 4-MBET, and 4-MBMT. The results of the hemolytic assay are presented in Figure 4.

Figure 4. Hemolysis assay for 4-MBAT, 4-MBET and 4-MBMT



The graph data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. The mean value of the positive control was used as 100%. C⁺: Triton X-100; C⁻: sterile saline. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test, where **** = $p < 0.0001$ compared to C⁺.

In the hemolytic assays performed for the three compounds, the results were remarkably similar. None of the tested concentrations caused hemolysis, indicating that these compounds do not affect the integrity of erythrocyte membranes, nor do they cause cellular damage. This is a favorable outcome regarding the potential application of these molecules.

The study by Savarino et al. evaluated the hemolytic effect of sulfur-containing saponins extracted from the sea cucumber *Holothuria scabra*. Their results demonstrated that concentrations up to 5 µg/mL did not cause significant hemolysis in bovine erythrocytes. However, at higher concentrations, an increase in hemolytic activity was observed. For comparison, the authors removed the sulfur atom from the natural saponin molecule and tested the hemolytic effect of the resulting derivative. The results showed that the absence of sulfur completely eliminated hemolysis at all tested concentrations. The authors explained that the presence of the sulfur atom facilitates the interaction between the lipophilic portion of the saponin and the cell membrane, leading to hemolysis ³⁴. Although this study highlights the role of sulfur in promoting hemolysis, our findings suggest that the mere presence of sulfur atoms is not sufficient to induce hemolytic activity. Supporting this observation, the concentrations of thiosulfonates tested in our study were higher than those used by Savarino et al., yet no hemolysis was observed.

In another study, Bulakowska et al. (2023) evaluated the hemolytic activity of different synthetic molecules derived from N-(4-chloro-2-mercapto-5-methylphenylsulfonyl)cinnamamide. The experiment demonstrated that at 31.25 µg/mL, some compounds did not cause hemolysis, while those that did showed hemolysis rates ranging between 10% and 20%. At higher concentrations, all compounds caused hemolysis above 20%. At concentrations below 16 µg/mL, none of the compounds exhibited hemolytic activity. The authors emphasized that the tested concentrations were lower than the bactericidal concentrations of the compounds, which is favorable for their potential application ³⁵. This study reinforces the importance of conducting hemolytic assays for antimicrobial candidates, as it is essential to establish safe doses that do not cause significant damage to red blood cells. Moreover, in vitro testing is

crucial for estimating safe dosages for in vivo experiments, which are necessary for the future application of these molecules.

Another important point is that sulfur-containing compounds can exhibit non-hemolytic behavior at certain concentrations, and this property may vary depending on their molecular structure. No studies were found evaluating the hemolytic effects of thiosulfonates, making this work the first to apply this methodology to this molecular class.

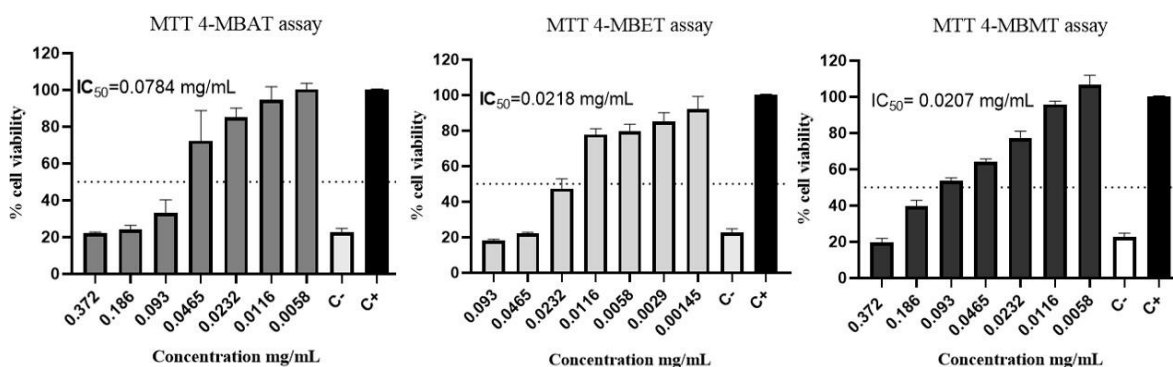
3.6 MTT Assay:

In the MTT assay for the compound 4-MBAT, it was observed that the two highest concentrations reduced mitochondrial viability by approximately 20%. As the concentrations decreased, cell viability increased, approaching the level of the positive control. The dose of 0.0784 mg/mL was established as the concentration responsible for reducing cellular viability by 50% .

The MTT assay results for the compound 4-MBET , showed that at the highest concentrations, cell viability was reduced to approximately 20%. At a concentration of 0.0232 mg/mL, viability was around 45%. As the concentrations decreased, cell viability increased, reaching values close to that of the positive control. The concentration capable of inhibiting 50% of cell viability was 0.0218 mg/mL.

In the case of the compound 4-MBMT, the highest concentrations reduced cell viability to levels close to the negative control. As the concentration decreased, cell viability improved, reaching values comparable to those of the positive control. The concentration that inhibited 50% of cell viability was calculated to be 0.0207 mg/mL

Figure 5. MTT assay for 4-MBAT, 4-MBET e 4-MBMT



The data are presented as mean $\pm$ standard deviation from duplicates and were analyzed using the Kruskal–Wallis test in comparison to C⁺, where C⁺ consisted of culture medium and cells, and C⁻ consisted of culture medium, cells, and Triton X. No significant differences were observed between the values. The IC₅₀ was calculated using nonlinear regression analysis.

All compounds demonstrated cytotoxicity by reducing cell viability at concentrations equal to or lower than their respective MIC values. This is a common finding among compounds with antibacterial potential, emphasizing the need to develop formulations that reduce or circumvent toxicity, thereby making these compounds viable for future pharmaceutical applications.

The MTT assay plays a crucial role in evaluating how chemical compounds affect mitochondrial function and, consequently, overall cell viability. Pantea et al. investigated the cytotoxicity of several thiosemicarbazide-based compounds at a concentration of 10 μ M using the MTT assay in rat hepatocytes. Their results demonstrated that the tested thiosemicarbazide derivatives caused only a slight reduction in cell viability, ranging from 5% to 15%, depending on the molecule, indicating low cytotoxicity³⁶.

Similarly, Gabriele et al. evaluated hybrid methanethiosulfonate molecules against the HCT-116 cell line at concentrations of 100 and 200 μ M. None of the molecules tested exhibited a reduction in cell viability greater than 15%, confirming low cytotoxic activity. The authors suggested that this limited effect could be attributed to

several physicochemical properties, including poor solubility, low stability in culture medium, limited membrane permeability, or susceptibility to enzymatic hydrolysis ³⁷.

Both studies demonstrate the low cytotoxic activity of thiosulfonate derivatives against different cell lines, which contrasts with the results obtained in our study. One possible explanation for this discrepancy is the superior solubility and stability of our synthesized molecules in the culture medium. Additionally, our experimental data clearly demonstrate that these compounds possess effective membrane permeability, as evidenced by the significant mitochondrial damage observed. These findings suggest that the cytotoxic potential of our thiosulfonates warrants further investigation, not only to fully elucidate their mechanisms of cytotoxicity but also to explore their potential application as antitumor agents, as proposed in the studies discussed.

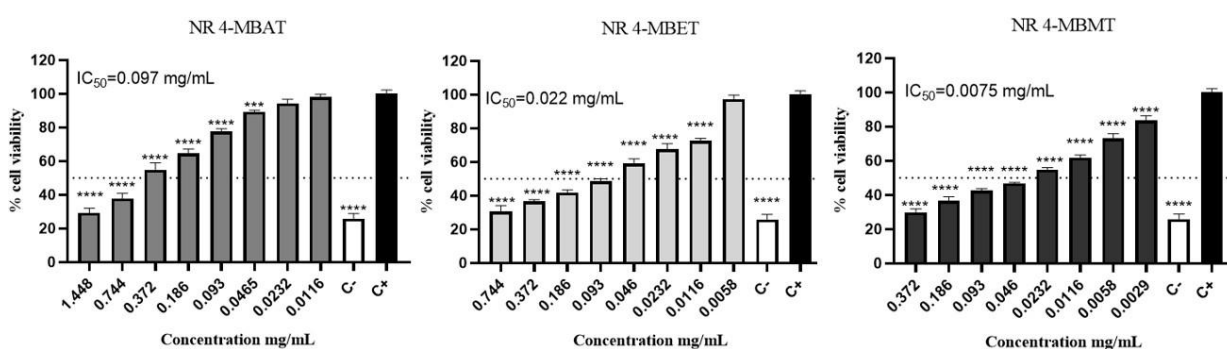
3.7 Neutral Red Uptake Assay:

The compound 4-MBAT demonstrated that at concentrations of 1.448 and 0.744 mg/mL, cell viability was reduced to approximately 30% and 40%, respectively. At the concentration of 0.372 mg/mL, cell viability exceeded 50%, showing no significant difference compared to the positive control at the two lowest concentrations. The concentration capable of inhibiting 50% of cell viability was calculated as 0.097 mg/mL.

The compound 4-MBET demonstrated the highest cytotoxicity at concentrations of 0.744, 0.372, and 0.186 mg/mL, with cell viability reduced to approximately 30%, 35%, and 40%, respectively. At a concentration of 0.093 mg/mL, cell viability approached 50%, and viability continued to increase as the concentration decreased, eventually showing no significant difference compared to the positive control at the lowest concentration tested. The concentration that inhibited 50% of cell viability was calculated to be 0.022 mg/mL.

For the compound 4-MBMT, the highest concentration tested reduced cell viability to approximately 30%. As the concentrations decreased, cell viability increased, surpassing 80% at the lowest concentration tested; however, a significant difference compared to the positive control was still observed at all concentrations. The concentration capable of inhibiting 50% of cell viability was calculated to be 0.0075 mg/mL.

Figure 6. Neutral Red (NR) assay for 4-MBAT, 4-MBET e 4-MBMT



The data are presented as mean $\pm$ standard deviation from triplicates and were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test, where **** = $p < 0.0001$ compared to C+. The C- consisted of culture medium, cells, and Triton X; C+ consisted of cells and culture medium. The IC₅₀ was calculated using the nonlinear regression method.

Haridevamuthu et al. investigated the cytotoxic potential of certain benzo[b]thiophene analogues against HEP-2 cancer cells using the Neutral Red uptake (NRU) assay. The compounds were tested at a concentration of approximately 30 μ M, and both molecules demonstrated the ability to reduce cell viability to approximately 45%, indicating significant cytotoxic potential against this tumor cell line³⁸. In a study by Szychowski et al., the authors evaluated the cytotoxicity of *Allium sativum* L. (garlic) extract, specifically the cultivar known as Harnás. Among the assays performed, the Neutral Red assay was applied to the SCC-15 cell line. The tested concentrations were 0.062, 0.125, 0.250, 0.500, and 1 mg/mL. After 24 hours of exposure, the concentration of 0.250 mg/mL reduced cell viability by 15%, while the highest concentrations (0.500

and 1 mg/mL) led to reductions of approximately 50%. Garlic extracts are known to contain sulfur-containing compounds, with allicin being the most notable. The authors emphasized that the observed reduction in cell viability was primarily attributed to the increased release of reactive oxygen species (ROS), which cause cellular damage and ultimately lead to cell death ³⁹.

The findings of both studies are in agreement with the results obtained in our research, as our thiosulfonate compounds, like these other sulfur-containing molecules, demonstrated clear cytotoxic effects. Nevertheless, further studies are needed to elucidate the mechanisms by which these compounds induce cell death. An important distinction is that we did not assess our compounds against tumor cell lines, which represents a promising future application for these thiosulfonates. Additionally, it is crucial to highlight that the cytotoxicity and hemolytic assays conducted in this study were aimed at evaluating the toxicity of our compounds. This information is essential for guiding future studies aimed at enhancing the antimicrobial potential of thiosulfonates, particularly by developing strategies to reduce their cytotoxicity and enable potential therapeutic applications. To the best of our knowledge, this is the first study to apply the Neutral Red uptake assay to thiosulfonate compounds.

3.8 Global IC₅₀

The IC₅₀ values from all cytotoxicity experiments for each compound are presented in Table 5. The global IC₅₀ was calculated as the average of the IC₅₀ values obtained from the MTT and Neutral Red uptake assays for the compounds 4-MBAT, 4-MBET, and 4-MBMT.

Table 5. Global IC₅₀ values

Compounds	MTT IC ₅₀ (mg/mL)	NR IC ₅₀ (mg/mL)	Global IC ₅₀ (mg/mL)
4-MBAT	0.0784	0.097	0.0877

4-MBET	0.0218	0.022	0.0219
4-MBMT	0.0207	0.0075	0.0141

Krishnappa et al. (2021) evaluated biogenic nano-sulfur nanosheets against human lung carcinoma (A549) and epidermoid carcinoma (A431) cell lines using the MTT assay. The reported IC₅₀ values were 9.5 µg/mL for A549 cells and 18.29 µg/mL for A431 cells. These findings highlight the antitumor potential of sulfur-containing compounds and are comparable to the cytotoxicity values observed in our study, further supporting the cytotoxic effects of the tested thiosulfonates.

In another study, Osipova et al. (2022) evaluated diphenyl 1,6-trisulfide and bis(2-methoxyphenyl) disulfide against A549 and HCT116 (colorectal cancer) cell lines. The IC₅₀ values against A549 cells were 46.3 µM and 29.6 µM for diphenyl trisulfide and bis(2-methoxyphenyl) disulfide, respectively. For HCT116 cells, the IC₅₀ values were 18.8 µM and 24.4 µM, respectively. These findings further support the antitumor potential of sulfur-based compounds. The authors suggested that the observed cytotoxicity may be associated with the inhibition of protein synthesis and increased expression of ubiquitinated proteins, ultimately disrupting essential cellular functions.

The findings from both cited studies are consistent with our results, reinforcing the evidence for the cytotoxic effects of the thiosulfonates investigated. Although further testing on tumor cell lines is necessary to validate their potential antitumor activity and selectivity, the similarity in effective concentration ranges—particularly in comparison with Krishnappa’s study—suggests comparable cytotoxic profiles. As a future perspective, mechanistic studies will be crucial to elucidate the cellular pathways involved in the cytotoxicity of these molecules.

4. CONCLUSION

The synthetic thiosulfonates evaluated in this study demonstrated significant antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacterial strains, including clinical isolates. Among the compounds tested, 4-MBMT, 4-MBET, and 4-MBAT stood out for their low MIC and MBC values and rapid bactericidal action in time-kill assays.

In addition to their antimicrobial effectiveness, these compounds exhibited low hemolytic potential and acceptable cytotoxicity at concentrations below or close to those required for bacterial inhibition. The combination of potent antimicrobial action and selective toxicity reinforces their potential as candidates for the development of new therapeutic agents, especially in the context of increasing bacterial resistance.

Considering their synthetic simplicity, high yield, and promising biological profiles, these molecules deserve further investigation, including in vivo studies and the development of pharmaceutical formulations aimed at enhancing their efficacy and reducing toxicity. The results presented here contribute to the advancement of alternative strategies for combating resistant bacterial infections.

References

1. Hernando-Amado S, Coque TM, Baquero F, et al. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat Microbiol.* 2019;4(9):1432-1442. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>
2. Murray CJL, Ikuta KJ, Sharara F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet.* 2022;399(10325):629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
3. Huemer M, Shambat SM, Brugger SD, Zinkernagel AS. Antibiotic resistance and persistence—implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Rep.* 2020;21(12):e51034. <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
4. Terreni M, Taccani M, Pregnolato M. New antibiotics for multidrug-resistant bacterial strains: latest research developments and future perspectives. *Molecules.* 2021;26(9):2671. <https://doi.org/10.3390/molecules26092671>

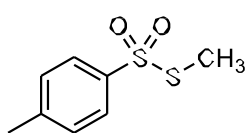
5. Baptista CT, Cerveira MM, Santos VB, et al. A systematic review of essential oils antimicrobial and antibiofilm activity against *Klebsiella pneumoniae*. *Curr Res Complement Altern Med*. 2022;6:162. <https://doi.org/10.29011/CRCAM-162.100162>
6. Song M, Liu Y, Li T, et al. Plant natural flavonoids against multidrug-resistant pathogens. *Adv Sci*. 2021;8(15):2100749. <https://doi.org/10.1002/advs.202100749>
7. Alam M, Bano N, Ahmad T, et al. Synergistic role of plant extracts and essential oils against multidrug resistance and gram-negative bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(6):855. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060855>
8. Nakamoto M, Kunimura K, Suzuki J, et al. Antimicrobial properties of hydrophobic compounds in garlic: allicin, vinyl dithiin, ajoene and diallyl polysulfides. *Exp Ther Med*. 2020;19(2):1550-1555. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.8302>
9. Chang Z, An L, He Z, et al. Allicin suppressed *Escherichia coli*-induced urinary tract infections by a novel MALT1/NF- κ B pathway. *Food Funct*. 2022;13(7):3495-3507. <https://doi.org/10.1039/D1FO04283A>
10. Blume L, Long T, Turos E. Applications and opportunities in using disulfides, thiosulfonates and thiosulfonates as antibacterials. *Int J Mol Sci*. 2024;24(9):8659. <https://doi.org/10.3390/ijms24098659>
11. Cai W, Gu Z. Organosulfur reactions: sulfone formation via mild oxidation of thioethers. *Org Lett*. 2019;21(9):3204-3209. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b00963>
12. Silva CH, Soares J, Peixoto CR, Azeredo JB, de Souza BS, Roehrs JA, Godoi M. Antibacterial potential of synthetic thiosulfonates: synthesis and biological evaluation. *Chem Select*. 2023;8(5):e202302630. <https://doi.org/10.1002/slct.202302630>
13. Fujiki K, Tanifuji N, Sasaki Y, Yokoyama T. Synthesis of thiosulfonates from disulfides and sulfinic acids. *Synthesis (Stuttg)*. 2002;(3):343-348. <https://doi.org/10.1055/s-2002-19872>
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 33rd ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2023.
15. Ferrer EMK, Cerveira MM, Cruz PHF, et al. Effects of Imazethapyr-based herbicide formulation in the zebrafish (*Danio rerio*) hepatocyte cell line (ZF-L): Cytotoxicity and oxidative stress. *J Environ Prot*. 2024;15(5):747-765. <https://doi.org/10.4236/jep.2024.155043>
16. Lubenets V, Stadnytska N, Baranovych D, et al. Thiosulfonates: The prospective substances against fungal infections. *Fungal Infect*. 2019;8(6):436-461.

17. Mampuy P, McElroy C, Clark J, et al. Thiosulfonates as emerging reactants: synthesis and applications. *Adv Synth Catal.* 2019;362(1):3-64. <https://doi.org/10.1002/adsc.201900123>
18. Wang X, Meng J, Zhao D, et al. Synthesis and applications of thiosulfonates and selenosulfonates as free-radical reagents. *Chin Chem Lett.* 2023;34(1):63-77. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2022.09.003>
19. Leontiev R, Hohaus N, Jacob C, et al. A comparison of the antibacterial and antifungal activities of thiosulfinate analogues of allicin. *Sci Rep.* 2018;8:6763. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25065-5>
20. Falcon-Piñeiro A, Garcia-López D, Gil-Martínez L, et al. PTS and PTSO, two organosulfur compounds from onion by-products as a novel solution for plant disease and pest management. *Chem Biol Technol Agric.* 2023;10:76. <https://doi.org/10.1186/s40538-023-00433-6>
21. Sorlózano-Puerto A, Albertuz-Crespo M, Lopez-Machado I, et al. Antibacterial and antifungal activity of propyl-propane-thiosulfinate and propyl-propane-thiosulfonate, two organosulfur compounds from *Allium cepa*: In vitro antimicrobial effect via gas phase. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021;14(1):21. <https://doi.org/10.3390/ph14010021>
22. Turos E, Revell KD, Ramaraju P, et al. Unsymmetric aryl-alkyl disulfide growth inhibitors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Bacillus anthracis*. *Bioorg Med Chem.* 2008;16(16):6501-6508. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.05.054>
23. Sorlózano-Puerto A, Albertuz-Crespo M, Lopez-Machado I, et al. In vitro antibacterial activity of propyl-propane-thiosulfinate and propyl-propane-thiosulfonate derived from *Allium* spp. against Gram-negative and Gram-positive multidrug-resistant bacteria isolated from human samples. *Biochem Res Int.* 2018;2018:1-9. <https://doi.org/10.1155/2018/7864529>
24. D'Amico F, Casalino G, Dinardo FR, et al. Antimicrobial efficacy of Phyto-L, a thiosulfonate from *Allium* spp.-containing supplement, against *Escherichia coli* strains from rabbits. *Vet Sci.* 2023;10(8):411. <https://doi.org/10.3390/vetsci10080411>
25. Borlinghaus J, Foerster J, Kappler U, et al. Allicin, the odor of freshly crushed garlic: a review of recent progress in understanding allicin's effects on cells. *Molecules.* 2021;26(6):1505. <https://doi.org/10.3390/molecules26061505>
26. Borlinghaus J, Albrecht F, Gruhlke MCH, et al. Allicin: chemistry and biological properties. *Molecules.* 2014;19(8):12591-12618. <https://doi.org/10.3390/molecules190812591>
27. Sorlózano-Puerto A, Cerezo-Collado L, Roca-Lagrilliere E, et al. Activity of propyl-propane-thiosulfinate and propyl-propane-thiosulfonate against carbapenem-resistant

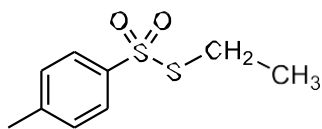
- Gram-negative bacteria. *APMIS*. 2024;132(5):581-593.
<https://doi.org/10.1111/apm.13234>
28. Karkhut AI, Konechnyi YT, Konechna RT, et al. Synthesis of new S-(ω -fluoroalkyl) 4-substituted benzenesulfonothioates and their antimicrobial activity. *Vopr Khim Khim Tekhnol*. 2024;(3):75-82. <https://doi.org/10.32434/0321-4095-2024-148-3-75-82>
 29. Vaishampayan A, Grohmann E. Antimicrobials functioning through ROS-mediated mechanisms: Current insights. *Microorganisms*. 2022;10(1):61. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010061>
 30. Southam HM, Smith TW, Lyon RL, et al. A thiol-reactive Ru(II) ion, not CO release, underlies the potent antimicrobial and cytotoxic properties of CO-releasing molecule-3. *Redox Biol*. 2018;18:114-123. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.06.010>
 31. Huang Y, Zhu Y, Yue H, et al. Flavomycin restores colistin susceptibility in multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *mSystems*. 2024;9(1):e0109123. <https://doi.org/10.1128/msystems.01091-23>
 32. Tong Y, Li P, Yang Y, et al. Detection of antibiotic resistance in feline-origin ESBL *Escherichia coli* from different areas of China and the resistance elimination of garlic oil to cefquinome on ESBL *E. coli*. *Int J Mol Sci*. 2023;24(9):9627. <https://doi.org/10.3390/ijms24099627>
 33. Ruiz R, García MP, Lara A, et al. Garlic derivatives (PTS and PTS-O) differently affect the ecology of swine faecal microbiota in vitro. *Vet Microbiol*. 2010;144(1-2):110-117. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.038>
 34. Savarino P, Colson E, Caulier G, et al. Microwave-assisted desulfation of the hemolytic saponins extracted from *Holothuria scabra* viscera. *Molecules*. 2022;27(2):537. <https://doi.org/10.3390/molecules27020537>
 35. Bulakowska A, Slawinski J, Halasa R, et al. An in vitro antimicrobial, anticancer and antioxidant activity of N-[(2-Arylmethylthio)phenylsulfonyl]cinnamamide derivatives. *Molecules*. 2023;28(7):3087. <https://doi.org/10.3390/molecules28073087>
 36. Pantea V, Cobzac V, Tagadiuc O, et al. In vitro evaluation of the cytotoxic potential of thiosemicarbazide coordinating compounds in hepatocyte cell culture. *Biomedicines*. 2023;11(2):366. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020366>
 37. Gabriele E, Ricci C, Meneghetti F, et al. Methanethiosulfonate derivatives as ligands of the STAT3-SH2 domain. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2017;32(1):337-344. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1256387>
 38. Haridevamuthu B, Manjunathan T, Alphonse C, et al. Functionalized sulfur-containing heterocyclic analogs induced sub-G1 arrest and apoptotic cell death of laryngeal

39. Szychowski KA, Binduga UE, Thaczyk KR, et al. Cytotoxic effects of two extracts from garlic (*Allium sativum* L.) cultivars on the human squamous carcinoma cell line SCC-15. *Saudi J Biol Sci*. 2018;25(8):1703-1712.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.12.014>
40. Krishnappa S, Naganna CM, Rajan HK, et al. Cytotoxic and apoptotic effects of chemogenic and biogenic nano-sulfur on human carcinoma cells: a comparative study. *ACS Omega*. 2021;8:32548–32562.
41. Osipova V, Gracheva Y, Polovinkina M, et al. Antioxidant activity and cytotoxicity of aromatic oligosulfides. *Molecules*. 2022;27:3961.

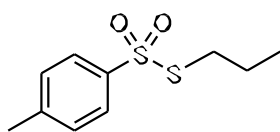
Supplementary materials



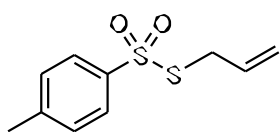
S-methyl 4-methylbenzenesulfonothioate: Yield: (89%); white solid. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) δ 7.80 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 2.50 (s, 3H), 2.46 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) = 144.94, 140.92, 129.93, 127.22, 21.72, 18.10.



S-ethyl 4-methylbenzenesulfonothioate: Yield: (88%); colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) δ 7.82 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 3.01 (q, J = 7.5 Hz, 2H), 2.45 (s, 3H), 1.28 (t, J = 7.5 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) = 144.81, 142.14, 129.94, 127.11, 30.51, 21.74, 14.19.

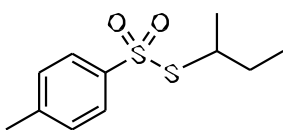


S-propyl 4-methylbenzenesulfonothioate: Yield: (96%); colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) δ 7.81 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 2.97 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.45 (s, 3H), 1.64 (h, J = 7.3 Hz, 2H), 0.93 (t, J = 7.4 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) = 144.76, 142.26, 129.94, 127.13, 38.04, 22.32, 21.77, 13.29.

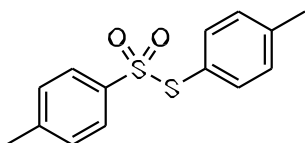


S-allyl 4-methylbenzenesulfonothioate: Yield: (89%); colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) δ 7.81 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 5.71 (ddt, J = 17.0, 10.0, 7.1 Hz, 1H), 5.21 (dd, J = 16.9, 1.2 Hz, 1H), 5.13 – 5.08 (m, 1H), 3.67 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 2.45

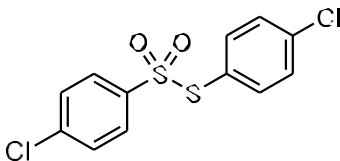
(s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) = 144.93, 142.20, 130.75, 129.94, 127.24, 120.10, 38.94, 21.78.



S-(*sec*-butyl) 4-methylbenzenesulfonylthioate: Yield: (70%); colorless oil. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) δ 7.82 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 3.30 (h, J = 6.8 Hz, 1H), 2.45 (s, 3H), 1.60 (p, J = 7.3 Hz, 2H), 1.31 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 0.87 (t, J = 7.4 Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) = 144.63, 142.85, 129.88, 127.12, 49.34, 29.82, 21.78, 21.48, 11.11.



S-(*sec*-butyl) 4-methylbenzenesulfonylthioate: Yield: (66%); white solid. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) δ 7,53 (d, 2H, J = 8Hz); 7,43 (d, 2H, J = 8Hz); 7,37-7,31(m, 4H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) = 141,4; 140,7; 138,6; 137,8; 130,0; 129,4; 129,0; 126,1.



S-(*sec*-butyl) 4-methylbenzenesulfonylthioate: Yield: (70%); white solid. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) δ 7,53 (d, 2H, J = 8Hz); 7,43 (d, 2H, J = 8Hz); 7,37-7,31(m, 4H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) = 141,4; 140,7; 138,6; 137,8; 130,0; 129,4; 129,0; 126,1.

5. DISCUSSÃO:

O aumento da resistência bacteriana aos antibióticos convencionais é crescente, principalmente no ambiente hospitalar e os pacientes imunodeprimidos são os que mais sofrem com este problema. Alternativas estão sendo propostas por vários grupos de pesquisa, que buscam elucidar atividades antimicrobianas de compostos naturais e sintéticos como forma de combater infecções resistentes e oferecer novas opções de tratamento. O objetivo é não apenas tratar infecções existentes, mas também prevenir a disseminação de bactérias resistentes, garantindo assim a segurança dos pacientes e a eficácia dos tratamentos médicos.

Nesse cenário os tiosulfonatos moléculas que já possuem diversas aplicações no setor agrícola, petrolífero, industrial e farmacêutico, ganham relevância, algumas pesquisas demonstram o potencial antimicrobiano dessa classe de compostos. Diversas metodologias de síntese foram desenvolvidas e cada vez mais baratas e verdes, sendo mais bem exploradas na revisão bibliográfica deste trabalho. As metodologias utilizadas para a síntese de nossos tiosulfonatos, já demonstram um bom rendimento, com elevado grau de pureza, baixa produção de resíduos tóxicos além de terem um custo financeiro baixo. Assim podemos afirmar que os métodos escolhidos para síntese de tiosulfonatos em nosso trabalho são eficientes e verdes.

Em nosso estudo, os resultados do ensaio de disco de difusão mostraram que todos os compostos testados de tiosulfonatos têm potencial antimicrobiano. Ao analisarmos os halos de crescimento, verifica-se que frente as bactérias Gram-positivas os compostos mostram-se mais eficientes. O composto 4-MBSBT, apresentou um halo de 33,5 mm frente a *S.aureus*. Os melhores resultados frente a bactérias Gram-negativa ficaram para o 4-MBMT, com halos médio de 24 e 23 mm, respectivamente, para *E. coli* e *P. aeruginosa*. Os resultados encontrados nesse experimento corroboram com dados presentes na literatura, que afirmam que compostos com enxofre apresentam promissor efeito antimicrobiano, sendo os tiosulfinitos e tiosulfonatos de diferentes arranjos moleculares, capazes de inibir o crescimento bacteriano (LEONTIEV *et al.* 2018; BLUME *et al.* 2024). Outro fator importante é que os halos encontrados são bastante similares aos halos

encontrados em experimento que utilizam o propil propano tiosulfonato (PTSO) frente a bactérias de importância agrônômica, como *Pseudomonas savastanoi*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*. Nesses estudos, o halo frente as espécies de *Pseudomonas* foi de aproximadamente 12 mm, e o halo de *Xanthomonas* foi próximo a 30mm (FALCON-PIÑEIRO *et al.*, 2023). Essa similaridade é possível devido a semelhança de classe molecular dos compostos e às semelhanças morfológicas das bactérias.

Após verificarmos que todos os compostos apresentaram potencial antimicrobiano, a determinação da MIC e MBC foram realizadas. As espécies bacterianas utilizadas nesse estudo, foram escolhidas levando em consideração a lista do acrônimo ESKAPE da OMS, grupo cuja necessidade de novas moléculas capazes de combatê-los é de urgência (HERNANDO-AMADO *et al.*, 2019; HUEMER *et al.* 2020; MURRAY *et al.*, 2022). Nossos resultados demonstram o potencial que esses compostos derivados de tiosulfonatos possuem, pois todos inibiram o crescimento bacteriano. O composto para-Cl foi o que obteve a MIC mais elevada para todas as cepas testadas, sendo de 23.805 mg/mL. O composto para-CH₃ apresentou uma MIC maior para as bactérias Gram-negativas, demonstrou um desempenho promissor frente a cepas Gram-positivas, com um destaque para a MIC e MBC de respectivamente, 0.372 e 0.744 mg/mL, frente a *S aureus*.

Os compostos 4-MBSBT e 4-MBPT também demonstraram melhores efeitos frente a cepas Gram-positiva, tendo inclusive a mesma MIC frente a *S. aureus* de 0.093 mg/mL. Já se tratando da MBC o 4-MBPT teve essa igual a sua MIC, enquanto o 4-MBSBT teve uma MBC de 0.186 mg/mL. Além disso, o 4-MBPT também teve um desempenho melhor frente a *E. coli* e *E. faecalis* com valores de MIC de 0.744 e 0.093 mg/mL, respectivamente. Ao analisarmos os compostos 4-MBAT, 4-MBET e 4-MBMT verifica-se que foram os três compostos com os melhores resultados de MIC. O 4-MBAT, demonstrou atividade em concentrações baixas frente a todas as cepas. Isso sugere que esse composto é promissor e a partir de outros estudos, pode se tornar um futuro antimicrobiano de amplo espectro. 4-MBET, se destacou com concentrações baixas tanto de MIC quanto de MBC frente a todas as bactérias

testadas, mas seu melhor efeito foi frente a *K. pneumoniae* e *E. hormaechei*, com MBC de 0.186 e 0.093 mg/mL, respectivamente. 4-MBMT foi a molécula com os melhores valores encontrados, apresentando as menores MIC e MBC frente a todas as bactérias testadas, apresentando um grande potencial tanto bacteriostático quanto bactericida, com os melhores valores frente a *K. pneumoniae* e *E. hormaechei*.

De acordo com Sorlózano-Puerto e colaboradores (2020), tiossulfonatos como o propil-propano tiossulfonato (PTSO), demonstram capacidade de inibir diversas cepas bacterianas. Os estudos mostraram MICs relativamente baixas, utilizando-se a fase gasosa dessa molécula. Ocorreu a inibição de *E. coli* ATCC 25922 com uma concentração de aproximadamente 11 mg/mL, *K. pneumoniae* ATCC 700603 com MIC aproximada de 18 mg/mL, para *E. faecalis* ATCC 29212 a concentração foi de aproximadamente 10 mg/mL. Em trabalho feito por D'AMICO e colaboradores (2023), testando PTSO em fase líquida, os autores encontraram os seguintes resultados: 1.25 µL/mL, 2.5 µL/mL frente a diferentes cepas de *E. coli* provenientes de coelhos.

Se tratando do efeito das moléculas contra isolados clínicos, o 4-MBMT demonstrou uma superioridade em relação ao efeito antimicrobiano quando comparado as demais moléculas. Observa-se esse resultado nas concentrações de 0,006 mg/mL frente a *A. baumannii*, 0,0015 mg/mL frente a *E. coli* e *K. pneumoniae*, 0,003 mg/mL frente a *P. aeruginosa* e 0,046 mg/mL frente a *S. aureus*. O segundo melhor composto, em termos de atividade foi o 4-MBET. Esse, apresentou nas concentrações de 0,023 mg/mL frente a *A. baumannii* e *K. pneumoniae*, 0,003 mg/mL frente a *E. coli*, 0,186 mg/mL frente a *P. aeruginosa* e 0,046 mg/mL frente a *S. aureus*, demonstrando o melhor efeito frente a *E.coli*. Já o 4-MBAT, apresentou as concentrações mais elevadas em relação as outras duas moléculas, entretanto demonstrou o seu melhor efeito bactericida frente a *S.aureus* isolado clínico, com MBC de 0.046 mg/mL. Com esses resultados é possível afirmar que essas moléculas têm capacidade de inibir o crescimento de bactérias clínicas, se tornando uma alternativa promissora.

Existem poucos estudos demonstrando resultados de tiosulfonatos frente a isolados clínicos e/ou a bactérias com histórico de resistência. Sorlozano-Puerto e colaboradores (2018), demonstraram que o PTSO possui MIC frente a diferentes cepas de amostras clínicas de *S. aureus*, *E. faecalis* e *Streptococcus agalactiae* de respectivamente 4 a 8 mg/L, 8 a 16 mg/L e 8 a 16 mg/L. Entretanto, os valores são muito maiores quando aplicadas a cepas Gram-negativas, como *P. aeruginosa* (MIC variando de 512-2048 mg/L), membros da família Enterobacteriaceae (MIC de 64-128 mg/L). Esses resultados corroboram com os obtidos por nosso grupo. O estudo de Sorlózano-Puerto e colaboradores (2024), utilizou PTSO frente a diferentes cepas bacterianas com resistência a carbapenêmicos. Os resultados obtidos por eles, demonstraram para *K. pneumoniae* uma MIC variando entre 128-256 mg/L, *E. coli* e *E. cloacae* com valores entre 64-256 mg/L, já para *A. baumannii* os valores encontrados foram de 32-256 mg/L, e os piores valores encontrados foram frente a *P. aeruginosa*, 256-2048 mg/L¹⁸. Novamente os dados encontrados, concordam entre si e com o presente trabalho, demonstrando a eficiência de tiosulfonatos e que as concentrações podem variar em função do tipo de cepa bacteriana testada.

O ensaio de curva de morte foi realizado para avaliar a eficácia dos compostos de tiosulfonatos sobre a sobrevivência de algumas bactérias. Esse tipo de ensaio é importante, porque permite observar como diferentes concentrações de um composto químico, afetam a taxa de mortalidade ao longo do tempo. Além disso, ele ajuda a entender a dinâmica de crescimento e morte celular, contribuindo para o desenvolvimento de novas terapias.

No ensaio de curva de morte, o composto 4-MBAT demonstrou atividade bactericida significativa. Nas concentrações de 2,976 mg/mL contra *Escherichia coli* e 1,488 mg/mL contra *Staphylococcus aureus*, observou-se eliminação completa das bactérias após apenas seis horas de exposição. Além disso, na concentração correspondente a 2 vezes a concentração inibitória mínima (2×MIC), o composto apresentou efeito bactericida frente a *S. aureus* em 24 horas, enquanto para *E. coli* esse efeito foi observado em 12 horas. Esses resultados indicam que a atividade bactericida do 4-MBAT é dependente do

tempo de exposição e da concentração, sendo esta inversamente proporcional ao tempo necessário para eliminação bacteriana. A concentração utilizada para o composto 4-MBET para as bactérias *E. coli* e *S. aureus* foram as mesmas concentrações encontradas na MIC. Para *S. aureus* as concentrações de 2x e 4x a MIC necessitaram de apenas 6 horas de exposição para reduzir as colônias bacterianas a zero, porém na concentração igual a MIC foi necessária 48h para zerar as populações bacterianas. Se tratando da *E. coli*, a concentração de 1.488 mg/mL precisou de 6h para a redução total das colônias bacterianas na concentração de 0.744 mg/mL foi necessário 12h para eliminar completamente as bactérias. Na concentração da MIC foi necessário 48h. O 4-MBET se mostrou capaz de inibir as colônias bacterianas em todas as concentrações, demonstrando novamente o potencial do tiosulfonatos como antimicrobianos.

O composto 4-MBMT apresentou como resultados frente a cepa *E. coli*, um efeito bactericida em 6h, na maior concentração testada. Com a concentração de 2xMIC, o tempo para zerar as colônias foi de 48h, já na menor concentração, verificou-se que o composto foi apenas capaz de reduzir o número de colônias, demonstrando que essa concentração era apenas inibitória. O mesmo ocorreu na menor concentração frente a *S. aureus*. Na concentração de 4x a MIC foi necessário 6h e na concentração de 2x a MIC foi necessário 12h para acabar completamente com as bactérias.

O ensaio de curva de morte na literatura recente, vem sendo utilizado principalmente para testes de melhora no efeito antibacteriano causada por sinergismo entre substâncias. Além disso, diferente do presente estudo, frequentemente utilizam bactérias com um histórico de resistência. Huang e colaboradores (2024), utilizaram o teste frente a *E. coli* com resistência a multidrogas, testaram uma mistura de colistina e flavomicina. Na concentração de 16µg/mL de flavomicina+4µg/mL de colistina, as colônias bacterianas em apenas 4 horas foram totalmente inibidas. Na concentração de 8 µg/mL+ 2 µg/mL dos mesmos fármacos, houve apenas uma redução nas colônias até as primeiras 4 horas, após esse período houve recuperação de viabilidade bacteriana. No trabalho de Tong e colaboradores (2023), na análise da adição

de óleo de alho nas concentrações de 256-512 µg/mL a cefquinome em concentrações de 64, 512 e 1024 µg/mL, nas maiores concentrações foi capaz de inibir completamente as colônias de *E. coli* ESBL provenientes de amostras clínicas de fezes de gato na China, isso em um intervalo de tempo de 6 a 8 horas.

No trabalho de WU e colaboradores (2023), foi testada a adição do medicamento simeprevir (SIM) associado a polimixina E e a polimixina B frente a *S. aureus* MRSA. Essa associação foi capaz de zerar as colônias de MRSA com duas horas de exposição, o que não aconteceu nas concentrações individuais, mostrando que o sinergismo entre esses dois fármacos é capaz de inibir bactérias resistentes. Fica claro a importância do teste de curva de morte, pois mostra como o efeito do composto ocorre em função do tempo, permite também comparar diferentes moléculas em função do tempo, o que permite entender a cinética e o comportamento frente aos patógenos, sendo assim um ensaio bastante importante para uma mais completa elucidação do efeito antimicrobiano.

Nos testes hemolíticos realizados para os três compostos, os resultados foram bastante semelhantes. Todas as concentrações que foram utilizadas não causaram hemólise, demonstrando que os compostos não afetam as membranas das hemácias ou tão pouco causam danos a integridade dessas células, o que é um resultado favorável para a aplicação dessas moléculas.

O ensaio hemolítico ganha bastante destaque quando se pensa na aplicação farmacológica ou nutracêutica das moléculas testadas. Salem e colaboradores (2023), em estudo de hemólise utilizando extrato de manga com etanol e outro com água destilada, demonstraram como os diferentes tipos de solvente influenciam na hemólise, a primeira extração resultou em 79% de hemólise e a extração aquosa, resultou na hemólise de 1%. O etanol não foi seguro para aplicação, enquanto o extrato aquoso se mostrou mais promissor. O estudo de Dogra e colaboradores (2024), utilizando o óleo essencial de *Euphorbia calyptrata* demonstrou que esse composto da medicina tradicional marroquina, pode ser utilizado de forma a não causar hemólise na concentração de 100 µg/mL, sendo essa a maior concentração testada e tendo

cerca de 9,5% de hemólise, resultado bastante semelhante ao controle negativo. Esses dois trabalhos servem para exemplificar como moléculas bioativas devem ser testadas conforme os efeitos em estruturas essenciais a sobrevivência como as hemácias, e que esse teste permite verificar doses seguras para os próximos ensaios, principalmente quando a pesquisa avança para o “*in vivo*”.

No experimento de MTT do composto 4-MBAT, foi possível verificar que as duas maiores concentrações reduziram a viabilidade mitocondrial em aproximadamente 20%. Conforme as concentrações vão sendo reduzidas, a viabilidade foi aumentando, assemelhando-se ao controle positivo. Foi estabelecida, também a dose de 0.0784 mg/mL, como responsável por reduzir a viabilidade celular em 50%. Os resultados do ensaio do MTT para o composto 4-MBET demonstraram que nas maiores concentrações, a viabilidade celular foi reduzida para aproximadamente 20%. Na concentração de 0.0232 mg/mL a viabilidade ficou próxima a 45%. Conforme as concentrações foram sendo reduzidas, a viabilidade celular foi aumentando, chegando próxima ao valor do controle positivo. A concentração capaz de inibir 50% da viabilidade celular foi de 0.0218 mg/mL. No caso do composto 4-MBMT as maiores concentrações reduziram a viabilidade celular, a valores próximos do controle negativo, e conforme a concentração ia sendo reduzida, houve uma melhora na viabilidade celular, sendo inclusive próximo aos valores do controle positivo. O valor de inibição de 50% da viabilidade celular foi calculado em 0.0207 mg/mL. Todos os compostos demonstraram citotoxicidade reduzindo a viabilidade celular em concentrações menores ou próximas aos valores de MIC encontradas, o que é muito comum em compostos com potencial antibacteriano, sendo necessário desenvolver formulações para contornar ou reduzir a toxicidade dessas moléculas, para então tornar possível a aplicação desses compostos como futuros fármacos.

O ensaio do MTT é bastante importante para verificar como compostos químicos podem afetar a mitocôndria celular e por consequência a viabilidade das células. Utilizando um herbicida como composto de interesse Ferrer e colaboradores (2024), verificaram que conforme as concentrações iam

diminuindo, a viabilidade das células ia aumentando, demonstrando que na concentração de 0.24 µg/mL de herbicida, a viabilidade havia se mantida semelhante a viabilidade do controle onde havia células e meio de cultivo apenas. O trabalho Dogra e colaboradores (2024), testando o extrato de *Artemisia vestita* com o intuito de aplicá-lo como medicamento, ao testar diferentes concentrações verificaram que nas menores concentrações, de 31.25 e de 62.5 mantiveram a viabilidade celular em 98% e 97% respectivamente, demonstrando que nessas concentrações o composto é seguro para utilização, principalmente para evoluir para aplicações “*in vivo*”. Os trabalhos demonstram a importância de testes “*in vitro*”, tornando mais seguro e permitindo verificar se as moléculas são adequadas para serem aplicadas em modelos animais.

O composto 4-MBAT demonstrou nas concentrações de 1.448 e 0.744 mg/mL, redução da viabilidade celular aproximadamente 30% e 40%, respectivamente. Na concentração de 0.372 mg/mL a viabilidade celular consegue passar dos 50% chegando a não ter diferença significativa em relação ao controle positivo nas duas menores concentrações. A concentração capaz de inibir 50% da viabilidade celular foi calculada como 0.097 mg/mL. O composto 4-MBET, demonstrou ter a maior citotoxicidade nas concentrações de 0.744, 0.372 e 0.186 mg/mL, ficando com viabilidade de aproximadamente 30%, 35% e 40%, respectivamente. Na concentração de 0.093 mg/mL ficou próximo a 50% e a viabilidade celular foi aumentando conforme a concentração diminui, chegando a não ter diferença significativa do controle positivo na menor concentração testada. A concentração que inibiu 50% da viabilidade celular foi calculada no valor de 0.022 mg/mL. Para o composto 4-MBMT a maior concentração demonstrou reduzir a viabilidade celular para aproximadamente 30%, conforme as concentrações iam reduzindo a viabilidade celular foi aumentando, se tornando superior a 80% na menor concentração, entretanto ainda assim houve uma diferença significativa desta e das demais barras em relação ao controle positivo. A concentração capaz de inibir 50% da viabilidade celular foi calculada em 0.0075 mg/mL.

Oliveira e colaboradores no ano de 2021, utilizaram o método do vermelho neutro em duas linhagens celulares diferentes (HRT-18, 3T3) para determinar a citotoxicidade do euphol, composto extraído da planta *Euphorbia umbellata*. Encontraram a concentração capaz de inibir 50% das duas linhagens celulares, sendo 70,8 μM para HRT-18 e 39,2 μM para 3T3. Esse dado demonstra a importância do teste de citotoxicidade para utilização em compostos com potencial medicinal. Os autores destacam, no respectivo estudo, que a depender da dose, o euphol tem potencial como anti-inflamatório e antitumoral. O trabalho de Goiato e colaboradores utilizou o teste de vermelho neutro para verificar o efeito de diferentes antissépticos (sálina, sabão, peróxido de hidrogênio, triclosan 1%, clorexidina 4% e óleo de citronela) de próteses oculares em células da conjuntiva humana, apesar de causarem uma leve redução na viabilidade celular, todos os antissépticos demonstraram ser seguros para o uso. Os estudos citados demonstram a aplicabilidade do teste de NR para demonstrar citotoxicidade e como compostos de uso médico ou de direto contato com tecidos devem passar por essa validação antes de sua aplicação.

6. CONCLUSÃO

As moléculas de tiosulfonatos avaliadas demonstraram atividade antimicrobiana *in vitro*, sendo os compostos 4-MBMT, 4-MBET e 4-MBAT os que apresentaram os melhores desempenhos. Além disso, esses mesmos compostos foram eficazes na eliminação de bactérias isoladas de amostras clínicas. Quando utilizados em concentrações correspondentes a 4 vezes a concentração inibitória mínima ($4 \times \text{MIC}$), os tiosulfonatos foram capazes de erradicar completamente as unidades formadoras de colônias (UFC) em um intervalo de 6 a 12 horas, evidenciando um considerável potencial como agentes antimicrobianos.

Outro aspecto relevante observado foi que os compostos 4-MBMT, 4-MBET e 4-MBAT não apresentaram atividade hemolítica, embora tenham demonstrado citotoxicidade celular, a qual foi reduzida de forma dose-dependente. Esse achado abre duas perspectivas distintas: a primeira consiste

na possibilidade de otimizar a segurança desses compostos por meio do desenvolvimento de formulações farmacêuticas ou modificações estruturais que reduzam sua toxicidade. A segunda perspectiva considera o potencial uso dessa citotoxicidade como estratégia terapêutica contra células tumorais, indicando um possível redirecionamento desses compostos para aplicações em oncologia.

Diante dos resultados obtidos, destacam-se como perspectivas futuras a realização de estudos *in vivo* para avaliação da eficácia e segurança dos tiosulfonatos, o desenvolvimento de formulações que minimizem a toxicidade, e a ampliação dos testes frente a patógenos resistentes a antimicrobianos, bem como frente a patógenos fúngicos. Tais investigações serão fundamentais para explorar de forma mais ampla o potencial terapêutico desses compostos.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABUSHAHEEN, M. A.; MUZAHEED.; FATANI, A. J.; *et al.* Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-month**. Ed. 66, pag. 71-90, 2020.

ANBAZHAGAN, P. V.; SINGH, B. R.; BHARDWAJ, M. Emergence of herbal antimicrobial drug resistance in clinical bacterial isolates. **Pharmaceutica analytica acta**. Ed. 6, pag. 1-7, 2015.

ARMBRUSTER, C.; PARSEK, M. New Insight into the early stages of biofilm formation. **Biological Sciences**, Ed. 115, pag. 4317-4319, 2018.

BARAN, A.; KWIATKOWSKA, A.; POTOCKI, L. Antibiotics and bacterial resistance-A short story of na endless arms race. **International journal of molecular sciences**. Ed. 24, pag. 57-77, 2023.

BHATIA, R. Vaccines as a tool to cotain antimicrobial resistance. **Indiam Journal Medicinal Microbiology**. Ed. 37, pag. 1-4, 2019.

BLUME, L.; LONG, T. E.; TUROS, E. Applications and Opportunities in using disulfides, thiosulfinates and thiosulfonates as antibacterials. **International journal of molecular sciences**. Ed. 24, pag. 8659, 2023.

BRINKMAN, C.; SCHMIDT-MALAN, S.; KARAU, M.; *et al.* Exposure of bacterial biofilms to electrical current leads to cell death mediated in part by reactive oxygen species. **Plos One**. Ed.11, pag. 85-95, 2016.

BUSTAMANTE-CÓRDOVA, L.; MELGOZA-GONZÁLEZ, E. A.; HERNÁNDEZ, J. Recombinant antibodies in veterinary medicine: an update. **Frontiers in veterinary science**. Ed. 5, pag. 175-191, 2018.

BURANAAMNUAY, K.; The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: A Variety of the assay protocols. **Open Veterinary Journal**. Ed. 11, pag. 251-269, 2021.

CARVALHO, D.; PINHO, C.; OLIVEIRA, R. *et al.* Chromatographic methods developed for the quantification of quercetin extracted from natural sources: systematic review of published studies from 2018 to 2022. **Molecules**. V. 28, pag. 7714-7729, 2023.

CATALANO, A.; IACOPETTA, D.; CERAMELLA, J.; Antibiotic-resistant ESKAPE pathogens and covid-19: the Pandemic beyond the pandemic. **Viruses**. Ed. 15, pag. 18-40, 2023.

CHAMPNEY, W. S., MILLER, M. Linezolid is a specific inhibitor of 50s ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells. **Current microbiology**. Ed. 44, pag. 350-356, 2002.

DENISSEN, J.; REYNEKE, B.; WASO-REYNEKE, M.; *et al.* Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, Community-acquired infection and risk to human health. **International Journal of Hygiene and Environmental health**. Ed. 244, pag. 114-131, 2022.

DÍAZ-PUERTAS, R.; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F.; FALCO, A. Phytochemical-based nanomaterials against antibiotic-resistant bacteria: an updated review. **Polymers**. Ed. 15, pag. 1392, 2023.

DOGRA, S., KOUL, B., SINGH, J., *et al.*, Phytochemical analysis, antimicrobial screening and in vitro pharmacological activity of *Artemisia vestita* leaf extract. **Molecules**. Ed. 29, pag. 1829, 2024.

DONELLI, G.; VUOTTO, C. Biofilm-based Infections in Long-Term Care Facilities. **Future Microbiology**. Ed. 9, pag. 175-188, 2014

EVANS, A.; STRAUSS, M.; CORCOS, A. *et al.* Two-Dimensional polymers and polymerizations. **Chemical Reviews**. V 122, pag. 442-564, 2021.

FALCON-PIÑEIRO, A.; GARCÍA-LÓPEZ, D.; GIL-MARTÍNEZ, L.; *et al.* PTS and PTSO, Two organosulfur compounds from onion by-products as a novel solution for plant disease and pest management. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**. Ed. 10, pag.76-96, 2023.

FALCÓN-PIÑERO, A.; REMESAL, E.; NOGUERA, M.; *et al.* Antifungal activity of propyl-propane-thiosulfinate (PTS) and Propyl-propane-thiosulfonate (PTSO) from *Allium cepa* against *Verticillium dahliae*: in vitro and in planta assays. **Journal of fungi**. Ed. 7, pag. 736, 2021.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**. Ed. 8, Pag. 623-633. 2010.

FONG, J. N. C.; YILDIZ, F. H. Biofilm Matrix Proteins. **Microbiology Spectrum**. Ed.3, 2015.

GHOSH, S.; BASU, S.; ANBARASU, A. *et al.* A comprehensive review of antimicrobial agentes against clinically importante bacterial pathogens: prospects for phytochemicals. **Phytotherapy Research**. Ed. 39, pag. 138-161, 2025.

GUPTA, R.; SHARMA, S. Role of alternatives to antibiotic in mitigatin the antimicrobial resistance crisis. **Indian Journal Of Medical Research**. Ed. 153, pag. 464-477, 2022.

GUPTA, R.; SINGH, M.; PATHANIA, R. Chemical genetic approaches for the Discovery of the bacterial cell wall inhibitors. RSC Medicinal chemistry. Ed. 14, pág 2125-2154, 2023.

HALAWA, E.; FADEL, M.; AL-RABIA, M.; *et al.* Antibiotic action and resistance: updated review of mechanisms, spread, influencing factors, and alternative approaches for combating resistance. **Frontiers in pharmacology**. Ed. 14, pag. 52-94, 2024.

HERNANDO-AMADO, S.; COQUE, T.; BAQUERO, F.; *et al.* Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. **Nature microbiology**. Vol. 4, pag. 1432-1442, 2019.

HOELZER, K.; BIELKE, L.; BLAKE, D.; *et al.* Vaccines as alternatives to antibiotic for food producing animals. Part 1: challenges and needs. **Veterinary research**. Ed. 49, pag. 64-86, 2018.

HUEMER, M.; SHAMBAT, S.; BRUGGER, S.; *et al.* Antibiotic resistance and persistence- implications for human health and treatment perspectives. **EMBO reports**. Vol. 12, pag. 34-51, 2020.

JAMAL, M.; TASNEEM, U.; HUSSAIN, T.; *et al.* Bacterial biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. **Research & Reviews: Journal Of Microbiology and Biotechnology**. Ed. 4, pag. 1-15, 2015.

JANSEN, K. U.; ANDERSON, A. S. The role of vaccines in Fighting antimicrobial resistance (AMR). **Humam Vaccines & Immunotherapeutics**. Ed. 14, pag. 2142-2149. 2018.

JIANG, B.; LAI, Y.; XIAO, W.; *et al.* Microbial extracellular vesicles contribute to antimicrobial resistance. **Plos pathogens**. Ed. 20, pag. 21-43, 2024.

JIAO, Y.; D'haeseleer, P.; DILL, B. D.; *et al.* Identification of Biofilm matrix-associated proteins from an acid mine drainage microbial Community. **Applied and Environmental microbiology**. Ed. 77, pag. 5230-5237, 2011.

KARAKONSTANTIS, S.; KRITSOTAKIS, E.; GIKAS, A. Treatment options for *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* co-resistant to carbapenems, aminoglycosides, polymyxins and tigecycline: an approach based on the mechanisms of resistance to carbapenems. **Infection**. Ed. 48, pag. 835-851, 2020.

KARKHUT, A. I.; KONECHNYI, Y. T.; KONECHNA, R. T.; *et al.* Synthesis of new S-(ω -Fluoralkyl) 4-substituted benzenesulfonothioates and their antimicrobial activity. **Issues of Chemistry and chemical technology**. Ed. 54, pag.75-82, 2024.

KERRY, R. G.; PATRA, J. K.; GOUDA, S.; *et al.* Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of food and drug analysis**. Ed. 26, pag. 927-939, 2018.

KIM, K.; GLUCK, M. Fecal microbiota transplantation: an update on clinical practice. *Clinical endoscopy*. Ed. 52, pag. 137-143, 2019.

KIM, W. H.; LILLEHOJ, H. S. Immunity, immunomodulation, and antibiotic alternatives to maximize the genetic potential of poultry for growth and disease response. **Animal feed science and technology**. Ed. 250, pag. 41-50, 2019.

KIND, T., FIEHN, O. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. **Bioanalytical review**. Ed. 2, pag 23-60, 2010.

KRAWCZYK, S., LESNICZAC-STASZAK, M., GOWIN, E., *et al.* Mechanistic insights into clinically relevant ribosome-targeting antibiotics. **Biomolecules**. Ed. 14, pag 1263, 2024.

LEI, Z.; KARIM, A. The Challenges and applications of nanotechnology against bacterial resistance. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**. Ed. 44, pag. 281-297, 2021.

LEONTIEV, R., HOHAUS, N., JACOB, C. *et al.* A comparison of the antibacterial and antifungal activities of thiosulfinate analogues of allicin. **Scientific Reports**. Ed. 8, pag 6763-6783, 2018.

LEWIS, K. The Science of Antibiotic Discovery. **CELL**. Ed. 181, pag. 29-45, 2020.

LI, X. H.; LEE, J. H. Antibiofilm agentes: a new perspective for antimicrobial strategy. **Journal of Microbiology**. Ed. 55, pag. 753-766, 2017.

LIU, Y.; DAT, Q.; RHOADS, M. Probiotics in disease prevention and treatment. **The Journal Of Clinical Pharmacology**. Ed. 58, pag. 164-179, 2018.

LUBENETS, V.; KARPENKO, O.; PONOMARENKO, M.; *et al.* Development of new antimicrobial compositions of thiosulfonate structure. **Chemistry & Chemical Technology**. Ed. 7, pag. 119-125, 2013.

LUBENETS, V.; STADNYTSKA, N.; BARANOVYCH, D.; *et al.* Thiosulfonates: The prospective substances against fungal infections. **Fungal Infection**. Ed. 8, pag. 436-461, 2019.

MAMPUYS, P.; MCELROY, C.; CLARK, J. *et al.* Thiosulfonates as emerging reactants: synthesis and applications. **Advanced Synthesis & Catalysis**. Ed. 362, Pág 3-64, 2019.

MARKOWIAK, P.; SLIZEWSKA, K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. **Gut pathogens**. Ed. 10, 2018.

MARQUES, G. S., LEÃO, W. F., LYRA, M. A. M. *et al.* Comparative evaluation of UV/VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of *Bauhinia forficata*. **Revista brasileira de farmacognosia**. Ed. 23, pag 143, 2013.

MESLEH, M. F., RAJARATNAM, P., CONRAD, M., *et al.* Targeting bacterial cell wall peptidoglycan synthesis by inhibition of glycosyltransferase activity. **Chemical biology & drug desing**. Ed. 28, pag 190-199, 2016.

METHERALL, J.; CARROLL, R.; COLES, S. *et al.* Advanced crystallisation methods for small organic Molecules. **Chemical Society Reviews**. V. 52, pag 1995-2010, 2023.

MILLER, W. R.; ARIAS, C. A. ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. **Nature Reviews microbiology**. Ed. 22, pag. 598-616, 2024.

MINATO, Y., DAWADI, S., KORDUS, S. L., *et al.* Mutual potentiation drives synergy between trimethoprim and sulfamethoxazole. **Nature Communications**. Ed. 9, pág 34-47, 2018.

MOHANRAJ, K.; KARTHIKEYAN, B. S.; VIVEK-ANANTH, R. P.; *et al.* IMPPAT: a curated database of Indian Medicinal Plants, Phytochemistry And Therapeutics. **Scientific reports**. Ed. 8, pag. 4329-4347, 2018.

MORAES, L. S., BURCH, J. E., DELGADILLO, D. A., *et al.* Structural elucidation and absolute stereochemistry for pharma compounds using microed. **Organic Letters**. Ed. 26, pág 6944-6949, 2024.

MOUBARECK, C. A. Polymyxins and bacterial membranes: a review of antibacterial activity and mechanisms of resistance. **Membranes**. Ed. 10, pág 181, 2020.

MURRAY, C. J. L.; IKUTA, K. J.; SHARARA, F. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**. Ed. 399, pág. 629-655, 2022.

NAGHAVI, MOHSEN *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. **The Lancet**, Volume 404, Issue 10459, 1199 – 1226, 2024.

NANTES, C. I.; PEREIRA, I. D.; BAI, R.; *et al.* S-(4-Methoxyphenyl)-4-methoxybenzenesulfonothioate as a promising lead compounds for the development of a renal carcinoma agent. Medicinal chemistry. Ed.15, pág. 449-458, 2020.

NATARAJAN, P. Facile synthesis of symmetric thiosulfonates by oxidation of disulfide with oxone /MX (MX=KBr, KCl, NaBr, and NaCl). **Tetrahedron letters**. V. 56, Pág 4131-4134, 2015.

NIJLAND, R.; HALL, M. J.; BURGESS, J. G. Dispersal of biofilms by secreted, matrix degrading, bacterial DNase. **Plos One**. Ed. 12, pag. 56-68, 2010.

OJKIC, N., LILJA, E., DIREITO, S., *et al.* A roadblock-and-kill mechanism of action model for the DNA-targeting antibiotic ciprofloxacin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. Ed. 64, pág 19, 2020.

OLIVEIRA, D. M. P. de; FORDE, B. m.; KIDD, T. J. *et al.* Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Clinical Microbiology reviews**. Ed. 33, pag. 181-231, 2020.

OMS. WHO bacterial priority pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. ISBN 978-92-4-009346-1.

PANDAY, A. K., KUMAR, A., SRIVASTAVA S. K. Blue light-induced coupling of N-Hydroxy sulfonamides: An efficient and green approach to symmetrical thiosulfonates. **Russian journal of organic chemistry**. Ed. 58, pág 844-849, 2022.

PARMANIK, A.; DAS, S.; KAR, B.; *et al.* Current treatment strategies against multidrug-resistant bacteria: a review. *Current microbiology*. Ed. 79, pag. 388, 2022.

PARAJULI, N. P., MANDAVA, C. S., PAVLOV, M. Y., *et al.* Mechanism insights into translation inhibition by aminoglycoside antibiotic arbekacin. **Nucleic Acids Research**. Ed 49, pág 6880-6892, 2021.

PULINGAM, T.; PARUMASIVAM, T.; GAZZALI, A.; *et al.* Antimicrobial prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. **European journal of Pharmaceutical sciences**. Ed. 170, pag. 103-123, 2022.

RABIN, N.; ZHENG, Y.; OPOKU-TEMENG, C.; Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agentes. *Future Medicinal Chemistry*. Ed. 7, pag. 493-512, 2015.

RATHER, M.; GUPTA, K.; BARDHAN, P.; *et al.* Microbial biofilm: A matter of grave concern for human health and food industry. **Journal of basic microbiology**. Ed. 61, pag. 380-395, 2021.

RATHER, M. A.; GUPTA, K.; MANDAL, M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. **Brazilian Journal of Microbiology**. Ed.52, pág. 1701-1718, 2021.

ROSANOVA, M. T., POMPA, L. C., LEDE, R. *et al.* Is Trimethoprim-Sulfamethoxazole a Valid Alternative in the Management of Infections in Children in the Era of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*? A Comprehensive Systematic Review. **Journal of pharmacy technology**. Ed. 32, pág 2484, 2016.

ROY, R.; TIWARI, M.; DONELLI, G. *et al.* Strategies for combating biofilms: a focus on anti-biofilm agentes and their mechanisms of action. **Virulence**. Ed. 9, pag. 522-554, 2018.

SHAPIRO, R. S. Antimicrobial-induced DNA damage and genomic instability in microbial pathogens. **Plos pathogens**. Ed. 11, pág 4678, 2015.

SINGH, B. R.; SINHA, D. K.; RAJENDRAN, V. O. Effect of herbal antimicrobial on bacterial strains of food of vegetable and animal origin. **Journal of food chemistry and nanotechnology**. Ed. 2, pag. 115-123. 2016.

SINGH, B. R.; VINODH, K.; SINHA, D. K.; *et al.* Antimicrobial resistance profile of enteropathogens isolated from diarrhea patients: herbal antimicrobials, a ray of hope. **Annals of pharmacology and pharmaceutics**. Ed. 2, pag. 1068-1076, 2018

SINGH, B. R.; SINHA, D. K.; VINODH, K.; *et al.* Antimicrobial activity of agarwood oil against multiple-drug-resistant (MDR) microbes of clinical, food and environmental origin. **Current drug discovery technologies**. Ed. 17, pag. 348-356, 2020.

SINGH, B. R.; YADAV, A.; SINHA, D. K.; *et al.* Potential of herbal antibacterials as an alternative to antibiotics for multiple drug resistant bacteria: an analysis. **Research journal of veterinary sciences**. Ed. 13, pag. 1-8, 2020.

SKRZYDLEWSKI, P.; TWARUZEK, M.; GRAJEWSKI. Cytotoxicity of mycotoxins and their combinations on different cell lines: a Review. **Toxins**. Ed 14, pág 244, 2022.

SMITH, W. P. J.; WUCHER, B. R.; NADELL, C. D.; *et al.* Bacterial defences: mechanisms, Evolution and antimicrobial resistance. **Nature reviews microbiology**. Ed. 21, pag. 519-534, 2023.

SOBOLEWSKA, E., BIESAGA, M. High-Performance Liquid Chromatography Methods for Determining the Purity of Drugs with Weak UV Chromophores – A Review. **Critical Reviews in analytical chemistry**. Ed. 55, Pág 419-433, 2024.

SORLOZANO-PUERTO, A.; ALBERTUZ- CRESPO, M.; LOPEZ-MACHADO, I.; *et al.* In vitro antibacterial activity of propyl-propane-thiosulfinate and propyl-propane-thiosulfonate derived from *Allium* spp. against gram-negative and gram-positive multidrug-resistant bacteria isolated from human samples. **Biochemistry Research International**. 2018.

SORLÓZANO-PUERTO, A.; CEREZO-COLLADO, L.; ROCA-LAGRILLIERE, E.; *et al.* Activity of propyl-propane-thiosulfinate and propyl-propane-thiosulfonate against

carbapenems resistant gram-negative bacteria. **Journal of pathology, microbiology and immunology**. Ed. 132, pag. 581-593, 2024.

SPARROW, E.; FRIEDE, M.; SHEIKH, M.; *et al.* Therapeutic antibodies for infectious diseases. **Bulletin of the world health organization**. Ed. 95, pag.235-237, 2017.

SWANEY, S. M., AOKI, H., GANOZA, M. C. *et al.* The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. Ed. 42, pag 3251-3255, 1998.

TOYOFUKU, M.; INABA, T.; KIROKAWA, T. *et al.* Environmental factors that shape biofilm formation. **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**. Ed. 80, pag. 7-12, 2016.

TOYOFUKU, M.; ROSCHITZKI, B.; RIEDEL, K.; *et al.* Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix. *Journal of Proteome Research*. Ed. 11, pag. 4906-4915, 2012.XU, S.; LIAO, Y.; WANG, Q.; *et al.* Current studies and potential future research directions on biological effects and related mechanisms of allicin. **Critical Reviews in food science and nutrition**. Ed. 63, pag.7722-7748, 2022.

UDDIN, T. M.; CHAKRABORTY, A. J.; KHUSRO, A.; *et al.* Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. **Journal of infection and public health**. Ed.14, pag. 1750-1766, 2021.

VENKATESWARAN, P.; VASUDEVAN, S.; DAVID, H.; *et al.* Revisiting ESKAPE pathogens: virulence, resistance, and combating strategies focusing on quorum sensing. **Frontiers in cellular and infection microbiology**. Ed. 13, pag. 97-115, 2023.

VETTER, V.; DENIZER, G.; FRIEDLAND, L.; *et al.* Understanding modern-day vaccines: what you need to know. **Annals of medicine**. Ed. 50, pag. 110-120, 2018.

WANG, X.; MENG, J.; ZHAO, D. *et al.* Synthesis and applications of thiosulfonates and selenosulfonates as free-radical reagents. **Chinese chemical letters**. V. 34, pag 63-77, 2023.

YANG, S., WANG, H., ZHAO, D., *et al.* Polymyxins: recent Advances and challenges. **Frontiers in pharmacology**. Ed 15, pag 47-65, 2024.

YANG, Z., SHI, Y., ZHAN, Z., *et al.* Sustainable Electrocatalytic oxidant-free Syntheses of thiosulfonates from thiols. **Chemelectrochem**. Ed 23, pag 3619-3623, 2018.

ZHAO, X.; ZHAO, F.; WANG, J.; *et al.* Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. **RSC Advances**. Ed. 58, pag. 36670-36683, 2017.

ZHOU, W.; LIANG H.; QIN, X. *et al.* The isolation of Pyrroloformamide congeners and characterization of their biosynthetic gene cluster. **Journal of natural products**. Ed. 83, pag. 202-209, 2020.

ZURAWSKI, V. D.; MCKLENDON, M. K. Monoclonal antibodies as an antibacterial approach against bacterial pathogens. **Antibiotics**. Ed. 9, pag. 155-172, 2020.