



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

ANA LUIZA DE AGUIAR ROCHA MARTIN

**EFEITO *IN VITRO* E *IN SILICO* DE DERIVADOS CUMARÍNICOS NA
INIBIÇÃO DA FUNÇÃO DA BOMBA DE EFLUXO MepA e NorA EM
*Staphylococcus aureus***

Fortaleza/CE

2023

ANA LUIZA DE AGUIAR ROCHA MARTIN

**EFEITO *IN VITRO* E *IN SILICO* DE DERIVADOS CUMARÍNICOS NA
INIBIÇÃO DA FUNÇÃO DA BOMBA DE EFLUXO MepA E NorA EM
*Staphylococcus aureus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia

Orientador: Profa. Marta Maria de França Fonteles, PhD.

Fortaleza/CE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M334e Martin, Ana Luiza de Aguiar Rocha.
Efeito in vitro e in silico de derivados cumarínicos na inibição da função da bomba de efluxo MepA e NorA em *Staphylococcus aureus* / Ana Luiza de Aguiar Rocha Martin. – 2023.
101 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles.
1. Derivados da cumarina. 2. Resistência Microbiana a Antibióticos. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. Simulação de Acoplamento Molecular. 5. Simulação de Dinâmica Molecular. I. Título.
- CDD 615.1
-

ANA LUIZA DE AGUIAR ROCHA MARTIN

**EFEITO *IN VITRO* E *IN SILICO* DE DERIVADOS CUMARÍNICOS NA INIBIÇÃO DA
FUNÇÃO DA BOMBA DE EFLUXO MepA E NorA EM *Staphylococcus aureus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Farmacologia da Universidade Federal do Ceará
como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutora em Farmacologia

Orientador: Profa. Marta Maria de França Fonteles,
PhD.

BANCA EXAMINADORA

Profa Dra. Marta Maria de França Fonteles (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof Dr. Diogo Teixeira Carvalho
Universidade Federal de Alfenas (UFAL)

Profa Dra. Natália Bitú Pinto
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Prof Dr. Aracélio Viana Colares
Centro Universitário Leão Sampaio (UNILEÃO)

Fortaleza/CE

2023

Aos meus pais, Mário Martin (in memoriam) e Ana Helena Martin por serem meu exemplo de vida e família, força e superação, pelo amor e carinho que sempre me foram dedicados e pelo inesgotável apoio e esforços em meus projetos profissionais e intelectuais.

AGRADECIMENTOS

À **Deus e Nossa Senhora**, por nunca me deixarem só, sempre me concedendo força para superar os inúmeros momentos difíceis e por me guiarem como toda sua misericórdia.

À **Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles**, por ter me acolhido num momento decisivo da minha jornada acadêmica e sobretudo, por ter confiado que juntas, faríamos um bom trabalho. Pelos ensinamentos, paciência e palavras de conforto quando tudo parecia impossível. Obrigada por ser firme e doce ao mesmo tempo. És inspiração!

À **Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana**, exemplo de pesquisadora a quem dispenso um enorme carinho e admiração e agradeço por termos caminhado juntas um determinado período dessa jornada. Aprendi muito com o nosso convívio, obrigada!

Ao **Prof. Dr. Henrique Douglas de Melo Coutinho**, pelo acolhimento, admiração e imensurável colaboração neste trabalho, permitindo que os experimentos fossem realizados em seu laboratório, me ensinando como é importante o compromisso e que assim, conseguimos colher bons frutos. Obrigada!

Ao **Prof. Dr. Irwin Rose de Alencar Menezes**, pela grande colaboração neste trabalho, sempre trazendo questionamentos e ideias inovadoras que contribuíram muito para esse resultado. Obrigada!

Ao **Prof. Dr. Diogo Teixeira**, pela parceria na síntese e disponibilização dos compostos utilizados neste trabalho e por sempre ser disponível quando tive alguma dúvida. Obrigada!

Ao **Dr. Gabriel Costa da Hora**, pela parceria nas análises computacionais deste trabalho, por me mostrar um universo novo na pesquisa, me incentivar e acreditar que tudo daria certo. Obrigada!

Ao **Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior**, pela condução da coordenação da PPGF com ética e seriedade, mas ao mesmo com muita empatia e acolhimento. Obrigada!

Aos colegas de laboratório, **Janaína, Raimundo, Thiago, Saulo, Datiane, Gustavo, Silvio e Renata** pelo apoio e cooperação na realização dos experimentos. Muito Obrigada!

À minha mãe **Ana Helena Martin**, por sempre acreditar que eu seria capaz, por nunca me deixar desistir, mesmo nos dias mais difíceis. Por ter largado tudo nessa reta final e ter vindo ficar comigo para dar apoio no que foi preciso. Sem dúvida, não teria sido possível sem a senhora, mãezinha. Minha eterna gratidão!

Ao meu marido **Pablo Farias**, por estar sempre ao meu lado, me ajudar nos quesitos tecnológicos, por sempre acreditar em mim e me incentivar a ser uma profissional e pessoa melhor.

Aos meus filhos **Mário e Marina**, por serem a melhor coisa da minha vida, por me fazerem querer ser uma pessoa melhor a cada dia. Pela paciência durante toda minha ausência enquanto

realizava os experimentos, escrevia os artigos e, principalmente, essa tese. Por terem um sorriso que me acalma e um abraço que me aquece. Amo vocês infinito e além!

Ao meu amigo **Fernando Figueredo**, que com sua positividade infinita me trazia calma nos momentos mais estressantes, por sempre ter acreditado em mim e por colocar a mão na massa comigo em alguns experimentos. Muito obrigada mesmo!

Ao meu amigo **Rodrigo Lemos**, pela disponibilidade constante quando eu precisava de ajuda nas correlações químicas. Muito obrigada!

Às minhas amigas do **Grupo da corrida, Lícia, Juliana, Sally e Eruska** pela amizade, torcida constante e por entenderem que não pude estar presente em muitos momentos.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial à **Milena e Laura** por toda disponibilidade em tirar nossas dúvidas sempre que necessário. Obrigada!

Enfim, a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado!

RESUMO

A ocorrência de resistência bacteriana tem aumentado e isso compromete o tratamento de diversas infecções. A alta virulência do *Staphylococcus aureus* permite a manutenção do processo infeccioso, sendo causador de muitas mortes e internações hospitalares. A bomba de efluxo MepA e NorA constituem proteínas transportadoras responsáveis por expulsar agentes antimicrobianos como as fluoroquinolonas da célula bacteriana. As cumarinas são compostos fenólicos e têm sido estudadas por sua diversidade de ações biológicas, inclusive contra bactérias. Foi realizada uma caracterização farmacocinética *in silico* dos compostos C10, C11, C13 e C14 de acordo com os princípios da regra dos cinco de Lipinsk, além da busca por similaridade no ChemBL e posterior busca por publicações no CAS SciFinder. Todos os compostos foram avaliados quanto à sua atividade antibacteriana e moduladora *in vitro* contra cepas padrão e multirresistente Gram positivas e Gram negativas. O efeito das cumarinas C9, C10, C11, C13 e C14 como inibidor da bomba de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus* foi avaliado através do método de microdiluição (MepA ou NorA) e fluorimetria (NorA). O comportamento das cumarinas com relação a bomba de efluxo foi determinado a partir das propriedades de interação com membrana e cumarinas-proteína usando *docking* molecular e simulações de dinâmica molecular. Apenas o composto cumarínico C13 isolado apresentou atividade antibacteriana contra cepas padrão de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. No entanto, as outras cumarinas testadas apresentaram capacidade moduladora de antibacterianos fluoroquinolona e aminoglicosídeo. Os compostos C10, C13 e C14 foram eficazes na diminuição da CIM dos dois antibióticos para ambas as cepas multirresistente e a C11, potencializou o efeito da norfloxacin e gentamicina para a bactéria Gram positiva e Gram negativa e do norfloxacin apenas para Gram negativa. Apenas a cumarina C14 produziu efeitos sinérgicos quando associada à ciprofloxacina em cepas portadoras de MepA. Todas as cumarinas testadas apresentam capacidade de inibir da bomba de efluxo NorA presente no *Staphylococcus aureus* tanto na redução da CIM como induzindo o aumento da emissão de fluorescência do brometo de etídio na fluorimetria. As descobertas deste estudo oferecem uma perspectiva atomística sobre o potencial das cumarinas como inibidores ativos da bomba NorA, destacando seu modo de ação específico que visa principalmente a inibição da proteína. No *docking* molecular, observou-se que as cumarinas são capazes de interagir com diversos resíduos de aminoácidos da bomba NorA. A simulação mostrou que a cumarina C10 consegue atravessar a bicamada, no entanto, as outras cumarinas interagiram com a membrana, mas não foram capazes de atravessá-la. As cumarinas demonstraram seu papel potencializador do efeito do norfloxacin por duplo mecanismo: inibição da bomba de efluxo por interação direta com a proteína (C9, C10, C11 e C13) e maior interação com a membrana (C10 e C13). E no contexto dos estudos de predição farmacocinética, as estruturas estudadas apresentam um perfil químico adequado para possivelmente serem utilizados por via oral. Sugerimos que os derivados cumarínicos podem ser uma alternativa interessante no futuro para tratamento de infecções bacterianas resistentes, com a possibilidade de efeito sinérgico com outros antibacterianos, sendo necessário mais estudos para caracterizar seus efeitos terapêuticos e de toxicidade.

Palavras-chave: Derivados da cumarina. Resistência Microbiana a Antibióticos. *Staphylococcus aureus*. Simulação de Acoplamento Molecular. Simulação de Dinâmica Molecular

ABSTRACT

IN VITRO AND IN SILICO EFFECT OF COUMARIN DERIVATIVES ON THE INHIBITION OF MepA AND NorA EFFLUX PUMP FUNCTION IN *Staphylococcus aureus*

The occurrence of bacterial resistance has been increasing, compromising the treatment of various infections. The high virulence of *Staphylococcus aureus* allows for the maintenance of the infectious process, causing many deaths and hospitalizations. The MepA and NorA efflux pumps are transporter proteins responsible for expelling antimicrobial agents such as fluoroquinolones from the bacterial cell. Coumarins are phenolic compounds that have been studied for their diverse biological actions, including against bacteria. A pharmacokinetic in silico characterization of compounds C10, C11, C13, and C14 was carried out according to the principles of Lipinski's Rule of Five, in addition to searching for similarity in ChemBL and subsequent search for publications in CAS SciFinder. All compounds were evaluated for their in vitro antibacterial and modulatory activity against standard and multidrug-resistant Gram-positive and Gram-negative strains. The effect of coumarins C9, C10, C11, C13, and C14 as efflux pump inhibitors in *Staphylococcus aureus* strains was evaluated using the microdilution method (MepA or NorA) and fluorimetry (NorA). The behavior of coumarins regarding the efflux pump was determined from their interaction properties with the membrane and coumarin-protein using molecular docking and molecular dynamics simulations. Only the isolated coumarin compound C13 showed antibacterial activity against standard strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. However, the other tested coumarins showed modulatory capacity for fluoroquinolone and aminoglycoside antibacterials. Compounds C10, C13, and C14 were effective in reducing the MIC of both antibiotics for both multidrug-resistant strains, while C11 potentiated the effect of norfloxacin and gentamicin for Gram-positive and Gram-negative bacteria and only norfloxacin for Gram-negative. Only coumarin C14 produced synergistic effects when associated with ciprofloxacin in MepA-carrying strains. All tested coumarins have the ability to inhibit the NorA efflux pump present in *Staphylococcus aureus*, both in reducing the MIC and inducing increased ethidium bromide fluorescence emission in fluorimetry. The findings of this study offer an atomistic perspective on the potential of coumarins as active inhibitors of the NorA pump, highlighting their specific mode of action mainly targeting protein inhibition. In molecular docking, it was observed that coumarins are capable of interacting with various amino acid residues of the NorA pump. The simulation showed that coumarin C10 can cross the bilayer; however, the other coumarins interacted with the membrane but were unable to cross it. Coumarins demonstrated their potentiating role in the effect of norfloxacin through a dual mechanism: efflux pump inhibition through direct interaction with the protein (C9, C10, C11, and C13) and increased interaction with the membrane (C10 and C13). In the context of pharmacokinetic prediction studies, the studied structures have a suitable chemical profile for possible oral use. We suggest that coumarin derivatives may be an interesting alternative in the future for the treatment of resistant bacterial infections, with the possibility of a synergistic effect with other antibacterials, although further studies are needed to characterize their therapeutic effects and toxicity.

Keywords: Coumarins. Drug Resistance, Microbial. *Staphylococcus aureus*. Molecular Docking Simulation. Molecular Dynamics Simulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Famílias de bomba de efluxo.	19
Figura 2. Biossíntese da cumarina.....	23
Figura 3. Cumarina (1,2-benzopirona)	23
Figura 4. Rota de síntese para a obtenção das cumarinas avaliadas.....	32
Figura 5. Fluxo metodológico da primeira fase da pesquisa.	35
Figura 6. Ácido graxo POPG.....	40
Figura 7. Fluxo metodológico da segunda fase da pesquisa.....	36
Figura 8. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de diferentes antibióticos (Norfloxacino ou Gentamicina) na presença ou ausência da substância C10 contra <i>S. aureus</i> 10 e <i>E. coli</i> 06....	46
Figura 9. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de diferentes antibióticos (Norfloxacino ou Gentamicina) na presença ou ausência da substância C11 contra <i>S. aureus</i> 10 e <i>E. coli</i> 06....	47
Figura 10. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de diferentes antibióticos (Norfloxacino ou Gentamicina) na presença ou ausência da substância C13 contra <i>S. aureus</i> 10 e <i>E. coli</i> 06....	47
Figura 11. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de diferentes antibióticos (Norfloxacino ou Gentamicina) na presença ou ausência da substância C14 contra <i>S. aureus</i> 10 e <i>E. coli</i> 06....	48
Figura 12. Capacidade dos compostos C9, C10, C11, C13 e C14 de inibir a bomba de efluxo MepA em combinação com brometo de etídio (EtBr) (A) e ciprofloxacino (B) e contra a cepa de <i>S. aureus</i> K2068.....	51
Figura 13. Capacidade dos compostos C9, C10, C11, C13 e C14 de inibir a bomba de efluxo NorA em combinação com norfloxacina (A), brometo de etídio (B) e contra a cepa de <i>S. aureus</i> 1199B.....	54
Figura 14. Avaliação da inibição da bomba de efluxo NorA pelos compostos C9, C10, C11, C13 e C14. Avaliado por emissão de fluorescência. (A) Derivados de cumarina em 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (B) Derivados de cumarina em 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	59
Figura 15. <i>Cluster</i> mais populoso para a cumarina (A) C9 e (B) C10 na bomba de efluxo NorA.	61
Figura 16. Visão ampliada do <i>cluster</i> mais populoso de C10 em NorA.	62
Figura 17. (A) <i>Cluster</i> mais populoso para a cumarina C11. (B) Outro modo de ligação para a C11 na região central da proteína Nora.	64

Figura 18. Área por grupo cabeça do lipídio POPG nas simulações com diferentes cumarinas. Valores médios: (A) 67,89; (B) 67,83; (C) 67,25; (D) 67,34 e (E) 66,84 Å ²	66
Figura 19. Espessura do lipídio POPG nas simulações com diferentes cumarinas.	67
Figura 20. Posição Z do centro de massa de cada molécula (cores diferentes) de cada cumarina (C9, C10, C11, C13 e C14) na simulação da bicamada de POPG.	68
Figura 21. Parâmetro de ordem de deutério (S_{CD}) para as cadeias oleil e palmitoil do POPG no início (linha tracejada, 0 a 50 ns) e no final (linha sólida, 450 a 500 ns) da simulação para cada cumarina.	70
Figura 22. (A) Quadro inicial e (B) quadro final de uma simulação da bicamada lipídica POPG com a bomba NorA e moléculas de cumarina C10.	72
Figura 23. (A) Visão frontal e (B) Visão inferior da imagem final da simulação de C10 com a NorA incorporada na bicamada lipídica POPG. A NorA é representada em azul sólido. As moléculas de C10 estão em tubos verdes (carbono), brancos (hidrogênio) e vermelhos (oxigênio).....	73
Figura 24. (A) Número de contatos das cumarinas C10 com a bomba de efluxo NorA. (B) Instantâneo de três cumarinas C10 mostrando diferentes mecanismos de interação.	74
Figura 25. Representação do complexo NorA-POPG com moléculas de cumarina C13 aos 20 ns iniciais.	76
Figura 26. Número de contatos das cumarinas C13 com a bomba de efluxo NorA.	76
Figura 27. (A) Simulação da bicamada lipídica POPG com a bomba NorA e moléculas de cumarina C13. (B) Visão frontal da imagem final da simulação de C13 com a NorA incorporada na bicamada lipídica POPG.....	77
Figura 28. Síntese do fluxo de trabalho baseado nos principais achados de cada fase.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ações biológicas das cumarinas	25
Tabela 2. Estrutura química das cumarinas avaliadas.	32
Tabela 3. Atividades farmacológicas dos derivados cumarínicos segundo a literatura.	43
Tabela 4. Número estimado de organismos-alvo para cumarinas de estudo (ChEMBL).	43
Tabela 5. Propriedades físico-químicas dos derivados cumarínicos.	44
Tabela 6. Regiões, taxa de ocupação dos <i>clusters</i> e energias médias de ligação das cumarinas com a bomba de efluxo NorA.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABC. Superfamília ligada à ATP cassette
- ADME. Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
- ADP. Difosfato de adenosina
- ADT. *AutoDock Tools*
- ATCC. *American Type Culture Collection*
- ATP. Trifosfato de adenosina
- BHI. *Brain Heart Infusion*
- C10. *7-(Allyloxy)-4-methyl-2H-chromen-2-one*
- C11. *7-(alpha-D-Galactopyranosyloxy)-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-one*
- C13. *8-Acetyl-7-hydroxy-4-methylcoumarin*
- C14. *7-Hydroxy-4-methyl-2H-chromen-2-one*
- C9. *7-hydroxy-4-methyl-8-(morpholin-4-ylmethyl)-2H-chromen-2-one*
- CAS. *Chemical Abstracts Service*
- CCCP. *Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl-hydrazone*
- ChEBI. *Chemical Entities of Biological Interest*
- CIM. Concentração Inibitória Mínima
- DNA. ácido desoxirribonucléico
- EBI. Instituto Europeu de Bioinformática
- EMBL. *European Molecular Biology Laboratory*
- EtBr. brometo de etídio
- HIV. Vírus da imunodeficiência humana
- LMBM. Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular
- MATE. Superfamília de extrusão de multidrogas e de compostos tóxicos
- MD. *dinâmica molecular*
- MFS. Subfamília grande facilitadora
- PBS. *phosphate buffered saline*
- PDBe. *Protein Data Bank* na Europa
- POPG. *1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol)*
- PSA. área de superfície polar
- RNA. Ácido ribonucléico
- RND. Superfamília de divisão celular de nodulação de resistência

SAR. relação estrutura-atividade

SEM. erro padrão da média

SIB. Instituto Suíço de Bioinformática

SMR. Pequena família de resistência a múltiplos medicamentos

TPSA. área de superfície polar topológica

URCA. Universidade Regional do Cariri

ZCOM. Coordenada Z

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	15
1.1.1 <i>Epidemiologia das infecções bacterianas</i>	15
1.1.2 <i>Mecanismos de resistência bacteriana</i>	16
1.1.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	17
1.1.2.2 Bombas de efluxo	18
1.1.2.2.1 Bombas de efluxo MepA e NorA	19
1.1.2.2.2 Inibidores de bomba de efluxo.....	20
1.2 PRODUTOS DE ORIGEM NATURAL.....	21
1.2.1 <i>Cumarinas</i>	22
1.3 ESTUDOS COMPUTACIONAIS.....	25
1.3.1 <i>Predição farmacocinética</i>	26
1.3.2 <i>Regra dos Cinco de Lipinsk</i>	27
1.3.3 <i>Relação estrutura-atividade</i>	28
2 JUSTIFICATIVA.....	28
3 OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 OBTENÇÃO DAS CUMARINAS	31
4.2 ENSAIOS PRELIMINARES <i>IN SÍLICO</i>	33
4.2.1 <i>Análise de atividade biológica por similaridade e propriedades farmacocinéticas (ADME)</i>	33
4.3 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	34
4.3.1 <i>Linhagens utilizadas</i>	34
4.3.2 <i>Fármacos e reagentes</i>	34
4.3.3 <i>Meios de cultura</i>	34
4.3.4 <i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i>	35
4.3.5 <i>Ensaio de modulação da ação de antibióticos</i>	36

4.3.6	<i>Avaliação da inibição de bomba de efluxo NorA ou MepA por redução do CIM do brometo de etídio</i>	37
4.3.7	<i>Avaliação da Inibição da Bomba de efluxo NorA por Emissão de Fluorescência de EtBr</i>	37
4.3.8	<i>Análise Estatística</i>	38
4.4	ANÁLISE COMPUTACIONAL DA INIBIÇÃO DA BOMBA DE EFLUXO NORA	38
4.4.1	<i>Docking</i>	38
4.4.2	<i>Dinâmica Molecular: derivados cumarínicos e membrana POPG</i>	39
4.4.3	<i>Dinâmica Molecular: complexo NorA-POPG com C10 e C13</i>	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	ENSAIOS PRELIMINARES <i>IN SÍLICO</i>	43
5.1.1	<i>Análise de atividade biológica por similaridade e propriedades farmacocinéticas (ADME)</i>	43
5.2	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	44
5.2.1	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i>	44
5.2.2	<i>Ensaio de modulação da ação de antibióticos</i>	46
5.2.3	<i>Avaliação da inibição de bomba de efluxo MepA por redução do CIM do EtBr</i> ..	50
5.2.4	<i>Avaliação da inibição de bomba de efluxo NorA por redução do CIM do EtBr</i> ...	53
5.2.5	<i>Avaliação da Inibição da Bomba de efluxo NorA por Emissão de Fluorescência de EtBr</i>	57
5.3	ANÁLISE COMPUTACIONAL DA INIBIÇÃO DA BOMBA DE EFLUXO NORA	60
5.3.1	<i>Docking</i>	60
5.3.2	<i>Dinâmica Molecular: Derivados de cumarina e membrana de Fosfatidilglicerol (POPG)</i>	65
5.3.3	<i>Dinâmica Molecular: complexo NorA-POPG e C10 e NorA-POPG e C13</i>	71
6	CONCLUSÃO	79
	APÊNDICE A – PUBLICAÇÃO (FATOR DE IMPACTO: 3,8)	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA

1.1.1 Epidemiologia das infecções bacterianas

As infecções bacterianas são uma preocupação significativa para a saúde pública em todo o mundo. Essas infecções são causadas por bactérias patogênicas que invadem o organismo e podem provocar diversas alterações, desde infecções leves até condições consideradas graves e potencialmente fatais (WHO, 2020). A incidência de infecções bacterianas varia de acordo com vários fatores, incluindo a região geográfica, as condições sanitárias, a idade, o estado imunológico das pessoas e o acesso aos cuidados de saúde. Em áreas com acesso limitado a água potável, saneamento básico inadequado e falta de medidas de controle de infecções, a incidência de infecções bacterianas é geralmente mais alta (VON HUTH; KOFOED; HOLMSKOV, 2019).

As infecções bacterianas são comuns ao ponto de se apresentarem como a segunda maior causa de morte em seres humanos e podem afetar diferentes sistemas e órgãos do corpo humano. Alguns exemplos comuns incluem infecções do trato respiratório, como pneumonia e sinusite, infecções do trato urinário, como cistite e pielonefrite, infecções da pele e tecidos moles, como celulite e furúnculos, e infecções do trato gastrointestinal, como gastroenterite bacteriana (GBD 2019 ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS, 2022)

Estima-se que milhões de pessoas em todo o mundo sejam afetadas por infecções bacterianas a cada ano (GBD 2019 ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS, 2022). A prevalência varia de acordo com a idade e o contexto individual de cada local. Em países em desenvolvimento, as infecções bacterianas são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em crianças, especialmente aquelas com acesso limitado a vacinas e cuidados adequados (HARTMAN et al., 2013; ROMANDINI et al., 2021).

De acordo com o último relatório, a metade de todas as mortes bacterianas globais em 2019 foram devidas infecções provocadas por cinco patógenos bacterianos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (GBD 2019 ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS, 2022).

Desde a descoberta de substâncias com atividade antimicrobiana, os desfechos negativos de simples infecções bacterianas reduziram substancialmente e contribuem, até hoje, para o controle da morbimortalidade em seres humanos. No entanto, o uso incorreto e

indiscriminado dos antibacterianos levou ao aumento significativo da resistência bacteriana na última década (BRINK, 2019; DE KRAKER; STEWARDSON; HARBARTH, 2016; IBRAHIM et al., 2021) até que, em 2014, uma estimativa levantada por um grupo de cientistas mostrou que se não fossem tomadas medidas rápidas e eficientes para lentificar o avanço desse fenômeno, até 2050, poderia causar 10 milhões de mortes anuais (O'NEILL, 2014). A pandemia de COVID-19, possivelmente provocou a redução no tempo dessa estimativa, infelizmente podendo-se chegar a esses números antes da data prevista (LAI et al., 2021; LIVERMORE, 2021). A velocidade com que as bactérias estão desenvolvendo mecanismos de resistência aos antibacterianos existentes é maior do que a velocidade que ciência consegue desenvolver novos fármacos para combater esse fenômeno (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013). Sendo assim, quando não for possível desenvolver novos antibacterianos, a descoberta e desenvolvimento de compostos que possam auxiliar na diminuição da resistência, promovendo efeito sinérgico é de grande importância.

1.1.2 Mecanismos de resistência bacteriana

A resistência bacteriana aos antibióticos é um dos principais desafios enfrentados pela clínica médica atualmente. Os mecanismos genéticos que promovem a resistência têm sido amplamente estudados com a finalidade de compreender como as bactérias adquirem a capacidade de sobreviver e proliferar mesmo na presença de agentes antimicrobianos específicos (APJOK et al., 2019; BLAIR et al., 2015; FARQUHAR; RASOULI KOOHI; CHARLEBOIS, 2021; GALETTI et al., 2019; SOMMER; DANTAS, 2011). Frequentemente, esse fenômeno se dá através de alterações genéticas decorrentes da mutação e captação de material genético por transferência horizontal de outras cepas bacterianas e são a forma mais comum de adquirir resistência (MUNITA; ARIAS, 2016). Os principais mecanismo pelo qual as bactérias resistem ao efeito dos antibacterianos são: expressão de bombas de efluxo, responsáveis pela remoção do fármaco que penetrou na célula bacteriana; produção de enzimas inativadoras que promovem a degradação do grupo farmacofórico de antibacterianos, não permitindo sua ação farmacológica; redução da penetração de antibacterianos na bactéria ou alteração do sítio alvo de antibacterianos (C REYGAERT, 2018; MARTINEZ, 2014; ZHANG; CHENG, 2022).

Um dos mecanismos mais comuns de resistência bacteriana é a produção de enzimas que inativam os antibióticos. Um exemplo notável é a β -lactamase, uma enzima capaz de hidrolisar

a estrutura dos antibióticos β -lactâmicos, como as penicilinas e cefalosporinas (BUSH, 2018). Outro mecanismo importante é a mutação de genes-alvo do antibiótico como acontece na resistência à rifampicina, um antibiótico amplamente utilizado no tratamento da tuberculose. Mutações em genes como *rpoB* podem alterar a conformação da RNA polimerase bacteriana, reduzindo sua afinidade pelo fármaco. Essas mutações genéticas podem ocorrer espontaneamente ou serem induzidas pela exposição prévia a antibióticos (LEEHAN; NICHOLSON, 2021).

A resistência da *Escherichia coli* às fluoroquinolonas como o ciprofloxacino, agente comumente utilizado para tratar infecções do trato urinário, parece ser conferida pelo acúmulo de várias substituições nas regiões de *gyrA* e *parC*. Outro aspecto importante no mecanismo de resistência antibiótica dessa bactéria é mediada por plasmídeos, que codificam proteínas na membrana bacteriana com a função de promover o efluxo desses agentes, resultando na sobrevivência da bactéria (DEHBANIPOUR et al., 2019). A resistência do *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) à macrolídeos e fluoroquinolonas ocorre, também por meio de efluxo dependente de energia, além da produção de várias toxinas pelo *S. aureus* que atuam degradando moléculas de adesão celular (THAMMAVONGSA et al., 2015).

Algumas bactérias desenvolvem vários destes mecanismos de forma simultânea, o que as torna resistente a múltiplos fármacos, reduzindo assim, as possibilidades terapêuticas para o manejo das infecções. Entre os vários mecanismos de resistência bacteriana, as bombas de efluxo transmembrana têm sido comumente associadas à resistência a vários antibióticos e outros agentes quimioterápicos (MARTINEZ, 2014; MOHANTY; PACHPUTE; YADAV, 2021; PIDDOCK, 2006a; ZHANG; CHENG, 2022).

1.1.2.1 *Staphylococcus aureus*

Entre as bactérias que possuem a capacidade de adquirir esse mecanismo de resistência, podemos destacar algumas cepas de *Staphylococcus aureus*, bactéria aeróbia Gram-positiva que tem sido alvo de infecções ao longo dos anos, sendo responsável por infecções na pele, trato respiratório, endocardite, osteomielite e até septicemia (TAYLOR; UNAKAL, 2022) e estão relacionadas com diversas internações hospitalares e mortes anuais (GBD 2019 ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS, 2022). Este microrganismo é versátil e capaz de adquirir facilmente resistência aos antibióticos, o que dificulta seu controle (GUO et al., 2020). A alta virulência do *S. aureus* é devido à múltiplos fatores como a produção de toxinas, capacidade de formação de cápsulas, presença de enzimas e proteínas associadas à

superfície celular, contribuindo para o início e a manutenção do processo infeccioso (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021; TRUONG-BOLDUC; ZHANG; HOOPER, 2003).

Entre os vários mecanismos de resistência bacteriana, as proteínas que atuam com bombas de efluxo transmembrana são frequentemente associadas à resistência à vários antibióticos e outros agentes quimioterápicos (JORDHEIM et al., 2012; MARTINEZ, 2014; MUNITA; ARIAS, 2016). Inclusive, a expressão das bombas de efluxo NorA e MepA por essas cepas tem gerado preocupação na comunidade científica e aumentado a busca pela descoberta e síntese de compostos que possam, de alguma forma, reverter essa resistência e reestabelecer a eficácia desses agentes antibacterianos (COSTA et al., 2011; KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005; SCHINDLER et al., 2013).

1.1.2.2 Bombas de efluxo

Os mecanismos de efluxo desempenham um papel negativo importante no tratamento de infecções por *S. aureus*, visto que atuam sobre diversos fármacos, promovendo a redução da concentração do antibacteriano na célula bacteriana. Essas proteínas são fisiológicas nesses microorganismos e possuem capacidade de promover tanto o influxo com o efluxo de componentes (PIDDOCK, 2006a), dentre elas, o efluxo de metais pesados e antibióticos. Essas bombas funcionam dependente de dois sistemas de transporte: o sistema de co-transporte e o sistema ATPase (BHARDWAJ; MOHANTY, 2012). No primeiro, a remoção de antibióticos do ambiente intracelular se dá pela troca de íons como sódio ou hidrogênio presentes meio extracelular. No segundo, o sistema depende da energia liberada decorrente hidrólise de ATP, utilizado para promover a expulsão do antibiótico da célula bacteriana (POOLE, 2007). Existem cinco famílias de bombas de efluxo, como mostrado na Figura 1 (PIDDOCK, 2006b):

- a) Superfamília grande facilitadora (MFS)
- b) Superfamília ligada à ATP cassette (ABC)
- c) Pequena família de resistência a múltiplos medicamentos (SMR)
- d) Superfamília de divisão celular de nodulação de resistência (RND)
- e) Superfamília de extrusão de multidrogas e de compostos tóxicos (MATE)

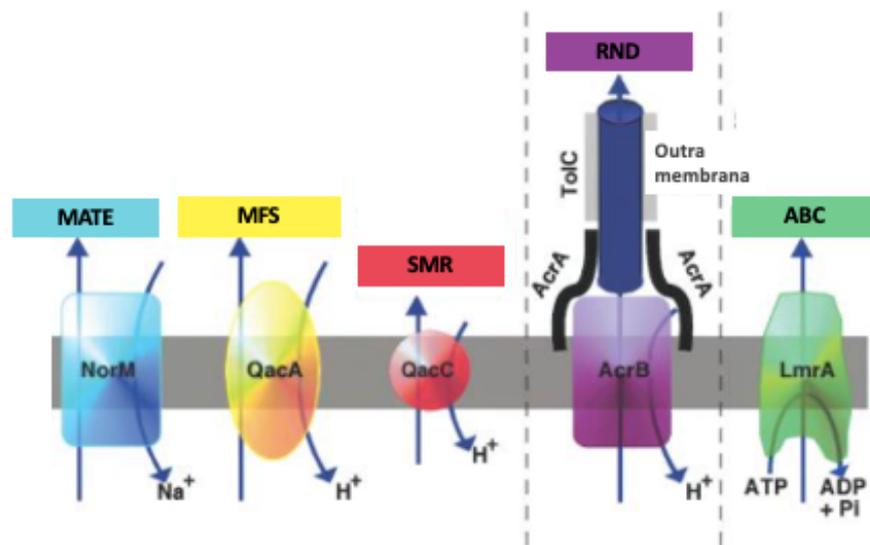


Figura 1. Famílias de bomba de efluxo.

Adaptada de (PIDDOCK, 2006b); Cortesia de Melissa Brown.

Alguns dos genes que codificam a expressão de bombas de efluxo requerem indução ou mutações nos seus reguladores, no entanto, podem também ser expressos de forma constitutiva (BUTAYE; CLOECKAERT; SCHWARZ, 2003; COSTA et al., 2013). Podem ser encontrados integrados ao genótipo bacteriano, em elementos de transposição ou nos plasmídeos. Neste último, esses genes permitem a transferência de resistência entre a mesma espécie bacteriana ou espécies diferentes (BUTAYE; CLOECKAERT; SCHWARZ, 2003). Estratégias na tentativa de reverter esse tipo de resistência tem sido alvo de pesquisas atualmente (BUSH, 2018).

1.1.2.2.1 Bombas de efluxo MepA e NorA

A MepA é uma proteína codificada pelo gene que recebe o mesmo nome *mepA* e pode estar presente em bactéria como *Staphylococcus aureus*. Pertence à família MATE, que são bombas de extrusão para diversos fármacos e toxinas. Sua fonte de energia para o transporte do substrato é o gradiente de prótons, através da antiporta de íons sódio (GUILHELMELLI et al., 2013; KAATZ; DEMARCO; SEO, 2006; KURODA; TSUCHIYA, 2009). Fármacos que são substratos para essa bomba serão expulsos da célula bacteriana, o que compromete sua eficácia antibiótica.

A bomba de efluxo NorA pertence a superfamília grande facilitadora (MFS) frequentemente encontrado em bactérias como *S. aureus* (LEKSHMI et al., 2018). É uma proteína transportadora responsável por expulsar agentes antimicrobianos como as

fluoroquinolonas de caráter hidrofóbico, vários biocidas como compostos quaternários de amônio e corantes como o brometo de etídio, rodamina e acriflavina (NEYFAKH; BORSCH; KAATZ, 1993). A proteína NorA é codificada pelo gene 1164 bp *norA* e possui uma variabilidade genética com três alelos principais descritos (*norAI*, *norAII* e *norAIII*), que diferem em sua sequência de nucleotídeos e polipeptídeos, sendo assim responsáveis pela resistência a diversos antibióticos (KAATZ; SEO; RUBLE, 1993; NOGUCHI et al., 2004).

As bombas de efluxo constituem um importante mecanismo de resistência bacteriana. Esse fenômeno é um problema de saúde global que compromete seriamente o tratamento de diversas infecções, sendo necessária a contínua busca e descoberta de novas substâncias que possam reverter esse mecanismo de resistência bacteriana (DA COSTA et al., 2021; REZENDE-JÚNIOR et al., 2020; ROCHA et al., 2021).

1.1.2.2.2 Inibidores de bomba de efluxo

Os inibidores de efluxo em bactérias atuam bloqueando ou reduzindo a atividade das bombas que expulsam os antibióticos da célula bacteriana. Ao inibir essas bombas, tais compostos aumentam a concentração dos antibióticos dentro da bactéria, tornando-as mais suscetíveis aos tratamentos antibacterianos convencionais. Alguns inibidores também podem reverter a resistência adquirida associada com a superexpressão de bombas de efluxo e suprimir o aparecimento de mutações que conduzem à resistência (VILA; MARTINEZ, 2008).

Existem diversos grupos de agentes e mecanismos que podem inibir as bombas de efluxo, são eles: desacopladores de energia; inibidores da ligação direta das bombas de efluxos, modificações química do substrato; quelantes de ferro; anticorpos, dentre outros. Sobre os desacopladores de energia, a clorpromazina e o *Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl-hydrazone* (CCCP) merecem destaque por serem comumente utilizados como controle positivo em ensaios de inibição de bomba de efluxo. Como essas bombas utilizam prótons como fonte de energia disparadora, compostos que comprometam o fornecimento energético da bomba, podem atuar como inibidor de bomba de efluxo (MALLÉA et al., 2002).

A clorpromazina apresenta uma reconhecida atividade inibitória de bomba por ser potencializadora do efeito de diversos antibióticos contra *S. aureus* (BARRETO et al., 2014; COUTO et al., 2008; KAATZ et al., 2003). Algumas possibilidades para essa atividade da clorpromazina foram mencionadas: prejuízo o fluxo de K^+ através da membrana do *S. aureus*; alterações estruturais da parede celular e divisão celular bacteriana e uma possível interferência

no fornecimento energético dependente de H^+ para a bomba de efluxo bacteriana (KRISTIANSEN; MORTENSEN; NISSEN, 1982; LIMA; RAMOS-ALVES; SOARES, 2019). O CCCP não atua de forma direta na bomba de efluxo, promove inibição por modificação do potencial eletroquímico transmembrana (PAGÈS; MASI; BARBE, 2005). Inibidores de bombas de efluxo podem ser utilizados como adjuvante no tratamento com antibióticos tradicionais (PAPKOU et al., 2020), desde que sejam eficazes e seguros clinicamente.

1.2 PRODUTOS DE ORIGEM NATURAL

Compostos provenientes da natureza são conhecidos por apresentarem atividade biológica. Algumas plantas já são reconhecidas como produtoras de compostos bioativos de natureza tóxica contra bactérias, podendo interferir no metabolismo e crescimento dos microrganismos ou prevenir contaminações microbianas. A utilização de dois ou mais compostos pode apresentar resposta antimicrobiana superior ao uso de apenas um único composto, principalmente no combate de infecções provocadas por bactérias resistentes (CHEVEREAU; BOLLENBACH, 2015). O sinergismo pode ser obtido através da combinação de antibióticos com extrato ou outras substâncias à uma concentração subinibitória aplicada diretamente ao meio de cultura (COUTINHO et al., 2008a, 2010; FARIAS et al., 2015). Esta estratégia é chamada de *shotgun herbs* e refere-se à utilização de plantas e drogas em uma abordagem usando mono ou multi-extrato de combinações, o que pode afetar não apenas um alvo único, mas vários alvos, onde os diferentes componentes terapêuticos colaboram de uma forma sinérgica-agonísticas. Esta abordagem não é apenas para combinações de extratos, as combinações entre os produtos naturais ou extratos e produtos sintéticos ou fármacos antibióticos também são possíveis e podem apresentar boas alternativas (BRITO et al., 2015; COUTINHO et al., 2010; CRISTO et al., 2016; WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009).

Dessa forma, substâncias de origem vegetal e seus metabólitos, tornaram-se uma alternativa viável e eficiente para o aumento da atividade antimicrobiana de fármacos (COUTINHO et al., 2008b; FIGUEREDO et al., 2013), dificultando os mecanismos de resistência antimicrobiana pela complexidade das suas estruturas e evitando, conseqüentemente, adaptações microbianas futuras (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003).

1.2.1 Cumarinas

Para minimizar a resistência, a busca por produtos naturais ou sintéticos que possuam atividades antibacterianas e/ou que inative os mecanismos de resistência das bactérias como as bombas de efluxo tem aumentado recentemente. Neste contexto, os compostos cumarínicos, metabólitos secundários de diversas espécies vegetais podem ser classificados como heterosídeo e são estruturalmente lactonas do ácido *o*-hidroxi-cinâmico. As cumarinas presentes em fontes naturais são produzidas através do metabolismo da glicose por meio do ácido chiquímico, responsável pela síntese de três aminoácidos aromáticos: fenilalanina, triptofano e tirosina. Os quais desempenham um papel intermediário importante na biossíntese de diversos produtos naturais aromáticos (CZELUSNIAK et al., 2012).

A Química Medicinal e a Biotecnologia possuem importante papel na investigação de séries homologas com potenciais biológicos que possam ser utilizados na produção de medicamentos com maior potencial antimicrobiano (SANGI, 2016). A síntese de compostos orgânicos é uma área fundamental na química, que tem como objetivo a construção de moléculas complexas a partir de precursores mais simples. Essa técnica é amplamente utilizada na produção de fármacos, na qual a síntese de compostos orgânicos permite a obtenção de moléculas com a atividade biológica desejada, de forma mais seletiva e menos tóxica (NICOLAOU, 2014).

A cumarina é sintetizada (Figura 2) naturalmente a partir do aminoácido fenilalanina. Esse aminoácido sofre desaminação enzimática pela ação da enzima fenilalanina amonialiase e dá origem o ácido cinâmico. Este ácido sofre hidroxilação da sua cadeia lateral catalisada pela enzima trans-cinamato-4-hidroxilase formando o composto ácido *o*-cumárico que sofre *o*-glicosilação e em seguida uma isomerização da dupla ligação da cadeia lateral. A cumarina, resultado final desse processo, é formada pela lactonização do ácido *o*-cumárico através de ação enzimática na presença de calor (DEWICK, 2002).

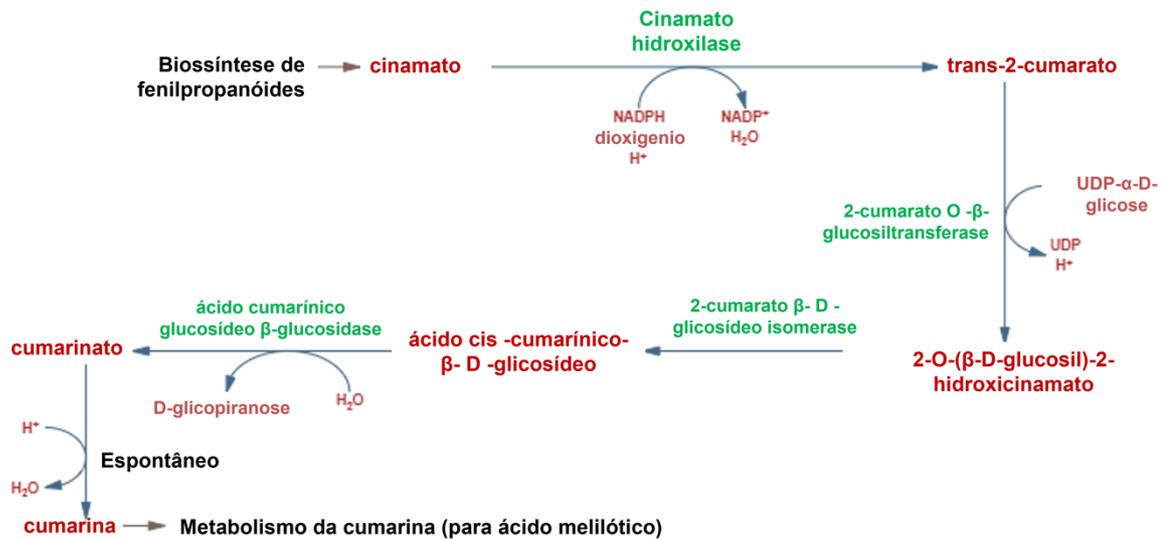


Figura 2. Biossíntese da cumarina

Adaptado de *Pathway Tools* versão 27.0 (*software da SRI International*) em 8 de junho de 2023, BIOCYC18B (CASPI et al., 2020).

Os compostos cumarínicos possuem inúmeros alvos, sendo assim, demonstram diversos efeitos farmacológicos. O uso de cumarinas como anticoagulante já é bem estabelecido na clínica. A interferência na hemostasia secundária devido sua capacidade de inibir a vitamina K epoxidase, reduzindo a ativação hepática dos fatores de coagulação e promovendo efeito anticoagulante, parece não ser a única atividade desses compostos na hemostase, pois evidência recente demonstrou também a capacidade das cumarinas em bloquear o receptor de ADP localizado na superfície da plaqueta, o que exibe um efeito na hemostasia primária como redução da agregação plaquetária (LU et al., 2022).

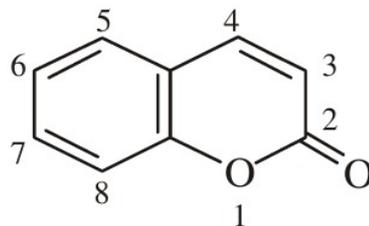


Figura 3. Cumarina (1,2-benzopirona)

A síntese de compostos cumarínicos e seu melhoramento químico utilizado na produção de homólogos ou formação de híbridos tem sido uma estratégia interessante na busca de

moléculas mais ativas e menos tóxicas (FOTOPOULOS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2020). As substituições químicas promovidas no núcleo 1,2-benzopirona (Figura 3) têm demonstrado propriedades interessantes nas pesquisas farmacológicas, como descrito na Tabela 1. Derivados de 3-arilcumarina parecem reduzir a glicemia. As cumarinas que contêm hidroxila na posição C-7 parecem apresentar atividade inibitória da α -glicosidase, o que reduziria a absorção de carboidratos da dieta (PAN et al., 2022). A atuação de derivados cumarínicos no sistema nervoso central foi evidenciada demonstrando a capacidade destes em inibir a acetilcolinesterase e butirilcolinesterase *in vitro*, o que pode representar, no futuro, uma perspectiva no manejo da Doença de Alzheimer (ABU-AISHEH et al., 2019). Apresenta também efeito anti-inflamatório e neuroprotetor por inibição da glicogênio sintase cinase-3 (GSK-3), enzima importante presente no processo de neuroinflamação de doenças degenerativas (FRANCISCO et al., 2020). Pesquisa de substâncias que possam aprimorar a farmacoterapia do câncer demonstram que as substituições químicas promovidas ao redor do núcleo da cumarina, podem auxiliar no desenvolvimento de análogos anticâncer ou reduzir os potenciais efeitos colaterais das terapias já existentes (KHURSHEED; JAIN, 2021; KÜPELI AKKOL et al., 2020). Derivados à base de cumarina têm o potencial de inibir diferentes estágios no ciclo de replicação do HIV, desde o impedimento da entrada do vírus na célula hospedeira até a inibição de enzimas importantes para manutenção viral (XU et al., 2021). Estas substâncias apresentam, também propriedades antifúngicas e redutora de biofilme bacteriano (JIA et al., 2019; QAIS et al., 2021).

A atividade antibacteriana de derivados cumarínicos tem sido relatada na última década. Evidências demonstram que derivados cumarínicos presente em plantas (CHARMFOROSHAN et al., 2022) ou formados a partir da molécula 4-hidroxycumarina (REHMAN et al., 2013) apresentaram atividade contra bactérias patogênicas importantes como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus atropheus* e *Bacillus subtilis*. Alguns derivados apresentaram atividade moderada contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Lin e colaboradores (2012) evidenciaram atividade contra bactérias Gram positivas como o *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, superior até do que contra bactérias Gram negativas (LIN et al., 2012).

Tabela 1. Ações biológicas das cumarinas

Ação biológica	Referência
Redução da glicemia	Pan et al, 2022
Inibição da colinesterase	Abu-Aisheh et al., 2019
Inibição da GSK-3	Francisco et al., 2020
Anticoagulante e antiplaquetária	Lu et al., 2022
Anticâncer	Khursheed; Jain, 2021 Küpeli Akkol et al., 2020
Antiviral	Xu et al., 2020
Antifúngica	Jil et al., 2019
Antibacteriana	Charmforoshan et al., 2022 Rehman et al., 2012 Lin et al., 2012

Com a velocidade reduzida no surgimento de novos antibióticos, associar moduladores de resistência a esses fármacos, já utilizados na prática clínica, é uma estratégia promissora para controlar a resistência bacteriana. A busca por compostos que possuem a capacidade de potencializar a atividade dos agentes antimicrobianos, reduzindo a concentração de antibióticos necessários para tratar infecções ou reverter a resistência celular à terapia convencional, tem sido alvo de diversas pesquisas científicas (MEDEIROS BARRETO et al., 2014; SOUSA SILVEIRA et al., 2020; TINTINO et al., 2020b).

1.3 ESTUDOS COMPUTACIONAIS

Os principais desafios enfrentados na pesquisa de novos fármacos incluem: o alto custo, a complexidade do processo de descoberta, a inviabilidade de muitas moléculas desenvolvidas, a toxicidade e a dificuldade em atingir o alvo farmacológico *in vivo* por limitações farmacocinéticas. Tais obstáculos, muitas vezes inviabilizam o processo de desenvolvimento de alguns fármacos. A tecnologia pode ajudar a superar esses desafios por meio dos estudos computacionais *in silico*, reduzindo o tempo e custo envolvidos no caminho da descoberta de novos fármacos e permitindo um melhor direcionamento nas investigações sobre novas moléculas com maior eficácia. Além disso, a tecnologia também pode auxiliar na identificação de alvos terapêuticos específicos e no desenvolvimento de técnicas mais avançadas para testes

pré-clínicos e clínicos (KHAN; PATEL; PATEL, 2018; PALMER et al., 2021; PESTANA-NOBLES et al., 2022; TIWARI et al., 2020).

Os estudos computacionais podem ser combinados com os testes pré-clínicos e clínicos para garantir a segurança e eficácia de novas moléculas de diversas maneiras. Primeiro, os modelos computacionais podem fornecer informações valiosas sobre as propriedades físico-químicas e farmacológicas de uma molécula, bem como prever possíveis eventos adversos (LABUTE et al., 2014), além da toxicidade (GUO et al., 2019), atividade sobre enzimas do citocromo P450 (ORTIZ-ANDRADE et al., 2020), dentre outras. Isso contribui na identificação de moléculas promissoras a serem escolhidas para os ensaios pré-clínicos e clínicos.

Nos ensaios pré-clínicos, os modelos computacionais podem ser usados para prever a farmacocinética da molécula em um organismo vivo, o que ajuda a determinar as doses adequadas e o regime terapêutico (BAGGOT, 1990). Além disso, esses modelos podem ser usados para identificar possíveis interações com outros medicamentos ou alimentos (EKINS; CLARK; WRIGHT, 2015). Durante os testes clínicos, os modelos computacionais podem ser usados para prever a eficácia do fármaco em diferentes populações de pacientes e ajudar na seleção dos pacientes mais adequados para o estudo (YU et al., 2019).

A busca por alvos moleculares pode ser realizada através da pesquisa em bancos de dados públicos ou privados que contêm informações sobre proteínas e outras moléculas biológicas. Esses bancos podem ser explorados através da inserção da estrutura química ou sequências de aminoácidos para identificar proteínas que possam estar envolvidas em uma determinada doença ou processo biológico (BENTO et al., 2014).

Outra abordagem é a utilização de técnicas que envolvem o uso de modelos computacionais para prever quais moléculas podem se ligar a um determinado alvo molecular, como o *Docking*, que avalia a energia de ligação entre a molécula e o seu alvo na cristalografia e a Dinâmica Molecular, que possui uma aproximação mais realística, já que analisa o movimento físico de átomos moléculas durante um determinado tempo, permitindo uma visão de evolução dinâmica do sistema (VENABLE; KRÄMER; PASTOR, 2019).

1.3.1 Predição farmacocinética

Os ensaios ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) são uma parte importante do processo de desenvolvimento de novas substâncias. Esses estudos visam avaliar como uma determinada substância seria absorvida, ou seja, chegaria na corrente sanguínea,

distribuída para os tecidos, inclusive os mais difíceis de serem penetrados, como o cérebro (barreira hematoencefálica), convertida quimicamente no metabolismo e, conseqüentemente, eliminada definitivamente do organismo (GOMBAR; SILVER; ZHAO, 2003).

Os estudos ADME podem ser realizados em modelos computacionais para avaliar a segurança e eficácia dos fármacos antes dos testes clínicos em humanos. Eles ajudam a identificar possíveis problemas com o fármaco, como a baixa biodisponibilidade que afeta diretamente a sua eficácia terapêutica. No entanto, os estudos ADME também possuem algumas limitações como: não são totalmente preditivos para a farmacocinética humana, não consideram interações medicamentosas ou variações genéticas individuais que podem afetar a resposta biológica (DOOGUE; POLASEK, 2013). Portanto, os resultados dos estudos ADME devem ser interpretados em conjunto com outros dados de experimentos pré-clínicos ou clínicos.

1.3.2 Regra dos Cinco de Lipinsk

A regra dos cinco foi estabelecida por Lipinski e se tornou uma ferramenta bastante utilizada para avaliar a viabilidade de uma molécula como um candidato a fármaco a ser administrado por via oral. A regra estabelece que, para ser absorvida pelo trato gastrointestinal e ter uma boa chance de se tornar um fármaco possivelmente administrado por essa via de forma eficaz, uma molécula deve atender a pelo menos três dos seguintes critérios (LIPINSKI, 2004):

1. Peso molecular inferior a 500 Da;
2. LogP (coeficiente de partição) inferior a 5;
3. Não mais do que 5 grupos doadores de hidrogênio ligados ao átomo de nitrogênio ou oxigênio;
4. Não mais do que 10 grupos aceptores de hidrogênio.

Esses critérios foram desenvolvidos com base em estudos sobre as propriedades físico-químicas das moléculas que são absorvidas pelo trato gastrointestinal e se tornaram fármacos com administração oral. A regra dos cinco é amplamente utilizada na indústria farmacêutica como uma ferramenta inicial para avaliar a viabilidade de uma molécula como um candidato a fármaco oral antes de prosseguir com testes pré-clínicos e clínicos mais avançados. Outros parâmetros como a área de superfície polar (PSA) ou área de superfície polar topológica (TPSA) foram estabelecidos como importantes e somados a essa regra, permitindo melhor predição sobre a biodisponibilidade por via oral (VEBER et al., 2002).

1.3.3 Relação estrutura-atividade

A relação estrutura-atividade (*quantitative structure-activity relationship*, QSAR) é um método utilizado na descoberta e desenvolvimento de fármacos que busca estabelecer uma correlação entre a estrutura química de um composto e sua atividade biológica. O objetivo é identificar as características estruturais que são importantes para a atividade biológica da substância testada (GÓMEZ-JIMÉNEZ et al., 2018).

Os estudos QSAR envolvem a síntese de uma série de compostos análogos com variações estruturais específicas, seguida da avaliação da atividade biológica desses compostos. A partir desses dados, é possível identificar as características estruturais que são importantes para a atividade biológica, como grupos funcionais específicos, posições dos substituintes ou conformações moleculares. Podem ser usados para prever a atividade biológica de compostos relacionados com base em sua estrutura química, e assim, otimizar a atividade biológica dos compostos existentes ou projetar novos compostos com atividades desejadas (GUHA, 2013).

Os métodos utilizados nos estudos QSAR incluem cálculos e técnicas computacionais, como modelagem molecular (*docking*) (SANTOS et al., 2014) e simulação por dinâmica molecular (DE VIVO et al., 2016). Esses métodos permitem uma análise mais abrangente das relações entre a estrutura química e a atividade biológica dos compostos, no entanto, o uso de forma isolada ou indevida, pode produzir resultados limitados, sendo sempre importante a correlação com ensaios *in vitro* ou *in vivo* (GUHA, 2013). Dessa forma, estabelecer uma relação estrutura-atividade é importante no desenvolvimento novos compostos, permitindo o projeto racional com atividades desejadas e/ou otimização da atividade biológica dos compostos já existentes.

2 JUSTIFICATIVA

A resistência antimicrobiana é uma das maiores ameaças à saúde global, comprometendo a eficácia dos tratamentos antibióticos convencionais e aumentando a morbidade e mortalidade associadas a essas infecções. O desenvolvimento de novos agentes terapêuticos capazes de combater bactérias multirresistentes é de extrema importância para garantir a eficácia dos tratamentos e a saúde pública.

Nesse contexto, os compostos cumarínicos têm demonstrado potencial como agentes antimicrobianos, exibindo atividade contra diferentes cepas bacterianas. No entanto, além da

atividade antibacteriana intrínseca, a possibilidade desses compostos reestabelecerem o efeito de antibacterianos convencionais se faz uma estratégia importante e necessária na tentativa de frear o fenômeno da resistência bacteriana que vem aumentando em uma escala assustadora nos últimos anos.

A bomba de efluxo é um mecanismo importante de resistência bacteriana, pois permite que as bactérias eliminem agentes antimicrobianos do seu interior, reduzindo sua concentração intracelular e evitando sua eficácia. A compreensão dos mecanismos de resistência ao efluxo e a capacidade dos compostos cumarínicos em inibir a proteína NorA e MepA fornecerão informações fundamentais na identificação e um novo agente e, quem sabe, no desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes a base de compostos cumarínicos contra infecção por *S. aureus* resistentes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade inibidora da função da bomba de efluxo MepA e NorA de derivados cumarínicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a atividade biológica das cumarinas por similaridade *in silico*;
- Determinar, *in silico*, os parâmetros físico-químicos importantes para as propriedades farmacocinéticas (ADME) das cumarinas;
- Avaliar atividade antibacteriana *in vitro* das cumarinas frente a bactérias padrão, multirresistente ou portadoras da bomba de efluxo MepA ou NorA;
- Avaliar o efeito potencializador *in vitro* dos derivados cumarínicos frente a fluoroquinolonas ou aminoglicosídeos utilizados na clínica;
- Avaliar o efeito de derivados cumarínicos na redução da resistência bacteriana por bomba de efluxo MepA ou NorA à antibacteriano das classes das fluoroquinolonas;
- Analisar a afinidade de derivados cumarínicos com a bomba de efluxo NorA e suas interações específicas
- Calcular a energia de interação dos derivados cumarínicos com a bomba de efluxo NorA através de *docking* molecular - *in silico*;

- Analisar a afinidade dos derivados cumarínicos com a membrana composta por lípidios do tipo 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol (POPG) - *in silico*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS CUMARINAS

A série homóloga dos derivados cumarínicos foi sintetizada e cedida pelo professor Dr. Diogo Teixeira Carvalho, coordenador do Laboratório de Pesquisa em Química farmacêutica (LQFar) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) em Minas Gerais. A síntese dos compostos descritos na Tabela 2 foi realizada de acordo com o procedimento descrito na Figura 4, anteriormente publicado (MARTIN et al., 2023).

Brevemente, a cumarina protótipo (C14) foi preparada por reação de Pechmann entre acetoacetato de etila e resorcinol, sob catálise ácida (TIMONEN et al., 2011). A cumarina C9 foi preparada por reação de Mannich entre C14, morfolina e formaldeído em etanol sob aquecimento (DOMÍNGUEZ et al., 2016). Já a cumarina C10 foi obtida por reação de substituição nucleofílica de C14 com brometo de alila em meio básico e na presença de solvente polar aprótico (RASHEED; QUAYLE, 2018). A cumarina glicosilada C11 foi preparada por adaptação do procedimento proposto por (PARK; SHIN, 2007), em duas etapas, a partir do tratamento de C14 com o agente glicosilante brometo de glicopiranosila, seguido de transesterificação com metóxido de sódio. A cumarina C13 foi preparada em duas etapas, mediante O-acetilação de C14 com anidrido acético, seguido de rearranjo de Fries com cloreto de alumínio (KUMAR et al., 2009).

Todos essas cumarinas já foram descritas na literatura. As análises espectrométricas e cromatográficas usadas em sua caracterização forneceram resultados que atestam sua identidade e pureza.

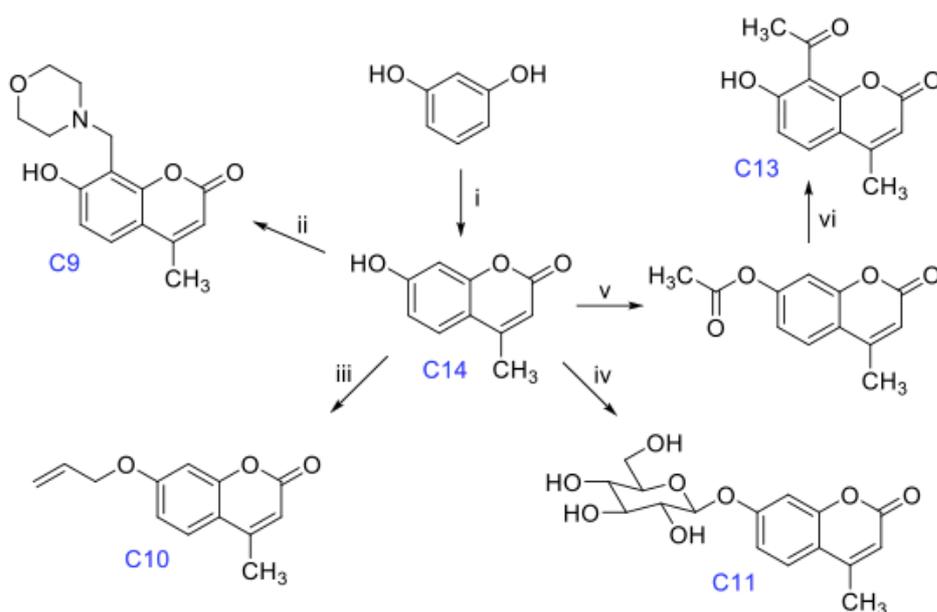


Figura 4. Rota de síntese para a obtenção das cumarinas avaliadas.

Condições experimentais: i) acetoacetato de etila, ácido perclórico, 25 °C, 80%; ii) morfolina, formaldeído, etanol, 70 °C, 40%; iii) brometo de alila, carbonato de sódio, acetona, 70 °C, 60%; iv) a: brometo de alfa-D-glicopiranosila, hidróxido de sódio, água, acetona, 25 °C; b: metóxido de sódio, metanol, 0 °C; 15% (2 etapas); v) anidrido acético, *N,N*-dimetilaminopiridina (cat.), diclorometano, 25 °C, 82%; vi) cloreto de alumínio anidro, 150 °C, 40%.

Tabela 2. Estrutura química das cumarinas avaliadas.

Cumarina	Estrutura química	Nomenclatura IUPAC
C9		7-hidroxi-4-metil-8-(morfolin-4-ilmetil)-2H-cromen-2-ona
C10		7-(Aliloxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona
C11		7-(alfa-D-Galactopiranosiloxi)-4-metil-2H-1-benzopirano-2-ona
C13		8-Acetil-7-hidroxi-4-metilcumarina
C14		7-Hidroxi-4-metil-2H-cromen-2-ona

4.2. ENSAIOS PRELIMINARES *IN SILICO*

4.2.1 Análise de atividade biológica por similaridade e propriedades farmacocinéticas (ADME)

As estruturas moleculares das substâncias foram analisadas com o apoio do banco de dados ChEMBL, uma concessão estratégica do *Wellcome Trust* e do *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL), para o campo de quimiogenômica. O acesso é gratuito através do Instituto Europeu de Bioinformática (EBI, <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>), que faz parte do EMBL e responsável pelo financiamento. EMBL-EBI torna os dados disponíveis livremente a partir de experimentos de ciências da vida que cobrem todo o espectro da biologia molecular. O ChEMBL é um banco de dados aberto alimentado manualmente de periódicos envolvendo pequenas moléculas (BENTO et al., 2014; GAULTON et al., 2012). Além do ChEMBL, foi utilizado o dicionário de pequenas moléculas ChEBI (*Chemical Entities of Biological Interest*) para uma busca unificada em diversas bases de dados utilizando o *software* UniChem 2.0, versão beta (CHAMBERS et al., 2013). Este identificador de compostos unifica recursos do EMBL-EBI e mantém referências cruzadas entre os recursos químicos do EBI e outros bancos de dados como o *Gene Expression Atlas* e o PDBe (*Protein Data Bank* na Europa).

Neste percurso realiza-se a predição de parâmetros ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) das moléculas. Para este procedimento, foi utilizado o *software* on-line SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>), desenvolvido e mantido pelo Grupo de Modelagem Molecular do SIB (Instituto Suíço de Bioinformática) (DAINA; MICHELIN; ZOETE, 2017). O SwissADME é uma ferramenta web que dá acesso a um conjunto de modelos preditivos rápidos e robustos, para propriedades físico-químicas (peso molecular, número de regiõesceptoras e doadoras de hidrogênio e o número de ligações rotacionáveis) e farmacocinética (lipofilicidade e solubilidade em água), bem como o *druglikeness*. Aqui vale destacar que o *druglikeness* diz respeito a um conceito frequentemente utilizado no desenho de fármacos. Ele indica o quão viável uma dada molécula é para se tornar um fármaco, considerando-se o contexto da biodisponibilidade (JARRAHPOUR et al., 2012). A busca de referências sobre as moléculas relatadas neste estudo foi realizada consultando suas estruturas químicas no CAS SciFinder[®] (GABRIELSON, 2018).

4.3 ENSAIOS *IN VITRO*

4.3.1 Linhagens utilizadas

A escolha dos microrganismos para a avaliação da atividade antimicrobiana (Figura 5) foi efetuada levando em consideração a presença de pelo menos um representante dos seguintes grupos de importância clínica: bactérias Gram-positivas e Gram-negativas:

a) Ensaio de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM): Linhagens bacterianas (padrão): *S.aureus* ATCC 25923 e *E.coli* ATCC 25922; *E. coli* 06 e *S. aureus* 10, *S. aureus* 1199B e *S. aureus* K2068

b) Ensaio da modulação da ação de antibióticos: Linhagens bacterianas (multirresistentes de isolados clínicos): *E. coli* 06 e *S. aureus* 10

c) Ensaio de inibição da bomba de efluxo: Linhagem bacteriana portadora da Bomba de efluxo MepA: *S. aureus* K2068 ou NorA: *S. aureus* 1199B

Todas as linhagens foram fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM - URCA).

4.3.2 Fármacos e reagentes

Para os testes de suscetibilidade bacteriana pelas cumarinas isoladas (C9, C10, C11, C13 ou C14) ou em associação com os antibacterianos, foram utilizados fármacos das classes dos aminoglicosídeos (gentamicina) ou fluoroquinolonas (norfloxacino ou ciprofloxacino). As soluções teste foram preparadas usando 10 mg dos compostos solubilizados em 9.265 µL de água destilada e 500 µL de DMSO, atingindo uma concentração de 1024 µg/mL.

O reagente resazurina sódica foi utilizado como indicador de crescimento bacteriano. Os antibacterianos e a resazurina sódica foram obtidos na Sigma–Aldrich (St Louis, MO), armazenados a 4°C protegidos da luz.

4.3.3 Meios de cultura

Nos ensaios biológicos foram utilizados os seguintes meios de cultura: *Infusion Agar* - HIA (Difco Laboratories Ltda.), Caldo *Brain Heart Infusion* – BHI (concentração indicada pelo fabricante e 10%) (*Acumedia Manufacturers Inc.*). Todos os meios de cultura foram preparados segundo as especificações do fabricante. Culturas de bactérias serão mantidas a 4°C em HIA. Antes dos testes, as linhagens foram repassadas para o meio citado e incubadas a 37°C, por 24

horas. As linhagens repicadas testadas foram inoculadas em Caldo BHI e incubadas na mesma situação antes do teste. Suspensões com crescimento bacteriano foram diluídas até a obtenção de 10^5 céls/mL (CLSI, 2021)

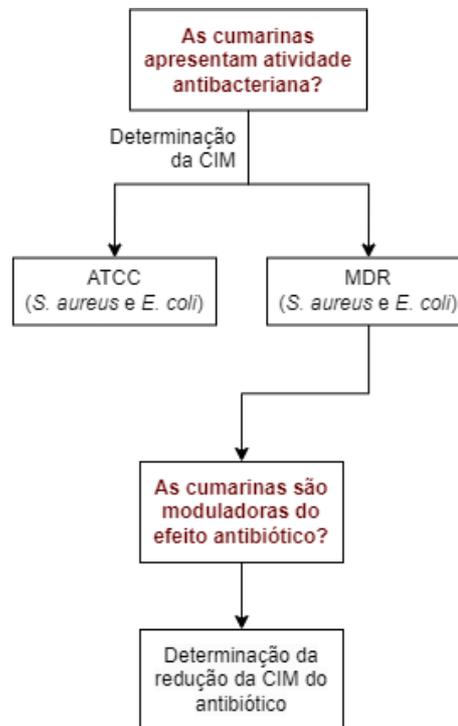


Figura 5. Fluxo metodológico da primeira fase da pesquisa.

4.3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para distribuição na placa de microdiluição foram preparados tubos eppendorf® contendo, cada um deles, 1 mL de solução contendo 900 μ L de BHI 10% e 100 μ L da suspensão bacteriana (*S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* 10, *E. coli* 06, *S. aureus* K2068 ou *S. aureus* 1199B). A placa de 96 poços foi preenchida no sentido numérico adicionando-se 100 μ L desta solução em cada e em seguida procedeu-se a microdiluição seriada com 100 μ L de cada substância (C10, C11, C13 ou C14), resultando em uma faixa de concentração de 512 a 8 μ g/mL. As placas foram levadas à incubadora por 24 horas a 37° C. A determinação da CIM bacteriana foi realizada utilizando-se a leitura após a adição de 20 μ L de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido). Na leitura dos testes, a mudança de coloração azul para rosa, devido à redução do revelador, indica o crescimento bacteriano e a permanência azul indica a ausência de crescimento (CLSI, 2021). A CIM foi definida como a menor concentração na qual nenhum crescimento foi observado. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.5 Ensaio de modulação da ação de antibióticos

Para verificar se as substâncias modificaram a ação dos antibióticos frente às cepas multirresistentes testadas (*S. aureus* 10, *E. coli* 06), foi utilizada o método proposto por Coutinho e colaboradores, no qual a solução de cada substância foi testada em concentração sub-inibitória, CIM/8 (COUTINHO et al., 2008a). A placa foi preenchida adicionando-se 100 μ L das soluções cumarínicas (C10, C11, C13 ou C14) em cada poço. Em seguida, 100 μ L de antibiótico foi misturado ao primeiro poço, procedendo a microdiluição seriada e a CIM dos antibióticos (norfloxacino ou gentamicina) foram determinadas na presença ou ausência do compostos cumarínicos conforme descrito anteriormente. Poços contendo antibiótico, meio ou inóculo na ausência dos compostos foram usados como controle. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

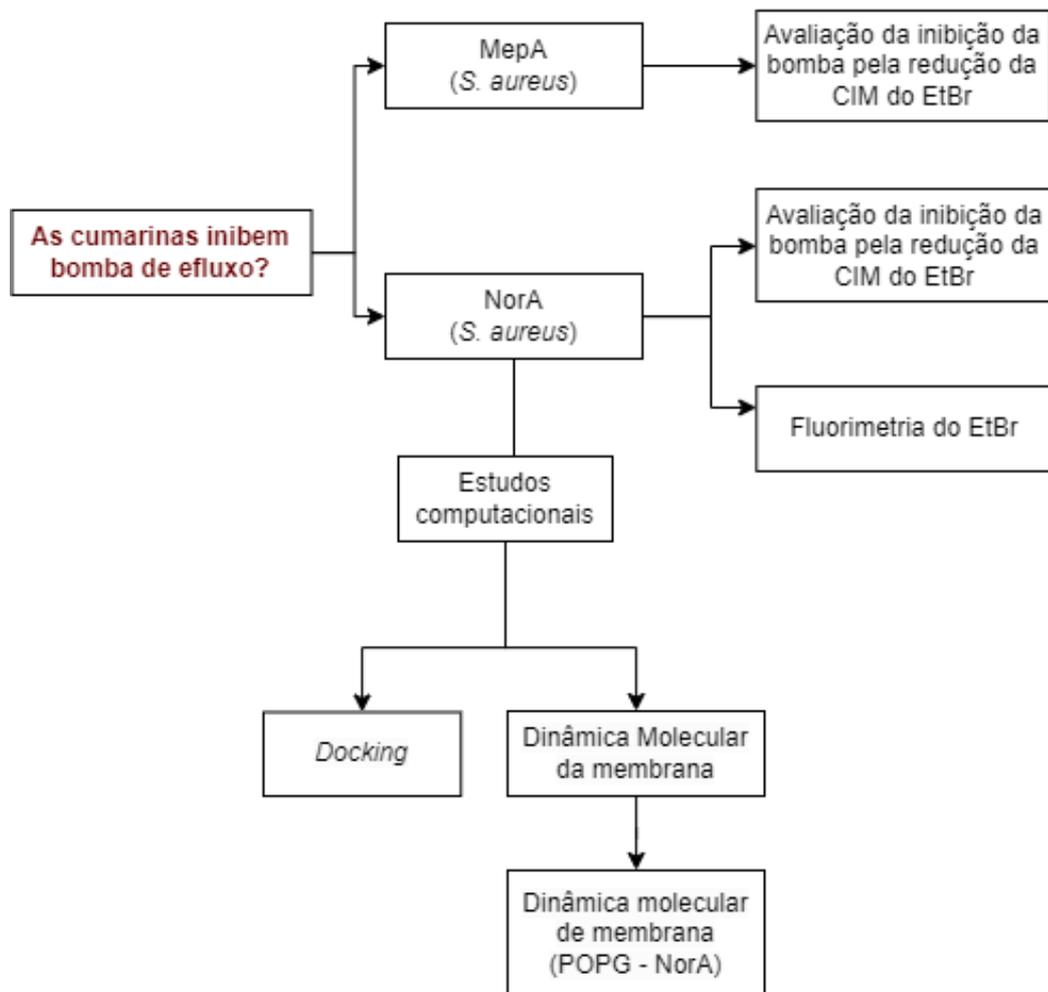


Figura 6. Fluxo metodológico da segunda fase da pesquisa.

4.3.6 Avaliação da inibição de bomba de efluxo NorA ou MepA por redução do CIM do brometo de etídio

Após a determinação da CIM das cumarinas C9, C10, C11, C13 ou C14 nas cepas de *S. aureus* K2068 ou *S. aureus* 1199B, a redução do CIM do brometo de etídio (EtBr) ou antibiótico foi determinada e esse parâmetro é indicativo de inibição de bomba (Figura 6). A inibição da bomba de efluxo foi testada usando concentrações subinibitórias (CIM/8) das substâncias C9, C10, C11, C13 ou C14, com o objetivo de avaliar a capacidade de cada substância em diminuir a CIM do brometo de etídio e do antibiótico norfloxacino, substrato conhecido para as bombas de efluxo NorA ou ciprofloxacino no teste com a cepa de *S. aureus* K2068, portadora da bomba MepA. 150 µL de inóculo bacteriano suspenso em solução salina, correspondente a 0,5 da escala de McFarland foram adicionados aos eppendorfs juntamente com 1350µL de infusão de cérebro e coração (BHI) como controle. Para os ensaios de avaliação do efeito potencializador das cumarinas, 150 µL de inóculo bacteriano suspenso em solução salina foram adicionados aos eppendorfs juntamente com 188 µL (1/8 MIC) das substâncias C9, C10, C11, C13 ou C14, complementado com 1162 µL de infusão cérebro coração (BHI). As soluções de eppendorf foram transferidas para placas de microdiluição de 96 poços e diluições seriadas foram realizadas com 100 µL de norfloxacino 1024 µg/mL até o penúltimo poço, pois no último não foi adicionado por ser utilizado como controle de crescimento (LIMAVERDE et al., 2017). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e realizado a leitura das placas por visualização de mudança de cor do meio caracterizado pela adição de 20 µL de resazurina. A CIM foi definida com as concentrações de norfloxacino e brometo de etídio que variaram entre 0,5 e 512 µg/mL e foram comparadas aos padrões de clorpromazina. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.7 Avaliação da Inibição da Bomba de efluxo NorA por Emissão de Fluorescência de EtBr

Em um período de 24 h antes da realização do experimento, a cepa *S. aureus* 1199B foi semeada em HIA e mantida em estufa bacteriológica a 37°C. Durante o ensaio foi preparado o inóculo bacteriano em tampão *phosphate buffered saline* (PBS) até atingir uma contagem de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias. Foi preparada uma solução contendo inóculo com os derivados cumarínicos C9, C10, C11, C13 e C14 em 50 µg/mL ou 100 µg/mL, para o teste. O CCCP (50 µg/mL) foi utilizado como controle positivo. Em seguida foi adicionado PBS até

obter-se volume final de 1 mL. As soluções foram incubadas e, em seguida, adicionou-se o EtBr (100 µg/mL) em todas as soluções. As soluções foram novamente incubadas. Após 1h as soluções foram centrifugadas com ciclos de centrifugação a 10.000 rpm por 2 minutos com lavagens intercalares com PBS, desprezando o sobrenadante. A leitura foi realizada com *Software* Gen5™ em leitor de microplaca de fluorescência Cytation 1 da BioTek® usando excitação 530 nm e emissão comprimento de onda 590 nm. A leitura foi realizada nos tempos: a cada 10 minutos até 1h hora após a lavagem, totalizando seis leituras. Foi realizada a leitura dos seguintes grupos: controle de crescimento contendo apenas inóculo; controle negativo composto por inóculo + EtBr; inóculo + EtBr + CCCP como controle positivo; e o teste contendo inóculo + EtBr + derivados cumarínicos (BLAIR; PIDDOCK, 2016; PAL et al., 2020).

4.3.8 Análise Estatística

Após ter passado pelo teste de normalidade (Shapiro-Wilk), os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média (SEM). Para analisar a diferença entre os grupos experimentais foi utilizado o *software* GraphPad Prism 9.0 e aplicado ANOVA unidirecional (*one way*) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4.4 ANÁLISE COMPUTACIONAL DA INIBIÇÃO DA BOMBA DE EFLUXO NORA

4.4.1 Docking

Os métodos computacionais empregados neste estudo tiveram como objetivo investigar as interações de ligação entre a proteína NorA e os cinco derivados da cumarina em nível atômico. Simulações de ancoragem molecular foram conduzidas utilizando o *software* AutoDock 4.2.6 em combinação com *AutoDock Tools* (ADT) (MORRIS et al., 2009; MORRIS; HUEY; OLSON, 2008), fornecendo informações valiosas sobre a afinidade de ligação e as interações potenciais entre os ligantes e a proteína NorA.

Para realizar as simulações de ancoragem, a estrutura da proteína NorA foi a mesma utilizada no estudo anterior (DE LIMA SILVA et al., 2022; TINTINO et al., 2020b). As estruturas dos derivados de cumarina foram obtidas por meio de cálculos de estrutura eletrônica com o programa Gaussian16 (FRISCH et al., 2016), utilizando o método B3LYP/6-31G(d,p)

(BECKE, 1988; LEE; YANG; PARR, 1988; STEPHENS et al., 1994; VOSKO; WILK; NUSAIR, 1980) Os tipos de átomos do ligante foram definidos como A, C, HD, OA e N, correspondendo a diferentes tipos de átomos presentes nos derivados de cumarina. Mapas de potencial eletrostático e de dessolvatação também foram incorporados para considerar seus efeitos. A constante dielétrica foi ajustada para -0,1465.

O método de Gasteiger (GASTEIGER; MARSILI, 1980) foi empregado para calcular as cargas parciais do ligante, enquanto as cargas atômicas da NorA foram atribuídas com base nos parâmetros do campo de força AMBER86 (WEINER et al., 1986). O processo de ancoragem envolveu o algoritmo genético Lamarckiano (GA) combinado com a abordagem de busca local Solis & Wets (SOLIS; WETS, 1981). Uma série de 100 execuções de ancoragem utilizando uma estratégia híbrida GA-LS foi realizada, empregando diversas configurações iniciais e ajustes de parâmetros para aumentar a confiabilidade dos resultados. Os ligantes foram posicionados no centro da grade com as coordenadas -0,02, 0,1276, -0,0419, e as dimensões da grade foram definidas como $126 \times 126 \times 126$ com um espaçamento de 0,16945 Å. Os parâmetros do GA incluíram um tamanho de população de 150 indivíduos, 2.500.000 avaliações de energia e 27.000 gerações com uma taxa de mutação de 0,02 e uma taxa de cruzamento de 0,8. O GA-LS foi executado com um máximo de 300 iterações e uma tolerância de desvio médio quadrático de 2,0 Å para agrupar as conformações de energia mais baixa. Por fim, os resultados de ancoragem foram analisados usando uma análise de *cluster* classificada para avaliar a conformação de energia mais baixa e a afinidade de ligação entre a proteína NorA e cada derivado de cumarina.

4.4.2 Dinâmica Molecular: derivados cumarínicos e membrana POPG

As interações entre cinco derivados de cumarina e uma bicamada de POPG (1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol), mostrado na Figura 7, que serve como modelo para a membrana bacteriana de *Staphylococcus aureus*, foram investigadas por meio de simulações de dinâmica molecular (DM).

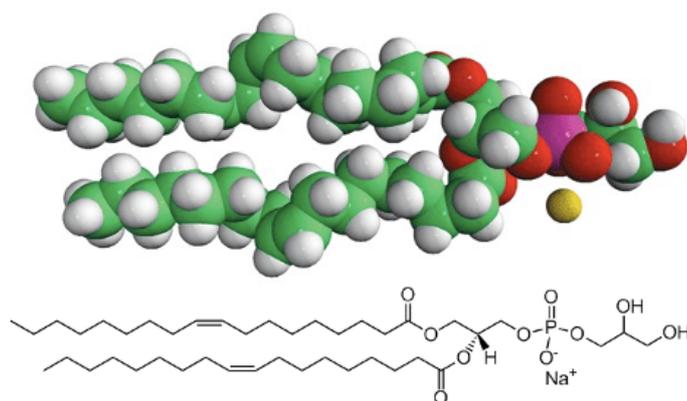


Figura 7. Ácido graxo POPG

A configuração e preparação do sistema envolveram as seguintes etapas utilizando o protocolo de construção de bicamada CHARMM-GUI (JO et al., 2009). Os parâmetros do campo de força CHARMM36 (HUANG; MACKERELL, 2013) foram utilizados para os lipídios, enquanto as moléculas de água foram representadas pelo modelo TIP3P (JORGENSEN et al., 1983). Os derivados de cumarina foram incorporados à água no sistema de bicamada. Os parâmetros da cumarina foram obtidos a partir dos parâmetros do campo de força CHARMM36 utilizando o programa CGenFF (VANOMMESLAEGHE; MACKERELL, 2012) no *Ligand Reader & Modeler* do CHARMM-GUI (“CHARMM-GUI ligand reader and modeler for CHARMM force field generation of small molecules - Kim - 2017 - Journal of Computational Chemistry - Wiley Online Library”, [s.d.]). Contra-íons, incluindo íons de sódio e íons de cloreto, foram adicionados para neutralizar a carga do sistema. Cada sistema foi composto por 100 moléculas de POPG, 5 cumarinas, 109 Na⁺, 9 Cl⁻ e aproximadamente 4000 moléculas de água.

Os sistemas passaram por um protocolo de minimização de energia e equilíbrio, envolvendo seis etapas conforme descrito no protocolo de construção de bicamada do CHARMM-GUI. O procedimento de minimização utilizou os algoritmos de descida mais íngreme e gradiente conjugado para aliviar contatos desfavoráveis e resolver colisões entre átomos. Posteriormente, foi realizado um processo de equilíbrio em etapas múltiplas, começando com restrição de posição e transição para dinâmica irrestrita, com graduais e decrescentes restrições nos átomos de lipídio. As simulações foram conduzidas utilizando um método de integração com um passo de tempo de 2 fs. As interações não ligadas empregaram o esquema de corte de Verlet (VERLET, 1967), com uma lista de vizinhos atualizada a cada 20

passos e uma distância de corte de 1,2 nm. As interações de Van der Waals foram tratadas utilizando um esquema de corte com um modificador de chave liga-desliga. A distância de chave liga-desliga do potencial de Van der Waals foi definida como 1,0 nm e a distância de corte foi definida como 1,2 nm. As interações eletrostáticas foram calculadas usando o método *particle mesh* Ewald (PME) (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993) com um corte de espaço real de 1,2 nm. O acoplamento de temperatura utilizou o algoritmo de Berendsen (BERENDSEN et al., 1984) com uma constante de acoplamento de temperatura de 1,0 ps e uma temperatura de referência de 303,15 K. O acoplamento de pressão utilizou o algoritmo de Berendsen (BERENDSEN et al., 1984) com um tipo de acoplamento semi-isotrópico, uma constante de acoplamento de pressão de 5,0 ps, uma compressibilidade de $4,5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ e uma pressão de 1,0 bar. Restrições de ligação de hidrogênio foram aplicadas utilizando o algoritmo LINCS para solução de restrições (HESS et al., 1997).

A fase de produção das simulações de dinâmica molecular (DM) foi realizada utilizando os seguintes parâmetros: assim como na etapa de equilíbrio, o esquema de corte foi definido como Verlet, com uma lista de vizinhos atualizada a cada 20 passos e uma distância de corte de 1,2 nm para interações de Van der Waals. Um modificador de chave liga-desliga foi utilizado, com uma distância de chave de 1,0 nm e uma distância de corte de 1,2 nm. As interações eletrostáticas de longo alcance foram tratadas utilizando o método PME (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993), com uma distância de corte de 1,2 nm e um espaçamento de grade de Fourier de 1,2 nm. O acoplamento de temperatura foi realizado utilizando o algoritmo de Nose-Hoover (HOOVER, 1985; NOSÉ, 1984) com uma constante de tempo de 1,0 ps e uma temperatura de referência de 303,15 K. O acoplamento de pressão foi implementado utilizando o algoritmo de Parrinello-Rahman (PARRINELLO; RAHMAN, 1981) de forma semisotrópica, com uma constante de tempo de 5,0 ps, uma compressibilidade de $4,5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ e uma pressão de referência de 1,0 bar. O algoritmo LINCS foi utilizado para restringir as distâncias de ligação com uma tolerância geométrica relativa de 0,00001. Por fim, o método de integração foi empregado com um passo de tempo de 2 fs, e a simulação foi executada por um total de 500 ns cada uma.

4.4.3 Dinâmica Molecular: complexo NorA-POPG com C10 e C13

Além dos sistemas previamente descritos, realizamos uma simulação de DM para investigar um sistema mais complexo envolvendo uma bicamada de POPG com a proteína NorA incorporada nela, juntamente com cinco moléculas de cumarina em uma solução aquosa.

Os parâmetros do campo de força específicos para cada molécula foram os mesmos descritos anteriormente. O sistema consistiu em uma bomba de efluxo NorA, 160 moléculas de POPG, 191 íons de sódio, 34 íons de cloreto, 12.882 moléculas de água representadas pelo modelo TIP3 e cinco moléculas de C10 ou C13. Os parâmetros utilizados para este sistema foram essencialmente os mesmos descritos anteriormente, seguindo o protocolo de construção de bicamada do CHARMM-GUI (“CHARMM-GUI ligand reader and modeler for CHARMM force field generation of small molecules - Kim - 2017 - Journal of Computational Chemistry - Wiley Online Library”, [s.d.]). As simulações de DM foram realizadas utilizando o mesmo método de integração com um passo de tempo de 2 fs, e o processo de equilíbrio foi realizado conforme descrito anteriormente. Para capturar a dinâmica e o comportamento do sistema, a simulação de DM foi estendida por uma duração total de 250 ns. Isso permitiu uma exploração abrangente das interações e propriedades do sistema complexo em investigação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS PRELIMINARES *IN SÍLICO*

5.1.1 Análise de atividade biológica por similaridade e propriedades farmacocinéticas (ADME)

A busca por similaridades no banco de dados UniChem 2.0 identificou moléculas com 100% de similaridade para todas as cumarinas incluídas neste estudo (CHAMBERS et al., 2013). Nesse sentido, a busca por publicações relatando moléculas semelhantes no CAS SciFinderⁿ mostrou que, exceto para C11, todos os derivados cumarínicos analisados foram relatados por apresentar atividade antibacteriana contra diferentes bactérias como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Atividades farmacológicas dos derivados cumarínicos segundo a literatura.

Molécula	Código de molécula similar (% similaridade) **	Atividade relatada	Referência***
C10	ZINC1676264 (100%)	Antioxidante (c) Anticolinesterásico (d) Antibacteriano (e)	(c) Vianna et al, 2012 (d)(e) Zayane et al, 2016 (e) Tătăringă et al, 2018
C11	ZINC4282211 (100%)	Inibição da enzima zinco anidrase carbônica (f)	(f) Touisni, 2011
C13	ZINC40588 (100%)	Antibacteriano (g)	(g) Konc et al, 2011
C14	ZINC58121 (Hymecromone) (100%)	Anticâncer (h) Antibacteriano (i)	(h) Piccioni et al, 2015 (i) Shi e Zhou, 2011 (i) Kawasea, 2001

* Fonte: PubChem, um banco de dados químico do National Institutes of Health (NIH)

** Banco de referência das moléculas similares: zinc.docking.org

*** Buscas pelas estruturas moleculares realizadas através do CAS SciFinderⁿ

Tabela 4. Número estimado de organismos-alvo para cumarinas de estudo (ChEMBL).

Organismos Alvo predito	C9	C10	C11	C13	C14
Eucariontes	7	3	6	-	118
Bactérias	1	-	2	-	9
Fungos	-	-	-	-	9
Vírus	7	-	-	-	2
Sem dados	2	2	1	-	5

Na identificação dos possíveis alvos para as cumarinas em estudo, o banco de dados ChEMBL demonstrou que, considerando o número total de organismos, os eucariotos foram os mais propensos a apresentar um alvo molecular para os compostos, com as bactérias ocupando o segundo lugar no número de alvos prováveis (Tabela 4). Sendo assim, essas cumarinas parecem possuir alvos moleculares potenciais em uma grande variedade de organismos entre os quais se destacam as bactérias, o que incentiva a investigação das atividades antibacterianas desses derivados.

A Tabela 5 apresenta as propriedades físico-químicas que estão mais frequentemente relacionadas à probabilidade de uma molécula se tornar um fármaco para ser utilizado por via oral.

Tabela 5. Propriedades físico-químicas dos derivados cumarínicos.

Composto	Fórmula molecular	Peso (g/mol)	NLR	NHBA	NHBD	TPSA(Å ²)	iLogP
C10	C ₁₃ H ₁₂ O ₃	216.23	3	3	0	39	2.67
C11	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	338.31	3	8	4	129	-0.72
C13	C ₁₂ H ₁₀ O ₄	218.21	1	4	1	67	2.01
C14	C ₁₀ H ₈ O ₃	176.17	0	3	1	50	1.81
Gentamicina	C ₁₀ H ₄₃ N ₅ O ₇	477.60	7	7	8	200	-3.32
Norfloxacino	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	319.33	3	5	1	73	1.26

NLR: Número de links rotativos. NHBA: Número de regiões aceitadoras de ligações de hidrogênio. NHBD: Número de regiões doadoras de ligações de hidrogênio. TPSA: Área de superfície polar topológica.

Os resultados demonstram que os derivados cumarínicos são moléculas pequenas, com poucas regiões aceptoras ou doadoras hidrogênio, pequena área de superfície polar e coeficientes de partição baixos. Dessa forma, possuem propriedades físico-químicas e farmacocinéticas promissoras, indicando que, do ponto de vista computacional, possuem potencial para serem utilizados no desenvolvimento de fármacos orais, pois nenhuma molécula apresentou qualquer violação da regra dos cinco de Lipinsk (LIPINSKI, 2004).

5.2 ENSAIOS *IN VITRO*

5.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Dentre os derivados cumarínicos avaliados neste estudo, apenas o C13 apresentou atividade antibacteriana clinicamente relevante contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (MIC ≤ 128 µg/mL) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (MIC ≤ 256 µg/mL). Como os demais

compostos apresentaram valores da CIM acima de 1024 µg/mL, estes não apresentam atividade antimicrobiana de relevância contra essas cepas.

Ensaio previamente realizados com os derivados cumarínicos estudados, mostraram atividade antibacteriana contra cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas (KAWASE et al., 2011; SHI; ZHOU, 2011; SUKANYA et al., 2019; SUMAKANTH; SUKANYA; SRUTHI, 2019; TĂȚĂRÎNGĂ et al., 2018; TRYKOWSKA KONC et al., 2011; ZAYANE et al., 2016). Nesse estudo, apenas a cumarina C13 apresentou tal atividade contra a cepa de *S. aureus* ATCC 25923, o que corrobora com o estudo de Konc e colaboradores (2011) que mostrou que a substância 8-Acetyl-7-hydroxy-4-methylcoumarin apresenta atividade contra bactérias Gram positivas como *S. aureus* ATCC 6538, *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633 e *M. luteus* ATCC 9341, no entanto, não encontrou atividade contra bactérias Gram negativas como *E. coli* ATCC 10536 (TRYKOWSKA KONC et al., 2011), diferentemente do verificado neste estudo, no qual a cumarina C13 apresentou atividade antibacteriana também contra a bactérias Gram negativa *E. coli* ATCC 25922.

Uma possível hipótese para que apenas o composto cumarínico C13 tenha apresentado tal efeito, seria talvez, pela presença de um grupamento cetona ao lado do fenol. A carbonila na posição C-8, na posição orto em relação a hidroxila na posição C-7, poderia promover um campo com grande densidade eletrônica, o que teria o potencial de sequestrar íons cátions, funcionando, talvez, como agente quelante de metais importantes para sobrevivência bacteriana. Um estudo que avaliou compostos orgânicos contendo grupos carbonila e fenol com relação sua atração e capacidade de ligação com o ferro em diferentes valências para formação de *clusters*, mostrou que o grupamento fenol quando desprotonado forma o ânion fenóxi, aumentando a capacidade nucleofílica da molécula, o que proporciona uma maior atração pelo ferro. O grupamento carbonila também possui a capacidade de formar pontes com metais, e, quando associada no mesmo composto que contém fenol, dependendo das diferenças no sistema de coordenação, essa atração pelo ferro é aumentada quando a carbonila está na posição orto com o fenol (KITOS et al., 2017)

Com base nos resultados, é possível estabelecer a provável relação estrutura-atividade (SAR) para os derivados sintéticos de 4-hidroxycumarina presentes neste trabalho. A atividade antibacteriana intrínseca do composto C13 pode estar relacionada a alterações no anel benzílico, como a presença de grupos retirantes (metil cetona), próximo a um grupo hidroxila livre presente na posição 7 e maior capacidade de liberação de hidrogênio deste grupo. Os estudos

que avaliam relação estrutura atividade relacionam o grupo hidroxila livre na posição C-7 do anel fenil como crucial para a atividade antibacteriana (RANJAN SAHOO et al., 2021).

O composto C14 é o composto base das cumarinas sintéticas presentes neste trabalho, sem alteração no anel benzílico. Então, embora esse composto (C14) também tenha uma hidroxila livre, a ausência do grupo carbonila ao lado, pode reduzir a capacidade de liberação desse hidrogênio. Nos compostos C10 e C11, o lugar do hidrogênio da hidroxila, foi substituído por outros grupos funcionais, o que pode ter contribuído para essa perda de função.

5.2.2 Ensaio de modulação da ação de antibióticos

Para avaliar a capacidade desses compostos modularem a atividade de antibacterianos das classes aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, representantes dessas classes foram combinados com concentrações sub-inibitórias (CIM/8) de cada cumarina contra as cepas multirresistentes *S. aureus* 10 e *E. coli* 06. Exceto para a associação de norfloxacina com o composto C11 frente a *S. aureus* 10 (Figura 9), as cumarinas C10 (Figura 8), C13 (Figura 10) e C14 (Figura 11) demonstram a capacidade de reduzir da resistência a antibióticos para bactérias Gram-negativas e positivas.

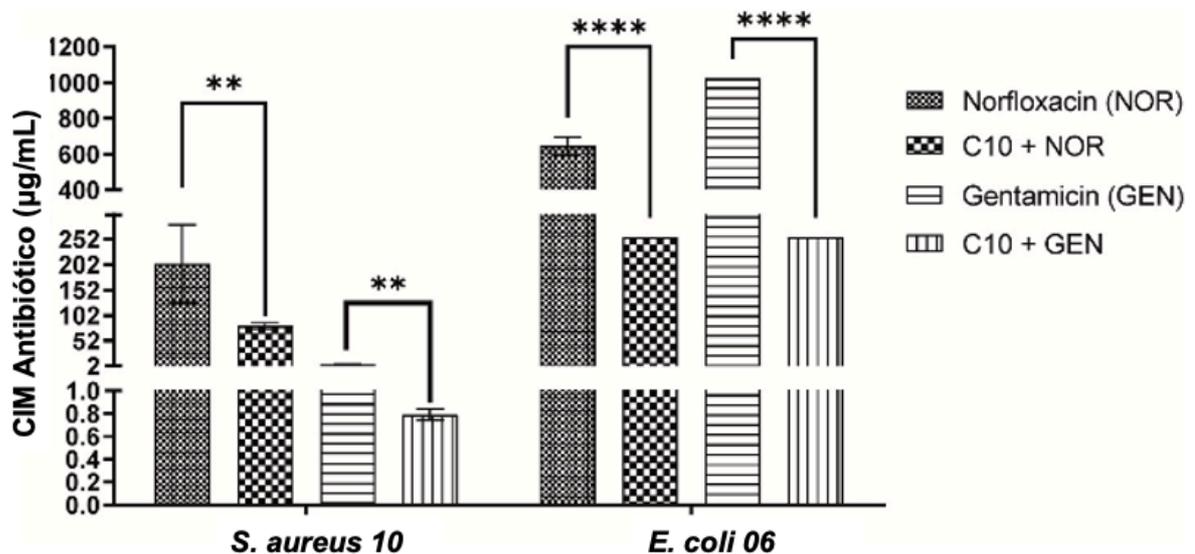


Figura 8. Concentração inibitória mínima (µg/mL) de diferentes antibióticos (Norfloxacino ou Gentamicina) na presença ou ausência da substância C10 contra *S. aureus* 10 e *E. coli* 06.

p<0,01; **p<0,0001.

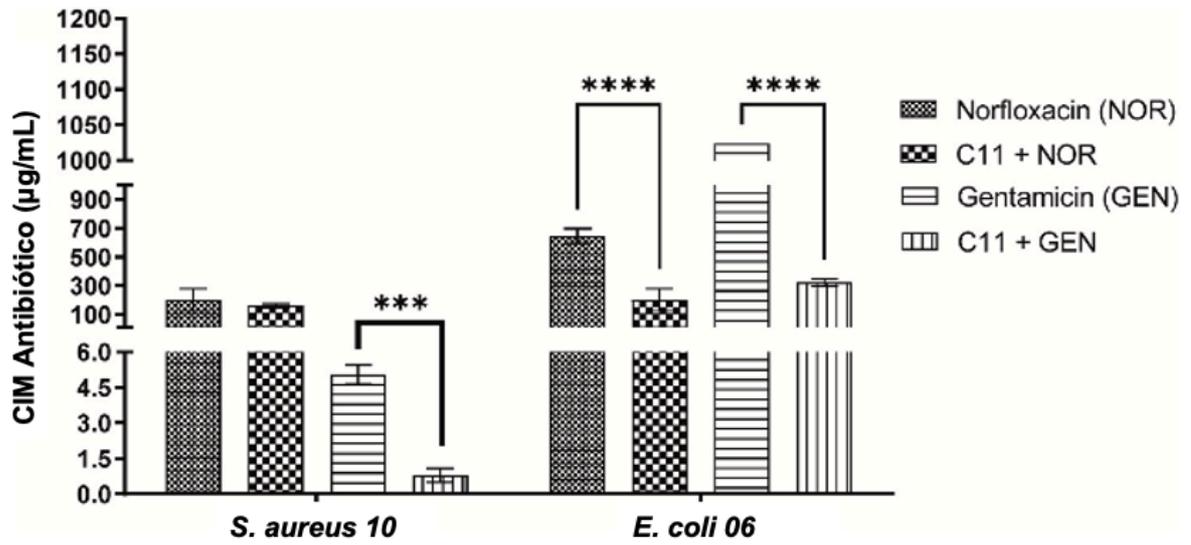


Figura 9. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) de diferentes antibióticos (Norfloxacino ou Gentamicina) na presença ou ausência da substância C11 contra *S. aureus 10* e *E. coli 06*.
 *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

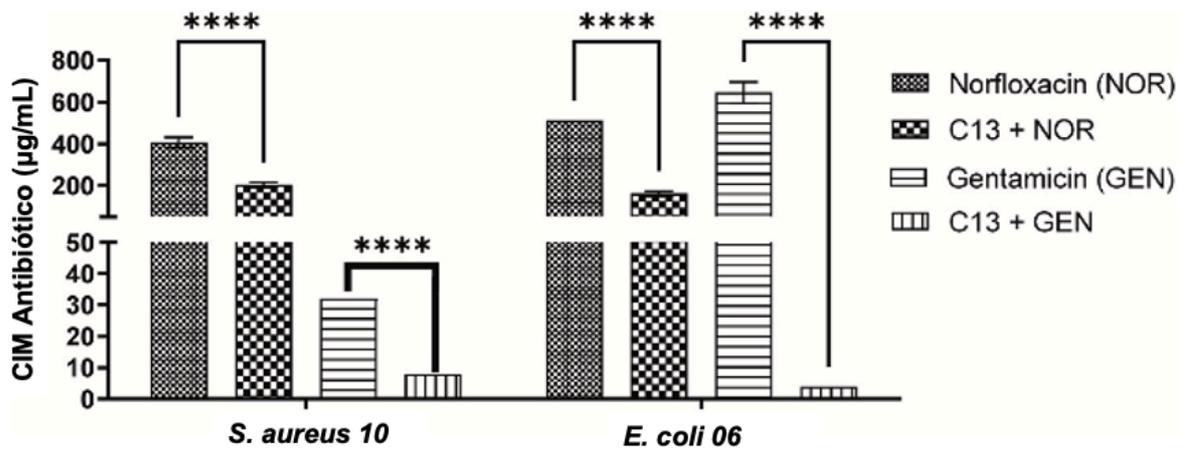


Figura 10. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) de diferentes antibióticos (Norfloxacino ou Gentamicina) na presença ou ausência da substância C13 contra *S. aureus 10* e *E. coli 06*.
 **** $p < 0,0001$.

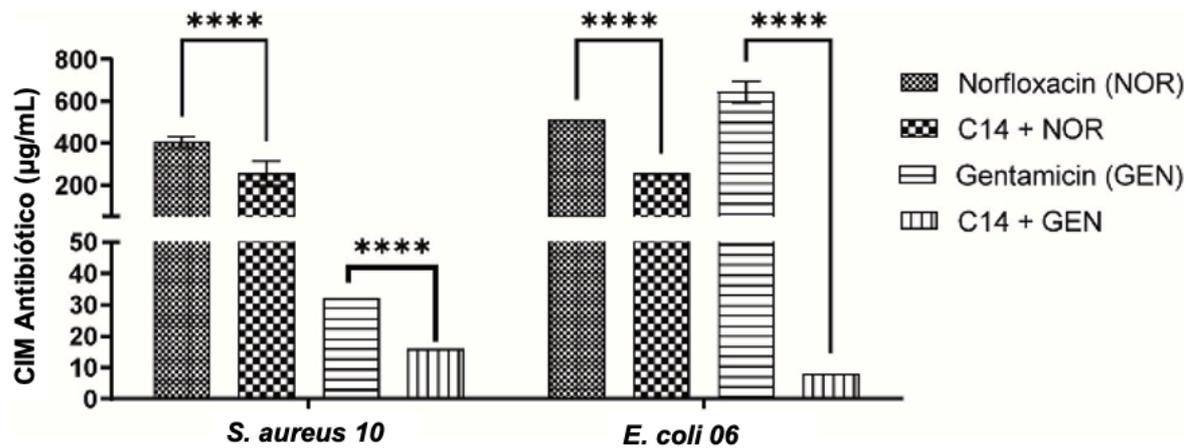


Figura 11. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) de diferentes antibióticos (Norfloxacino ou Gentamicina) na presença ou ausência da substância C14 contra *S. aureus* 10 e *E. coli* 06.

**** $p < 0,0001$.

Enquanto a maioria dos derivados cumarínicos não demonstrou atividade antibacteriana clinicamente eficaz, todos eles mostraram a capacidade de potencializar a atividade de antibióticos padrão (norfloxacina ou gentamicina ou ambos) contra cepas multirresistentes de *S. aureus* 10 e *E. coli* 06, indicando que esses compostos podem reverter a resistência a antibióticos *in vitro*. Enquanto os estudos que avaliam a atividade moduladora de antibióticos por derivados cumarínicos são escassos, o estudo de Araújo et al. (2016) demonstrou que compostos cumarínicos podem atuar como inibidores da bomba de efluxo em *S. aureus* (DE ARAÚJO et al., 2016). Além disso, foi demonstrado que a combinação de cumarina e aminoglicosídeos (como gentamicina) e fluoroquinolonas (como levofloxacina) resultou em um efeito antibacteriano aprimorado contra bactérias resistentes à meticilina como *Staphylococcus aureus* (MRSA) (BETONI et al., 2006; HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008; MIKULÁŠOVÁ; CHOVANOVÁ; VAVERKOVÁ, 2016; OLIVEIRA et al., 2022; ZUO et al., 2016).

Com relação aos potenciais mecanismos para redução da resistência demonstradas pelos derivados cumarínicos ao potencializar o efeito de antibacterianos, um estudo que realizou a análise por microscopia eletrônica indicou que a 7-metoxicumarina causou lesões significativas na membrana bacteriana de *Ralstonia solanacearum*, uma bactéria patogênica que infecta plantas (HAN et al., 2021). Apesar das diferenças estruturais dos compostos e do fato dessa bactéria não ser patogênica para o ser humano, os achados da pesquisa relatada sugerem que os derivados cumarínicos podem afetar a integridade das membranas bacterianas, aumentando a penetração dos antibióticos e assim, possivelmente potencializando seu efeito antibacteriano.

Outra possibilidade é que compostos cumarínicos promoverem um efeito aditivo quando associados a antibióticos fluoroquinolonas. Essa ideia é suportada por estudos que demonstram que cumarinas podem se ligar à subunidade B da DNA girase em bactérias, inibindo o desespiralamento do DNA, o que resulta em um efeito bactericida (HU et al., 2020; SUMAKANTH; SUKANYA; SRUTHI, 2019). Como um mecanismo semelhante é desempenhado pelas fluoroquinolonas, tal efeito aditivo poderia justificar o sinergismo observado a partir da associação de C10, C13 e C14 com norfloxacin contra a cepa multirresistente de *S. aureus* 10, bem como da associação de C10, C11, C13 e C14 com fluoroquinolonas contra *E. coli* 06 multirresistentes.

Um estudo que integrou uma fração estrutural de cumarina a um composto base quinolona, mostrou que o composto resultante apresentou atividade antibacteriana aumentada contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em comparação com os compostos originais isolados, abrindo uma perspectiva do uso de cumarinas na Química Medicinal para obter compostos com atividade antibacteriana melhorada (EMAMI et al., 2008).

O composto C13 é mais lipofílico quando comparado com o C14, suportando a ideia de que a lipofilicidade desempenha um papel fundamental para a atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas (YUAN et al., 2021). Alterações estruturais como substituição de compostos no anel fenil contendo grupos doadores/retiradores de elétrons como os grupos –CH₃, –OH e –OMe no anel arílico podem estar associadas ao aumento da atividade antibacteriana com relação direta com a lipofilicidade, que contribui para a penetração pela membrana celular dessas bactérias (ROPPONEN et al., 2021; ZAVRŠNIK et al., 2008). Essas características podem contribuir tanto para o efeito antibacteriano da C13 como para sua capacidade de redução da resistência da *S. aureus* 10 e *E. coli* 06 multirresistentes à norfloxacin e gentamicina.

Alguns parâmetros físico-químicos parecem estar relacionados às diferenças de atividade dos compostos antibacterianos contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. A literatura relata um LogP ideal em torno de 4 para bactérias Gram-negativas e contra Gram-positivas em torno de 6 (LIEN; HANSCH; ANDERSON, 1968). Para bactérias Gram-negativas, uma maior área de superfície polar (PSA) ou área de superfície polar topológica (TPSA) (~165 Å²) parece ser importante para aumentar a disponibilidade bacteriana ao antibiótico (ROPPONEN et al., 2021). Essas características, talvez explique a atividade observada em C13 (LogP = 2.01; TPSA = 67 Å²) tanto isolada como na modulação de atividade favorável contra *S. aureus* 10.

Os substituintes no anel benzílico que contêm um anel heterocíclico (por exemplo, imidazol, piperazina, fluoro-isoquinolina, azol e tiazol) ligados ao grupo farmacofórico da cumarina desempenharam um papel fundamental na transformação da atividade antibacteriana (OSTROWSKA, 2020; R. VERMA et al., 2021; RAKESH et al., 2015; RAVINDAR et al., 2018; SK. VERMA et al., 2021; ULLAS et al., 2020)

Devido ao aumento da resistência bacteriana, a descoberta de compostos capazes de aumentar a atividade dos antibióticos convencionais podem contribuir significativamente para a terapia antimicrobiana, reduzindo a dose necessária do antibiótico utilizado e consequentemente promovendo menor toxicidade, proporcionando assim maiores benefícios na clínica.

5.2.3 Avaliação da inibição de bomba de efluxo MepA por redução do CIM do EtBr

Devido as cumarinas demonstrarem papel interessante na redução da resistência bacteriana à fluoroquinolonas em cepas multirresistentes *S. aureus* 10 e *E.coli* 06, isso levou a investigação da atividade desses compostos como possíveis inibidores das bomba de efluxo MepA e NorA, um mecanismo de resistência importante e comum em cepas de *S. aureus*.

As cumarinas testadas não apresentaram atividade antimicrobiana de relevância clínica contra as cepas bacterianas portadores de bomba de efluxo MepA presente nas cepas de *S. aureus* K2068, na qual a concentração inibitória mínima foi igual ou superior a 1024µg/mL. No entanto, todos os derivados cumarínicos mostraram resultados significativos ($p < 0.0001$) quanto ao seu potencial de reduzir a concentração inibitória mínima do brometo de etídio, o que indica um efeito inibitório sobre a função da bomba de efluxo.

Os compostos C10, C11, C13 e C14 apresentaram atividade potencializadora superior a demonstrada pelo controle positivo (clorpromazina) usado como padrão de inibição de bomba no estudo (Figura 12-A). No entanto, esse possível efeito sinérgico não foi confirmado quando os compostos cumarínicos, em concentrações sub-inibitórias, foram associados ao antibacteriano ciprofloxacino, pois apenas o derivado cumarínico C14 (7-Hydroxy-4-methyl-2H-chromen-2-one) foi capaz de reduzir a CIM do ciprofloxacino, confirmando uma possível inibição da bomba de efluxo MepA por esse composto. As cumarinas C9, C10, C11 e C13 mostraram um efeito sinérgico com brometo de etídio, no entanto, induziram um efeito

antagônico a ação antibacteriana da fluoroquinolona ciprofloxacino, demonstrado pelo aumento da concentração inibitória mínima do antibiótico (Figura 12-B).

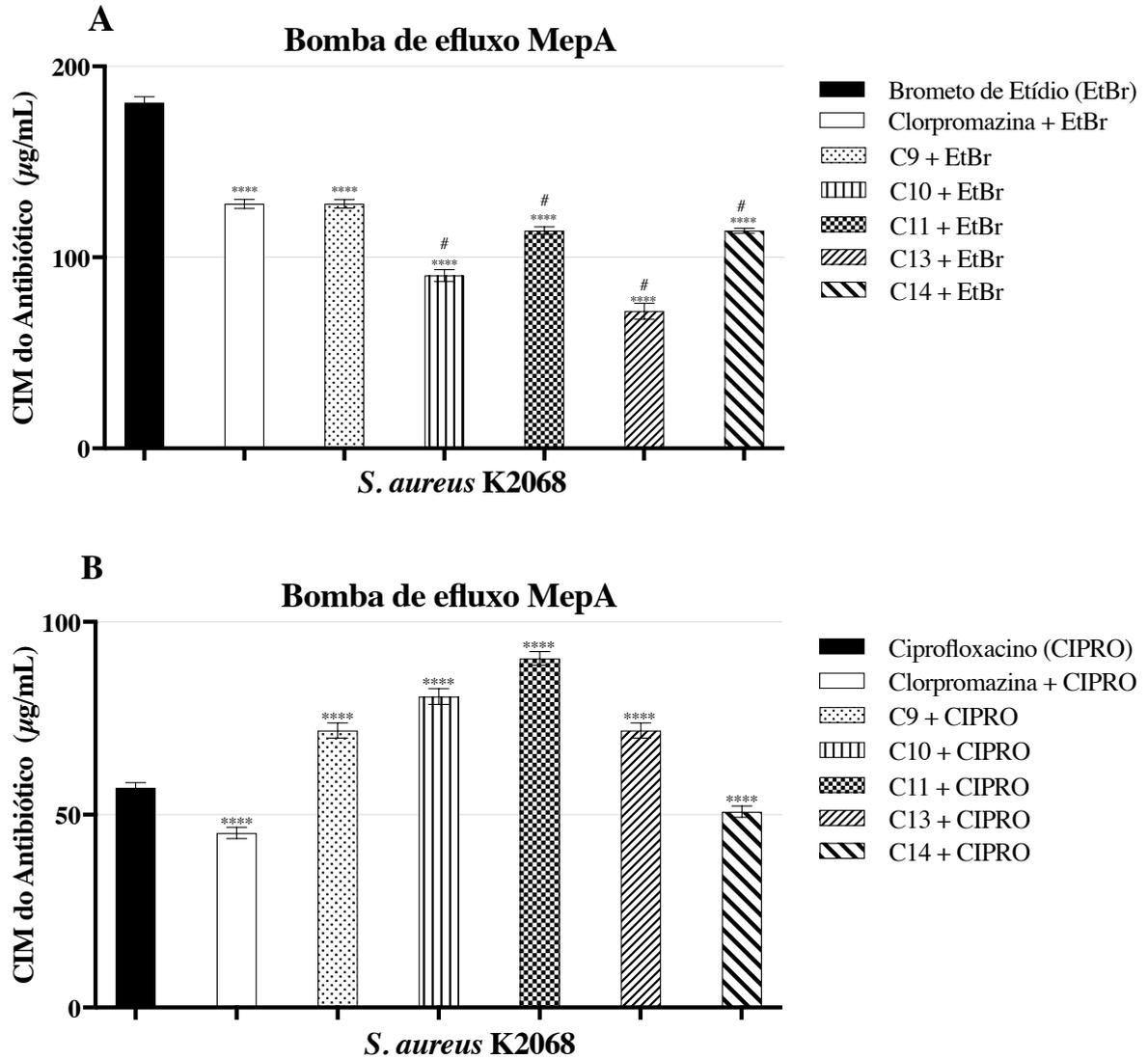


Figura 12. Capacidade dos compostos C9, C10, C11, C13 e C14 de inibir a bomba de efluxo MepA em combinação com brometo de etídio (EtBr) (A) e ciprofloxacino (B) e contra a cepa de *S. aureus* K2068.

Entre as substâncias que são substratos universais para bombas de efluxo bacteriana, o brometo de etídio é um dos mais utilizados e a redução da sua concentração inibitória mínima é indicativo de uma possível inibição da bomba de efluxo presente na bactéria. Estudos mostram que essa inibição pode ser avaliada pela ocorrência de uma redução de duas ou mais vezes na CIM do brometo de etídio, em comparação com o controle (ABD EL-BAKY et al., 2019; PIDDOCK, 2006b). Os resultados do teste com as substâncias em associação com o brometo

de etídio demonstram inibição da bomba MepA, pois apresentaram redução significativa da CIM do brometo de etídio contra a *S. aureus* K2068. Um destaque para as cumarinas C10 e C13, que mostraram uma redução de 2x e 2,5x, respectivamente, na CIM do corante frente a cepa estudada. Um destaque para as cumarinas C10, C11, C13 e C14, que apresentaram atividade moduladora superior ao inibidor padrão (clorpromazina) no teste com brometo de etídio.

Não há estudos na literatura que relatem compostos cumarínicos interagindo com bomba de efluxo MepA, no entanto, alguns estudos abordando compostos não cumarínicos tem demonstrado capacidade inibidora da bomba de efluxo MepA, podendo reduzir a resistência bacteriana ao antibiótico ou não. Compostos como o limoneno (FREITAS et al., 2022) a chalcona (2E)-1-(4'-aminofenil)-3-(fenil)-prop-2-en-1-ona (SIQUEIRA et al., 2021) e a 1,8-naftiridinas sulfonamidas (OLIVEIRA-TINTINO et al., 2021b) apresentam atividade inibitória da bomba MepA contra a cepa *S. aureus* K2068 e demonstram efeitos sinérgicos tanto com brometo de etídio quanto com a ciprofloxacina, potencializando seu efeito. Talvez, devido a diferença estrutural desses compostos com as cumarinas testadas nesse estudo, o antagonismo apresentado pelos derivados C9, C10, C11 e C13 quando associado ao antibacteriano tenha sido observado.

Resultados mostrados por Da Costa (2021) indicam que o estragol foi capaz de modular sinergicamente a ação do brometo de etídio contra *S. aureus* K2068 portando uma bomba de efluxo MepA, no entanto, não foi capaz de reduzir a CIM da ciprofloxacina, resultado diferente do que foi encontrado nesse estudo, pois com exceção da C14, todas as cumarinas testadas promoveram o aumento da CIM da ciprofloxacina, reduzindo seu potencial antibacteriano contra essa cepa (DA COSTA et al., 2021).

O carvacrol foi analisado e se mostrou eficaz na reversão do mecanismo de bomba de efluxo presente em *S. aureus* IS-58, reduzindo a CIM do brometo de etídio, no entanto, verificou-se um antagonismo (aumento da CIM) quando associado ao antibiótico testado (SOUSA SILVEIRA et al., 2020). Esse comportamento foi semelhante ao observado neste estudo, embora a cepa utilizada seja diferente. No entanto, evidencia-se, que diversos compostos, inclusive os derivados cumarínicos, possuem interações diferentes (sinérgicas ou antagonicas) com relação a resistência bacteriana por bomba de efluxo.

Alguns mecanismos que não envolvem a interação com a bomba de efluxo podem explicar o fenômeno de antagonismo farmacológico, são eles: a redução da permeabilidade da

membrana ao antibiótico; a quelação do Fe^{2+} , importante para bomba de efluxo (TINTINO et al., 2016), ou quelação de grupos funcionais importantes dos antibióticos, o que prejudica seu efeito; alterações estruturais da membrana resultando em um declínio das vias de sinalização envolvidas na expressão da bomba (TINTINO et al., 2020b) ou até mesmo, a interferência na ligação com proteínas transportadoras dos antibióticos na célula bacteriana. No entanto, mais estudos são necessários para verificar essas hipóteses e comprovar por quais mecanismos os compostos C9, C10, C11 e C13 se apresentaram de forma antagônica ao efeito antibacteriano da ciprofloxacina.

5.2.4 Avaliação da inibição de bomba de efluxo NorA por redução do CIM do EtBr

Na avaliação da capacidade antibacteriana intrínseca desses compostos, semelhante ao observado no teste com a bomba MepA, nenhuma cumarina apresentou atividade clinicamente relevante contra a cepa bacteriana portadora da bomba de efluxo NorA (*S. aureus* 1199B). Para todas as substâncias, a concentração inibitória mínima foi igual ou superior a 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Com relação aos efeitos dos compostos cumarínicos na possível capacidade de inibição de bomba, os compostos C9, C10, C11 e C13 apresentaram resultado significativo ($p < 0.0001$) quanto à redução da CIM do antibiótico norfloxacino, aumentando assim sua atividade antibacteriana. Os compostos C9, C10 e C13 apresentaram atividade inibidora superior ($p < 0.0001$) à do controle positivo (clorpromazina) usado como padrão de inibição de bomba no estudo. A cumarina C14 foi a única a não apresentar aumento do efeito antibacteriano do norfloxacino (Figura 13-A), apesar de ter demonstrado potencial para inibição de bomba de efluxo (Figura 13-B).

Quanto ao potencial inibitório da bomba de efluxo por redução da CIM do brometo de etídio, apenas o composto C14 não apresentou tal redução, todas as outras cumarinas C9, C10, C11, e C13 reduziram de forma significativa a CIM do brometo de etídio, o que indica uma possível inibição da bomba NorA. Das cumarinas que provocaram essa redução, três delas (C10, C13 e C14) apresentaram atividade inibidora superior à da clorpromazina ($p < 0.0001$), controle positivo usado como padrão de inibição de bomba no estudo (Figura 13-B).

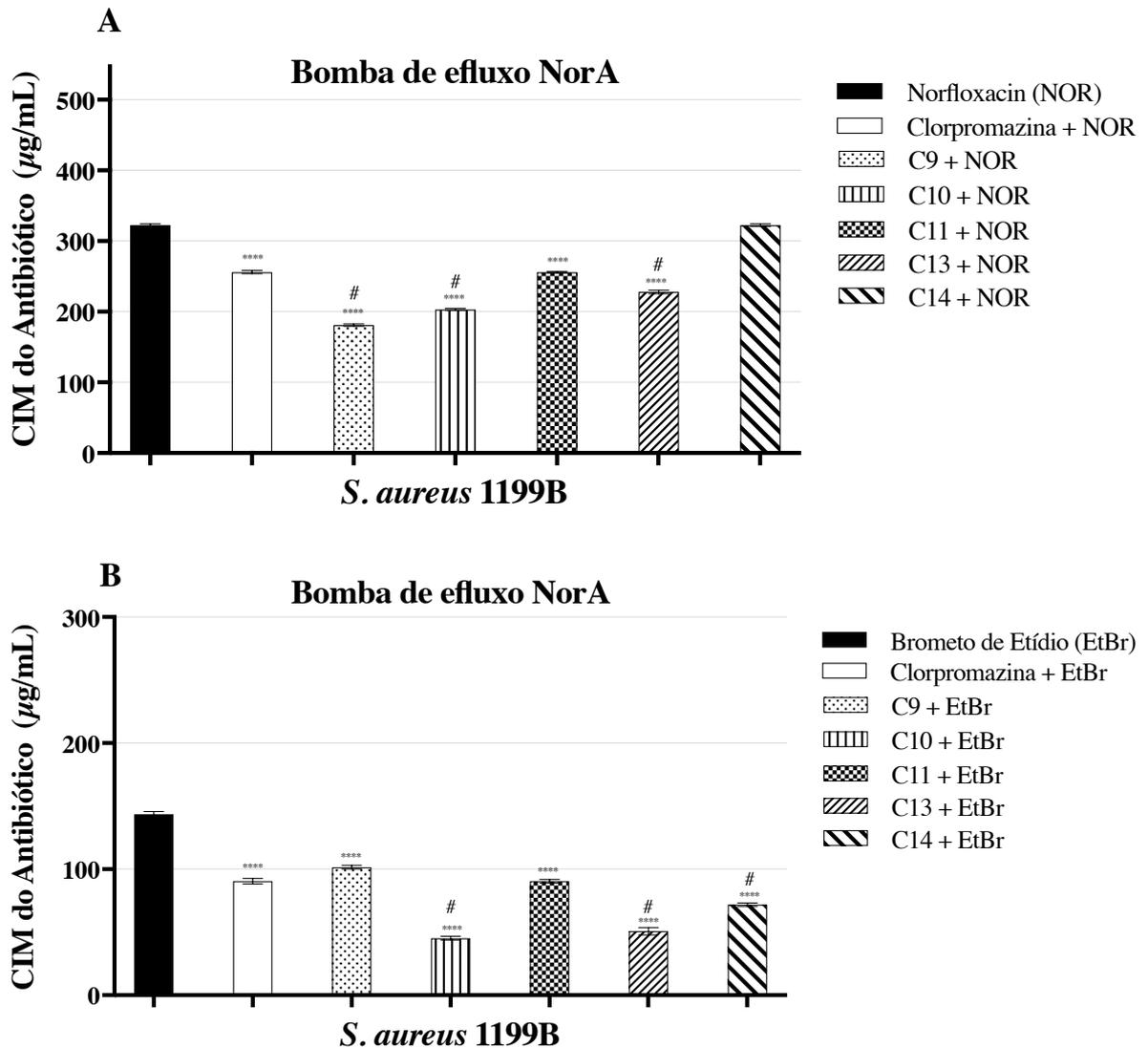


Figura 13. Capacidade dos compostos C9, C10, C11, C13 e C14 de inibir a bomba de efluxo NorA em combinação com norfloxacina (A), brometo de etídio (B) e contra a cepa de *S. aureus* 1199B.

Os valores representam a média geométrica \pm S.E.M. (erro padrão da média). ANOVA two-way seguida do teste *post hoc* de Bonferroni. **** $p < 0,0001$ vs controle; # $p < 0,0001$ vs clorpromazina; NOR = Norfloxacina; C9 = 7-hidroxi-4-metil-8-(morfolin-4-ilmetil)-2H-cromen-2-ona; C10 = 7-(Aliloxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona; C11 = 7-(alfa-D-Galactopiranosiloxi)-4-metil-2H-1-benzopiran-2-ona; C13 = 8-Acetil-7-hidroxi-4-metilcumarina; C14 = 7-hidroxi-4-metil-2H-cromen-2-ona; EtBr = brometo de etídio.

Mesmo não sendo eficazes no controle de infecções por *S. aureus* portadores de bomba de efluxo NorA quando utilizadas isoladas, essa característica não prejudicaria o uso desses compostos como adjuvantes, pois um dos requisitos para bons inibidores de bomba parece ser a ausência da atividade antibacteriana direta, essa característica parece reduzir a probabilidade

de desenvolvimento de resistência bacteriana futura (ASHIMA K. BHARDWAJ; PRIYABRATA MOHANTY, 2012).

Muitos estudos demonstram o papel de diversas substâncias ou mistura de substâncias na possível inibição da bomba de efluxo NorA presente na cepa de *S. aureus* 1199B e/ou na atividade moduladora de antibióticos que são substratos para essa proteína (ALVES BORGES LEAL et al., 2021; COSTA et al., 2016b; DE ARAÚJO et al., 2021; DE SOUSA ANDRADE et al., 2020; DOS SANTOS BARBOSA et al., 2021; LIMA JUNIOR et al., 2023; SILVA et al., 2022), no entanto, estudos com essa temática envolvendo derivados cumarínicos são escassos.

De acordo com os critérios bioenergéticos e estruturais de classificação dos transportadores multidrogas a proteína NorA pertence a principal superfamília facilitadora (MFS) frequentemente encontrado em bactérias (BOLHUIS et al., 1997). Essa proteína, que funciona como uma bomba de efluxo protege a célula bacteriana contra vários agentes como brometo de etídio e várias classes de antibacterianos como as fluoroquinolonas (HSIEH et al., 1998; KAATZ; SEO, 1995). Sendo assim, os fármacos que são substratos para essa bomba de efluxo, ao serem administrados, serão expulsos da célula bacteriana, o que compromete sua eficácia terapêutica e controle da infecção. Como o brometo de etídio é um substrato universal para esse tipo de proteínas extrusora, ou seja, a resistência ao brometo é exclusivamente mediada por bombas de efluxo, é possível relacionar a redução da sua CIM como parâmetro de avaliação da inibição da bomba de efluxo presente na bactéria (ABD EL-BAKY et al., 2019; MARTINS et al., 2011; PIDDOCK, 2006b).

Quanto ao potencial inibitório da bomba de efluxo por redução da CIM do brometo de etídio, as cumarinas C9, C10, C11, e C13 reduziram de forma significativa a CIM do agente intercalante, o que indica uma possível inibição da bomba de efluxo NorA. Dos derivados cumarínicos que provocaram essa redução da CIM do brometo de etídio, três compostos se destacaram por apresentarem atividade inibidora da bomba superior à da clorpromazina, utilizada como controle positivo no teste por apresentar uma reconhecida atividade inibitória de bomba (BARRETO et al., 2014; COUTO et al., 2008; KAATZ et al., 2003), foram elas, as cumarinas C10, C13 e C14. A clorpromazina parece exercer essa atividade inibidora de bomba de efluxo devido à provocar prejuízo no fluxo de K^+ através da membrana do *S. aureus*; promover alterações estruturais da parede e no processo de divisão celular bacteriana e, provocar uma interferência no fornecimento energético dependente de H^+ para a bomba de efluxo bacteriana (KAATZ et al., 2003; KRISTIANSEN; MORTENSEN; NISSEN, 1982; LIMA; RAMOS-ALVES; SOARES, 2019).

As cumarinas C10 e C13 apresentaram poder inibidor da bomba de efluxo superior à clorpromazina tanto no teste com brometo de etídio como no teste com norfloxacino, o que pode indicar essas cumarinas como as maior poder na inibição da bomba NorA.

Foi demonstrado a atividade inibitória da bomba de efluxo NorA de cumarinas extraídas e isoladas do botão da flor da *Mesua férrea*. Essas cumarinas foram avaliadas frente a mesma cepa bacteriana utilizada neste estudo, a *S. aureus* 1199B, e demonstrou atividade inibitória por redução da CIM do brometo de etídio e da fluoroquinolona estudada, potencializando assim seu efeito antibacteriano (ROY et al., 2013), corroborando com o observado com a maiorias das cumarinas deste estudo.

Outro estudo demonstrou a atividade potencializadora antibiótica de diversos derivados cumarínicos com radicais substituídos frente a cepas de *S. aureus* 1199B portadora da bomba de efluxo NorA, mostrando que diferentes características desses substituintes podem contribuir para uma atividade promissora e, conseqüentemente, atuarem reduzindo a resistência a antibióticos como o norfloxacino, envolvendo possivelmente a inibição das bombas de efluxo bacteriana. Sobre a atividade antimicrobiana e moduladora de derivados de cumarinas, pode-se discutir alguns aspectos com sua relação estrutura-atividade: nesta classe de compostos, grupos doadores de elétrons como os substituintes alquilas parecem atuar aumentando a densidade eletrônica no anel benzopirona, o que aumenta a atividade potencializadora de compostos cumarínicos (DE ARAÚJO et al., 2016). Por outro lado, substituintes com características polares parecem diminuir tal atividade. A atividade antibacteriana de compostos cumarínicos que continham uma hidroxila livre na posição 8 contra cepas de *S. aureus* tiveram sua atividade reduzida ao promover acetilação do precursor (SHAKEEL-U-REHMAN et al., 2010). A acetilação em cumarinas e a presença de grupos nitro parecem exercer efeito negativo, diminuindo a densidade de elétrons no anel benzopirona e contribuindo para redução da atividade potencializadora.

Modelos de estudos de estrutura-atividade demonstram que a ausência de hidroxilas livres, carboxilas e outros grupos polares aumentam a atividade potencializadora de antibióticos das cumarinas, ou seja, derivados cumarínicos com maior presença de grupos polares se apresentam menos ativos com relação ao efeito modulador (PEDRETTI; VILLA; VISTOLI, 2004). Deve-se ressaltar que além do tipo de substituinte, o número de grupos polares e apolares e a posição desses grupos também afetam a relação estrutura-atividade das cumarinas em diversas atividades (GONG; XI; LIU, 2015; MATOS et al., 2015).

A partir dos resultados experimentais desse estudo, a cumarina C9 apresentou melhor atividade potencializadora do norfloxacino. Estruturalmente, ela possui um substituinte alquil-amino com distância de 2 carbonos entre amina e oxigênio o que pode ser utilizado como estratégia de modificação para aprimorar atividades biológicas (YU et al., 2019), além de possuir um grupo doador de elétrons como o grupo metila. Os grupos doadores como (CH₃- e CH₃-O-) são responsáveis pela melhora do potencial antioxidante de derivados cumarínicos 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituídos (DHARAVATH et al., 2020).

A cumarina C10, o composto com melhor atividade a redução da CIM do EtBr e o segundo na potencialização da atividade antibacteriana do norfloxacino, apresenta uma ramificação alquenila na substituição de uma hidroxila livre, o que representa uma vantagem frente aos seus análogos, já que aumenta sua superfície apolar, possivelmente reforçando sua atividade potencializadora.

A presença da carbonila cetônica na posição 8 na cumarina C13 reflete um momento de dipolo substancialmente maior do que os correspondentes alquenos, o que confere maior polaridade à molécula, possivelmente contribuindo para o menor efeito potencializador quando comparado ao composto C10. Contudo, enquanto a carbonila cetônica possui efeito retirador, no entanto, a hidroxila possui efeito doador e parece prevalecer sobre o efeito retirador da carbonila. O aumento da densidade eletrônica do anel benzopirona e, conseqüentemente, reforçar sua atividade de potencialização do efeito antibiótico.

O derivado cumarínico C11 apresenta, na sua estrutura, um oxigênio glicosídico na posição 7 do anel benzeno. Oxigênios glicosídeos possuem relevância biológica conhecida, muitos antibióticos são glicosídeos. Em alguns casos, os resíduos glicosídeos são cruciais para essa atividade, em outros, apenas melhoram suas características farmacocinéticas e, o aumento do volume da molécula conferido pela presença desse grupo, pode contribuir para um notável impedimento estérico numa possível inibição de bomba. No entanto, pode-se melhorar a atividade moduladora das cumarinas a partir da modificação dessa fração glicosídica com grupos alquila, o que geraria análogos com maior atividade (KŘEN; ŘEZANKA, 2008; YU et al., 2005).

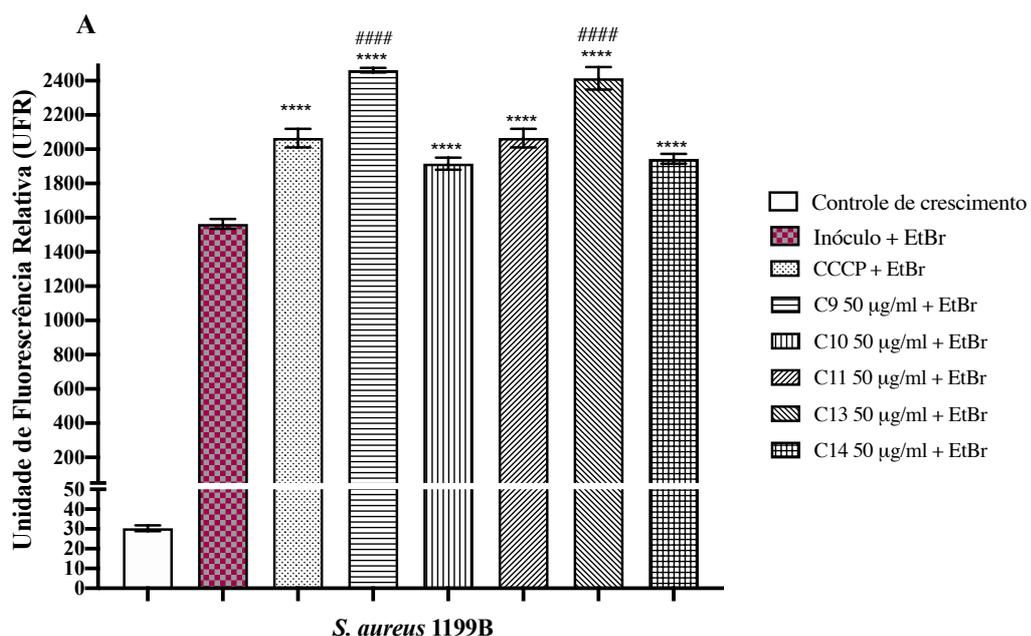
5.2.5 Avaliação da Inibição da Bomba de efluxo NorA por Emissão de Fluorescência de EtBr

Na tentativa de confirmar o efeito inibitório das cumarinas sobre o efeito da bomba de efluxo NorA, foi realizado o teste de inibição por emissão de fluorescência, considerado padrão

ouro nesse tipo de investigação. A medição da intensidade da fluorescência é um método válido e confiável na avaliação dos inibidores da bomba. Diversos estudos utilizam essa técnica, o que demonstra que essa análise é um parâmetro essencial para esse tipo de avaliação. Dentro da célula bacteriana, o EtBr pode intercalar e causar danos ao DNA enquanto emite uma fluorescência dependente da concentração (BLAIR; PIDDOCK, 2016; OLMSTED; KEARNS, 1977).

Na avaliação da inibição da bomba de efluxo por emissão de fluorescência do EtBr, de acordo com os resultados, a associação com todas as cumarinas testadas (C9, C10, C11, C13 e C14) nas concentrações de 50µg/mL ou 100µg/mL induziram um aumento na intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídio em comparação à bactéria associada apenas ao EtBr, como mostrado na Figura 14 (A e B). A fluorescência é emitida pelo brometo de etídio intercalado ao DNA bacteriano, portanto, quanto mais esse agente se acumula na célula, maior será a emissão da fluorescência, indicando maior potencial de inibição da bomba de efluxo NorA por parte das cumarinas testadas.

Embora todas as cumarinas testadas sejam indicativas de promoverem inibição de bomba, nas concentrações de 50µg/ml ou 100µg/ml, as cumarinas C9 e C13 induziram maior emissão de fluorescência que os compostos C11, C10 e C14, maior até que a emitida quando o brometo de etídio foi associado ao um inibidor de bomba de efluxo padrão (controle positivo) como o *Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazine* (CCCP) indicando essas duas cumarinas como as de maior potencial de inibição da bomba NorA em cepas de *S. aureus* 1199B.



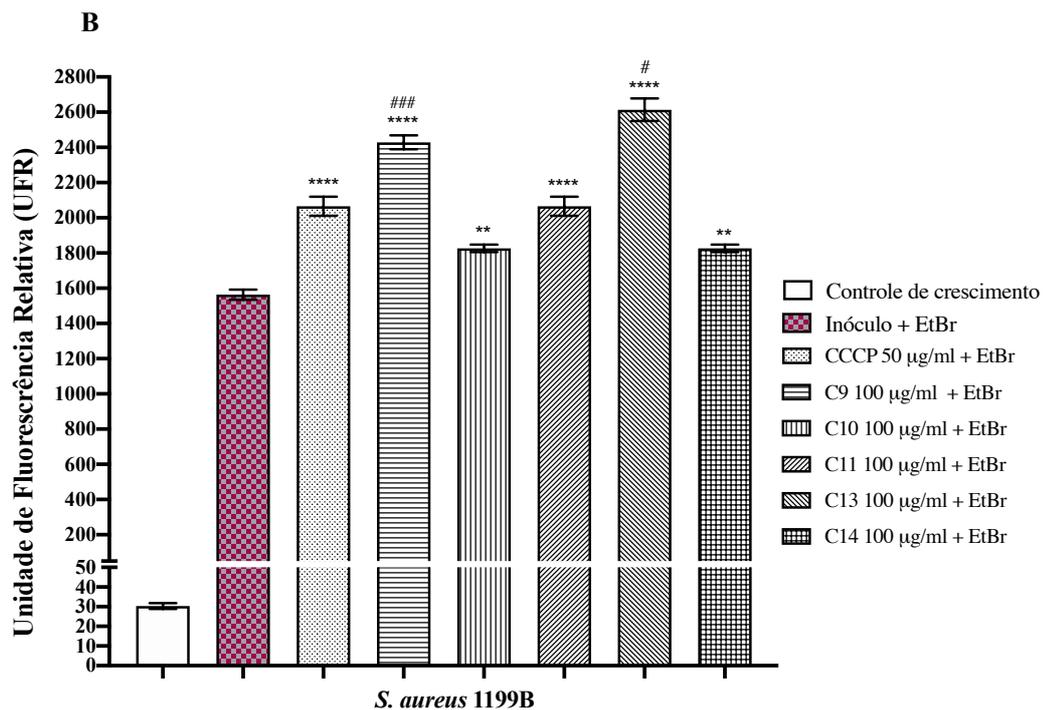


Figura 14. Avaliação da inibição da bomba de efluxo NorA pelos compostos C9, C10, C11, C13 e C14. Avaliado por emissão de fluorescência. (A) Derivados de cumarina em 50 µg/ml (B) Derivados de cumarina em 100 µg/mL.

** $p < 0,001$ vs inóculo + EtBr; **** $p < 0,0001$ vs inóculo + EtBr; # $p < 0,05$ vs CCCP; ### $p < 0,001$ vs CCCP; #### $p < 0,001$ vs CCCP; C9 = 7-hidroxi-4-metil-8-(morfolin-4-ilmetil)-2H-cromen-2-ona; C10 = 7-(Aliloxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona; C11 = 7-(alfa-D-Galactopiranosiloxi)-4-metil-2H-1-benzopirran-2-ona; C13 = 8-Acetil-7-hidroxi-4-metilcumarina; C14 = 7-hidroxi-4-metil-2H-cromen-2-ona; EtBr = brometo de etídio.

O aumento na fluorescência observada quando o EtBr foi associado a todas as cumarinas (C9, C10, C11, C13 e C14) testadas indica um aumento da permanência e concentração desse agente intercalante no citoplasma bacteriano. Esse resultado corrobora com os dados experimentalmente obtidos *in vitro*, no qual todos os compostos testados foram capazes de reduzir a CIM do EtBr. Como a bomba de efluxo é o único mecanismo conhecido relatado para a resistência ao EtBr (LIMAVERDE et al., 2017), as evidências da redução do CIM e aumento da fluorescência promovidos pelas cumarinas testadas sugerem que estas possuem propriedade inibidora da bomba de efluxo NorA.

Destaca-se o composto C13 que foi capaz de induzir o aumento significativo da fluorescência quando comparado ao inibidor padrão utilizado no teste, o CCCP. Esse resultado também corrobora com os dados obtidos *in vitro*, no qual a cumarina C13 demonstrou a capacidade de reduzir de forma significativa a CIM do EtBr associado ao inibidor de bomba padrão utilizado, a clorpormazina.

Recentemente, a inibição da bomba de efluxo NorA presente em cepas de *S.aureus* 1199B e, conseqüentemente o aumento do efeito antibacteriano das fluoquinolonas tem sido descrita através do aumento da fluorescência emitida pelo EtBr induzida pela associação com compostos que, quando usados isolados, não demonstram antibacteriana intrínseca. Esse efeito potencializador está relacionado a capacidade desses compostos inibirem a bomba NorA e aumentar a permanência e concentração das fluoroquinolonas dentro da célula bacteriana, aumentando assim, seu efeito farmacológico (FAILLACE et al., 2021; FELICETTI et al., 2018; OLIVEIRA-TINTINO et al., 2021a; TINTINO et al., 2020b). Esses achados corroboram com os apresentados no presente estudo.

Dessa forma, o uso de compostos que, embora não sejam capazes que atuar de forma bactericida ou bacteriostática direta quando usados de forma isolada em bactérias resistentes, ao serem associados à antibacterianos comumente utilizados, podem potencializar seu efeito ao inibir o efluxo e se tornar uma alternativa interessante no controle de infecções resistentes.

5.3 ANÁLISE COMPUTACIONAL DA INIBIÇÃO DA BOMBA DE EFLUXO NORA

5.3.1 *Docking*

Simulações de *docking* molecular foram realizadas com a proteína NorA e cinco derivados cumarínicos usando a mesma configuração de parâmetros para a grade a fim de mantê-la consistente entre os derivados que apresentaram melhores resultados experimentais. O objetivo do *docking* foi avaliar os sítios de ligação de cada cumarina e comparar a energia média de ligação relativa entre os derivados. Os dados resumidos estão na Tabela 6.

Tabela 6. Regiões, taxa de ocupação dos *clusters* e energias médias de ligação das cumarinas com a bomba de efluxo NorA

Composto	Cluster	Ocupação (%)	Região	Energia de ligação (Kcal/mol)
C9	1, 2	56	Inferior	-6,48
C10	1, 2 e 3	98	Superior	-5,99
C11	1	54	Central	-6,20
C13	1 e 3	99	Superior	-6,05
C14	1	100	Superior	-5,78
Clorpromazina	1, 3 e 11	54	Inferior, inferior e Central	-6,29

*A energia média escolhida foi a do cluster mais populoso

Inicialmente, as afinidades de ligação de três moléculas de cumarina (C9, C10 e C13) apresentaram os melhores resultados em diversos testes experimentais em comparação com a proteína NorA e com o inibidor padrão da bomba, clorpromazina. Para C9, foram observados dois *clusters* distintos (*Clusters* 1 e 2), localizados em uma região diferente da observada pela menadiona descrita em estudo anterior (aqui denominado como o sítio de ligação superior) (BHASKAR et al., 2016b; COSTA et al., 2016b; TINTINO et al., 2020b). O *Cluster* 1, com uma energia de ligação de -7,17 kcal/mol e 10 conformações, mostrou interações com resíduos-chave da proteína NorA, incluindo PHE306, ARG310, PHE140, ASN137 e GLU222. Notavelmente, interações potenciais de ligação de hidrogênio foram observadas entre C9 e esses resíduos, indicando interações eletrostáticas favoráveis.

O *Cluster* 2 (Figura 15-A), composto por 46 conformações com uma energia média de ligação de -6,48 kcal/mol, exibiu interações similares ao *Cluster* 1. O *Cluster* 4, posicionado na mesma região dos *Clusters* 1 e 2, apresentou uma energia de ligação de -5,74 kcal/mol com uma conformação. Os *Clusters* 3, 5 e 6 foram encontrados no sítio de ligação superior, sendo que o *Cluster* 3 foi o mais populoso (38 conformações) e exibiu uma energia média de ligação de -6,08 kcal/mol. Esses achados sugerem que C9 pode adotar múltiplos modos de ligação dentro do sítio ativo, potencialmente influenciando sua afinidade de ligação.

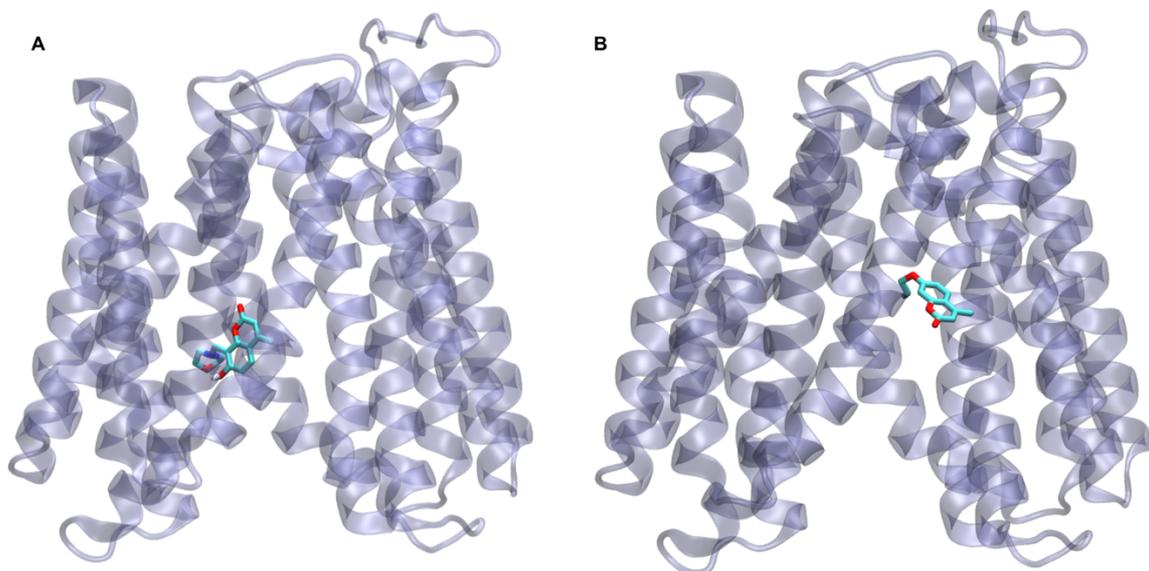


Figura 15. *Cluster* mais populoso para a cumarina (A) C9 e (B) C10 na bomba de efluxo NorA. As estruturas proteicas são mostradas em azul transparente, enquanto as moléculas de cumarina são representadas em formato de tubo, com átomos de carbono em verde, átomos de oxigênio em vermelho e átomos de nitrogênio em azul.

De forma semelhante, para C10, três *clusters* (Figura 15-B) foram identificados no sítio de ligação superior. O *Cluster 2*, o mais populoso com 52 conformações, apresentou interações com resíduos-chave como MET109, GLN51, PHE16, SER337, ILE15, ILE19 e ALA105, presentes na proteína NorA (Figura 16). Notavelmente, interações potenciais de ligação de hidrogênio foram observadas entre C10 e esses resíduos. O *Cluster 1*, com 22 conformações e uma energia média de ligação de -6,05 kcal/mol, e o *Cluster 3*, com 24 conformações e uma energia média de ligação de -5,93 kcal/mol, também ocuparam o sítio de ligação superior. O *Cluster 4*, posicionado na região alternativa de ligação observada para C9, exibiu uma energia de ligação de -5,76 kcal/mol. Esses achados sugerem que C10 pode adotar múltiplas conformações de ligação dentro do sítio de ligação superior e potencialmente estabilizar sua interação com a proteína NorA. No caso de C13, a maioria das conformações (93 de 94) agrupou-se no sítio de ligação superior (*Cluster 1*), indicando uma forte preferência por essa região. O *Cluster 1* exibiu uma energia média de ligação de -6,05 kcal/mol, sugerindo interações favoráveis com a proteína NorA. Resíduos-chave envolvidos nas interações com C13 no *Cluster 1* incluíram MET109, GLN51, PHE16 (interação de ligação de hidrogênio), ILE12, ILE19, ILE13 e SER337. Além disso, dois *clusters* menores (*Clusters 2 e 3*) foram observados, mas eles foram menos populados e localizados na região onde C9 foi encontrado.

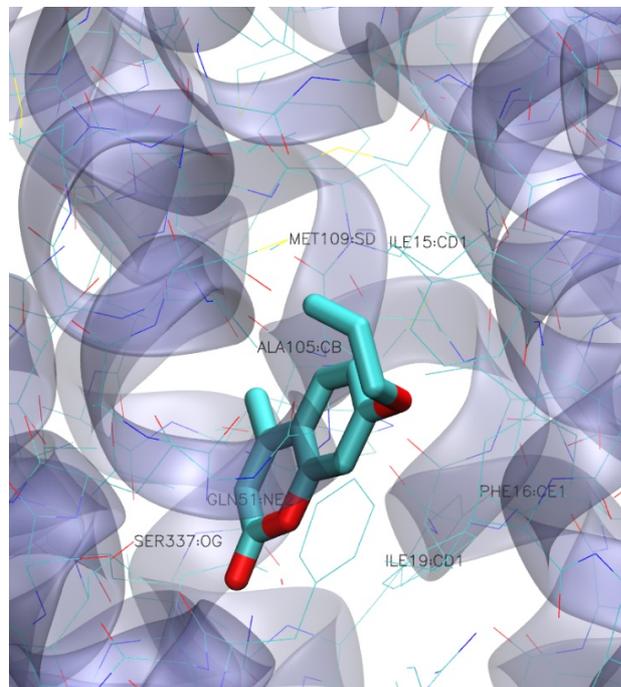


Figura 16. Visão ampliada do *cluster* mais populoso de C10 em NorA. Os resíduos vizinhos são representados em bastões. NorA está representado em azul transparente. C10 é representado em formato de tubo: átomos de C em verde, átomos de O em vermelho e átomos de N em azul.

Além desses três, as outras duas moléculas de cumarina promissoras, C11 e C14, foram avaliadas quanto às suas afinidades de ligação com a proteína NorA. C11, que possui sete torções ativas, apresentou um comportamento de ligação mais complexo. O *Cluster 1*, o *cluster* mais populoso com uma energia média de ligação de -6,20 kcal/mol e 54 conformações, ocupou uma posição entre o sítio de ligação superior e uma região alternativa (Figura 17-A). Ele apresentou interações com resíduos-chave, incluindo ASN340 (envolvido em múltiplas interações de ligação de hidrogênio), SER337 (ligação de hidrogênio), ILE15 e PHE16. No entanto, devido ao seu tamanho maior e ao número considerável de graus de liberdade torcionais, C11 apresentou notável impedimento estérico. A glicosilação da estrutura C11 frente aos seus análogos, atua modificando suas características. A maior presença de hidroxilas aumenta sua solubilidade em água, sendo a mais hidrofílica da série, apresentando muitos pontos de interação de ligações de hidrogênio, essenciais para interação com os sítios receptores e sua ação biológica (ABELIAN et al., 2021). No entanto, esse mesmo composto possui frente aos seus análogos uma elevada massa molar e uma elevada área de superfície superior e, já foi observado na literatura, uma correlação negativa de TPSA com dados de atividade para alcaloides anticâncer, agonistas MT1 e MT2, MAO-B e inibidores do fator de necrose tumoral- α (PRASANNA; DOERKSEN, 2009). A glicosilação nessa série de derivados cumarínicos demonstra afetar negativamente sua atividade biológica, o que já foi relatado com outros produtos naturais na literatura (KIM et al., 2015).

Os *Clusters 2 a 5* demonstraram semelhanças em seus modos de ligação, estando posicionados dentro da região central da molécula (Figura 17-B). O *Cluster 4*, em particular, mostrou interações com GLU222 (envolvido em interações de ligação de hidrogênio), LEU218 e ASN340, sugerindo um potencial efeito estabilizador na afinidade de ligação. O *Cluster 5* exibiu interações com PHE140, PHE303 (possivelmente envolvidos em interações pi-pi), ASP307 (interação de ligação de hidrogênio), bem como ASN137. O impedimento estérico e as possíveis interações de ligação de hidrogênio de C11 contribuem para sua versatilidade de ligação e podem influenciar sua afinidade de ligação geral, por ser um composto volumoso, são estabelecidas muitas interações com a proteína, no entanto, percebe-se uma dificuldade dessa molécula alcançar os sítios de ligação mais importantes. Em contraste, C14, que possui apenas uma torção ativa, exibiu um comportamento de ligação mais simples. O *Cluster 1* englobou todas as conformações e ocupou predominantemente o sítio de ligação superior. Ele apresentou uma energia média de ligação de -5,78 kcal/mol e interagiu com GLN51, MET109, SER337, ILE15 (envolvido em interação de ligação de hidrogênio) e PHE47. Notavelmente, C14 parecia

estar relativamente distante do sítio ativo em comparação com os outros derivados de cumarina, e suas interações dependiam principalmente de forças de van der Waals em vez de interações fortes de ligação de hidrogênio. Esses achados sugerem que C14 pode ter uma afinidade de ligação mais fraca em comparação com as outras cumarinas.

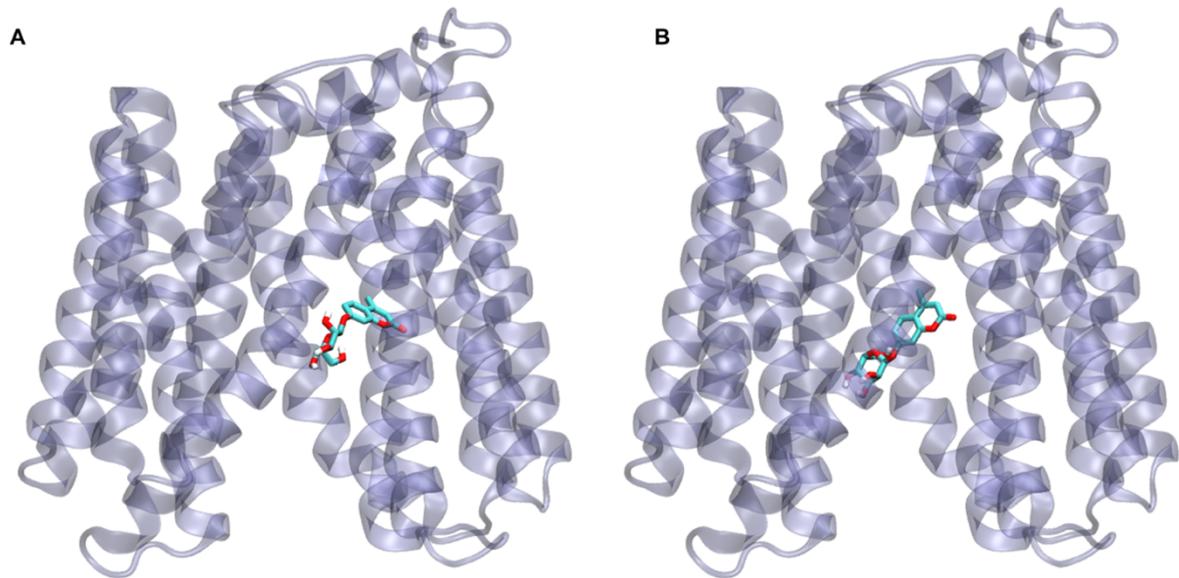


Figura 17. (A) *Cluster* mais populoso para a cumarina C11. (B) Outro modo de ligação para a C11 na região central da proteína Nora.

NorA está representada em azul claro transparente. C11 é representada em formato de tubo: átomos de C em verde, átomos de O em vermelho e átomos de N em azul.

De forma geral, os múltiplos modos de ligação observados para C9 e a forte preferência de C10 e C13 pelo sítio de ligação da parte superior da proteína sugerem que variações estruturais potenciais por diferentes substituintes que podem influenciar a afinidade de ligação e, conseqüentemente no efeito. Esse sítio de ligação já foi identificado em estudos anteriores com diferentes inibidores (BHASKAR et al., 2016a; COSTA et al., 2016a; SINGH et al., 2017; TINTINO et al., 2020a). A presença de interações de ligação de hidrogênio entre as cumarinas e resíduos de aminoácidos específicos, também sugere a importância das interações eletrostáticas no processo de ligação. C14 apresenta um comportamento de ligação mais direto, na qual todas as moléculas migraram para um mesmo espaço, 100% das moléculas em apenas um *cluster*, no entanto, no que diz respeito as interações, estas foram mais fracas e com número limitado de torções ativas, o que promove um maior distanciamento em relação ao sítio da parte superior, essa característica parece se refletir nos experimentos *in vitro*, na qual a C14 parece inibir a bomba reduzindo a CIM do EtBr e aumentando a RFU na fluorimetria, mas não

potencializa e efeito antibacteriano do norfloxacino. Em contraste, o tamanho maior de C11 e seu maior número de torções ativas contribuem para sua diversidade conformacional. Esses múltiplos modos de ligação em outras regiões da proteína juntamente com o impedimento estérico, contribuem para menor especificidade dessa molécula com a bomba NorA.

Considerando as simulações de *docking*, apoia-se a hipótese de que C9, C10 e C13 possuem o potencial de apresentar efeitos inibitórios mais fortes na bomba NorA em comparação com a clorpromazina. As energias de ligação favoráveis e as interações observadas nos resultados de *docking (in silico)*, juntamente com as observações experimentais (*in vitro*), ambas sugerem que essas cumarinas parecem ter maior afinidade pela proteína alvo e exibir propriedades inibitórias aprimoradas, quando comparadas à C11 e C14. A afinidade por essa área da proteína pode ser explicada pelo caráter mais hidrofóbico dessas três cumarinas, combinada com a característica também hidrofóbica da região superior de contato com a bomba, que apresenta resíduos de aminoácidos alifáticos como a isoleucina e alanina e aromáticos como a fenilalanina. O estudo de Tintino et al (2020), demonstrou que a vitamina K3 (menadiona), uma molécula também com características hidrofóbicas, é capaz de interagir e inibir a mesma região superior da bomba de efluxo NorA que as cumarinas desse estudo demonstraram (TINTINO et al., 2020b).

5.3.2 Dinâmica Molecular: Derivados de cumarina e membrana de Fosfatidilglicerol (POPG)

Outra possibilidade de mecanismo das cumarinas possuírem efeito potencializador da fluoroquinolona norfloxacino, seria uma possível interação e desorganização na membrana bacteriana, o que levaria a uma maior permeabilidade do antibiótico na célula. Essa possibilidade, instigou a investigação computacional da ação das cumarinas sobre a dinâmica molecular da membrana bacteriana.

Para investigar o potencial de permeação e os efeitos potenciais dos compostos cumarínicos na membrana bacteriana, foram realizadas simulações de Dinâmica Molecular (DM). Cinco unidades de cada composto de cumarina (C9, C10, C11, C13 ou C14) foram simuladas individualmente em uma bicamada de POPG por uma duração de 500 ns. A escolha do POPG como modelo lipídico foi baseada em sua representação da bicamada bacteriana. Essas simulações de DM visaram explorar o comportamento das cumarinas dentro da bicamada lipídica, bem como sua capacidade de permear a membrana e provocar quaisquer efeitos

combinados potenciais com a bomba de efluxo NorA. Ao examinar as trajetórias resultantes e analisar as interações das cumarinas, essas simulações fornecem *insights* valiosos sobre sua dinâmica, potencial desestabilização da estrutura da bicamada e influência geral nas propriedades da membrana.

As análises das simulações de DM incluíram o cálculo da área por grupo cabeça do lipídio (Figura 18) e da espessura da membrana (Figura 19) para cada caixa de simulação das cumarinas. Esses parâmetros são importantes para avaliar as características de integridade da membrana e, ao serem alterados, pode-se fazer uma relação com a mudança da permeabilidade da membrana.

As flutuações observadas nesses parâmetros estavam dentro dos valores de referência (DA HORA et al., 2016; KUČERKA et al., 2012; SHAHANE et al., 2019), demonstrando assim, que as cumarinas não afetaram esses parâmetros de forma importante.

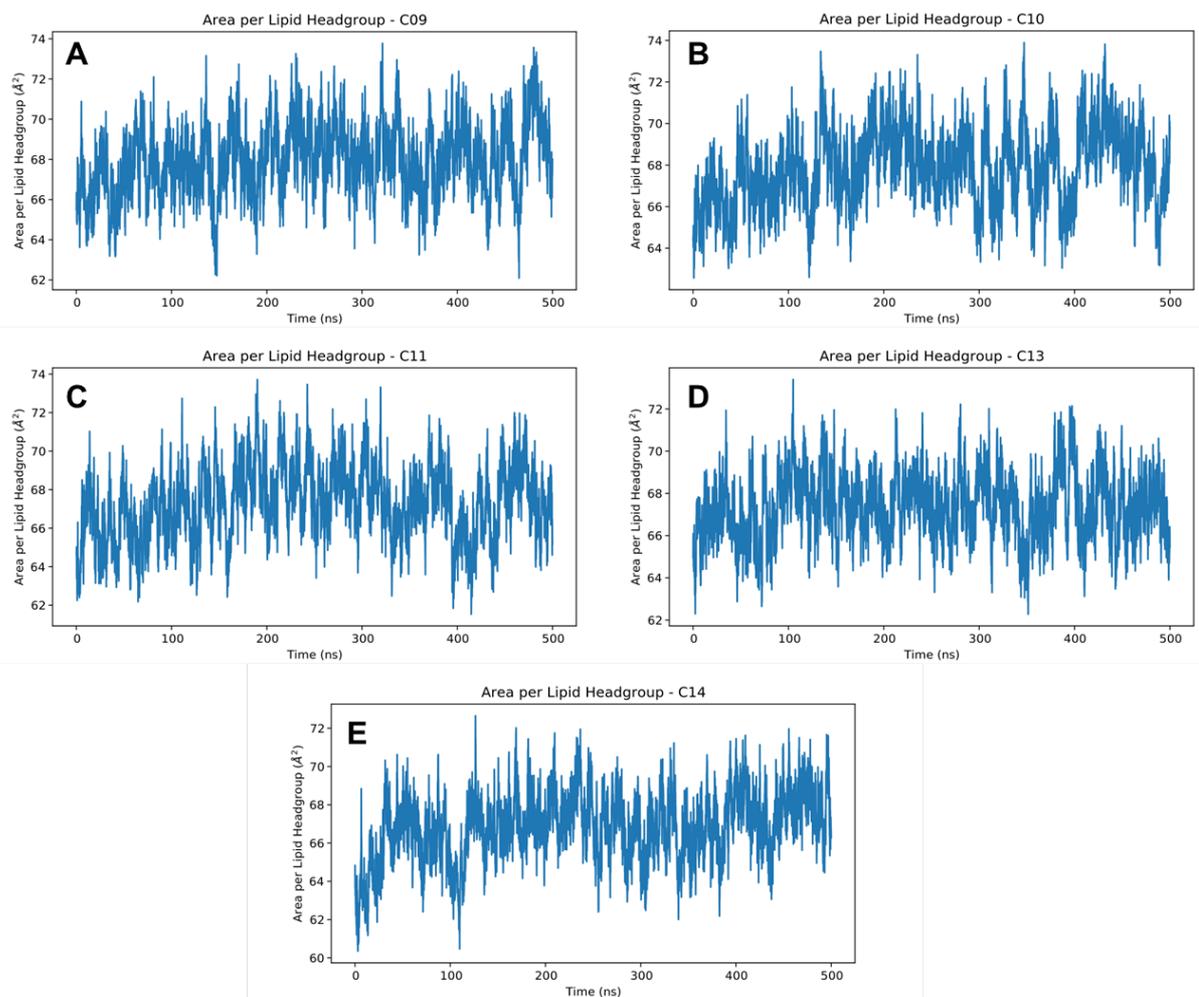


Figura 18. Área por grupo cabeça do lipídio POPG nas simulações com diferentes cumarinas. Valores médios: (A) 67,89; (B) 67,83; (C) 67,25; (D) 67,34 e (E) 66,84 Å².

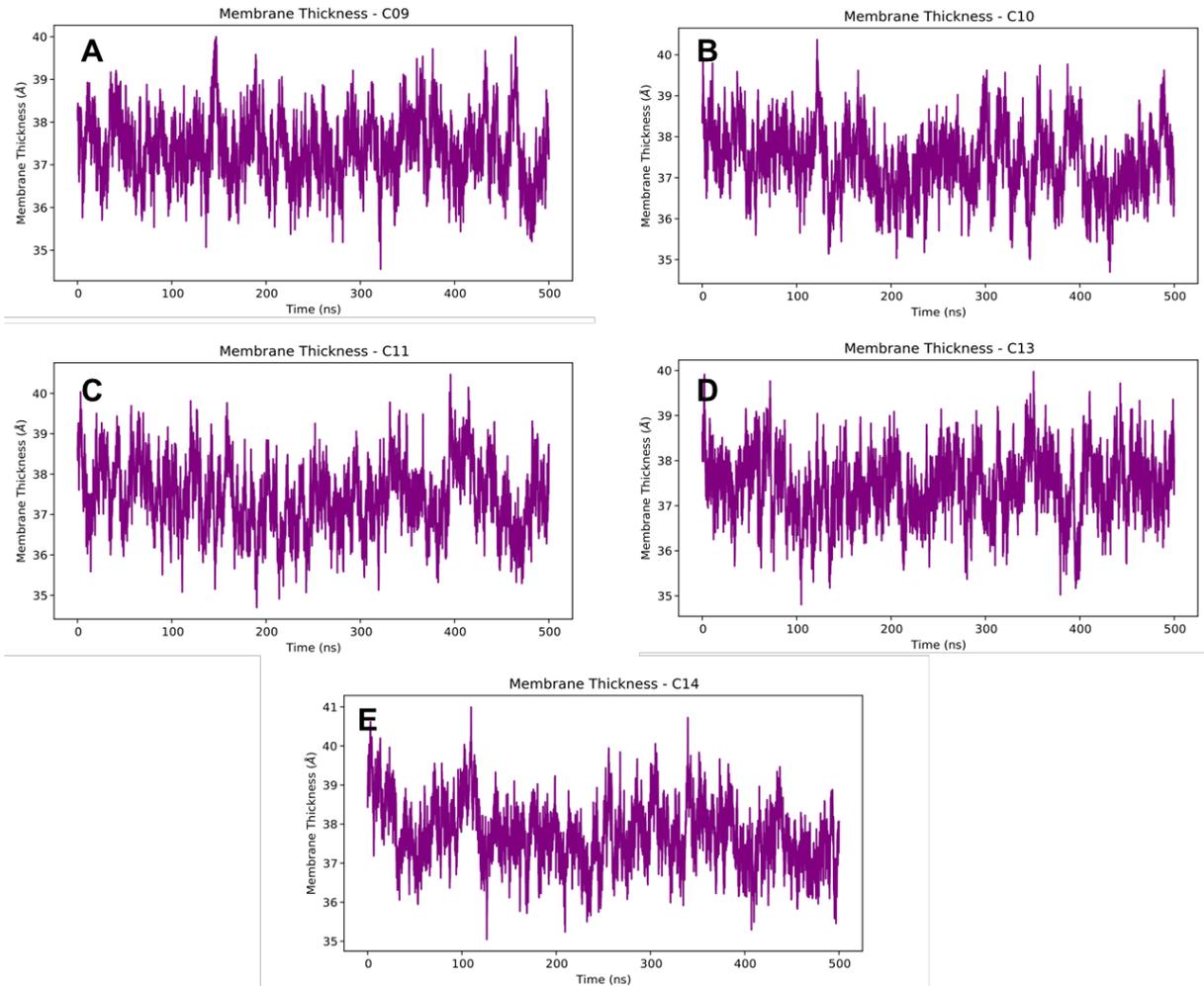


Figura 19. Espessura do lipídio POPG nas simulações com diferentes cumarinas. Valores médios: (A) 37,37; (B) 37,39; (C) 37,44; (D) 37,43 e (E) 37,72 Å.

Esses resultados indicam que a presença das cumarinas na bicamada de POPG não afetou significativamente as propriedades gerais da membrana, como evidenciado pelos valores médios semelhantes descritos para a uma membrana íntegra, que são de $66.0 \pm 1.3 \text{Å}^2$ para a área por cabeça de lipídio e $36.7 \pm 0.7 \text{Å}$ para espessura da camada da membrana (KUČERKA et al., 2012). Isso sugere que as cumarinas foram capazes de se incorporar na bicamada lipídica sem causar perturbações ou desestruturas significativas na membrana. As cumarinas apresentaram flutuações e movimento dentro da bicamada lipídica, explorando diferentes regiões da membrana durante o tempo de simulação. As cumarinas possuem capacidade de explorar a bicamada lipídica, possivelmente provocando alterações muito localizadas, sem promover comprometimento geral da membrana.

Para investigar a capacidade das cumarinas de difundir e permear a membrana, as posições (coordenada Z - ZCOM) do centro de massa de cada cumarina foram rastreadas para avaliar sua interação com a membrana de POPG (Figura 20).

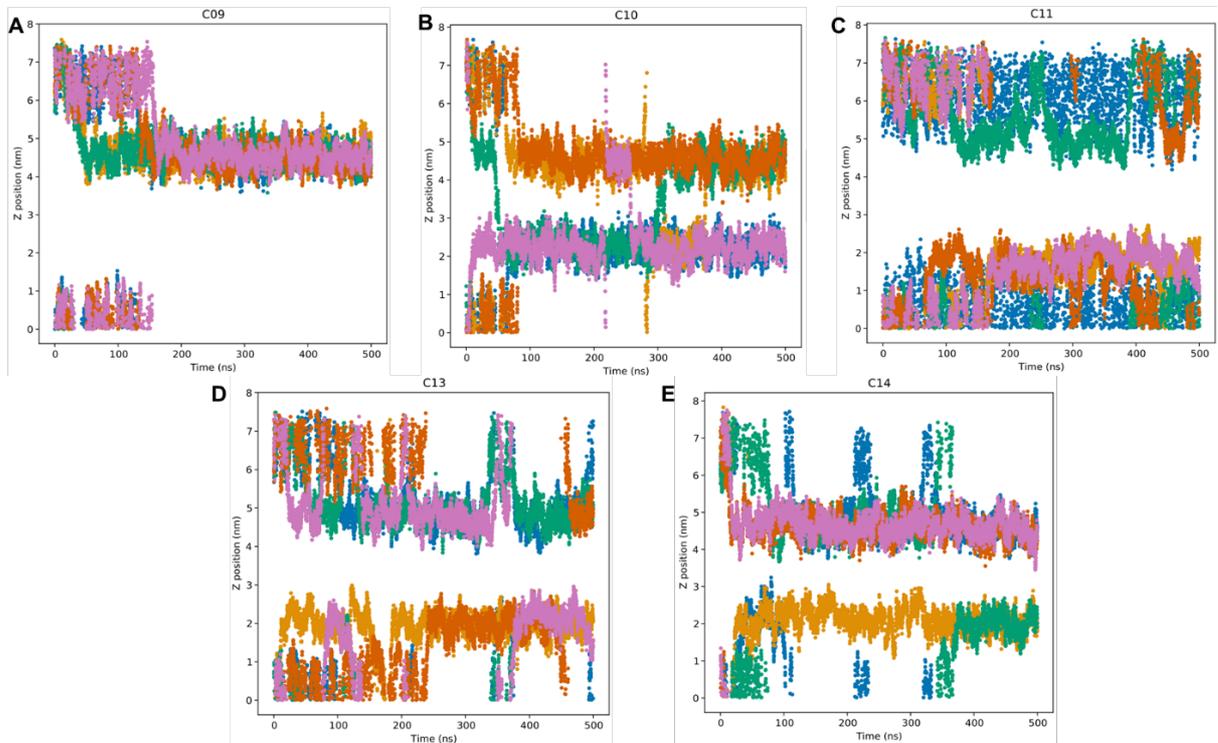


Figura 20. Posição Z do centro de massa de cada molécula (cores diferentes) de cada cumarina (C9, C10, C11, C13 e C14) na simulação da bicamada de POPG. O centro da bicamada está em torno de 3,6 nm.

A análise das posições ZCOM revelou comportamentos distintos entre as cumarinas. C9, mostrada na Figura 20-A, demonstrou uma ligação estável com camada superior da membrana de POPG, com penetração limitada no núcleo hidrofóbico. Esse comportamento sugere que C9 interage predominantemente com os grupos funcionais presentes na cabeça dos lipídios (porção polar) em vez de se intercalar na membrana. A estrutura de C9, com seus grupos funcionais polares, permite interações favoráveis com as cabeça dos ácidos graxos da membrana, ancorando-a à sua superfície. C10, como indicado na Figura 20-B, apresentou a capacidade de permear a membrana, indicando seu potencial para atravessar a bicamada lipídica. Essa observação reflete das características físico-químicas que a cumarina C10 possui, facilitando as interações com as moléculas lipídicas, permitindo assim, sua penetração na membrana. A estrutura de C10 possui um anel aromático não polar e cadeia lateral hidrofóbica, o que provavelmente facilita as interações com a região hidrofóbica da membrana de POPG,

permitindo que ela se incorpore na bicamada lipídica e a atravesse. Em contraste, C11, a cumarina glicosilada, permaneceu principalmente na fase aquosa ao longo da simulação, como ilustrado na Figura 20-C. A presença do grupo glicosilado dificulta suas interações com a bicamada lipídica, pois a presença desse grupo torna a cumarina C11 mais hidrofílica, limitando sua capacidade de incorporação na membrana. A natureza polar do grupo glicosídeo interrompe as interações favoráveis com a região hidrofóbica da membrana de POPG, resultando na preferência de C11 pelo ambiente aquoso. C13, representada na Figura 20-D, apresentou uma forte atração pela membrana, com penetração parcial na bicamada lipídica. Esse comportamento sugere que C13 possui interações favoráveis com as moléculas lipídicas, permitindo sua incorporação parcial no núcleo hidrofóbico. A estrutura de C13, com regiões polar (hidroxila e carbonila) e hidrofóbica (anel benzopirona), facilita as interações com a cabeça dos lipídios e com a região éster (hidrofílica) da bicamada de POPG. Por fim, C14 (Figura 20-E) apresentou uma tendência semelhante à de C10, com uma notável atração pela membrana. Embora C14 não tenha penetrado completamente na membrana, sua proximidade e interação favorável com as moléculas lipídicas sugerem uma forte afinidade pela bicamada lipídica. A permeação limitada de C14 e outras cumarinas pode ser atribuída à necessidade de superar uma barreira energética entrópica, que exigiria métodos de amostragem aprimorados para facilitar e verificar sua penetração completa (DA HORA; NGUYEN; SWANSON, 2022; FIKRET AYDIN et al., 2021). A estrutura de C14, caracterizada por sua hidroxila livre e seu anel aromático hidrofóbico, provavelmente contribui para suas interações com a região éster e as regiões hidrofóbicas compostas por hidrocarbonetos da membrana. Sua área média por cabeça de lipídio relativamente menor ($66,84 \text{ \AA}^2$) em comparação com os outros sistemas de cumarina-bicamada pode ser um indicativo de seu potencial para causar um impacto negativo na estrutura da membrana, no entanto, enfrenta uma maior barreira energética para um possível atravessamento.

Adicionalmente, o parâmetro de ordem de deutério (S_{CD}) foi calculado para examinar o possível efeito de desordenamento, provocado pelos compostos cumarínicos, na dinâmica das cadeias (oleil e palmitoil) dos ácidos graxos que compõe membrana de POPG (Figura 21). A ideia foi utilizar o S_{CD} para fornecer dados sobre a ordenação e o empacotamento das moléculas lipídicas e oferecer uma compreensão adicional da influência das cumarinas nas propriedades da membrana.

Esse parâmetro mede o ângulo do hidrogênio do carbono em relação à normal do carbono anterior da cauda. A mudança de ângulo, demonstra perturbação na estrutura e,

consequente, desordenamento. Quanto maior for o desordenamento das moléculas que compõe a membrana, maior será a interferência promovida pelas cumarinas.

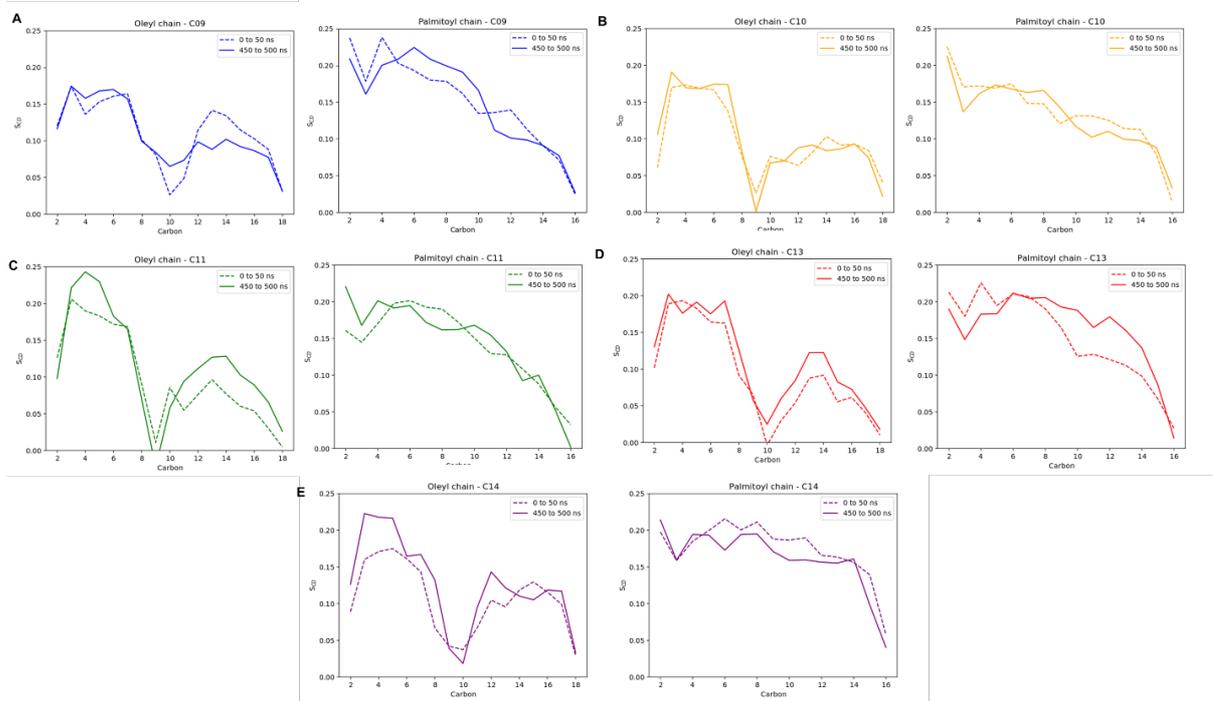


Figura 21. Parâmetro de ordem de deutério (S_{CD}) para as cadeias oleil e palmitoil do POPG no início (linha tracejada, 0 a 50 ns) e no final (linha sólida, 450 a 500 ns) da simulação para cada cumarina.

Para C9 (Figura 21-A), a análise do parâmetro de ordem de deutério revelou mudanças mínimas na cadeia oleil (insaturada) ao longo da simulação. No entanto, houve uma diminuição significativa na ordem em direção aos carbonos finais (12 a 17) da cadeia oleil. Na cadeia palmitoil (saturada), observou-se uma resposta mista, com aumento na ordem para os carbonos 6 a 10 e diminuição na ordem para os carbonos 2 a 5 e 11 a 14. Essas observações sugerem que C9 tem um impacto limitado na dinâmica geral das cadeias lipídicas, mas pode induzir perturbações localizadas específicas na membrana. No caso de C10 (Figura 21-B), a análise do parâmetro de ordem de deutério mostrou mudanças mínimas na cadeia oleil, indicando um efeito limitado na dinâmica das cadeias lipídicas. Da mesma forma, a cadeia palmitoil apresentou ligeiras diminuições na ordem para os carbonos 2 a 5 e 11 a 14, juntamente com um ligeiro aumento para os carbonos 7 a 10. Esses resultados reforçam ainda mais a noção de que C10 tem uma influência relativamente pequena na dinâmica das cadeias lipídicas e na estrutura geral da membrana e possivelmente, seu efeito se dê especificamente por sua afinidade pela bomba. Em contraste, C11 (Figura 21-C), a cumarina glicosilada, demonstrou aumento na ordem da cadeia oleil em direção ao final da simulação, sugerindo maior grau de ordenamento

das cadeias lipídicas. Essa observação pode ser atribuída à atração preferencial de C11 pelo ambiente aquoso, limitando suas interações com a bicamada lipídica. Na cadeia palmitoil, observou-se um aumento geral na ordem, exceto por uma diminuição na ordem entre os carbonos 5 a 9, o que demonstra um baixo impacto negativo no ordenamento da membrana. Em relação a C13 (Figura 21-D), foi observado um leve aumento na ordem para a cadeia oleil, com um aumento mais substancial nos carbonos 8 a 15 da cadeia palmitoil. No entanto, foi observada uma diminuição significativa na ordem para os carbonos 2 a 5 da cadeia palmitoil, sendo possivelmente a região próxima de interação entre essa cumarina e o ácido graxo. Por fim, para C14 (Figura 21-E), foi observado um aumento significativo na ordem no início da cadeia oleil (carbonos 2 a 6), indicando um empacotamento lipídico mais ordenado nessa região. Na cadeia palmitoil, observou-se uma diminuição notável na ordem entre todos os átomos, a partir do carbono 4. Essas observações sugerem que C14 induz perturbações localizadas na dinâmica das cadeias lipídicas, possivelmente devido a interações específicas com a membrana.

Embora a dinâmica geral das cadeias lipídicas seja minimamente afetada, cumarinas específicas, como C9 e C14, apresentam perturbações localizadas na ordenação das cadeias lipídicas, sugerindo perturbações potencialmente limitadas na estrutura da membrana. É mais provável que o efeito potencializador da atividade antibacteriana do norfloxacino observada *in vitro* na associação com a maioria das cumarinas, seja devido a sua atração pela membrana e posterior migração para a bomba de efluxo NorA. Essas descobertas reforçam ainda mais a ideia de que C10, com sua capacidade de permeação (ZCOM), e C13, com suas interações (ZCOM) com a bicamada lipídica, favoreçam a chegada até a proteína. Dessa forma podem apresentar efeitos combinados com a bomba NorA na inibição de sua atividade.

5.3.3 Dinâmica Molecular: complexo NorA-POPG e C10 e NorA-POPG e C13

Nesta parte do estudo, direcionamos nossa investigação para os compostos cumarínicos C10, devido aos resultados promissores obtidos nos estudos de *docking* e à sua capacidade de permear a membrana na ausência de qualquer potencial de viés e C13, devido as suas fortes interações com a bomba. Para obter uma compreensão mais aprofundada sobre a migração e os potenciais efeitos inibidores da proteína do composto C10 e C13, foram realizadas simulações de dinâmica molecular (DM) do complexo NorA-POPG com a incorporação de cinco unidades de C10 ou C13.

Ao incorporar a bomba NorA em uma bicamada de POPG e introduzir cinco unidades de C10 (Figura 22-A), nosso objetivo foi elucidar o comportamento dinâmico do complexo e compreender a interação entre C10, a membrana e a bomba de efluxo NorA.

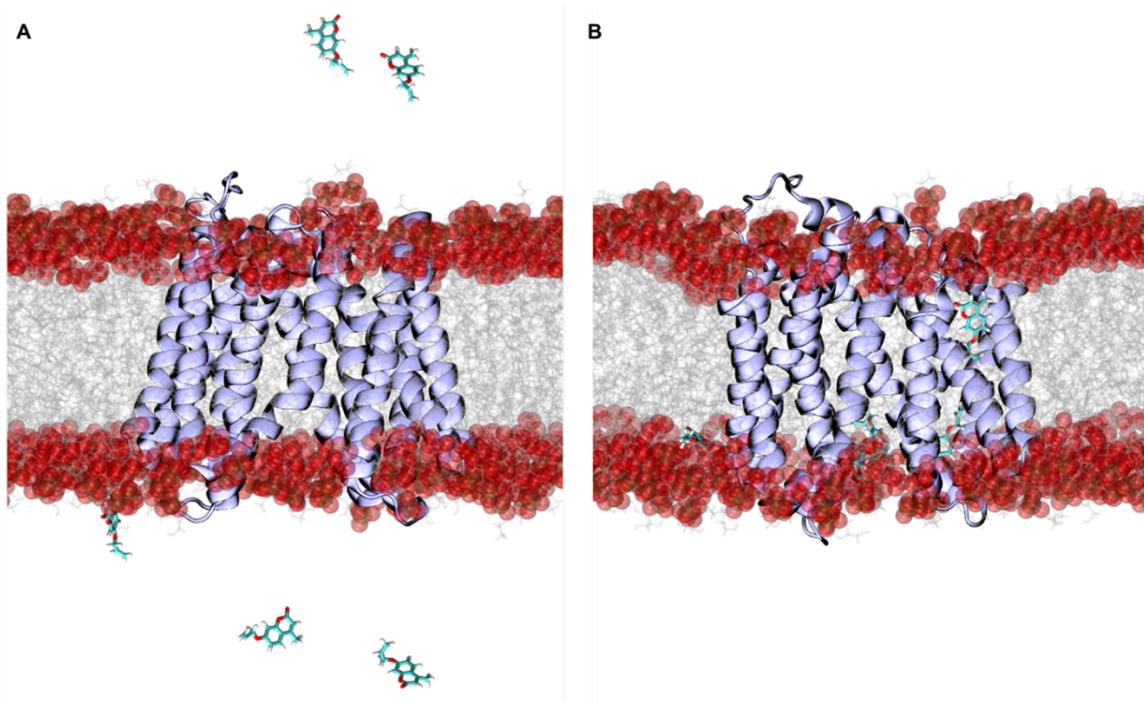


Figura 22. (A) Quadro inicial e (B) quadro final de uma simulação da bicamada lipídica POPG com a bomba NorA e moléculas de cumarina C10.

As cadeias hidrofóbicas são representadas como bastões cinzas, enquanto os oxigênios da parte hidrofílica são representados por esferas vermelhas. A proteína transmembranar NorA é representada em azul-claro e as cumarinas em tubos verdes (carbono), brancos (hidrogênio) e vermelhos (oxigênio).

No quadro inicial e no quadro final (Figura 22-A e B, respectivamente) da simulação NorA-POPG e C10, observamos a rápida (ZCOM) atração das moléculas de cumarina em direção à bicamada lipídica, o que está de acordo com as simulações anteriores de C10 e a membrana isolada. Ao atingir a membrana, as cumarinas C10 imediatamente interagem com a proteína NorA, permanecendo em contato próximo ao longo de toda a trajetória. Notavelmente, quatro das cinco moléculas de cumarina (Figura 23-A) conseguem encontrar seu caminho em direção à parte interna da proteína, indicando seu potencial para acessar o sítio de ligação e interferir potencialmente na função da bomba.

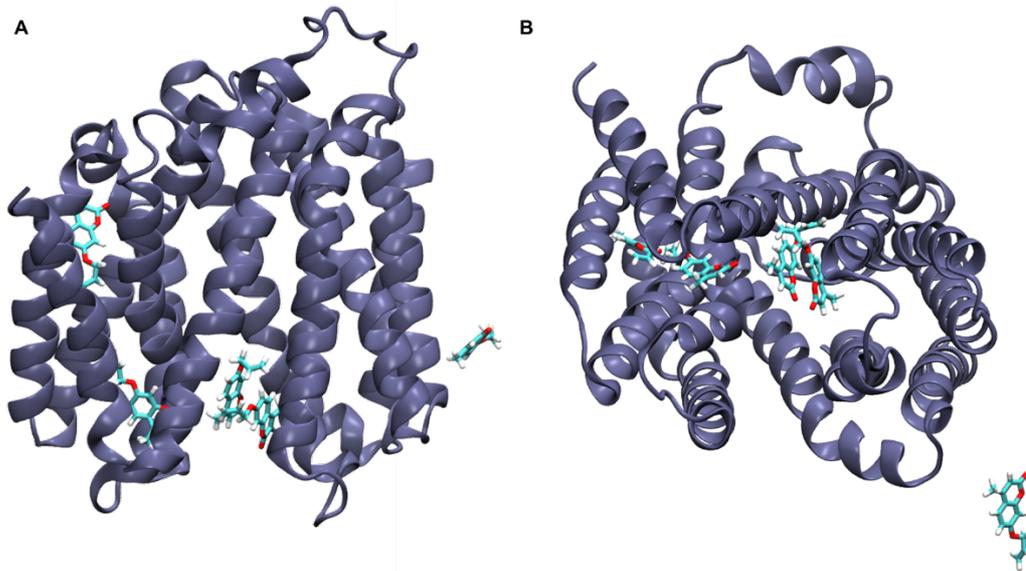


Figura 23. (A) Visão frontal e (B) Visão inferior da imagem final da simulação de C10 com a NorA incorporada na bicamada lipídica POPG. A NorA é representada em azul sólido. As moléculas de C10 estão em tubos verdes (carbono), brancos (hidrogênio) e vermelhos (oxigênio).

Além disso, a Figura 23-B apresenta uma visão detalhada do complexo da proteína NorA com quatro das cinco moléculas de cumarina C10 localizadas dentro do sítio de ligação. Essa observação corrobora a ideia de que esse composto têm o potencial de inibir a função da bomba de efluxo NorA, bloqueando o caminho que seria usado para extrusão do antibiótico e, dessa forma, reestabelecendo o efeito do norfloxacin, corroborando com o que foi observado nos experimentos *in vitro*. Interessantemente, a C10 apresenta interações entre si em uma região que lembra o *cluster* mais populoso observado na análise de acoplamento de C9 (*Cluster 2*). Isso sugere que essa cumarina pode adotar uma conformação que efetivamente impede o canal da bomba, reforçando ainda mais o seu papel inibitório, embora as moléculas do *cluster* mais populoso de C10 na análise de acoplamento não tenham sido observadas nessa região. É plausível que o tempo de simulação (250 ns) não tenha sido suficiente para a sua migração. Simulações mais longas ou a utilização de múltiplas cópias de C10 (sistema supersaturado) poderiam facilitar a exploração dessa região crítica.

Uma análise de contatos também foi realizada para investigar a estabilidade da interação entre as cumarinas C10 e a bomba de efluxo NorA (Figura 24-A). Os contatos foram definidos com base em um critério de proximidade, considerando que uma molécula está em contato com a proteína quando se aproxima a uma distância de 4,5 Å de qualquer resíduo. Essa análise indica a dinâmica e a durabilidade das interações cumarina-proteína, destacando a natureza robusta e persistente dessas interações ao longo da simulação. O alto número de

contatos observados, que rapidamente atingiu um platô e se manteve relativamente estável (acoplamento e desacoplamento) indica uma associação forte e contínua entre as cumarinas C10 e a proteína NorA.

Entre as interações cumarina-cumarina, conseguimos detectar que três das cumarinas exibem interações coulômbicas (interação de carga entre as cumarinas), especialmente por meio de interações O-H, enfatizando o papel das ligações de hidrogênio em sua interação. De forma bastante intrigante, o *cluster* revela a presença de interações pi-pi entre as cumarinas C10 (Figura 24-B). Essas interações pi-pi sugerem que o arranjo estrutural específico das cumarinas, como os anéis aromáticos, desempenham um papel crucial na facilitação das interações intermoleculares. A formação dessas interações intermoleculares entre as cumarinas C10 não apenas demonstra sua capacidade de interagir com a proteína NorA, mas também destaca a importância potencial de suas características estruturais na modulação de seus efeitos inibitórios sobre a bomba.

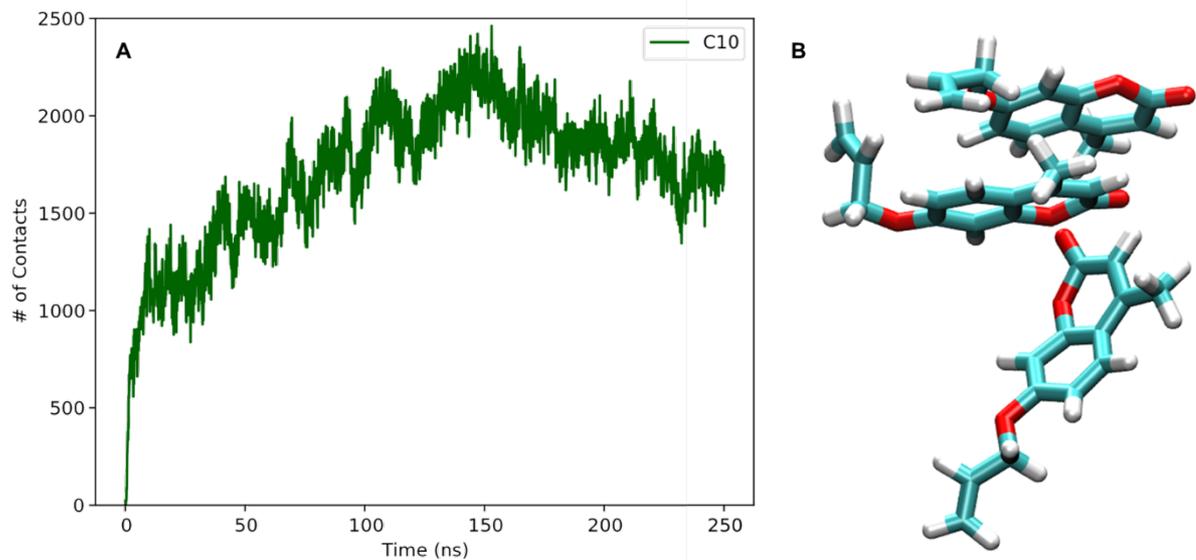


Figura 24. (A) Número de contatos das cumarinas C10 com a bomba de efluxo NorA. (B) Instantâneo de três cumarinas C10 mostrando diferentes mecanismos de interação.

Além das observações relacionadas à membrana, as simulações de dinâmica molecular do complexo NorA-POPG com C10 revelaram uma rápida atração das cumarinas em direção à membrana, seguida por suas interações imediatas com a proteína NorA. As cumarinas C10 permaneceram em contato próximo com a proteína ao longo da trajetória, bloqueando efetivamente o canal da bomba. A estabilidade e frequência das interações entre as cumarinas

C10 e a proteína foram corroboradas pela análise de contatos, que demonstrou um alto número de contatos persistentes entre as moléculas de C10 e os resíduos proteicos. Esses achados sugerem que a cumarina C10 têm o potencial de inibir a bomba NorA por meio de sua forte e contínua associação com a proteína. Além disso, esta característica permite que as cumarinas interaja com outras cumarinas por meio de ligações de hidrogênio e interações π - π de seus anéis aromáticos dentro da bomba de efluxo, o que contribui para sua ligação estável. Portanto, este resultado indica que a interação dessas cumarinas com a NorA promovem realmente a inibição da bomba, observada experimentalmente através da redução da CIM do e aumento emissão de fluorescência do brometo de etídio. Efeito semelhante foi observado na inibição da bomba NorA pela menadiona, que como as cumarinas, conseguem se aglomerar através dessas interações intermoleculares, o que pode levar a um maior bloqueio físico do canal (TINTINO et al., 2020a).

Realizamos, também, simulações de dinâmica molecular para investigar o comportamento da cumarina C13 no complexo NorA-POPG. Assim como a C10, observamos que a C13 foi prontamente atraída tanto para a membrana lipídica quanto, principalmente, para a bomba NorA. Em menos de 20 ns de simulação a maioria das moléculas de C13 já havia estabelecido interações com a bomba (Figura 25). Além do sítio de interação, foram identificadas na superfície externa da bomba, indicando que as cumarinas foram atraídas em direção à proteína. O número de contatos entre as cumarinas e a bomba NorA aumentou de forma semelhante ao observado com a C10 durante os primeiros 25 ns de simulação (Figura 26). No entanto, a partir desse ponto, notamos uma distinção marcante entre a C13 e a C10, enquanto a C10 mantinha interações persistentes com a bomba NorA ao longo de toda a simulação, a C13 apresentou um comportamento diferente.

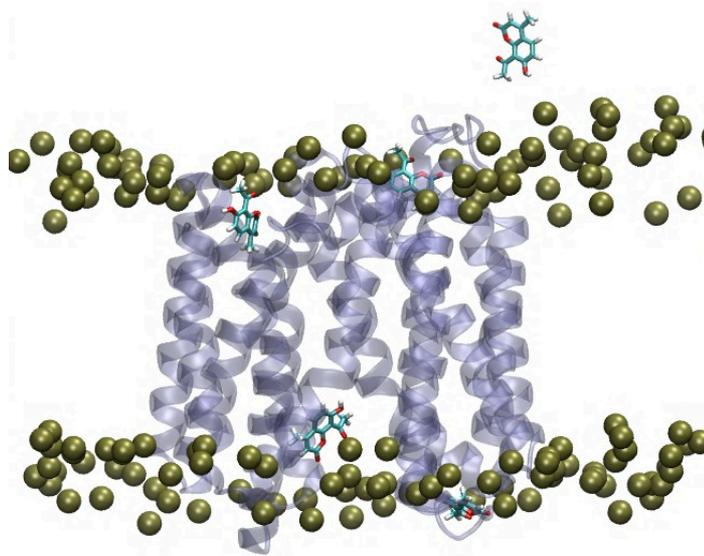


Figura 25. Representação do complexo NorA-POPG com moléculas de cumarina C13 aos 20 ns iniciais. Simulação evidencia os múltiplos sítios de interação iniciais na parte externa da membrana. Uma das cumarinas adentra no canal.

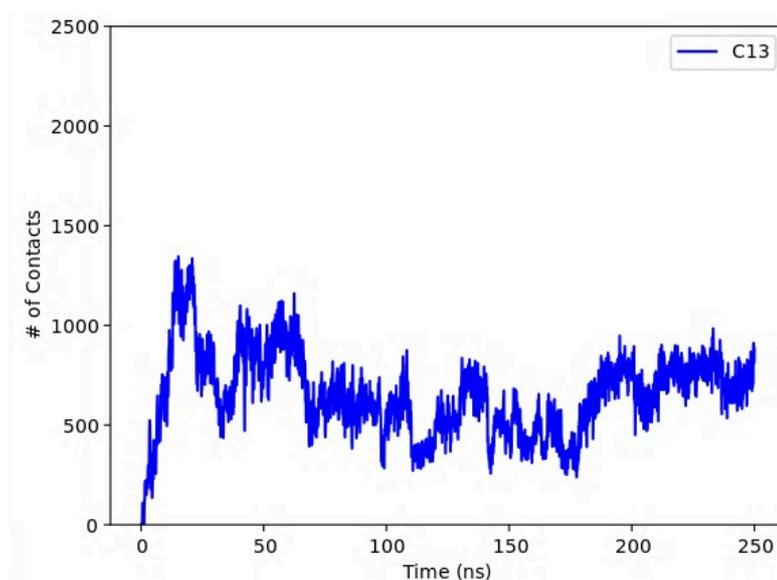


Figura 26. Número de contatos das cumarinas C13 com a bomba de efluxo NorA.

Apenas uma das cumarinas de C13, inicialmente localizada próxima à região mais ampla do canal da bomba, exibiu interações consistentes e adentrou o canal, permanecendo aprisionada ao longo de toda a simulação (Figura 27). Essa observação ressalta uma diferença significativa no comportamento das duas cumarinas, indicando que suas variações estruturais

desempenham um papel importante no mecanismo de ligação e nos efeitos inibitórios na bomba NorA.

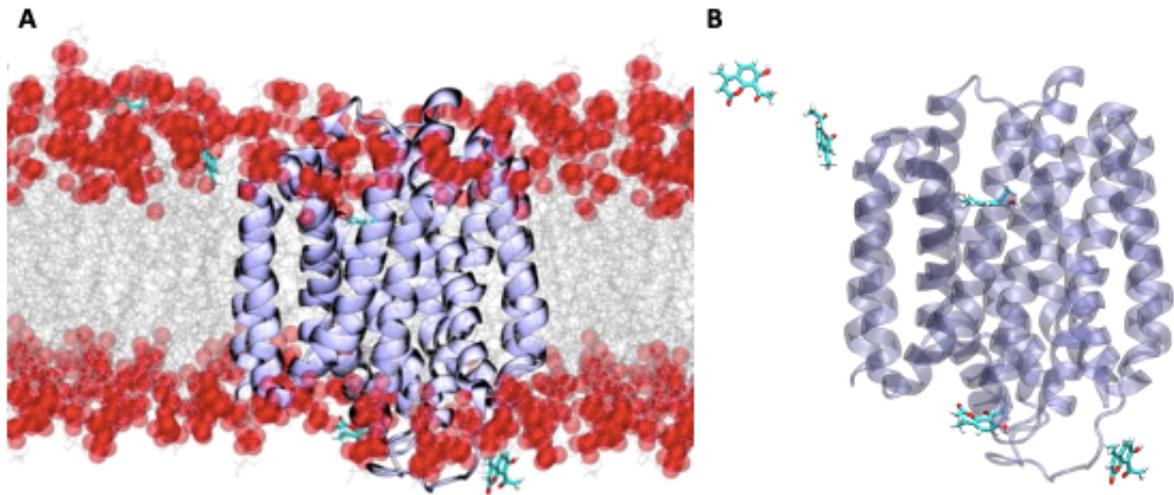


Figura 27. (A) Simulação da bicamada lipídica POPG com a bomba NorA e moléculas de cumarina C13. (B) Visão frontal da imagem final da simulação de C13 com a NorA incorporada na bicamada lipídica POPG.

Além disso, diferentemente da C10, não foram observadas interações intermoleculares persistentes ou interações π - π entre as moléculas de C13. Isso sugere que as características estruturais específicas da C10 desempenham um papel fundamental na facilitação de interações intermoleculares. Essas descobertas destacam a importância de considerar as diferenças estruturais entre as cumarinas C10 e C13 ao avaliar possíveis alterações para aumento do potencial inibitório na bomba NorA.

Um resumo dos principais questionamentos, métodos e achados da pesquisa estão descritos na Figura 28.

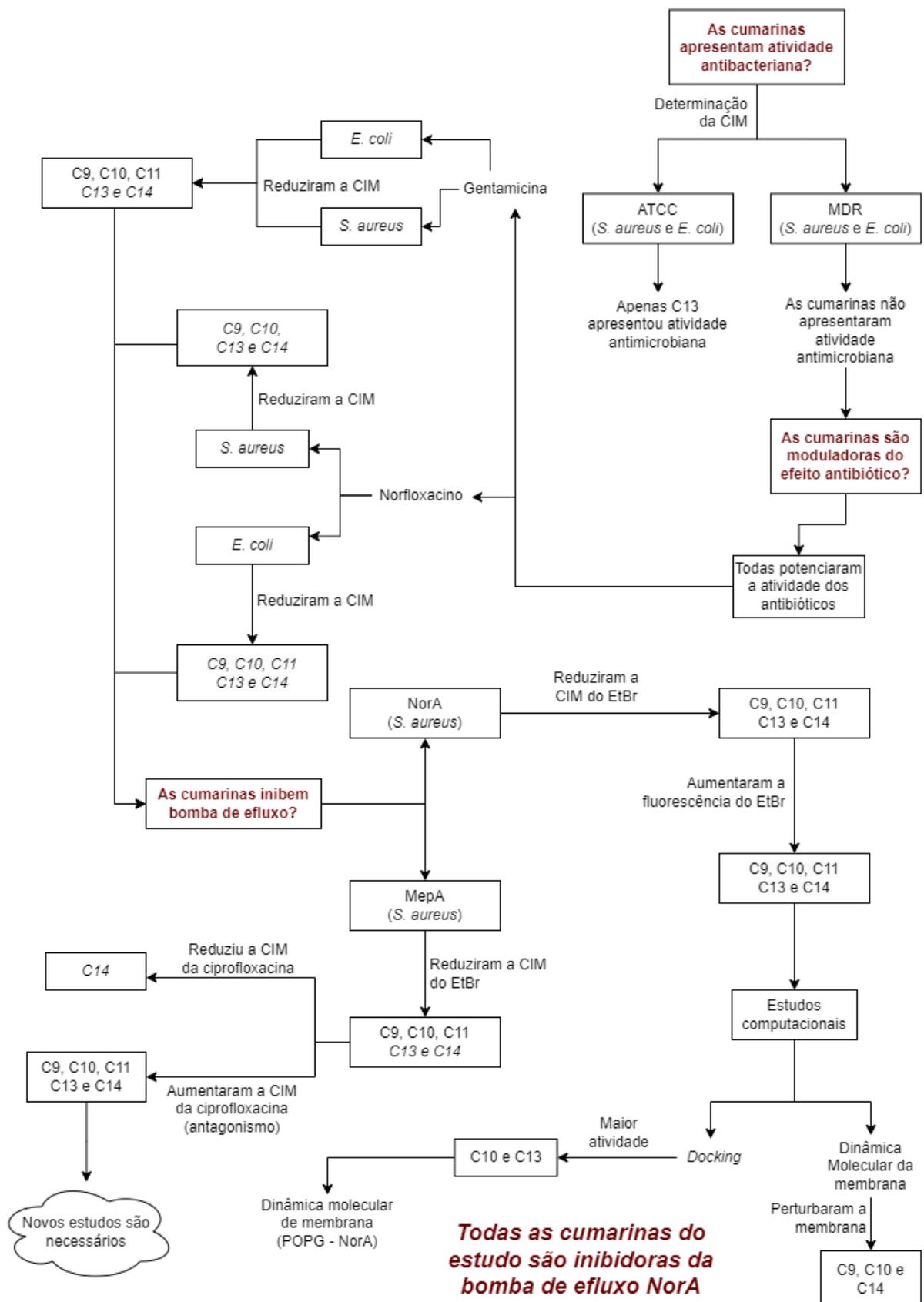


Figura 28. Síntese do fluxo de trabalho baseado nos principais achados de cada fase.

6 CONCLUSÃO

A velocidade com que as bactérias desenvolvem mecanismos de resistência aos antibacterianos existentes é significativamente maior do que a velocidade com que a ciência consegue desenvolver novos fármacos que sejam mais potentes e capaz de combater a resistência.

Todos os derivados cumarínicos investigados possuem propriedades potencializadoras de antibióticos contra cepas multirresistentes de *S. aureus* 10 e *E. coli* 06. Além de potencializar o efeito dos antibacterianos norfloxacino e gentamicina, o derivado C13 demonstrou efeitos antibacterianos clinicamente relevantes quando utilizado sozinho. Embora os mecanismos subjacentes aos efeitos antibacterianos dos derivados da cumarina contra essas cepas permaneçam incertos, a análise *in silico* indica que esses compostos possuem propriedades físico-químicas, perfis farmacocinéticos e características que possibilitam seu possível uso por via oral.

O estudo *in vitro* com a bomba de efluxo MepA, mostrou que todos os derivados cumarínicos estudados reduziram a concentração inibitória mínima de brometo de etídio contra a cepa *Staphylococcus aureus* K2068. No entanto, apenas a cumarina C14 produziu efeitos sinérgicos quando associada à ciprofloxacina.

Quando testadas em cepas de *Staphylococcus aureus* 1199B portadores da bomba de efluxo NorA, todas as cumarinas (C9, C10, C11, C13 e C14) apresentam potencial inibitório da bomba de efluxo, destacando os compostos C9, C10 e C13 que parecem interagir com a bomba de forma mais potente. A análise abrangente das simulações de dinâmica molecular e encaixe, propriedades da membrana, comportamento da cumarina e interações cumarina-proteína fornecem valiosas informações sobre o potencial desses compostos como inibidores ativos de membrana da bomba NorA. As cumarinas C10 e C13 se destacam pela capacidade de permear a membrana, possuírem rápida atração em direção à membrana e interagir imediatamente com a proteína NorA, bloqueando efetivamente seu canal. Os tipos de interações intermoleculares entre as moléculas de C10 e o alto número de contatos entre essas cumarinas e os resíduos proteicos demonstram estabilidade na interação, confirmando seu poder inibidor da bomba NorA.

As observações apoiam a noção de que as cumarinas podem reestabelecer a atividade antibacteriana das fluoroquinolonas em bactérias como mecanismo de resistência por bomba de efluxo NorA e esse efeito pode estar relacionado com um modo de ação combinado, como

uma boa interação e atração com a membrana (C10 e C13), mas principalmente pela capacidade de interação e inibição da proteína NorA (C9, C10, C11, C13 e C14), destacando assim, a promessa desses derivados como inibidores eficazes, o que pode vir a ser uma alternativa interessante no controle de infecções resistentes. No entanto, estudos que avaliem esses efeitos em ensaios pré-clínicos *in vivo* se faz necessário e é fundamental para continuidade da comprovação do efeito inibidor de bomba desses derivados cumarínicos.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-BAKY, R. M. et al. A novel mechanism of action of ketoconazole: inhibition of the NorA efflux pump system and biofilm formation in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 12, p. 1703–1718, jun. 2019.
- ABELIAN, A. et al. Pharmaceutical chemistry. Em: **Remington**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 105–128.
- ABU-AISHEH, M. N. et al. Coumarin derivatives as acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors: An in vitro, molecular docking, and molecular dynamics simulations study. **Heliyon**, v. 5, n. 4, p. e01552, abr. 2019.
- ALVES BORGES LEAL, A. L. et al. Potentiating activity of Norfloxacin by synthetic chalcones against NorA overproducing *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 155, p. 104894, jun. 2021.
- APJOK, G. et al. Limited Evolutionary Conservation of the Phenotypic Effects of Antibiotic Resistance Mutations. **Molecular Biology and Evolution**, v. 36, n. 8, p. 1601–1611, 1 ago. 2019.
- ASHIMA K. BHARDWAJ; PRIYABRATA MOHANTY. Bacterial Efflux Pumps Involved in Multidrug Resistance and their Inhibitors: Rejuvenating the Antimicrobial Chemotherapy. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 7, n. 1, p. 73–89, 1 maio 2012.
- BAGGOT, J. D. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. **Annales De Recherches Veterinaires. Annals of Veterinary Research**, v. 21 Suppl 1, p. 29S-40S, 1990.
- BARRETO, H. M. et al. Effect of *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 6, n. 5, p. 560–564, out. 2014.
- BECKE, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. **Physical Review A**, v. 38, n. 6, p. 3098–3100, 1 set. 1988.
- BENTO, A. P. et al. The ChEMBL bioactivity database: an update. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D1083–D1090, jan. 2014.
- BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 1984.
- BETONI, J. E. C. et al. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 4, p. 387–390, jun. 2006.

- BHARDWAJ, A. K.; MOHANTY, P. Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: rejuvenating the antimicrobial chemotherapy. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 7, n. 1, p. 73–89, abr. 2012.
- BHASKAR, B. V. et al. Homology modeling, molecular dynamics, and virtual screening of nora efflux pump inhibitors of *Staphylococcus aureus*. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, n. October, p. 3237–3252, 2016a.
- BHASKAR, B. V. et al. Homology modeling, molecular dynamics, and virtual screening of NorA efflux pump inhibitors of *Staphylococcus aureus*. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume 10, p. 3237–3252, out. 2016b.
- BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, jan. 2015.
- BLAIR, J. M. A.; PIDDOCK, L. J. V. How to Measure Export via Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps. **mBio**, v. 7, n. 4, p. e00840-16, 7 set. 2016.
- BOLHUIS, H. et al. Mechanisms of multidrug transporters. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55–84, ago. 1997.
- BRINK, A. J. Epidemiology of carbapenem-resistant Gram-negative infections globally: **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 32, n. 6, p. 609–616, dez. 2019.
- BRITO, S. M. O. et al. Analysis of bioactivities and chemical composition of *Ziziphus joazeiro* Mart. using HPLC–DAD. **Food Chemistry**, v. 186, p. 185–191, nov. 2015.
- BUSH, K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 10, p. e01076-18, out. 2018.
- BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 3, p. 205–210, set. 2003.
- C REYGAERT, W. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482–501, 2018.
- CASPI, R. et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes - a 2019 update. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D445–D453, 8 jan. 2020.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2013 (Report) – VoICE**. Disponível em: <<https://immunizationevidence.org/sources/antibiotic-resistance-threats-in-the-united-states-2013-report/>>. Acesso em: 16 jun. 2022.

CHAMBERS, J. et al. UniChem: a unified chemical structure cross-referencing and identifier tracking system. **Journal of Cheminformatics**, v. 5, n. 1, p. 3, dez. 2013.

CHARMFOROSHAN, E. et al. Antibacterial, Antioxidant and Melanogenesis Inhibitory Activity of Auraptene, a Coumarin from *Ferula szowitsiana* Root. **Nutrition and Cancer**, v. 74, n. 5, p. 1829–1836, 28 maio 2022.

CHARMM-GUI ligand reader and modeler for CHARMM force field generation of small molecules - Kim - 2017 - Journal of Computational Chemistry - Wiley Online Library.

Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.24829/abstract;jsessionid=8F68B1EA3940137FAE43D099E0A231E7.f04t03>. Acesso em: 28 maio. 2023.

CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547–569, 31 dez. 2021.

CHEVEREAU, G.; BOLLENBACH, T. Systematic discovery of drug interaction mechanisms. **Molecular Systems Biology**, v. 11, n. 4, p. 807, abr. 2015.

CLSI. **CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performances Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, p. M100. 31st-edition.** Publishing PhysicsWeb, , 2021.

Disponível em: <https://clsi.org/about/press-releases/clsi-publishes-m100-performance-standards-for-antimicrobial-susceptibility-testing-31st-edition/>

COSTA, L. M. et al. Inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by synthetic riparins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 5, p. 1312–1322, 2016a.

COSTA, L. M. et al. Inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by synthetic riparins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 5, p. 1312–1322, nov. 2016b.

COSTA, S. et al. Resistance to Antimicrobials Mediated by Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**, v. 2, n. 1, p. 83–99, 13 mar. 2013.

COSTA, S. S. et al. Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 241, dez. 2011.

COUTINHO, H. D. M. et al. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 328–330, 2008a.

COUTINHO, H. D. M. et al. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 670–675, dez. 2008b.

COUTINHO, H. D. M. et al. *In vitro* additive effect of *Hyptis martiusii* in the resistance to

- aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 9, p. 1002–1006, set. 2010.
- COUTO, I. et al. Efflux-mediated response of *Staphylococcus aureus* exposed to ethidium bromide. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 3, p. 504–513, 10 jun. 2008.
- CRISTO, J. S. et al. HPLC profile and antibiotic-modifying activity of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 903–908, dez. 2016.
- CZELUSNIAK, K. E. et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 400–409, 2012.
- DA COSTA, R. H. S. et al. Evaluation of antibacterial activity and reversal of the NorA and MepA efflux pump of estragole against *Staphylococcus aureus* bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 6, p. 3551–3555, ago. 2021.
- DA HORA, G. C. A. et al. Membrane negative curvature induced by a hybrid peptide from pediocin PA-1 and plantaricin 149 as revealed by atomistic molecular dynamics simulations. **Soft Matter**, v. 12, n. 43, p. 8884–8898, 2016.
- DA HORA, G. C. A.; NGUYEN, J. D. M.; SWANSON, J. M. J. Can membrane composition traffic toxins? Mycolactone and preferential membrane interactions. **Biophysical Journal**, v. 121, n. 22, p. 4260–4270, 15 nov. 2022.
- DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, n. 1, p. 39–44, fev. 2003.
- DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42717, 12 maio 2017.
- DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089–10089, 1993.
- DE ARAÚJO, A. C. J. et al. In Vitro and In Silico Inhibition of *Staphylococcus aureus* Efflux Pump NorA by α -Pinene and Limonene. **Current Microbiology**, v. 78, n. 9, p. 3388–3393, set. 2021.
- DE ARAÚJO, R. S. A. et al. Modulation of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus* with Coumarin Derivatives. **Scientifica**, v. 2016, p. 1–6, 2016.

- DE KRAKER, M. E. A.; STEWARDSON, A. J.; HARBARTH, S. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? **PLOS Medicine**, v. 13, n. 11, p. e1002184, 29 nov. 2016.
- DE LIMA SILVA, M. G. et al. Antibacterial effect and evaluation of the inhibitory effect against efflux pump in *Staphylococcus aureus* by abietic acid: In vitro and in silico assays. **Process Biochemistry**, v. 122, p. 363–372, nov. 2022.
- DE SOUSA ANDRADE, L. M. et al. Antimicrobial activity and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by extract and isolated compounds from *Arrabidaea brachypoda*. **Microbial Pathogenesis**, v. 140, p. 103935, mar. 2020.
- DE VIVO, M. et al. Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4035–4061, 12 maio 2016.
- DEHBANIPOUR, R. et al. High prevalence of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* strains isolated from urine clinical samples. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. Vol 60, p. E25 Pages, 2 abr. 2019.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2002.
- DHARAVATH, R. et al. Microwave-assisted synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of new coumarin-based 1,2,3-triazoles. **RSC Advances**, v. 10, n. 20, p. 11615–11623, 2020.
- DOMÍNGUEZ, J. L. et al. 8-Aminomethyl-7-hydroxy-4-methylcoumarins as Multitarget Leads for Alzheimer's Disease. **ChemistrySelect**, v. 1, n. 11, p. 2742–2749, 16 jul. 2016.
- DOOGUE, M. P.; POLASEK, T. M. The ABCD of clinical pharmacokinetics. **Therapeutic Advances in Drug Safety**, v. 4, n. 1, p. 5–7, fev. 2013.
- DOS SANTOS BARBOSA, C. R. et al. Effect of Carvacrol and Thymol on NorA efflux pump inhibition in multidrug-resistant (MDR) *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 53, n. 4, p. 489–498, ago. 2021.
- EKINS, S.; CLARK, A. M.; WRIGHT, S. H. Making Transporter Models for Drug–Drug Interaction Prediction Mobile. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 43, n. 10, p. 1642–1645, out. 2015.
- EMAMI, S. et al. Synthesis and Antibacterial Activity of Quinolone-Based Compounds Containing a Coumarin Moiety. **Archiv der Pharmazie**, v. 341, n. 1, p. 42–48, jan. 2008.
- FAILLACE, M. S. et al. Inhibition of the NorA efflux pump of *S. aureus* by (Z)-5-(4-Fluorobenzylidene)-Imidazolidines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 31, p. 127670, jan. 2021.

- FARIAS, P. et al. Antibiotic-modifying activity of riachin, a non-cyanogenic cyanoglycoside extracted from *Bauhinia pentandra*. **Drug Design, Development and Therapy**, p. 3067, jun. 2015.
- FARQUHAR, K. S.; RASOULI KOOHI, S.; CHARLEBOIS, D. A. Does transcriptional heterogeneity facilitate the development of genetic drug resistance? **BioEssays**, v. 43, n. 8, p. 2100043, ago. 2021.
- FELICETTI, T. et al. Studies on 2-phenylquinoline *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors: New insights on the C-6 position. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 155, p. 428–433, jul. 2018.
- FIGUEREDO, F. G. et al. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–5, 2013.
- FIKRET AYDIN et al. Improving the accuracy and convergence of drug permeation simulations via machine-learned collective variables. **The Journal of Chemical Physics**, v. 155, n. 4, p. 045101, 2021.
- FOTOPOULOS, I.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Hybrids of Coumarin Derivatives as Potent and Multifunctional Bioactive Agents: A Review. **Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 272–306, 17 abr. 2020.
- FRANCISCO, C. S. et al. Synthesis of Coumarin Derivatives as Versatile Scaffolds for GSK-3 β Enzyme Inhibition. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 153–160, 19 fev. 2020.
- FREITAS, P. R. et al. Inhibition of the MepA efflux pump by limonene demonstrated by in vitro and in silico methods. **Folia Microbiologica**, v. 67, n. 1, p. 15–20, fev. 2022.
- FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 16 Rev. C.01**. Wallingford, CT, 2016.
- GABRIELSON, S. W. SciFinder. **Journal of the Medical Library Association**, v. 106, n. 4, 4 out. 2018.
- GALETTI, R. et al. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 carries a chromosomal pack of acquired resistance genes: An example of high-risk clone associated with ‘intrinsic resistome’. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 16, p. 183–186, mar. 2019.
- GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, n. 22, p. 3219–3228, 1980.
- GAULTON, A. et al. ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. **Nucleic**

- Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D1100–D1107, 1 jan. 2012.
- GBD 2019 ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 400, n. 10369, p. 2221–2248, 17 dez. 2022.
- GOMBAR, V. K.; SILVER, I. S.; ZHAO, Z. Role of ADME characteristics in drug discovery and their in silico evaluation: in silico screening of chemicals for their metabolic stability. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 11, p. 1205–1225, 2003.
- GÓMEZ-JIMÉNEZ, G. et al. The OECD Principles for (Q)SAR Models in the Context of Knowledge Discovery in Databases (KDD). **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 113, p. 85–117, 2018.
- GONG, X.-R.; XI, G.-L.; LIU, Z.-Q. Activity of coumarin–oxadiazole-appended phenol in inhibiting DNA oxidation and scavenging radical. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 45, p. 6257–6261, nov. 2015.
- GUHA, R. On Exploring Structure–Activity Relationships. Em: KORTAGERE, S. (Ed.). **In Silico Models for Drug Discovery**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. v. 993p. 81–94.
- GUILHELMELLI, F. et al. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 353, 9 dez. 2013.
- GUO, Y. et al. Using a hybrid read-across method to evaluate chemical toxicity based on chemical structure and biological data. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 178, p. 178–187, ago. 2019.
- GUO, Y. et al. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in Staphylococcus aureus. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 107, 17 mar. 2020.
- HAN, S. et al. Preliminary Studies on the Antibacterial Mechanism of a New Plant-Derived Compound, 7-Methoxycoumarin, Against *Ralstonia solanacearum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 697911, 6 ago. 2021.
- HARTMAN, M. E. et al. Trends in the Epidemiology of Pediatric Severe Sepsis*: **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 14, n. 7, p. 686–693, set. 2013.
- HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 639–652, ago. 2008.
- HESS, B. et al. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of**

Computational Chemistry, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, 1997.

HOOVER, W. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. **Physical review. A**, v. 31, n. 3, p. 1695–1697, 1985.

HSIEH, P.-C. et al. Bacteria lacking a multidrug pump: A sensitive tool for drug discovery. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 12, p. 6602–6606, 9 jun. 1998.

HU, C.-F. et al. Ethylenic conjugated coumarin thiazolidinediones as new efficient antimicrobial modulators against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Bioorganic Chemistry**, v. 94, p. 103434, jan. 2020.

HUANG, J.; MACKERELL, A. D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. **Journal of Computational Chemistry**, v. 34, n. 25, p. 2135–2145, 2013.

IBRAHIM, S. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 10, p. 6987–6998, out. 2021.

JARRAHPOUR, A. et al. Petra, Osiris and Molinspiration (POM) together as a successful support in drug design: antibacterial activity and biopharmaceutical characterization of some azo Schiff bases. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 8, p. 1984–1990, ago. 2012.

JIA, C. et al. Antifungal Activity of Coumarin Against *Candida albicans* Is Related to Apoptosis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 445, 4 jan. 2019.

JO, S. et al. CHARMM-GUI Membrane Builder for Mixed Bilayers and Its Application to Yeast Membranes. **Biophysical Journal**, v. 97, n. 1, p. 50–58, jul. 2009.

JORDHEIM, L. P. et al. Gemcitabine is active against clinical multiresistant *Staphylococcus aureus* strains and is synergistic with gentamicin. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 5, p. 444–447, maio 2012.

JORGENSEN, W. L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926–935, 1983.

KAATZ, G. W. et al. Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 719–726, fev. 2003.

KAATZ, G. W.; DEMARCO, C. E.; SEO, S. M. MepR, a repressor of the *Staphylococcus aureus* MATE family multidrug efflux pump MepA, is a substrate-responsive regulatory protein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1276–1281, abr. 2006.

KAATZ, G. W.; MCALEESE, F.; SEO, S. M. Multidrug Resistance in *Staphylococcus aureus*

- Due to Overexpression of a Novel Multidrug and Toxin Extrusion (MATE) Transport Protein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1857–1864, maio 2005.
- KAATZ, G. W.; SEO, S. M. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 12, p. 2650–2655, dez. 1995.
- KAATZ, G. W.; SEO, S. M.; RUBLE, C. A. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 1086–1094, maio 1993.
- KAWASE, M. et al. Antimicrobial Activity of New Coumarin Derivatives. **Arzneimittelforschung**, v. 51, n. 01, p. 67–71, 27 dez. 2011.
- KHAN, IMRAN. H.; PATEL, N. B.; PATEL, V. M. Synthesis, In silico Molecular Docking and Pharmacokinetic Studies, In vitro Antimycobacterial and Antimicrobial Studies of New Imidazolones Clubbed with Thiazolidinedione. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 14, n. 4, p. 269–283, 3 out. 2018.
- KHURSHEED, A.; JAIN, V. Medicinal Research Progress of Natural Coumarin and its Derivatives. **The Natural Products Journal**, v. 11, n. 5, p. 648–662, out. 2021.
- KIM, H.-J. et al. Differential effects of quercetin glycosides on GABAC receptor channel activity. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 1, p. 108–114, jan. 2015.
- KITOS, A. A. et al. Binding of ligands containing carbonyl and phenol groups to iron(III): new Fe6, Fe10 and Fe12 coordination clusters. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 10, p. 3240–3251, 2017.
- KŘEN, V.; ŘEZANKA, T. Sweet antibiotics – the role of glycosidic residues in antibiotic and antitumor activity and their randomization. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 5, p. 858–889, ago. 2008.
- KRISTIANSEN, J. E.; MORTENSEN, I.; NISSEN, B. Membrane stabilizers inhibit potassium efflux from *Staphylococcus aureus* strain No. U2275. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 685, n. 3, p. 379–382, 8 mar. 1982.
- KUČERKA, N. et al. Scattering Density Profile Model of POPG Bilayers As Determined by Molecular Dynamics Simulations and Small-Angle Neutron and X-ray Scattering Experiments. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 1, p. 232–239, 12 jan. 2012.
- KUMAR, A. et al. Pyranocoumarins: A new class of anti-hyperglycemic and anti-dyslipidemic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 22, p. 6447–6451, nov. 2009.
- KÜPELI AKKOL, E. et al. Coumarins and Coumarin-Related Compounds in Pharmacotherapy of Cancer. **Cancers**, v. 12, n. 7, p. 1959, 19 jul. 2020.

- KURODA, T.; TSUCHIYA, T. Multidrug efflux transporters in the MATE family. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1794, n. 5, p. 763–768, maio 2009.
- LAI, C.-C. et al. Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 57, n. 4, p. 106324, abr. 2021.
- LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, v. 37, n. 2, p. 785–789, 15 jan. 1988.
- LEEHAN, J. D.; NICHOLSON, W. L. The Spectrum of Spontaneous Rifampin Resistance Mutations in the Bacillus subtilis *rpoB* Gene Depends on the Growth Environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 22, p. e01237-21, 28 out. 2021.
- LEKSHMI, M. et al. Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator superfamily in Staphylococcus aureus. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 1–18, 2018.
- LIEN, E. J. C.; HANSCH, C.; ANDERSON, S. M. Structure-activity correlations for antibacterial agents on gram-positive and gram-negative cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 430–441, maio 1968.
- LIMA JUNIOR, P. S. et al. Inhibition of NorA efflux pump of *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* by anacardic acids isolated from the cashew nutshell liquid of *ANACARDIUM OCCIDENTALE* L. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, p. fcp.12887, 10 mar. 2023.
- LIMA, W. G.; RAMOS-ALVES, M. C.; SOARES, A. C. Dos distúrbios psiquiátricos à antibioticoterapia: reposicionamento da clorpromazina como agente antibacteriano. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 48, n. 1, p. 5–28, 1 jan. 2019.
- LIMAVERDE, P. W. et al. Inhibition of the TetK efflux-pump by the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. and α -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 957–961, nov. 2017.
- LIN, P.-Y. et al. Synthesis and Antibacterial Activities of Novel 4-Hydroxy-7-hydroxy- and 3-Carboxycoumarin Derivatives. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 10846–10863, 10 set. 2012.
- LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337–341, dez. 2004.
- LIVERMORE, D. M. Antibiotic resistance during and beyond COVID-19. **JAC-Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. Supplement_1, p. i5–i16, 15 jun. 2021.
- LU, P.-H. et al. Coumarin Derivatives Inhibit ADP-Induced Platelet Activation and Aggregation. **Molecules**, v. 27, n. 13, p. 4054, 23 jun. 2022.

- MALLÉA, M. et al. Inhibitors of antibiotic efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 293, n. 5, p. 1370–1373, 24 maio 2002.
- MARTIN, A. L. A. R. et al. In vitro and in silico antibacterial evaluation of coumarin derivatives against MDR strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, v. 177, p. 106058, abr. 2023.
- MARTINEZ, J. L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. **Drug Discovery Today. Technologies**, v. 11, p. 33–39, mar. 2014.
- MARTINS, M. et al. Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the ethidium bromide-agar cartwheel method. **In Vivo (Athens, Greece)**, v. 25, n. 2, p. 171–178, 2011.
- MATOS, M. et al. Study of Coumarin-Resveratrol Hybrids as Potent Antioxidant Compounds. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 3290–3308, 16 fev. 2015.
- MEDEIROS BARRETO, H. et al. Phytochemical Prospection and Modulation of Antibiotic Activity In Vitro by *Lippia origanoides* H.B.K. in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–7, 2014.
- MIKULÁŠOVÁ, M.; CHOVANOVÁ, R.; VAVERKOVÁ, Š. Synergism between antibiotics and plant extracts or essential oils with efflux pump inhibitory activity in coping with multidrug-resistant staphylococci. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 4, p. 651–662, ago. 2016.
- MOHANTY, H.; PACHPUTE, S.; YADAV, R. P. Mechanism of drug resistance in bacteria: efflux pump modulation for designing of new antibiotic enhancers. **Folia Microbiologica**, v. 66, n. 5, p. 727–739, out. 2021.
- MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.
- MORRIS, G. M.; HUEY, R.; OLSON, A. J. Using AutoDock for Ligand-Receptor Docking. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 24, n. 1, dez. 2008.
- MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, p. 4.2.15, 25 mar. 2016.
- NEYFAKH, A. A.; BORSCH, C. M.; KAATZ, G. W. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 1, p. 128–129, jan. 1993.

- NICOLAOU, K. C. Organic synthesis: the art and science of replicating the molecules of living nature and creating others like them in the laboratory. **Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 470, n. 2163, p. 20130690, 8 mar. 2014.
- NOGUCHI, N. et al. Comparison of the Nucleotide Sequence and Expression of *norA* Genes and Microbial Susceptibility in 21 Strains of *Staphylococcus aureus*. **Microbial Drug Resistance**, v. 10, n. 3, p. 197–203, set. 2004.
- NOSÉ, S. A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. **Journal of Chemical Physics**, v. 81, p. 511–519, 1 jul. 1984.
- OLIVEIRA, L. C. C. et al. Antibacterial Activity of the Pyrogallol against *Staphylococcus aureus* Evaluated by Optical Image. **Biologics**, v. 2, n. 2, p. 139–150, 20 maio 2022.
- OLIVEIRA-TINTINO, C. D. D. M. et al. The 1,8-naphthyridines sulfonamides are *NorA* efflux pump inhibitors. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 24, p. 233–240, mar. 2021a.
- OLIVEIRA-TINTINO, C. D. DE M. et al. Chemical synthesis, molecular docking and *MepA* efflux pump inhibitory effect by 1,8-naphthyridines sulfonamides. **European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 160, p. 105753, 1 maio 2021b.
- OLMSTED, J.; KEARNS, D. R. Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids. **Biochemistry**, v. 16, n. 16, p. 3647–3654, 9 ago. 1977.
- O'NEILL, J. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. **Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations.**, 2014.
- ORTIZ-ANDRADE, R. et al. Toxicological Screening of Four Bioactive Citroflavonoids: In Vitro, In Vivo, and In Silico Approaches. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 24, p. 5959, 16 dez. 2020.
- OSTROWSKA, K. Coumarin-piperazine derivatives as biologically active compounds. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 2, p. 220–232, fev. 2020.
- PAGÈS, J.-M.; MASI, M.; BARBE, J. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. **Trends in Molecular Medicine**, v. 11, n. 8, p. 382–389, ago. 2005.
- PAL, S. et al. Adaptation of ethidium bromide fluorescence assay to monitor activity of efflux pumps in bacterial pure cultures or mixed population from environmental samples. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 1, p. 939–945, jan. 2020.
- PALMER, N. et al. Molecular Dynamics for Antimicrobial Peptide Discovery. **Infection and**

- Immunity**, v. 89, n. 4, p. e00703-20, 17 mar. 2021.
- PAN, Y. et al. Research progress of coumarins and their derivatives in the treatment of diabetes. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 616–628, 31 dez. 2022.
- PAPKOU, A. et al. Efflux pump activity potentiates the evolution of antibiotic resistance across *S. aureus* isolates. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 3970, 7 ago. 2020.
- PARK, S.; SHIN, I. Profiling of Glycosidase Activities Using Coumarin-Conjugated Glycoside Cocktails. **Organic Letters**, v. 9, n. 4, p. 619–622, 1 fev. 2007.
- PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **Journal of Applied Physics**, v. 52, n. 12, p. 7182–7182, 1981.
- PEDRETTI, A.; VILLA, L.; VISTOLI, G. VEGA – An open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 18, n. 3, p. 167–173, mar. 2004.
- PESTANA-NOBLES, R. et al. Docking and Molecular Dynamic of Microalgae Compounds as Potential Inhibitors of Beta-Lactamase. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1630, 31 jan. 2022.
- PIDDOCK, L. J. V. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 382–402, abr. 2006a.
- PIDDOCK, L. J. V. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 382–402, abr. 2006b.
- POOLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. **Annals of Medicine**, v. 39, n. 3, p. 162–176, jan. 2007.
- PRASANNA, S.; DOERKSEN, R. Topological Polar Surface Area: A Useful Descriptor in 2D-QSAR. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 21–41, 1 jan. 2009.
- QAIS, F. A. et al. Coumarin Exhibits Broad-Spectrum Antibiofilm and Antiquorum Sensing Activity against Gram-Negative Bacteria: *In Vitro* and *In Silico* Investigation. **ACS Omega**, v. 6, n. 29, p. 18823–18835, 27 jul. 2021.
- R. VERMA, R. et al. Pyrazole-based analogs as potential antibacterial agents against methicillin-resistance staphylococcus aureus (MRSA) and its SAR elucidation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 212, p. 113134, fev. 2021.
- RAKESH, K. P. et al. Quinazolinones linked amino acids derivatives as a new class of promising antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory agents. **European Journal of Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 254–260, 30 set. 2015.

- RANJAN SAHOO, C. et al. Coumarin derivatives as promising antibacterial agent(s). **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 2, p. 102922, fev. 2021.
- RASHEED, O.; QUAYLE, P. Azo Dyes: New Palladium- and Copper-Catalysed Coupling Reactions on an Old Template. **Synthesis**, v. 50, n. 13, p. 2608–2616, jul. 2018.
- RAVINDAR, L. et al. Aryl fluorosulfate analogues as potent antimicrobial agents: SAR, cytotoxicity and docking studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 81, p. 107–118, dez. 2018.
- REHMAN, S. et al. Synthesis, characterization, in vitro antimicrobial, and U2OS tumoricidal activities of different coumarin derivatives. **BMC Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 68, dez. 2013.
- REZENDE-JÚNIOR, L. M. et al. Chalcones Isolated from Arrabidaea brachypoda Flowers as Inhibitors of NorA and MepA Multidrug Efflux Pumps of Staphylococcus aureus. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 6, p. E351, 20 jun. 2020.
- ROCHA, J. E. et al. Antibacterial and antibiotic modifying activity, ADMET study and molecular docking of synthetic chalcone (E)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-(2,4-dimethoxy-3-methylphenyl)prop-2-en-1-one in strains of Staphylococcus aureus carrying NorA and MepA efflux pumps. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 140, p. 111768, ago. 2021.
- ROMANDINI, A. et al. Antibiotic Resistance in Pediatric Infections: Global Emerging Threats, Predicting the Near Future. **Antibiotics**, v. 10, n. 4, p. 393, 6 abr. 2021.
- ROPPONEN, H.-K. et al. Mastering the Gram-negative bacterial barrier – Chemical approaches to increase bacterial bioavailability of antibiotics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 172, p. 339–360, maio 2021.
- ROY, S. K. et al. NorA efflux pump inhibitory activity of coumarins from Mesua ferrea. **Fitoterapia**, v. 90, p. 140–150, out. 2013.
- SANGI, D. P. SYNTHETIC STRATEGIES IN DRUG DISCOVERY: EMPLOYING DIVERSITY-ORIENTED SYNTHESIS. **Química Nova**, 2016.
- SANTOS, C. B. R. D. et al. Molecular Modeling: Origin, Fundamental Concepts and Applications Using Structure-Activity Relationship and Quantitative Structure-Activity Relationship. **Reviews in Theoretical Science**, v. 2, n. 2, p. 91–115, 1 jun. 2014.
- SCHINDLER, B. D. et al. Mutagenesis and modeling to predict structural and functional characteristics of the Staphylococcus aureus MepA multidrug efflux pump. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 3, p. 523–533, fev. 2013.
- SHAHANE, G. et al. Physical properties of model biological lipid bilayers: insights from all-

atom molecular dynamics simulations. **Journal of Molecular Modeling**, v. 25, n. 3, p. 76, mar. 2019.

SHAKEEL-U-REHMAN et al. Isolation, characterisation and antibacterial activity studies of coumarins from *Rhododendron lepidotum* Wall. ex G. Don, Ericaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 886–890, dez. 2010.

SHI, Y.; ZHOU, C.-H. Synthesis and evaluation of a class of new coumarin triazole derivatives as potential antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 3, p. 956–960, fev. 2011.

SILVA, J. et al. Antibacterial and antibiotic modifying activity of chalcone (2E)-1-(4'-aminophenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-prop-2-en-1-one in strains of *Staphylococcus aureus* carrying NorA and MepA efflux pumps: In vitro and in silico approaches. **Microbial Pathogenesis**, v. 169, p. 105664, ago. 2022.

SINGH, S. et al. Boeravinone B, A novel dual inhibitor of nora bacterial efflux pump of *Staphylococcus aureus* and Human P-Glycoprotein, reduces the biofilm formation and intracellular invasion of bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, p. 1–12, 2017.

SIQUEIRA, M. M. R. et al. Aminophenyl chalcones potentiating antibiotic activity and inhibiting bacterial efflux pump. **European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 158, p. 105695, 1 mar. 2021.

SK. VERMA, S. K. et al. A key review on oxadiazole analogs as potential methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity: Structure-activity relationship studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 219, p. 113442, jul. 2021.

SOLIS, F. J.; WETS, R. J.-B. Minimization by Random Search Techniques. **Mathematics of Operations Research**, v. 6, n. 1, p. 19–30, fev. 1981.

SOMMER, M. O.; DANTAS, G. Antibiotics and the resistant microbiome. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 556–563, out. 2011.

SOUSA SILVEIRA, Z. DE et al. Evaluation of the Antibacterial Activity and Efflux Pump Reversal of Thymol and Carvacrol against *Staphylococcus aureus* and Their Toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Molecules**, v. 25, n. 9, p. 2103, 30 abr. 2020.

STEPHENS, P. J. et al. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 98, n. 45, p. 11623–11627, nov. 1994.

SUKANYA, M. et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity of coumadin

derivatives. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 3, p. 16, 2019.

SUMAKANTH, M.; SUKANYA, M.; SRUTHI, K. Synthesis and antibacterial activity of mannich bases of coumarins. **European Journal of Biomedical and Pharmaceutical sciences**, v. 6, n. 8, p. 7, 2019.

TĂȚĂRÎNGĂ, G. et al. Antimicrobial prospection of some coumarin derivatives. **Farmacia**, v. 66, n. 2, p. 323–330, 2018.

TAYLOR, T. A.; UNAKAL, C. G. *Staphylococcus Aureus*. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

THAMMAVONGSA, V. et al. Staphylococcal manipulation of host immune responses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 529–543, set. 2015.

TIMONEN, J. M. et al. Synthesis and anti-inflammatory effects of a series of novel 7-hydroxycoumarin derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3845–3850, set. 2011.

TINTINO, S. R. et al. Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 97, p. 9–13, ago. 2016.

TINTINO, S. R. et al. Effect of Vitamin K3 Inhibiting the Function of NorA Efflux Pump and Its Gene Expression on *Staphylococcus aureus*. **Membranes**, v. 10, p. 130, 2020a.

TINTINO, S. R. et al. Effect of Vitamin K3 Inhibiting the Function of NorA Efflux Pump and Its Gene Expression on *Staphylococcus aureus*. **Membranes**, v. 10, n. 6, p. 130, 25 jun. 2020b.

TIWARI, N. et al. In Silico Designing and Interaction of Coumarin-Amino Acid(s) Conjugates with Integrin Like Protein of *Cryptococcus neoformans*: Insights on Antifungal Drug Design. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 8587–8598, 2 ago. 2020.

TRUONG-BOLDUC, Q. C.; ZHANG, X.; HOOPER, D. C. Characterization of NorR Protein, a Multifunctional Regulator of *norA* Expression in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 10, p. 3127–3138, 15 maio 2003.

TRYKOWSKA KONC, J. et al. Synthesis and pharmacological activity of O-aminoalkyl derivatives of 7-hydroxycoumarin. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 2252–2263, jun. 2011.

ULLAS, B. J. et al. Multi-targeted quinazolinone-Schiff's bases as potent bio-therapeutics. **Results in Chemistry**, v. 2, p. 100067, jan. 2020.

VANOMMESLAEGHE, K.; MACKERELL, A. D. JR. Automation of the CHARMM General

- Force Field (CGenFF) I: Bond Perception and Atom Typing. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 12, p. 3144–3154, 21 dez. 2012.
- VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 6 jun. 2002.
- VENABLE, R. M.; KRÄMER, A.; PASTOR, R. W. Molecular Dynamics Simulations of Membrane Permeability. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 9, p. 5954–5997, 8 maio 2019.
- VERLET, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. **Physical Review**, v. 159, n. 1, p. 98–103, 5 jul. 1967.
- VILA, J.; MARTINEZ, J. Clinical Impact of the Over-Expression of Efflux Pump in Nonfermentative Gram-Negative Bacilli, Development of Efflux Pump Inhibitors. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 9, p. 797–807, 1 set. 2008.
- VON HUTH, S.; KOFOED, P.-E.; HOLMSKOV, U. Prevalence and potential risk factors for gastrointestinal parasitic infections in children in urban Bissau, Guinea-Bissau. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n. 9, p. 545–554, 6 set. 2019.
- VOSKO, S. H.; WILK, L.; NUSAIR, M. Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. **Canadian Journal of Physics**, v. 58, n. 8, p. 1200–1211, 1 ago. 1980.
- WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2–3, p. 97–110, mar. 2009.
- WEINER, S. J. et al. An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids. **Journal of Computational Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 230–252, 1986.
- WHO. **Antibiotic resistance**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>>.
- XU, Z. et al. Coumarin-based derivatives with potential anti-HIV activity. **Fitoterapia**, v. 150, p. 104863, abr. 2021.
- YU, A. S. L. et al. Long-term trajectory of kidney function in autosomal-dominant polycystic kidney disease. **Kidney International**, v. 95, n. 5, p. 1253–1261, maio 2019.
- YU, X. M. et al. Hsp90 Inhibitors Identified from a Library of Novobiocin Analogues. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 37, p. 12778–12779, 1 set. 2005.
- YUAN, G. et al. Antibacterial activity and mechanism of plant flavonoids to gram-positive bacteria predicted from their lipophilicities. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 10471, 18 maio 2021.

- ZAVRŠNIK, D. et al. The Synthesis and Antimicrobial Activity of Some 4-Hydroxycoumarin Derivatives. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 8, n. 3, p. 277–281, 20 ago. 2008.
- ZAYANE, M. et al. Design and synthesis of antimicrobial, anticoagulant, and anticholinesterase hybrid molecules from 4-methylumbelliferone. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1566–1575, 1 nov. 2016.
- ZHANG, F.; CHENG, W. The Mechanism of Bacterial Resistance and Potential Bacteriostatic Strategies. **Antibiotics**, v. 11, n. 9, p. 1215, 8 set. 2022.
- ZUO, G.-Y. et al. Synergism of coumarins from the Chinese drug *Zanthoxylum nitidum* with antibacterial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine**, v. 23, n. 14, p. 1814–1820, dez. 2016.

APÊNDICE A – PUBLICAÇÃO (FATOR DE IMPACTO: 3,8)

Microbial Pathogenesis 177 (2023) 106058



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micpath

In vitro and *in silico* antibacterial evaluation of coumarin derivatives against MDR strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

Ana Luíza A.R. Martin^{a,d}, Irwin R.A. De Menezes^b, Amanda K. Sousa^b, Pablo A.M. Farias^d, Francisco A.V. dos Santos^d, Thiago S. Freitas^b, Fernando G. Figueredo^{b,d}, Jaime Ribeiro-Filho^c, Diogo T. Carvalho^c, Henrique D.M. Coutinho^{b,*}, Marta M.F. Fonteles^{a,**}

^a Federal University of Ceará - UFC, Brazil

^b Regional University of Ceará - URCA, Brazil

^c Federal University of Alfenas - UNIFAL-MG, Brazil

^d CECAPÉ College, Brazil

^{*} Oswaldo Cruz Foundation - FIOCRUZ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Coumarin derivatives

ADME

Antibacterial

Antibiotic resistance

*Staphylococcus aureus**Escherichia coli*

ABSTRACT

The increase in antibiotic resistance rates has attracted the interest of researchers for antibacterial compounds capable of potentiating the activity of conventional antibiotics. Coumarin derivatives have been reported to develop effective antibacterials with possible new mechanisms of action for treating infectious diseases caused by bacteria with a profile of drug resistance. In this context, the aim of the present study we have now prepared one variety of new synthetic coumarins evaluating the pharmacokinetic and chemical similarity *in silico*, their antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Escherichia coli* (ATCC 25922), and potential for the modulation of antibiotic resistance against *Staphylococcus aureus* (SA10) and *Escherichia coli* (EG06) clinical isolate bacteria by *in vitro* assay. The antibacterial activity and antibiotic-enhancing properties were evaluated by the broth microdilution method and pharmacokinetically characterized according to the Lipinsk rule of 5 and had their similarity analyzed in databases such as ChEMBL and CAS SciFinder. The results demonstrated that only compound C13 showed significant antibacterial activity (MIC \leq 256 μ g/mL), and all other coumarins did not display relevant antibacterial activity (MIC \geq 1024 μ g/mL). However, they did modulate the antibiotics activities to norfloxacin and gentamicin, except, compound C11 to norfloxacin against *Staphylococcus aureus* (SA10). The *in silico* properties prediction and drug-likeness results demonstrated that all coumarins presented a good drug-likeness score with no violations and promising *in silico* pharmacokinetic profiles showing that they have the potential to be developed into an oral drug. The results indicate that the coumarin derivatives showed good *in vitro* antibacterial activity. These new coumarin derivatives also demonstrated the capacity to modulate antibiotic resistance with potential synergy action for current antimicrobials assayed, as antibiotic adjuvants, to reduce the emergence of antimicrobial resistance.