



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB

**AMANDA KARINE DE SOUSA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA POR  
CUMARINAS DERIVADAS DE EUGENOL E DIHIDROEUGENOL ASSOCIADAS À  
LUZ DE LED AZUL.**

CRATO, CEARÁ

2022

---



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA**

**AMANDA KARINE DE SOUSA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA POR  
CUMARINAS DERIVADAS DE EUGENOL E DIHIDROEUGENOL ASSOCIADAS À  
LUZ DE LED AZUL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito para obtenção do Título de Mestre/Doutor em Química Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

CRATO, CEARÁ

2022

---



Ficha Catalográfica elaborada pelo autor através do sistema  
de geração automático da Biblioteca Central da Universidade Regional do Cariri - URCA

De Sousa, Amanda KARINE

S725a AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E  
MODULADORA POR CUMARINAS DERIVADAS DE EUGENOL E  
DIHIDROEUGENOL ASSOCIADAS À LUZ DE LED AZUL. / Amanda KARINE  
De Sousa. CRATO - CE, 2022.

63p. il.

Tese. Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade  
Regional do Cariri - URCA.

Orientador(a): Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior

Coorientador(a): Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

1.Cumarinas, 2.Atividade antibacteriana, 3.Fototerapia, 4.Produutos Naturais,  
5.Resistência a antimicrobianos; I.Título.

CDD: 571.7



**Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações  
Eletrônicas**

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação abaixo identificada, autorizo à Universidade Regional do Cariri – URCA, a disponibilizar por tempo indeterminado ao alcance do público a obra abaixo citada, através do site <http://bdttd.ibict.br/bdttd/>, bem como da rede mundial de computadores – Internet, sem pagamento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, conforme permissões assinaladas, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data, atendendo à Portaria Nº 13 de 15/02/2006 da CAPES.

Identificação do Material Bibliográfico:	<input type="checkbox"/> Dissertação	<input checked="" type="checkbox"/> Tese
Autor: AMANDA KARINE DE SOUSA		
CPF: 035.110.113-61	RG:2004034096209	
Nacionalidade: BRASILEIRA	Estado Civil: CASADA	
Endereço Completo RUA FIDELIZ TEIXEIRA LUNA, 588		
CEP: 63038-748	Cidade: JUAZ. DO NORTE	Estado: CEARA
Fone/Celular: 88997112712	E-mail amandakarinedesousa@gmail.com	
Título:		
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DE CUMARINAS DERIVADAS DE EUGENOL E DIHIDROGENOL ASSOCIADAS À LUZ DE LED AZUL		
Orientador: LUCINDO JOSE QUINTANS JUNIOR		
Coorientador: HENRIQUE DOUGLAS MELO COUTINHO		
Membros da Banca: HELCIO SILVA DOS SANTOS; MARIA FLAVIANA BEZERRA MORAIS BRAGA;		
ARACELIO VIANA COLARES; CELESTINA ELBA SOBRAL DE SOUZA		
Data da Defesa: 30/11/2022	Curso: QUIMICA BIOLOGICA	
Área do Conhecimento:		
Palavras-Chave: Cumarinas. Atividade antibacteriana. Fototerapia. Produtos Naturais.		
3. Agência de Fomento: NAO HOUVE		
Informações de Acesso ao Documento: para publicação	<input checked="" type="checkbox"/> Acesso Total	<input type="checkbox"/> Acesso Parcial
Em caso de publicação parcial, especifique o(s) arquivo(s) e/ou capítulo(s) restrito(s):		

Crato, 21 de Dezembro de 2022

Havendo concordância com a publicação eletrônica enviamos o(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação gerada a partir da versão final corrigida e aprovada pelo Orientador. A restrição (parcial ou total) poderá ser mantida por até dois anos a partir da data de autorização da publicação sob responsabilidade do Programa. A extensão deste prazo demandará justificativa formal apresentada será comunicada à CAPES

Assinatura do Autor:

Assinatura do Orientador:

**AMANDA KARINE DE SOUSA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA POR  
CUMARINAS DERIVADAS DE EUGENOL E DIHIDROEUGENOL ASSOCIADAS À  
LUZ DE LED AZUL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Química Biológica.

Tese defendida e aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior

**Orientador**

(UFSE)

---

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

**Coorientador**

(URCA-CE)

---

Profa. Dr. Helcio Silva dos Santos

**Avaliador Interno**

(URCA)

---

Prof. Dra. Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga

**Avaliador Interno**

(URCA)

---

Prof. Dr. Aracélio Viana Colares

**Examinador Externo**

(UNILEÃO-CE)

---

Prof. Dra. Celestina Elba Sobral de Souza

**Examinador Externo**

(UNIVS-CE)

---

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira

**Suplente Interno**

(URCA-CE)



Dedico este trabalho ao meu filho, Erick de Sousa Leitão, meu maior e infinito amor.

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus, por ter me dado força, discernimento e perseverança diante dos obstáculos e das dificuldades. Em todas as etapas tive a certeza de que Ele sempre esteve comigo.

À minha mãe, Juciene de Sousa pelo exemplo de mulher forte, que não hesitou em nenhum momento para sempre me dar a melhor educação e oportunidades para um futuro promissor.

Meu pai, Adalberto de Sousa, por ser sempre espelho de paciência e humildade, e me tranquilizar nos momentos mais estressantes. Meus exemplos de pais e pessoas que pude ter na vida.

À minha irmã, Alana Karine, pelas conversas, por me escutar em todos os momentos e acompanhar todo o processo e ajudar sempre que possível, por ser uma amiga enfim.

Ao meu esposo, Renato Leitão, por me ouvir e apoiar, e compreender minhas ausências.

Ao meu filho, Erick de Sousa, amor incondicional que me tornou mais forte e me inspira e me dá coragem a fazer tudo e o melhor para ser o melhor exemplo para ele e para que nunca lhe falte amor.

À minha família, exemplos de pessoas fortes, solidárias que sempre estão prontos para apoiar, independente das circunstâncias e momentos.

A todos os colegas de curso Janaína Esmeraldo, Thiago Freitas, Raimundo Luiz Pereira e Priscila Ramos por toda ajuda na execução dos testes, além disso, as conversas, as risadas, os conselhos e o apoio. Vocês foram imprescindíveis para que tudo isso fosse possível, além de terem sido um suporte emocional em meio aos testes realizados numa pandemia em que a crise financeira e emocional e a incerteza dos dias, perturbavam e geravam dúvidas em todos.

À colega de profissão e de curso Maria Karollyna pelas conversas, trocas de vivência, pela positividade, por estar sempre lá para dizer que independente de qualquer coisa “Vai dar certo”.

Aos colegas de trabalho, professores e preceptores do Centro Universitário Dr. Leão Sampaio, por sempre darem apoio e pela torcida. Em especial, à coordenadora Ana Ruth Sampaio Grangeiro que sempre se mostra disposta a ajudar e apesar de, algumas vezes isso até atingir o funcionamento do curso, entende sempre que precisamos fazer escolhas que nos trazem progresso profissional.

Aos meus alunos, por me permitirem trocar saberes e por sempre acreditarem em mim, a torcida e a energia de vocês foram muito importantes nesta etapa. Às vezes o desânimo toma conta, mas quando nos vemos como exemplos e espelhos para vocês, precisamos nos reerguer e a admiração de vocês sempre dá força para isso.

Ao Prof. Dr. Lucindo Quintans e ao prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho pela disponibilidade e dedicação ao me orientar. E mais do que isso serem mentores desse processo, e terem muita paciência porque nem sempre fui a aluna mais assídua, da maneira que eu gostaria de ser. Vocês são pessoas incríveis que admiro muito.

Aos professores e coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, pelos ensinamentos e ricas discussões nas disciplinas ministradas.

Ao professor, Dr. Diogo Teixeira Carvalho e toda sua equipe pela parceria que tornou possível o acesso às substâncias testadas e por toda colaboração nos artigos.

Às universidades, Universidade Federal de Sergipe, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNIFAL - MG e Universidade Regional do Cariri.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização e finalização deste trabalho.

Aos profissionais de saúde que estavam a frente da COVID-19, bem como aos pesquisadores que tornaram possível o desenvolvimento das vacinas e todos os estudos para prevenção e tratamento dessa doença, meu reconhecimento e agradecimento, sem vocês nenhuma outra pesquisa ou atividade seria possível no país nesse momento. A luta que travaram nesse período indo contra todo negacionismo, resistindo a desvalorização, a falta de incentivo, e a todos os obstáculos desse momento será sempre lembrada.

Meus sinceros agradecimentos a todos!

Figura 1 – Estrutura Química da Cumarina	11
Figura 2 - Média Geométrica da Concentração Inibitória Mínima da modulação do composto 1,3-benzoil-8-metoxi-2H-cromen-2-ona frente a <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> com e sem exposição ao LED azul.	16
Figura 3 - Média Geométrica da Concentração Inibitória Mínima da modulação do composto 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-2H-cromen-2-ona frente a <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> com e sem exposição ao LED azul	17
Figura 4 - Média Geométrica da Concentração Inibitória Mínima da modulação do composto ácido 8-metoxi-2-oxo-2H-cromen-3-carboxílico frente a <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> com e sem exposição ao LED azul.	18
Figura 5 - Média Geométrica da Concentração Inibitória Mínima da modulação do composto 3-(4-aminobenzoil)-8-metoxi-2H-cromen-2-ona frente a <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> com e sem exposição ao LED azul	19
Figura 6 - Média Geométrica da Concentração Inibitória Mínima da modulação de 3-(4-aminobenzoil)-8-metoxi-2H-cromen-2-ona frente a <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> com e sem exposição ao LED azul.	20
Figura 7 – Média Geométrica da Concentração Inibitória Mínima da modulação de 3-(hidroxi(4-nitrofenil)metil)-8-metoxi-6-propil-2H-cromen-2-ona frente a <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> com e sem exposição ao LED azul	21
Figura 8 – Estrutura Química das Cumarinas Derivadas de Dihidroeuogenol	26
Figura 9 - Média Geométrica da Concentração Inibitória Mínima da modulação de 8-hidroxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-cromen-2-ona frente a <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> com e sem exposição ao LED azul.	27
Figura 10 - Média Geométrica da Concentração Inibitória Mínima da modulação de 3-(4-aminobenzoil)-8-metoxi-6-propil-2H-cromen-2-ona frente a <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> com e sem exposição ao LED azul	28

Figura 11 - Média Geométrica da Concentração Inibitória Mínima da modulação de 8-metoxi- 29  
3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2*H*-cromen-2-ona frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* com e sem exposição ao LED azul

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Cumarinas derivadas de Eugenol 16

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Cumarinas derivadas de Dihidroeugenol 27

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

**AMP** - Ampicillin

**CIM** - Concentração Inibitória Mínima

**DMSO** – Dimetilsufóxido

**DNA** - Desoxyribonucleic Acid

**ECAD** - *Escherichia coli adherente difusa*

**ECEA** - *Escherichia coli enteroagregativa*

**ECEI** - *Escherichia coli enteroinvasiva*

**ECEP** - *Escherichia coli enteropatogênica*

**ECET** - *Escherichia coli enterotoxigênica*

**ECPA** - *Escherichia coli patogênica aviaria*

**ECST** - *Escherichia coli shigatoxigenica*

**ERO's** - Espécies Reativas de Oxigênio

**GEN** – Gentamycin

**ITU** - Infecções do Trato Urinário

**LED** - Light-Emitting Diode

**LMBM** - Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular

**LQFar** - Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica

**MDF** - Medium Density Fiberboard

**MRSA** – Meticilina

**NOR** – Norfloxacin

**RAM** – Resistencia Antimicrobiana

**UNIFAL** – Universidade Federal de Alfenas

**URCA** - Universidade Regional do Cariri

**UV** – Ultravioleta

## SUMÁRIO

---

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	19
1.1 ESTRATÉGIAS DE PESQUISA .....	20
1.3 ESTRUTURA DA TESE.....	22
2 OBJETIVOS.....	24
2.1. Objetivo Geral.....	24
2.2. Objetivos Específicos.....	24
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	25
3.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS .....	25
3.2 PRINCIPAIS BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS .....	26
3.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	26
3.2.2 <i>Escherichia coli</i> .....	27
3.3 PROPRIEDADES QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS DAS CUMARINAS.....	28
3.4 TERAPIA FOTODINÂMICA E ATIVIDADE BACTERICIDA.....	30
4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	32
CAPÍTULO I: Dihydroeugenol derivatives associated with blue LED light: A different form to face multidrug resistant (MDR) bacteria. ....	32
CAPÍTULO II: Photobiological effect of eugenol-derived 3-benzoylcoumarin associated with led lights against MDR microorganisms.....	41
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
5.1 ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA .....	50
5.2 CONCLUSÕES GERAIS .....	51
5.3 PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS.....	52
6 REFERÊNCIAS.....	54
7 ANEXOS e APÊNDICES .....	58
APÊNDICE I – METODOLOGIA EXTENDIDA (METHODX) .....	58

---

**Avaliação da Atividade Antibacteriana e Moduladora de Cumarinas Derivadas de Eugenol E Dihidroeuogenol Associadas à Luz De LED Azul.**

**RESUMO**

As cumarinas são estudadas pelo seu potencial no combate a infecções em plantas e animais, desta maneira, evidenciando sua atividade contra microrganismos patógenos. O uso de associação terapêuticas pode potencializar atividades já encontradas destes compostos. A quimioterapia antimicrobiana fotodinâmica tem se apresentado como terapia alternativa com atividade antibacteriana, este tipo de terapia baseia-se na ativação de fotossensibilizadores, levando a formação de espécies reativas de oxigênio que causam a morte bacteriana. Diante do exposto, o presente estudo objetivou verificar a atividade antibacteriana e modulatória de derivados de cumarinas associados a luz de LED (Light Diode-Emitting) azul. Foram testadas cumarinas derivadas de eugenol e Dihidroeuogenol. Para este estudo foram utilizadas e testadas nove das substâncias disponibilizadas. Foram determinadas as Concentrações Inibitórias Mínima de cada substância para cepas padrões e multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, padrão e multirresistentes, posteriormente foram moduladas com antibióticos, norfloxacino, gentamicina e ampicilina. A modulação foi realizada para cada substância em duas placas, uma delas não foi exposta ao LED e a outra foi exposta por 20 minutos ao aparelho de LED na cor azul (415 nm). Para a leitura das placas utilizou-se a resazurina após 24 h de incubação em estufa a 37° C. As substâncias 3-benzoil-8-metoxi-2H-cromen-2-ona, ácido 8-metoxi-2-oxo-6-propil-2H-cromen-3-carboxílico, 3-(hidroxi(4-nitrofenil) metil)-8-metoxi-6-propil-2H-cromen-2-ona e 3-(4-aminobenzoil)-8-metoxi-6-propil-2H-cromen-2-ona exibiram sinergismo aos antibióticos, tanto sem quanto com exposição ao LED azul, para *S. aureus* e *E. coli*. O mecanismo pelo qual o LED age na inativação bacteriana está associado a interação com os fotossensibilizadores e a produção de espécies reativas de oxigênio que levam à morte celular, o estudo de novas substâncias que produzam efeitos semelhantes auxiliam a ampliar a aplicação desse tipo de terapia. Os diferentes resultados indicam que é necessária uma investigação do mecanismo pelo qual cada substância interage associada ao LED, bem como cada antibiótico, que por vezes exibiram redução da CIM com a exposição ao LED, outras vezes mostram aumento dela. Os resultados obtidos trazem dados adicionais a respeito da utilização de compostos sintéticos no desenvolvimento de novos fármacos e associação com a fototerapia no enfrentamento ao problema da resistência antimicrobiana.

**Palavras-Chave:** Cumarinas. Atividade antibacteriana. Fototerapia. Produtos Naturais.

**Agradecimentos:** Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular; Universidade Federal de Alfenas.



---

**Evaluation of the Antibacterial and Modulating Activity of Coumarins Derived from Eugenol and Dihydroeugenol Associated with Blue LED Light.****ABSTRACT**

Coumarins are studied for their potential to fight infections in plants and animals, thus showing their activity against pathogenic microorganisms. The use of therapeutic association can enhance activities already found in these compounds. Thus, photodynamic antimicrobial chemotherapy has been presented as an alternative therapy with antibacterial activity, this type of therapy is based on the activation of photosensitizers, leading to the formation of reactive oxygen species that cause bacterial death. Given the above, this study aimed to verify the antibacterial and modulatory activity of coumarins derivatives associated with blue LED (Light Diode-Emitting) light. Nine coumarins derived from eugenol and dihydroeugenol were tested. The Minimum Inhibitory Concentrations of each substance were determined for standard and multiresistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, later modulated with antibiotics, norfloxacin, gentamicin and ampicillin. The modulation was performed for each substance on two plates, one of which was not exposed to the LED and the other was exposed for 20 minutes to the blue color device (415 nm). To read the plates, resazurin was used after 24 hours of incubation in an incubator at 37 °C. The substances 3-benzoyl-8-methoxy-2H-chromen-2-one, 8-methoxy-2-oxo-6-propyl-2H-chromen-3-carboxylic acid, 3-(hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)-8-methoxy-6-propyl-2H-chromen-2-one and 3-(4-aminobenzoyl)-8-methoxy-6-propyl-2H-chromen-2-one exhibited synergism to antibiotics both with and without exposure to the blue LED, for *S. aureus* and *E. coli*. The mechanism by which LED acts in bacterial inactivation is associated with interaction with photosensitizers and the production of reactive oxygen species that lead to cell death, the study of new substances that produce similar effects help to broaden the application of this type of therapy. The different results indicate that it is necessary to investigate the mechanism by which each substance interacts in association with LED, as well as each antibiotic, which sometimes showed a reduction in MIC with LED exposure, other times showed an increase in it. The results obtained bring additional data regarding the use of synthetic compounds in the development of new drugs and their association with phototherapy to face the problem of antimicrobial resistance.

**Keywords:** Coumarins. Antibacterial activity. Phototherapy. Natural products.

**Acknowledgements:** Laboratory of Microbiology and Molecular Biology. Federal University of Alfenas.

## **IMPORTÂNCIA/RELEVÂNCIA PARA A SOCIEDADE**

---

A pandemia da COVID-19 causada pelo coronavírus nos mostrou, entre outras coisas, a importância de estarmos atentos ao controle dos microrganismos, tendo em vista o seu potencial para ocasionar sérios danos à saúde humana. Além disso, uma situação que já vem há bastante tempo alertando os pesquisadores por todo o mundo é a questão da resistência aos antimicrobianos desenvolvida pelas bactérias, pois nestes casos poderíamos chegar ao ponto de não conseguir tratar determinadas doenças por falta de medicações efetivas contra determinadas espécies bacterianas.

Ademias, as substâncias derivadas de produtos naturais obtidas de plantas utilizadas com fins terapêuticos já são amplamente estudadas no combate a infecções bacterianas, dentre elas as cumarinas presentes em diversas espécies. Assim, nesse estudo, foi possível verificar a eficácia de compostos cumarínicos derivados de eugenol, produtos oriundos de plantas, para o uso associado aos antibióticos comumente utilizados, com a finalidade de potencializar seus efeitos e melhorar as condições de tratamento. Também foi testada a associação com luzes de LED azul que já mostrou que podem combater bactérias em outros tipos de tratamento, como a acne e para cicatrização de feridas, e que não representam riscos ao paciente, dessa maneira haveria mais uma possibilidade tratamento para os principais microrganismos causadores de doenças.

Os antibióticos foram os mais impactantes medicamentos já descobertos, pois são capazes de curar habitualmente por muitos pacientes. Porém, ao mesmo tempo, são os únicos medicamentos que perdem sua eficácia com o uso contínuo. O desenvolvimento de novos antibióticos está diminuindo, enquanto a resistência a eles está aumentando, o que pode ocasionar a perda destes medicamentos para a prática da medicina. (NATHAN, 2020; ROOPE et al., 2019).

Tal resistência aos antimicrobianos (RAM) surge como consequência do seu uso. Os antibióticos são necessários para curar infecções, entretanto, são utilizados de forma indevida, sob uso abusivo e desnecessário, e dessa maneira há aumento da pressão seletiva sobre as bactérias que desenvolvem, por decorrência, a resistência. Mundialmente, muitos pacientes sofrem as consequências da RAM, uma vez que, as infecções já não são mais responsivas à medicação comumente utilizada em seus tratamentos (WHO, 2012).

Os estudos avançam na busca por estratégias para descobrir novas drogas, entre elas, a triagem sistemática de bibliotecas de compostos sintéticos, a investigação de produtos naturais orientados pela etnofarmacologia, a modificação estrutural de drogas conhecidas e o desenho *in silico* de novas moléculas (KESERÜ; MAKARA, 2009; NEWMAN; CRAGG, 2016; OU-YANG et al., 2012).

A hibridização, fusão de subunidades distintas com propriedades farmacofóricas derivadas de bioativos sintéticos ou naturais, também tem grande apelo e importância, podendo possibilitar a descoberta de potenciais agentes anti-infecciosos, pois os híbridos podem ter suas propriedades aprimoradas em relação aos farmacóforos preexistentes individualmente (ANUMALA et al., 2017; PEDROSA et al., 2017).

Assim, todas as pesquisas comungam do mesmo objetivo de buscar alternativas para contornar essa resistência. Nesse contexto, os estudos com produtos naturais e seus derivados vem se mostrando promissores. Os metabólitos secundários, compostos produzidos pelas plantas como uma resposta adaptativa às condições que o ambiente lhes impõe tem sido amplamente utilizado nas pesquisas. Estes compostos apresentam uma grande diversidade estrutural, e conseqüentemente, apresentam diversas funções e atividades farmacológicas, algumas já conhecidas outras ainda em estudo (DIXON, 2001; DODDS; RATHJEN, 2010).

Entre estes metabólitos secundários, as cumarinas são estudadas pelo seu potencial no combate a infecções em plantas e animais, desta maneira, evidenciando sua atividade contra microrganismos patógenos. Esses compostos são produzidos pela via dos fenilpropanóides. Já

foram evidenciadas algumas atividades para esta classe de compostos, que variam de antimicrobiana e antiviral a anticoagulante e anticâncer (STRINGLIS; JONGE; PIETERSE, 2019).

As cumarinas utilizadas nesse estudo são derivadas de Eugenol e Dihidroeugenol. A estrutura química do eugenol pode ser modificada em laboratório e, portanto, pode dar origem a derivados com diferentes perfis de atividade biológicas (GOVÊA et al., 2020).

Ademais, o uso de associação terapêuticas pode potencializar atividades já encontradas destes compostos. Assim, a quimioterapia antimicrobiana fotodinâmica tem se apresentado como terapia alternativa com atividade antibacteriana, fundamentada na ativação de fotossensibilizadores, levando a formação de espécies reativas de oxigênio que causam a morte bacteriana. Várias classes de moléculas demonstraram efeito bactericida contra um amplo espectro de bactérias gram-positivas e gram-negativas multirresistentes quando irradiados com luz visível (DE OLIVEIRA et al., 2015; MAISCH, 2009).

Entre as terapias que utilizam a luz como princípio, o laser e o LED (*Light-Emitting Diode*) se destacam, ambas apresentam diversas aplicações, com efeitos anti-inflamatórios e cicatrizantes, a depender do comprimento de onda utilizado. Entre as aplicações apresentam também atividade bactericida, utilizada comumente no tratamento da acne e em biofilmes dentários, sendo a luz azul (407 – 420nm) a mais indicada pelo efeito bactericida (ABRAMOVITS; PETER ARRAZOLA; ADITYA, 2005).

Estudos que elucidem o comportamento das substâncias como possíveis fotossensibilizadoras para serem utilizadas nas terapias fotodinâmicas são relevantes e atuais, uma vez que a resistência antimicrobiana se mostra cada vez mais presente e limita o uso de antibióticos na prática da medicina e de outras áreas. Além disso, são necessárias pesquisas básicas que possam tornar possível o avanço no sentido de viabilizar o desenvolvimento de novos fármacos ou opções de tratamento para infecções por microrganismos resistentes. Diante do exposto, o presente estudo objetivou verificar a atividade antibacteriana intrínseca de derivados de cumarinas associados a luz de LED azul e seu efeito em associação com antibióticos.

## 1.1 ESTRATÉGIAS DE PESQUISA

As substâncias utilizadas foram cedidas gentilmente pelo Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica – LQFar, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNIFAL, Minas Gerais. Trata-se de cumarinas derivadas de eugenol e Dihidroeugenol. Para este estudo foram utilizadas e testadas nove das substâncias disponibilizadas. Tendo em vista a já conhecida ação

antibacteriana do Eugenol, e desta maneira esperando o mesmo efeito em compostos derivados do mesmo (MARCHESE et al., 2017; SANTOS et al., 2019; SOUZA et al., 2015).

As substâncias foram identificadas como: (1) 3-benzoil-8-metoxi-2H-cromen-2-ona, (2) 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-2H-cromen-2-ona, (3) ácido 8-metoxi-2-oxo-2H-cromen-3-carboxílico, (4) 3-(4-aminobenzoil)-8-metoxi-2H-cromen-2-ona, (5) ácido 8-metoxi-2-oxo-6-propil-2H-cromen-3-carboxílico, (6) 3-(hidroxi(4-nitrofenil)metil)-8-metoxi-6-propil-2H-cromen-2-ona, (7) 8-hidroxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-cromen-2-ona, (8) 3-(4-aminobenzoil)-8-metoxi-6-propil-2H-cromen-2-ona e (9) 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-cromen-2-ona.

As substâncias foram diluídas em água e dimetilsulfóxido (DMSO) para realização dos testes microbiológicos. Os testes microbiológicos foram realizados pelo método da microdiluição em caldo e seguiram o protocolo descrito para determinação da concentração inibitória mínima e atividade modulatória (COUTINHO et al., 2008, 2010). Para determinação da CIM, foram utilizadas as bactérias de cepas padrão (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e multirresistentes (*Staphylococcus aureus* 10 e *Escherichia coli* 06) fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA).

Já para modulação, foram utilizados os antibióticos ampicilina (beta-lactâmico), gentamicina (aminoglicosídeo) e norfloxacina (fluoroquinolonas). Essa escolha leva em consideração os diferentes mecanismo de ação dos antibióticos, que podem agir inibindo a síntese da parede celular, como os beta-lactâmicos, despolarizando a membrana celular, inibindo a síntese de proteínas, como os aminoglicosídeos, inibindo a síntese de ácidos nucléicos, como as fluoroquinolonas, ou ainda inibindo as vias metabólicas em bactérias (REYGAERT, 2018).

As placas de microdiluições foram inoculadas em triplicata, no que se refere às colunas para microdiluição, e cada placa foi feita em duplicata, sendo uma das placas expostas ao aparelho *Light-Emitting Diode* (LED) azul (415 nm) por 20 minutos, individualmente, antes da incubação em estufa, e a outra incubada sem a exposição prévia ao LED. Para expor as placas foram utilizados três aparelhos da marca New Estética®, utilizando uma caixa em MDF recoberta com papel laminado como aparato para isolar cada placa (PEREIRA et al., 2017). Após a modulação as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24h quando foram retiradas e reveladas com 20 µL de resazurina.

A terapia fotodinâmica com luz visível é amplamente aplicada no tratamento de diversas doenças, e já se tem relatos da sua eficácia em inativar os microrganismos. Ela se baseia na tríade, luz, fotossensibilizador e oxigênio disponível, assim, o fotossensibilizador é um corante atóxico que irá produzir espécies reativas de oxigênio, causando a morte bacteriana. São descritos pela literatura

também substâncias com papel fotoantimicrobiana, que podem ocasionar a morte bacteriana sob ativação da luz (WAINWRIGHT et al., 2017).

Os dados centrais e desvios padrões foram obtidos de acordo com a metodologia de (FREITAS et al., 2021), sobre análise microbiológica em placas de microdiluição. Os dados foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prisma 5.0 através de um teste ANOVA de duas vias. Em seguida foi feito um teste de Bonferroni post hoc (onde  $p < 0,05$  foi considerado significativo e  $p > 0,05$  não significativo).

### 1.3 ESTRUTURA DA TESE

O presente estudo relata os resultados obtidos a partir dos testes de modulação de cumarinas sintéticas obtidas a partir do eugenol e Dihidroeugenol. Para melhor compreensão os resultados foram expressos utilizando figuras contendo estruturas químicas e gráficos e tabelas. Através das quais é possível observar e comparar a atividade de cada um dos nove compostos aqui descritos.

A fim de promover um embasamento técnico-científico, foi desenvolvida uma fundamentação teórica com base nos principais pesquisadores das áreas afins, através de buscas em base de dados. As ideias foram apresentadas por meio de citações indiretas, promovendo o diálogo entre os autores citados.

Para melhor explorar e embasar os resultados a estrutura do trabalho foi dividida em introdução geral seguida pelos objetivos, já o embasamento teórico foi dividido por subtítulos:

- Resistencia Bacteriana a Antibióticos que traz um panorama geral acerca da problemática em torno do desenvolvimento da resistência por microrganismos e seus impactos. Bem como os fatores que contribuem para o desenvolvimento deste fenômeno e papel da ciência nesta questão.

-Principais Bactérias Resistentes a Antibióticos, caracterizando o desenvolvimento da resistência em alguns microrganismos de interesse clínico, discutindo de que maneira estes microrganismo são selecionados e apresentam tal resistência. Subdividindo-se em: *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* que foram os microrganismos aqui abordados, assim será possível entender a classificação destas bactérias, principais infecções ocasionadas por elas e aspectos de sua resistência.

-Propriedades Químicas das Cumarinas, que caracteriza a classe de compostos aqui utilizadas, fazendo ainda um levantamento sobre os estudos que utilizaram a mesma classe, as atividades já elucidadas e a relação estrutura-atividade.

-Fototerapia e atividade bactericida, que aborda os mecanismos e aspectos principais da utilização da luz como terapia de inativação de microrganismos, estudos prévios, evidências científicas do métodos e aplicação dessa terapia.

Os capítulos I e II trazem os artigos publicados a partir da tese. O capítulo I intitulado “Dihydroeugenol Derivatives Associated with Blue LED Light: A Different form to Face Multidrug Resistant (MDR) Bacteria”, nesse artigo foram abordados os resultados dos testes como se comportaram os compostos derivados de Dihidroeuogenol e sua associação com antibióticos de referência, bem como, a sua atividade em associação com a luz de LED azul.

Já o capítulo II, com o título: “Photobiological Effect of Eugenol-Derived 3-Benzoylcoumarin Associated with LED Lights Against MDR Microorganisms”, que mostra como as benzoilcumarinas em associação com o LED azul foram capazes de mostrar efeito contra cepas bacterianas padrão e multirresistentes.

Por fim, para finalização da tese aborda-se uma discussão geral, considerações finais e perspectivas futuras para o tema em questão abordado, expondo o ponto de vista do autor acerca dos resultados obtidos, a fim de ampliar a visão de pesquisadores que também se interessem pelo tema em área semelhante.

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Verificar a atividade antibacteriana intrínseca de derivados de cumarinas associados a luz de LED azul e seu efeito em associação com antibióticos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o efeito fotobiológico dos compostos em associação a luz de LED azul;
- Avaliar os compostos com relação a sua atividade antibacteriana frente bactérias patogênicas;
- Verificar o efeito modulador de antibióticos dos compostos frente aos microrganismos resistentes;
- Verificar as atividades antibacteriana e moduladora dos compostos com a exposição ao comprimento de onda de luz azul (LED).



#### 3.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS

A descoberta dos antibióticos foi crucial para medicina moderna, e contribuiu de forma significativa para aumento da expectativa de vida e diminuição da mortalidade infantil, além disso, são decisivos para cirurgias invasivas e tratamentos como a quimioterapia. Por outro lado, há um aumento significativo de infecções decorrentes de bactérias multirresistentes em todo o mundo, o que potencializa o número de infecções intratáveis (DAVIES et al., 2013).

Embora ocorra naturalmente, a resistência pode ser desencadeada por uma série de fatores ambientais, como o uso de maneira incorreta e excessiva de antimicrobianos, principalmente na agropecuária. Uma vez que esta prática acaba por selecionar os microrganismos mais resistentes quando utilizados para tratar ou prevenir infecções na produção animal. Por consequência, os seres humanos entram em contato direto ou indireto com essas formas resistentes, seja pelo manuseio ou consumo do alimento, e pela poluição produzida pelos resíduos biológicos agrícolas (ROCA et al., 2015).

O problema se agrava pelo uso indiscriminado de antibióticos pela população, através da prática da automedicação, em partes pela falta de conhecimento deste público, ou devido a ausência de fiscalização do consumo de antimicrobianos. Aliado a isso há o baixo investimento em pesquisa e desenvolvimento de antibióticos inovadores. Diante disso, nos últimos 40 anos, o desenvolvimento de antibióticos novos foi praticamente inexistente. Entre as consequências desse uso irregular e disseminado de antibióticos, incluem as infecções nosocomiais, de origem hídrica e alimentar, enteropatias, entre outras infecções ocasionadas por bactérias resistentes (BECATTINI; TAUR; PAMER, 2016; PAVYDĚ et al., 2015; UNITED NATIONS, 2016).

O auge da descoberta de antibióticos foi entre os anos 1960 e 70, mas esses achados declinaram rapidamente em virtude da identificação de novos compostos ter se tornado mais desafiadora. Outro fator que contribuiu para o crescimento da resistência foi o investimento e esforços das grandes farmacêuticas em áreas mais lucrativas. Assim, para enfrentar o problema da resistência é necessário o apoio e aumento da pesquisa e desenvolvimento de antibióticos. No entanto, é necessário saber que os microrganismos continuarão respondendo a eles e desenvolvendo resistência, já que isso é uma característica evolutiva, assim os estudos dos mecanismos de resistência devem ser contínuos, resilientes e estáveis (MUNITA; ARIAS, 2016).

## 3.2 PRINCIPAIS BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

A resistência bacteriana pode ser intrínseca ou adquirida. Quando intrínseca, a espécie é capaz de resistir a ação de um antibiótico como resultado de características estruturais e funcionais inerentes à bactéria. Isso porque as bactérias possuem uma plasticidade genética, de tal maneira que conseguem responder a uma gama de ameaças ambientais, nas quais estão inclusas as moléculas de antibióticos. Quando adquirida ocorre por meio de mutações em genes cromossômicos e transferida de maneira horizontal. (BLAIR et al., 2015; MUNITA; ARIAS, 2016).

Algumas bactérias patogênicas, por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, tem como característica a baixa permeabilidade da membrana lipopolissacarídica externa, o que as tornam resistentes naturalmente a muitos antibióticos, já que essa membrana servirá como obstáculo na difusão de antibióticos para o interior da bactéria (COCULESCU, 2009).

Em 2017, a Organização Mundial de Saúde, relatou por meio de um documento que os estudos envolvendo novos antibióticos devem priorizar as bactérias que tem poucas opções de tratamento. Este documento incluiu como prioridade crítica, Enterobacteriaceae resistentes a carbapenêmicos e as cefalosporinas de 3ª geração, onde se enquadram entre outras bactérias *Escherichia coli*, e como prioridade alta *S. aureus* resistente a vancomicina e a meticilina (WHO, 2017).

Em estudo realizado com materiais utilizados em ambientes hospitalares a resistência foi detectada em 93,33% (98) isolados. Foram coletadas 138 amostras em 27 instrumentos (52,17%), 50 equipamentos (36,23%) e 16 itens relacionados à higiene e antissepsia (11,59%). Nesse universo amostral foram isoladas 105 cepas. 83,81% (88) correspondiam a bactérias gram-positivas que apresentaram resistência a sulfazotrim, penicilina, ampicilina, norfloxacin, clindamicina e oxacilina. Todas as amostras foram sensíveis a vancomicina. Já as bactérias gram-negativas (16,19%) foram mais resistentes a sulfazotrim, ampicilina, amoxicilina, clorexidina, ácido nalidíxico e cefoxitina (SOUZA et al., 2021).

### 3.2.1 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Um dos principais representantes do grupo de gram-positivos, *Staphylococcus aureus* é encontrada colonizando as narinas anteriores em 20-25% da população adulta saudável, estando associada a um risco aumentado de infecção. Assim, pode causar infecções de pele e tecidos moles, uma vez que coloniza esses indivíduos. As infecções cutâneas costumam ser autolimitadas, no

entanto, podem servir de porta de entrada para tecidos mais profundos e na corrente sanguínea, ocasionando bacteremia (ELLIS et al., 2014; YAROVOY et al., 2019).

Esta espécie é versátil e pode sobreviver em condições hostis, causando infecções purulentas graves mediadas por toxinas. Podem causar ainda, intoxicação alimentar e algumas infecções mais agressivas, síndromes de choque tóxico, endocardite, meningite, osteomielite e pneumonia (GUACA-GONZÁLEZ et al., 2018).

Para avaliação dessas infecções é necessário averiguar os sinais e sintomas clínicos, aliados a histórias e achados físicos. Na maioria dos casos a cultura de rotina costumam revelar o diagnóstico, entretanto para casos de difícil diagnóstico pode ser necessário a realização de PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real, buscando genes 16S rRNA. Na orientação do tratamento, realiza-se os teste de sensibilidade aos antibióticos, antibiograma, tomando o cuidado de não haver contaminação, pois a presença de *S. aureus* na pele ou mucosa não indica obrigatoriamente uma infecção, já que este faz parte da microbiota (RASIGADE; VANDENESCH, 2014).

*S. aureus* desenvolve resistência aos antibióticos através da mutação em seus genes ou através da aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma ou até de outra espécie. Quando há a mutação do gene gera-se uma alteração no sítio de ação do antibiótico, já quando a resistência é adquirida por meio de genes transmitidos, geralmente envolve a inativação ou destruição da droga. A prevalência de *S. aureus* Resistente a Meticilina (MRSA) pode ser determinada por meio de estudos genéticos e já se sabe que a disseminação de clones foi responsável por essa prevalência, assim a caracterização fenotípica e genotípica auxilia na avaliação da disseminação dessas cepas (BERNARD et al., 2004; SANTOS et al., 2007).

Desta maneira, é essencial os cuidados no tratamento das infecções por este tipo de bactérias, limitando a duração do uso de antibiótico a não mais do que 7 a 10 dias, uma vez que já se sabe que a prescrição empírica de antibióticos levou a seleção das cepas resistentes. Para tanto, é necessária uma colaboração multiprofissional das equipes de saúde no sentido de direcionar a terapia, registrar o progresso para que ocorra a modificação do regime em casos de tratamentos ineficazes (TAYLOR; UNAKAL, 2020).

### 2.2.2 *ESCHERICHIA COLI*

*Escherichia coli* pertence à família Enterobacteriaceae, na classe Gammaproteobacteria, apresenta forma de bastão e é classificada como gram-negativa. Esta bactéria está entre as mais bem estudadas. Pode crescer rapidamente, se replicando em aproximadamente 20 min em condições ideais. Uma das utilizações mais comuns para essa bactérias é para avaliar a qualidade da água,

alimentos e solo por indicar contaminação fecal, uma vez que algumas cepas e sorotipos podem causar doenças em humanos (JANG et al., 2017).

*E. coli* é relatada entre as principais causas de diarreia bacteriana, principalmente entre crianças menores de cinco anos. Através da identificação de fatores de virulência e mecanismos de patogenicidade foram classificados seis tipos patogênicos: *E. coli* enteropatogênica (ECEP), *E. coli* enterotoxigênica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* shigatoxigenica (ECST), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* aderente difusa (ECAD). Desses tipos a enteropatogênica é o mais associado à diarreia em bebês, ocasionando febre e vômitos (GRUNDMANN et al., 2017; PÉREZ; GÓMEZ-DUARTE; ARIAS, 2010; SMALL et al., 2013).

A partir desses patótipos podem resultar três síndromes clínicas principais, a doença entérica/ diarreica, infecções do trato urinário (ITU) e sepse/ meningite. ECEP e ECET também pode ocasionar doenças em animais com fatores de virulência semelhantes aos dos humanos, porém com fatores de colonização diferentes. Há ainda um patótipo especificamente animal, *E. coli* patogênica aviária (ECPA), que causa infecções extra intestinais, principalmente respiratórias, pericardite e septicemia em aves (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

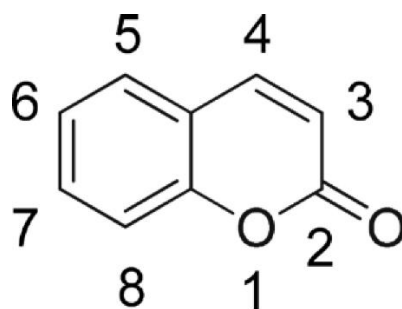
Estudos revelam a produção de enzimas responsáveis por resistência como as beta lactamases, mais presente na população acometida por ITU. Evento esse que só ocorria em ambientes hospitalares. Entre os fatores de risco para o desenvolvimento de infecções pelas cepas resistentes está o uso de antibióticos nos meses que antecedem a infecção (FAN et al., 2014; GOULENOK et al., 2013).

### 3.3 PROPRIEDADES QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS DAS CUMARINAS

As cumarinas compõe um grande grupo de metabólitos secundários das plantas, originadas a partir da via do ácido chímico. Estão presentes principalmente nos vegetais superiores, mas podem ser encontrados ainda em fungos e bactérias. O nome provém do caribenho *Cumarú*, nome popular da espécie *Dipterix odorata*, da família Fabaceae. Estruturalmente são lactonas, derivam do ácido *o*-hidróxi-cinâmico, sendo o representante mais simples a cumarina *per se* (1,2-benzopirona). Até então foram descritas, caracterizadas e isoladas cerca de 1400 cumarinas (RAZAVI, 2011; SANTOS; SIQUEIRA; SILVA-FILHO, 2013).

Este grupo de metabólito se classifica como heterocíclicos orgânicos e são caracterizados como 1,2 benzopirona, como mostra a figura 1. Em sua estrutura apresentam um anel pirano fundido ao benzeno com a carbonila da pirona no carbono 2, desta maneira são também chamadas de 2H-cromen-2-onas (KOSTOVA, 2006).

**Figura 1.** Estrutura Química da Cumarina



**Fonte:** Franco et al. (2021)

A função fisiológica das cumarinas nas plantas está relacionada ao papel antioxidante, atuando ainda como inibidores enzimáticos. Possuem também outras funções como controle do crescimento das plantas, envolvimento na respiração, fotossíntese e defesa contra infecções. Devido a sua gama de propriedades biológicas já reportadas houve um aumento pelo interesse no desenvolvimento da síntese orgânica, dessa maneira, obtendo compostos conhecidos em maior escala e novos derivados com utilidades biológicas e industriais (MEDINA et al., 2015).

As propriedades já conhecidas das cumarinas relatam atividade anti-inflamatória, antioxidante, anticoagulante, antibióticas, imunomodulatórias, antimicrobianas, antiviral e broncodilatadoras, com ampla utilização na medicina no tratamento de linfedemas, câncer, queimaduras, varizes e doenças reumáticas. Possuem ainda aplicações na indústria alimentícia, utilizadas como corantes e essências e em bebidas alcoólicas. Os setores de cosmético e higiene pessoal também conta com cumarinas como fixador de perfumes e em pasta de dentes. As cumarinas também apresentam diversas aplicações em diferentes áreas, sendo encontradas em borrachas sintéticas, materiais plásticos, inseticidas, detergentes, cigarros, tintas e sprays (AMMAR; FERY-FORGUES; EL GHARBI, 2003; JUNG; PARK, 2009; PAGONA; KATERINOPOULOS; TAGMATARCHIS, 2011; SANTOS; SILVA-FILHO, 2012).

A literatura relata que a estrutura química e os grupamentos presentes nas cumarinas e seus derivados apresenta relação direta com sua atividade. Dessa maneira, foi descrita, por exemplo, uma potente atividade antibacteriana em derivados cumarínicos combinados com 1,2,3-triazóis, podendo fornecer uma alternativa a superação da resistência aos medicamentos e melhoria da sua potência. Além disso, em estudo que sintetizou cumarino-triazóis foi obtido composto promissor com CIM – 130,7  $\mu$ M frente a *Enterococcus faecalis* (LÓPEZ-ROJAS et al., 2018; ZHOU; WANG, 2012).

Nas duas últimas décadas, foram estudadas e testadas uma ampla variedade de cumarinas para agente antimicrobianos, e alguns antibióticos já disponíveis no mercado são a base de cumarinas, como a novobiocina, aminocumarina e clorobiocina. Além disso, foram avaliados

alguns grupos farmacofóricos em algumas cumarinas sintéticas para diferentes aplicações biológicas (KHARB; KARUS; SHARMA, 2013; SUROWIAK et al., 2021).

### 3.4 TERAPIA FOTODINÂMICA E ATIVIDADE BACTERICIDA

O interesse em métodos que inativam microrganismos utilizando a luz vem aumentando, principalmente como alternativa ao enfretamento da resistência bacteriana. A luz ultravioleta (UV) já é bem consolidada pela sua atividade antimicrobiana, pois induz efeitos danificando o DNA. Por este mesmo motivo a utilização desse tipo de luz em tratamentos se torna limitada, pois pode ser prejudicial a pele e componentes dos olhos. Por outro lado, a luz visível já é utilizada em tratamentos como câncer e outras doenças, neste tipo de terapia a inativação ocorre pela adição de moléculas fotossensibilizantes (HAMBLIN; HASAN, 2004; MACLEAN et al., 2009).

A terapia fotodinâmica pode utilizar fotossensibilizadores exógenos, que uma vez introduzidos nas células, são irradiados com um comprimento de onda adequado de luz visível ou infravermelha. Quando ativadas, as moléculas do fotossensibilizador passa sua energia para o oxigênio molecular circulante, formando espécies reativas de oxigênio (ERO's). Estudos relatam o efeito da luz visível como bactericida, em sua maioria, afirmando que o comprimento de onda entre 400 e 500 nm, luz azul, é o responsável por matar vários patógenos, por induzir a formação de uma maior quantidade de ERO's (LUBART et al., 2011).

O uso de corantes ativáveis por luz vem sendo desenvolvidos desde a descoberta do processo fotodinâmico, no século 20. Já nas últimas duas décadas, vem sendo feitas várias abordagens na tentativa de otimizar as propriedades dos fotossensibilizadores, pela modificação da estrutura química ou pelo desenvolvimento de novas classe. Muitos estudos vêm investigando a eficácia antimicrobiana de terapia fotodinâmica aplicando fotossensibilizadores desde a década de 1990. Muitos desses estudos mostraram resultados promissores alcançando altas taxas de inativação (BOYCE; PITTET, 2002; WAINWRIGHT et al., 2017).

Entretanto, as bactérias gram-negativas são resistentes a terapia fotodinâmica com os fotossensibilizadores mais comumente usadas, já para as gram-positivas estes produtos são capazes de levar facilmente a fototoxicidade. Dessa maneira, os fotossensibilizadores que sejam capazes de aumentar a permeabilidade da membrana externa aumentará a eficácia em matar microrganismos gram-negativos. As evidências relatam que as cepas resistentes a antibióticos têm a mesma suscetibilidade de serem mortas pela terapia fotodinâmica que as cepas selvagens, e que as bactérias não desenvolverão prontamente resistência a essa terapia (HAMBLIN; HASAN, 2004).

Em trabalho realizado com vários patógenos de interesse clínico, fez-se a exposição desses microrganismos a um comprimento de onda de  $405 \pm \text{nm}$ , o estudo não utilizou fotossensibilizador exógeno. Foi possível notar uma eficácia do efeito bactericida deste comprimento que teve efeito fototóxico em uma gama de bactérias, como, *Staphylococcus aureus*-MRSA, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium perfringens*, do grupo de gram-positivas e *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Phaseolus vulgaris* e *Klebsiella pneumoniae*. No entanto, demonstrou-se que bactérias gram-positivas são mais suscetíveis do que as gram-negativas (MACLEAN et al., 2009).

Dessa maneira, evidencia-se que a terapia fotodinâmica é provida de características favoráveis ao tratamento de infecções microbianas, possuindo um amplo espectro de ação, inativação eficaz de cepas resistentes a antibióticos, baixo potencial mutagênico e a ausência de seleção de microrganismos fotorresistentes. Portanto, pesquisas vem evoluindo no sentido de definirem o escopo e o campo de aplicação dessa abordagem terapêutica (JORI et al., 2006).

### DIHYDROEUGENOL DERIVATIVES ASSOCIATED WITH BLUE LED LIGHT: A DIFFERENT FORM TO FACE MULTIDRUG RESISTANT (MDR) BACTERIA.

Autores:

Amanda Karine de Sousa, Janaina Esmeraldo Rocha, Thiago Sampaio de Freitas, Priscila Ramos Freitas, Raimundo Luiz Silva Pereira, Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro, José Vaz Cardoso Machado, Lucas Martins de Oliveira, Elkin Jose Torres Sierra, Francisco Nascimento Pereira Júnior, Diogo Teixeira Carvalho, Henrique Douglas Melo Coutinho, Lucindo José Quintans Júnior.

Revista: *Microbial Pathogenesis*; Fator de Impacto: 3,848; Qualis: A3

Link de acesso: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105827>

Situação: Publicado

Resumo do artigo em português

O eugenol já teve suas propriedades farmacológicas elucidadas em estudos anteriores, entre elas, as propriedades antibacteriana e antifúngica. A partir de tais informações, este estudo objetivou avaliar a atividade antibacteriana e moduladora de compostos cumarínicos preparados a partir de Dihidroeugenol e associá-los a luz de LED azul para a mesma atividade. Para este estudo foram utilizadas e testadas cinco das substâncias disponibilizadas. Foram identificadas como: composto 1 (C1), ácido 8-metoxi-2-oxo-6-propil-2H-cromen-3-carboxílico, composto (C2), 3-(hidroxi(4-nitrofenil)metil)-8-metoxi-6-propil-2H-cromen-2-ona, composto 7 (C3), 8-hidroxi-3-(4-nitrobenzoi)-6-propil-2H-cromen-2-ona, composto 8 (C4), 3-(4-aminobenzoi)-8-metoxi-6-propil-2H-cromen-2-ona e composto 9 (C5), 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoi)-6-propil-2H-cromen-2-ona. Para determinar a CIM foi realizada a técnica de microdiluição em caldo. Após a determinação da CIM, os produtos foram avaliados quanto ao potencial de modularem a atividade de antibióticos. Depois as placas foram subdividas em dois grupos, o primeiro foi submetido à luz de LED azul durante vinte minutos cada placa e o segundo grupo não foi submetido às luzes de LED. As placas foram incubadas a  $35 \pm 2$  °C, durante 24h e reveladas com resazurina. Quando expostos ao LED o C3 exibiu uma diminuição da CIM para SA ATCC e C5 para EC ATCC, com uma média de 645,08 µg/mL para ambos os casos. C2 e C4 exibiram sinergismo em maior número de situações quando comparados aos demais compostos. No entanto, o C3 mostrou uma atividade promissora contra *S. aureus* em quase todas as situações testadas. C1 e C2 já atuaram melhor contra *E. coli*, com o diferencial que C1 atuou melhor contra estas bactérias quando associado ao LED, ao contrário de C2 que não respondeu bem a este estímulo, alterando inclusive comportamentos de sinergismo para antagonismo após a exposição. De maneira geral, os compostos aqui estudados exibiram boa atividade antibacteriana quando associados ao LED, no entanto, é necessário conhecer suas propriedades de atuação para esclarecer o mecanismo pelo qual atuam na morte das bactérias em associação com a luz.

Palavras-chave: Atividade modulatória. Cumarinas. Fototerapia. Resistência aos antimicrobianos.





## Dihydroeugenol derivatives associated with blue LED light: A different form to face multidrug resistant (MDR) bacteria

Amanda Karine de Sousa<sup>a</sup>, Janaina Esmeraldo Rocha<sup>b</sup>, Thiago Sampaio de Freitas<sup>b</sup>, Priscila Ramos Freitas<sup>b</sup>, Raimundo Luiz Silva Pereira<sup>b</sup>, Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro<sup>a</sup>, José Vaz Cardoso Machado<sup>c</sup>, Lucas Martins de Oliveira<sup>c</sup>, Elkin Jose Torres Sierra<sup>c</sup>, Francisco Nascimento Pereira Júnior<sup>d</sup>, Diogo Teixeira Carvalho<sup>c</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>b,\*</sup>, Lucindo José Quintans Júnior<sup>e,\*\*</sup>

<sup>a</sup> University Center Dr. Leão Sampaio - UNILEÃO, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

<sup>b</sup> Regional University of Cariri - URCA, Crato, CE, Brazil

<sup>c</sup> Federal University of Alenas - UNIFAL, MG, Brazil

<sup>d</sup> Federal University of Cariri - URCA, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

<sup>e</sup> Federal University of Sergipe - UFS, Sergipe, SE, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Modulating activity  
Coumarins  
Phototherapy  
Antimicrobial resistance

### ABSTRACT

Eugenol has already had its pharmacological properties elucidated in previous studies, including antibacterial and antifungal properties. Based on such information, this study aimed to evaluate the antibacterial and modulatory activity of coumarin compounds prepared from dihydroeugenol and to associate them with blue LED light for the same activity. For this study, five of the substances available: compound 1 (C1), 8-methoxy-2-oxo-6-propyl-2H-chromen-3-carboxylic acid, compound (C2), 3-(hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)-8-methoxy-6-propyl-2H-chromen-2-one, compound 7 (C3), 8-hydroxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-chromen-2-one, compound 8 (C4), 3-(4-aminobenzoyl)-8-methoxy-6-propyl-2H-chromen-2-one and Compound 9 (C5), 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-chromen-2-one 2-one. To determine the MIC, the broth microdilution technique was used. The products were evaluated for their potential to modulate the activity of antibiotics. Afterward, the plates were submitted to blue LED light for 20 min. When exposed to LED, C3 exhibited a decrease in MIC for SA ATCC and C5 for EC ATCC, with an average of 645.08 µg/mL for both cases. C2 and C4 exhibited synergism in a greater number of situations. However, C3 showed promising activity against *S. aureus*. C1 and C2 already acted better against *E. coli*, with the difference that C1 acted better against these bacteria when associated with LED. In general, the compounds studied here exhibited good antibacterial activity when associated with LED.

### 1. Introduction

The healing ability of antibiotics had an impact on medicine. However, these drugs lose their effectiveness with continued use. Resistance to these drugs is increasing, on the other hand, the development of new antibiotics is slowing down, which can cause the loss of these drugs to the practice of medicine [1]. In this way, research is focused on finding new substances with antimicrobial activity or that can potentiate the effect of existing antibiotics. In addition to recent studies showing the

benefits of using probiotics to modulate the immune system [2–4].

Several strands have been developed to seek alternatives for antimicrobial resistance, including the study of natural products based on ethnopharmacology. In this line of research, eugenol has already had its pharmacological properties elucidated in previous studies, including antibacterial and antifungal properties [5–7]. Synthetic compounds obtained from natural phenylpropanoids, such as eugenol and its analogs, dihydroeugenol and isoeugenol, also showed promising antimicrobial activity [8–10].

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

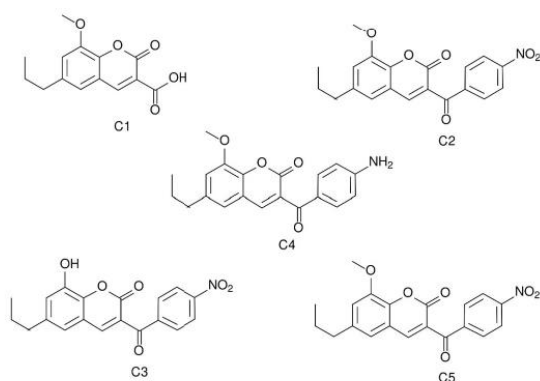
E-mail addresses: [amandakarinedesousa@gmail.com](mailto:amandakarinedesousa@gmail.com) (A.K. de Sousa), [hdmcoutinho@urca.br](mailto:hdmcoutinho@urca.br) (H.D.M. Coutinho).

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105827>

Received 27 July 2022; Received in revised form 7 October 2022; Accepted 10 October 2022

Available online 13 October 2022

0882-4010/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.



**Fig. 1.** Structural representation of compounds derived from dihydroeugenol. \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001 indicate significant difference between the groups.

**Table 1**  
Minimum inhibitory concentration (MIC) of eugenol-derived coumarins.

Treatment	E.C ATCC 25922	S.A ATCC 25923	E.C 06	S.A 10
C1	1024	1024	1024	1024
C1 + blue LED	1024	1024	1024	1024
C2	1024	1024	1024	1024
C2 + blue LED	1024	1024	1024	1024
C3	1024	1024	1024	1024
C3 + blue LED	1024	645,08	1024	1024
C4	1024	1024	1024	1024
C4 + blue LED	1024	1024	1024	1024
C5	1024	1024	1024	1024
C5 + blue LED	645,08	1024	1024	1024

Abbreviations: S.A., *Staphylococcus aureus*; E.C., *Escherichia coli*.

C1: 8-methoxy-2-oxo-6-propyl-2H-chromen-3-carboxylic acid.

C2: 3-(hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)-8-methoxy-6-propyl-2H-chromen-2-one.

C3: 8-hydroxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-chromen-2-one.

C4: 3-(4-aminobenzoyl)-8-methoxy-6-propyl-2H-chromen-2-one.

C5: 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-chromen-2-one. MIC values were expressed in µg/mL.

The association of these compounds with other technologies already used for these purposes also showed antibacterial action, such as Light Emitting Diodes (LED) [11–13]. This type of technology is already used to treat some infections, and also to promote wound healing, tissue repair and other effects on skin diseases. This feature produces safe radiating power, consumes little power, has a long lifespan, good power and low intensity [14,15].

Based on such information, this study aimed to evaluate the antibacterial and modulatory activity of coumarin compounds prepared from dihydroeugenol and to associate them with blue LED light for the same activity.

## 2. Results

Compound 1 (C1), 8-methoxy-2-oxo-6-propyl-2H-chromen-3-carboxylic acid, Compound 2 (C2), 3-(hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)-8-methoxy-6-propyl-2H-chromen-2-one, compound 3 (C3), 8-hydroxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-chromen-2-one, compound 4 (C4), 3-(4-aminobenzoyl)-8-methoxy-6-propyl-2H-chromen-2-one and compound 5 (C5), 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-chromen-2-one (Fig. 1) had their activities tested against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria, standard (ATCC) and multiresistant strains, modulated with the antibiotics norfloxacin, gentamicin and ampicillin, also used as modulation control.

The Minimum Inhibitory Concentration of these compounds, for the standard and multiresistant strains of the bacteria tested, was greater than or equal to 1024 µg/mL, all tests without exposure to LED, whereas when exposed to LED, C3 exhibited a decrease in MIC for SA ATCC and C5 for EC ATCC, with an average of 645.08 µg/mL for both cases (Table 1).

8-methoxy-2-oxo-6-propyl-2H-chromen-3-carboxylic acid acted antagonistically in most conditions tested with *S. aureus*. There was synergism after LED exposure with norfloxacin, albeit without significance, and with ampicillin (Fig. 2A). Conversely, in tests for *E. coli*, C1 exhibited synergism in most interactions and was indifferent when associated with norfloxacin and ampicillin, without LED exposure. This compound responded well to modulation with gentamicin, showing to potentiate the action of this antibiotic. In the exposure to blue LED, the response was also synergistic, in addition there was a reduction in the MIC of gentamicin and ampicillin (Fig. 2B).

With regard to 3-(hydroxy(4-nitrophenyl) methyl)-8-methoxy-6-propyl-2H-chromen-2-one, when tested in association with antibiotics for the bacterium *S. aureus*, it exhibited synergism with the three drugs tested. In the exposure to blue LED, there was a reversal of the behavior in relation to norfloxacin, however it is possible to verify that this occurred due to the reduction of the MIC of the antibiotic. Although this antagonistic activity was also shown with gentamicin, it can be seen that the MIC was reduced in relation to the situation without exposure to LED, showing a potentiation of antibacterial activity (Fig. 3A).

When tested in modulation of antibiotics against *E. coli*, C2 showed synergism. When we associate exposure to blue LED, we can see a drop in the MIC of antibiotics that caused antagonism with norfloxacin and gentamicin. Ampicillin, on the other hand, showed synergism despite the decrease in MIC values (Fig. 3B).

The modulation of 8-hydroxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-chromen-2-one was shown to be synergistic with respect to *S. aureus*. With exposure to LED, synergism was maintained, with a decrease in the MIC of norfloxacin and ampicillin. On the other hand, gentamicin, in association with C3, reacted differently to LED, displaying an indifferent MIC in relation to the control (Fig. 4A).

For *E. coli*, this compound acts potently, exhibiting low MICs when associated with gentamicin and ampicillin, although it is possible to note a slight degree of antagonism for gentamicin. This effect was accentuated with the blue LED, particularly for ampicillin. In the modulation with norfloxacin, there was antagonism, with and without LED exposure (Fig. 4B).

3-(4-aminobenzoyl)-8-methoxy-6-propyl-2H-chromen-2-one showed synergism when modulated with gentamicin and ampicillin against *S. aureus*. When exposed to LED, it was possible to observe synergism with all norfloxacin and ampicillin, while for gentamicin it was indifferent. An important effect also under these conditions was the reduction of the MIC of ampicillin (Fig. 5A). In contrast to *E. coli*, there is a synergistic effect with norfloxacin and gentamicin and with exposure to blue LED, there was also synergism with ampicillin. Exposure to LED had little change in the response pattern with the other antibiotics, but it is possible to observe low MIC values for gentamicin and ampicillin (Fig. 5B).

In reference to 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-chromen-2-one modulated gentamicin and ampicillin against *S. aureus* resulted in synergism, emphasizing its interaction with gentamicin which potentiated to a high degree the gentamicin. However, exposure to LED in this case interfered in this synergism in a negative way, maintaining the same pattern only for ampicillin (Fig. 6A). Modulation for *E. coli* did not show synergistic activity, however it exhibited low MIC values for gentamicin and ampicillin. When exposed to LED, there was synergism with ampicillin (Fig. 6B).

In summary of the behavior of the compounds, it can be seen that C2 and C4 exhibited synergism in a greater number of situations when compared to the other compounds. However, C3 showed promising activity against *S. aureus* in almost all situations tested. C1 and C2



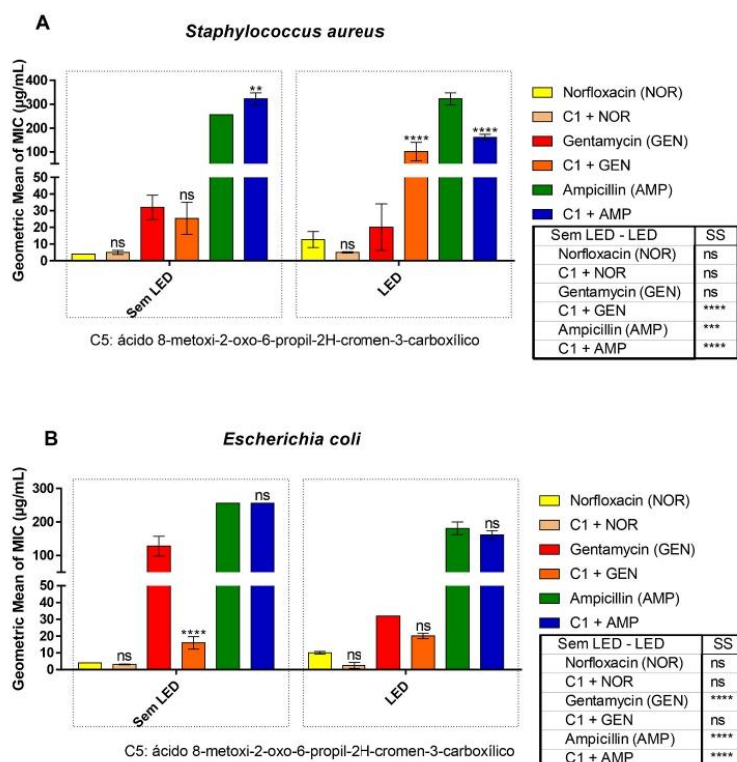


Fig. 2. Geometric Mean Minimum Inhibitory Concentration of 3-(4-aminobenzoyl)-8-methoxy-2H-chromen-2-one modulation against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with and without exposure to blue LED.

\* $p < 0,1$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  indicates significant difference between groups.

already acted better against *E. coli*, with the difference that C1 acted better against these bacteria when associated with LED, unlike C2 that did not respond well to this stimulus, even changing behaviors from synergism to antagonism after exposure (Table 2).

### 3. Discussion

In a study carried out with the modulation of *Eugenia uniflora* L. essential oil in association with LED lights, an increase in the inhibition halo for *E. coli* and *S. aureus* of ciprofloxacin was observed when associated with red and blue lights. In this study, when exposed to blue light, compounds 3 and 5 exhibited a decrease in MIC for *S. aureus* and *E. coli*, respectively. This may indicate the interaction between them and the blue LED, suggesting an increase in the formation of reactive oxygen species or an increase in the permeability of barriers against antibiotics in bacteria, causing their death [16].

Another promising study with the use of LED light was carried out with the essential oil of *Eugenia jambolana* against *S. aureus* and *E. coli*, showing that ciprofloxacin and norfloxacin under red and blue LED exposure caused an increase in the inhibition halo, indicating that these treatments showed synergism, however, the addition of the oil of this species showed no difference to these treatments [11]. In this study, it was also possible to observe that in some cases there was a reduction in the MIC of the antibiotic after exposure to the blue LED.

To be considered an excellent photosensitizing agent, with properties suitable for the treatment of microbial infections, the compound must exhibit the expected photophysical characteristics, such as high

quantum yield to generate cytotoxic oxygen species in both triplet and singlet states. These characteristics include a great affinity for microbial cells, the broad spectrum of action, a cell inactivation mechanism that minimizes the risk of selection of resistant strains or that allows adjusting the therapeutic window so that there is extensive death of bacteria without damage or with minimal damage to the host tissue in the area of infection, in addition to preventing the growth of new pathogens after treatment [17].

### 4. Materials and methods

#### 4.1. Obtaining compounds

The substances used were kindly provided by the Pharmaceutical Chemistry Research Laboratory – LQFar, from the Faculty of Pharmaceutical Sciences at UNIFAL, Minas Gerais, Brazil, following the procedures described by Brancaglioni et al. (2018). For this study, five substances were tested, namely: compound 1 (C1), 8-methoxy-2-oxo-6-propyl-2H-chromen-3-carboxylic acid, compound 2 (C2), 3-(hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)-8-methoxy-6-propyl-2H-chromen-2-one, (C3), 8-hydroxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-chromen-2-one, (C4), 3-(4-aminobenzoyl)-8-methoxy-6-propyl-2H-chromen-2-one and (C5), 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-chromen-2-one.

#### 4.2. Microorganisms

The Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM) of

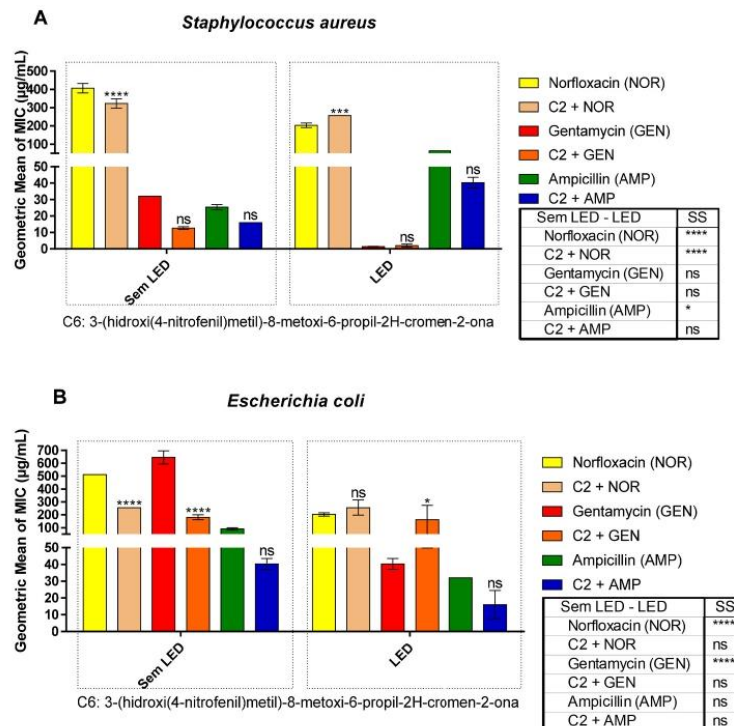


Fig. 3. Geometric Mean Minimum Inhibitory Concentration of 3-(hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)-8-methoxy-6-propyl-2H-chromen-2-one modulation against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with and without exposure to blue LED.  
\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  indicates significant difference between groups.

the Universidade Regional do Cariri (URCA) provided the strains used in the study. Bacteria standard strains (*Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) and multiresistant strains (*Staphylococcus aureus* 10 and *Escherichia coli* 06) were used.

#### 4.3. Minimum inhibitory concentration

To determine the MIC, the broth microdilution technique was performed in sterile 96-well plates, performing serial dilutions 1:1 [18]. Microbial cultures kept on stock agar under refrigeration in brain and heart infusion (BHI) broth were performed and incubated at 37 °C for 24 h. After this period, a BHI suspension was prepared, standardizing the inoculum through turbidity so that it was similar to the 0.5 tube on the McFarland scale. ( $1 \times 10^8$  CFU/mL). This suspension was diluted 100 times in BHI medium, which corresponds approximately to a suspension containing  $1 \times 10^6$  CFU/mL, 100 µL of this suspension was taken and diluted with 900 µL of BHI in an eppendorf. From this last dilution, the plate column was filled and microdiluted with 100 µL of the product to be tested until the penultimate well.

The substances to be evaluated were solubilized in 9265 µL of distilled water and 500 µL of DMSO, to obtain an initial concentration of 1024 µg/mL. The final concentrations of the samples in the culture medium were 512, 256, 128, 64, 32, 16 and 8 µg/mL.

Each test was performed in triplicate for the columns of the plates and each plate was prepared in duplicate, because one of them was exposed to LED for 20 min, while the other was not. The plates were incubated at  $35 \pm 2$  °C for 24 h. After this time, 20 µL of resazurin, a specific dye to reveal bacterial growth, was added to each well, and after 1 h at room temperature, the test was read. This solution was prepared in

sterile distilled water at a concentration of 0.01% (w/v). For the reading, the determination is made by staining the culture medium, being considered positive for wells that do not show microbial growth, that is, those with a red stain remain blue and negative [19].

The positive control of the test was performed with the culture media containing the inoculum. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was defined as the lowest concentration capable of completely inhibiting microbial growth in the microdilution wells as detected macroscopically.

After determining the MIC, the products were evaluated for their potential to modulate the activity of antibiotics. For this procedure, Eppendorf® tubes containing 1.5 mL are used, of which 150 µL are from the bacterial inoculum, product volume at sub-inhibitory concentration (MIC/8) and the remaining volume of BHI medium. Subsequently, microdilution with antibiotics is performed, diluting in water or DMSO (depending on the solubility of the antibiotic) and using 100 µL to microdiluted in the wells up to the penultimate well. A column containing antibiotic, medium and inoculum is also made on this plate, which will be used as a modulation control.

#### 4.4. Evaluation of photoactive effect with LED exposure

To carry out these tests, the same methodologies were initially used for the test to assess the antibacterial activity by microdilution. Then the plates were subdivided into two groups, first was subjected to blue LED light for 20 min each plate and the second group was not subjected to LED lights. To expose the plates, three devices from the New Estética® brand were used, using an MDF box covered internally with laminated paper and with three holes in the lid, as an apparatus to isolate each

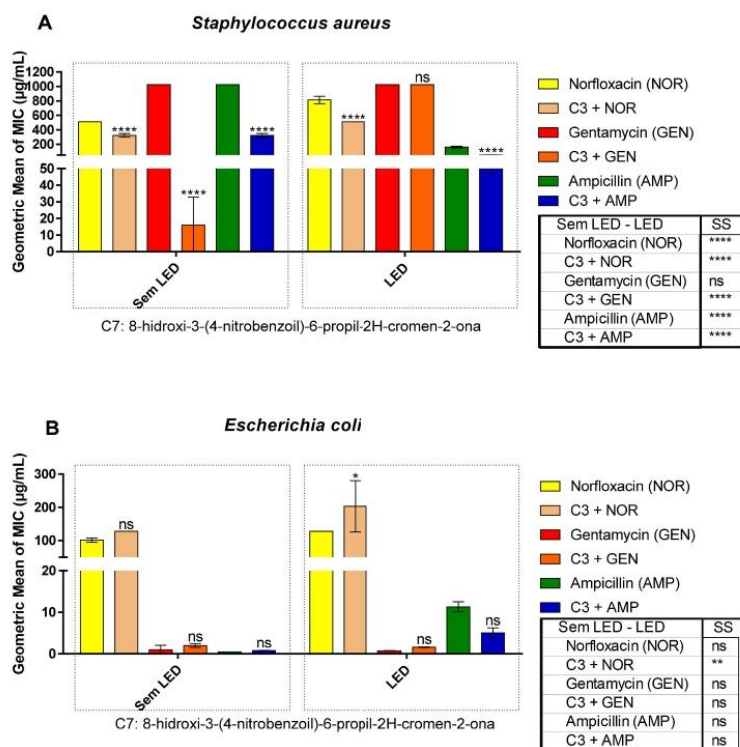


Fig. 4. Geometric Mean of Minimum Inhibitory Concentration of the modulation of 8-hydroxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-cromen-2-one against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with and without exposure to blue LED. \*\*\*\* $p < 0,0001$  indicates significant difference between groups.

plate from the external light [16]. Plates were incubated at  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  for 24h.

#### 4.5. Statistical analysis

The central data and standard deviations were obtained according to the methodology of [20], on microbiological analysis in microdilution plates. Data were analyzed using the statistical program GraphPad Prisma 5.0 through a two-way ANOVA test. Afterward, a *post hoc* Bonferroni test was performed (where  $p < 0.05$  was considered significant and  $p > 0.05$  non-significant).

#### 5. Conclusions

In general, when evaluating the compound that exhibited synergism with antibiotics, C2 and C4 stand out. In the evaluation of bacteria alone, C3 had better action against *S. aureus*, while C1 and C2 showed promising activity against *E. coli*. In response to LED, C1 exhibited more synergism situations, showing to act well when associated with this factor, especially for *E. coli*. C2, on the other hand, exhibited synergism in all situations tested without the LED and in some cases the exposure to it reverted to antagonism, showing not to respond well to the association with the LED.

The compounds studied here exhibited good antibacterial activity when associated with LED, however, it is necessary to know their action properties to clarify the mechanism by which they act in the death of bacteria in association with light.

#### Funding

This research received no external funding.

#### CRediT authorship contribution statement

**Amanda Karine de Sousa:** Conceptualization. **Janaina Esmeraldo Rocha:** Investigation. **Thiago Sampaio de Freitas:** Investigation. **Priscila Ramos Freitas:** Methodology. **Raimundo Luiz Silva Pereira:** Methodology. **Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro:** Software. **José Vaz Cardoso Machado:** Methodology. **Lucas Martins de Oliveira:** Methodology. **Elkin Jose Torres Sierra:** Methodology. **Francisco Nascimento Pereira Júnior:** Writing – original draft, Software. **Diogo Teixeira Carvalho:** Resources. **Henrique Douglas Melo Coutinho:** Supervision, Project administration. **Lucindo José Quintans Júnior:** Supervision.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Data availability

Data will be made available on request.



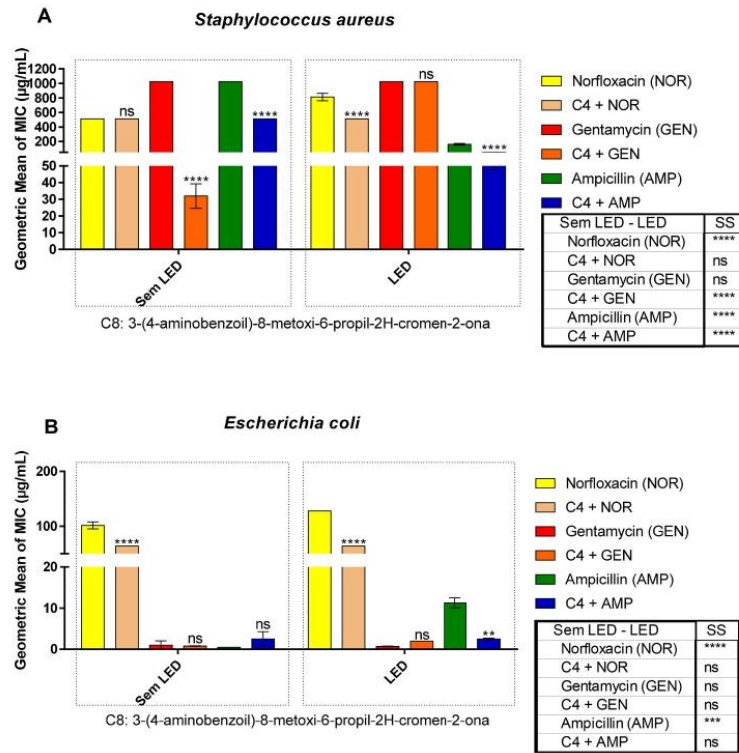


Fig. 5. Geometric Mean of Minimum Inhibitory Concentration of the modulation of 3-(4-aminobenzoil)-8-metoxi-6-propil-2H-cromen-2-one against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with and without exposure to blue LED.  
 \* $p < 0,1$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  indicates significant difference between groups.

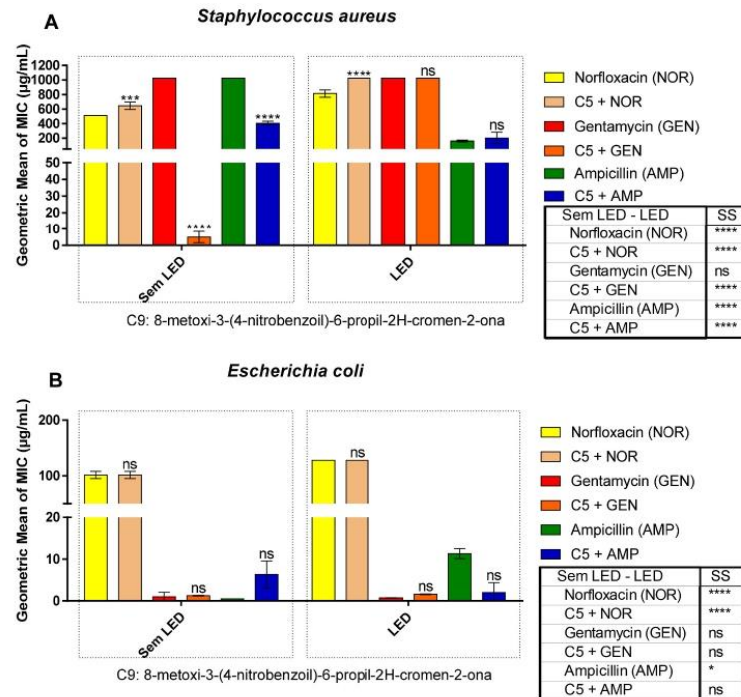


Fig. 6. Geometric Mean Minimum Inhibitory Concentration of the modulation of 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-cromen-2-one against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with and without exposure to blue LED.

Table 2

Behavior of substances against bacteria modulated to antibiotics and exposed to LED.

Compounds	C1	C2		C3		C4		C5	
Antibiotics	SA	SA	EC	SA	EC	SA	EC	SA	EC
NOR	A	I	S	S	A	I	S	A	I
NOR + LED	S	S	A	A	S	A	S	A	I
GEN	S	S	S	S	A	S	S	S	I
GEN + LED	A	S	A	A	I	A	A	I	A
AMP	A	I	S	S	A	S	A	S	A
AMP + LED	S	S	S	S	S	S	S	I	S

Abbreviations: D.E., *Staphylococcus aureus*; E., *Escherichia coli*; Is, Antagonism; E, Synergism; I, Indifferent. NOR, Norfloxacin; GEN, Gentamicin; AMP, Ampicillin.

## References

- M. Öztekin, B. Yılmaz, D. Ağaçgözü, R. Capasso, Overview of *Helicobacter pylori* infection: clinical features, treatment, and nutritional aspects, *Diseases* 9 (2021) 66, <https://doi.org/10.3390/diseases9040066>.
- C. Nathan, Resisting antimicrobial resistance, *Nat. Rev. Microbiol.* 18 (2020) 259–260, <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0348-5>.
- L.S.J. Roope, R.D. Smith, K.B. Pouwels, J. Buchanan, L. Abel, P. Eibich, C.C. Butler, P.S. Tan, A. Sarah Walker, J.v. Robotham, et al., The challenge of antimicrobial resistance: what economics can contribute, *Science* (1979) 364, <https://doi.org/10.1126/science.aau4679>, 2019.
- N.Y. Yesilyurt, B. Yılmaz, D.A. Ağaçgözü, R. Capasso, V. Apostolopoulos, Involvement of Probiotics and Postbiotics in the Immune System Modulation, 2021, <https://doi.org/10.3390/biologies1020006>.
- A. Marchese, R. Barbieri, E. Coppo, I.E. Orhan, M. Daglia, S.F. Nabavi, M. Izadi, M. Abdollahi, S.M. Nabavi, M. Ajami, Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: a mechanistic viewpoint, *Crit. Rev. Microbiol.* 43 (2017) 668–689.
- D. Campaniello, M.R. Corbo, M. Sinigaglia, Antifungal activity of eugenol against *penicillium*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species, *J. Food Protect.* 73 (2010) 1124–1128.
- S. Hemaiswarya, M. Doble, Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against gram negative bacteria, *Phytomedicine* 16 (2009) 997–1005, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.04.006>.
- T.B. de Souza, K.M. de Oliveira Brito, N.C. Silva, R.P. Rocha, G.F. de Sousa, L. P. Duarte, L.F.L. Coelho, A.L.T. Dias, M.P. Veloso, D.T. Carvalho, et al., New eugenol glucoside derivative shows fungistatic and fungicidal activity against opportunistic *Candida glabrata*, *Chem. Biol. Drug Des.* 87 (2016) 83–90, <https://doi.org/10.1111/cbdd.12625>.
- T. dos Santos, C.M. Coelho, T.C. Elias, F.S. Siqueira, E.S.S.D. Nora, M.M.A. de Campos, G.A.P. de Souza, L.F.L. Coelho, D.T. Carvalho, Synthesis and biological evaluation of new eugenol-derived 1,2,3-triazoles as antimicrobial agents, *J. Braz. Chem. Soc.* 30 (2019) 1425–1436, <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190038>.
- T.B. de Souza, P.O.B. Raimundo, S.F. Andrade, T.M.M. Hipólito, N.C. Silva, A.L. T. Dias, M. Ikegaki, R.P. Rocha, L.F.L. Coelho, M.P. Veloso, et al., Synthesis and antimicrobial activity of 6-triazolo-6-deoxy eugenol glucosides, *Carbohydr. Res.* 410 (2015) 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.04.002>.
- N.L.F. Pereira, P.E.A. Aquino, J.G.A.S. Júnior, J.S. Cristo, M.A. Vieira Filho, F. F. Moura, N.M.N. Ferreira, M.K.N. Silva, E.M. Nascimento, F.M.A. Correia, et al., Antibacterial activity and antibiotic modulating potential of the essential oil obtained from *Eugenia jambolana* in association with led lights, *J. Photochem. Photobiol., B* 174 (2017) 144–149, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.07.027>.
- R.O.M. da Silva, J.W.G. Castro, O. de M. Dantas Junior, A.C.J. de Araújo, M.K.D.N. S. Leandro, R.J.O. Costa, L.L. Pinto, L.M.G. Leandro, L.E. da Silva, W. do Amaral, et al., Photoinduced antibacterial activity of the essential oils from *Eugenia*

- brasiliensis lam and piper mosenii C. DC. By blue led light, *Antibiotics* 8 (2019), <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040242>.
- [13] M.K. do N. Silva Leandro, J.E. Rocha, C.F. Bezerra, P.R. Freitas, J.H.F. Feitosa, V. B. Bezerra, R. de O. Barros, L.M.G. Leandro, J.J.D.S. Aguiar, P.S. Pereira, et al., Modulation of antibiotic resistance by the essential oil of *ocimum gratissimum* L. In association with light-emitting Diodes (LED) lights, *Zeitschrift fur Naturforschung* 75 (2020) 377–387, <https://doi.org/10.1515/znc-2020-0034>.
- [14] K.B.V. Dourado, L.C. Carnevali-Júnior, R.J.F. de Paulo, A.C. Gomes, *Ensaio e Ciência: ciências Biológicas, Agrárias e Da Saúde, Ensaio e Ciência* 15 (2011) ~231–248.
- [15] A. Lipovsky, Y. Nitzan, A. Gedanken, R. Lubart, Visible light-induced killing of bacteria as a function of wavelength: implication for wound healing, *Laser Surg. Med.* 42 (2010) 467–472, <https://doi.org/10.1002/lsm.20948>.
- [16] N.L.F. Pereira, P.E.A. Aquino, J.G.A.S. Júnior, J.S. Cristo, M.A. Vieira Filho, F. F. Moura, N.M.N. Ferreira, M.K.N. Silva, E.M. Nascimento, F.M.A. Correia, et al., Vitro evaluation of the antibacterial potential and modification of antibiotic activity of the *Eugenia uniflora* L. Essential oil in association with led lights, *Microb. Pathog.* 110 (2017) 512–518, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.07.048>.
- [17] G. Jori, C. Fabris, M. Soncin, S. Ferro, O. Coppellotti, D. Dei, L. Fantetti, G. Chiti, G. Roncucci, Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications, *Laser Surg. Med.* 38 (2006) 468–481, <https://doi.org/10.1002/lsm.20361>.
- [18] NCCLS metodologia dos teste de Sensibilidade a agentes antimicrobianos por, Diluição Para Bactéria de Crescimento Aeróbico 23 (2003).
- [19] A. Salvat, L. Antonnacci, R.H. Fortunato, E.Y. Suarez, H.M. Godoy, *Lett. Appl. Microbiol.* (2001) 293–297.
- [20] T.S. Freitas, F.F. Campina, M.S. Costa, J.E. Rocha, R.P. Cruz, J.C.A. Pinheiro, F. N. Pereira-Júnior, M.A. Lima, M.F.C.P. de Sá, A.M.R. Teixeira, et al., UPLC-QTOF-MS/MS analysis and antibacterial activity of the manilkara zapota (L.) P. Royen against *Escherichia coli* and other MDR bacteria, *Cell. Mol. Biol.* 67 (2021) 116–124, <https://doi.org/10.14715/cmb/2021.67.1.18>.



## PHOTOBIOLOGICAL EFFECT OF EUGENOL-DERIVED 3-BENZOYLCOUMARIN ASSOCIATED WITH LED LIGHTS AGAINST MDR MICROORGANISMS

Amanda Karine de Sousa; Janaina Esmeraldo Rocha; Thiago Sampaio de Freitas; Priscila Ramos Freitas; Raimundo Luiz Silva Pereira; Francisco Nascimento Pereira Júnior; Guilherme Andrade Brancaglion; Daniela Carvalho de Paulo; Diogo Teixeira Carvalho; Irwin Rose Alencar de Menezes; Francisco Antonio Vieira dos Santos; Henrique Douglas Melo Coutinho; Lucindo José Quintans Júnior

Revista: Fundamental & Clinical Phamacology; Qualis A4; Fator de Impacto: 2,747

Situação: Publicado


Link: <http://doi.org/10.1111/fcp.12838>

Resumo do artigo em português:

A problemática da resistência aos antibiótico pelas bactérias ameaça a saúde humana. Diante disso, os estudos nessa área buscam alternativas para contorná-la. O estudo com cumarinas e eugenol já provou que estas classe de compostos atuam contra bactérias. Nesta mesma vertente, a exposição ao LED mostra também um efeito bactericida. Buscando uma possível potencialização deste efeito, o presente estudou cumarinas derivadas de eugenol com associação ao LED para averiguar o efeito bactericida. Foram testados quatro compostos. Para isso, foram determinadas as CIMs e a modulação com três antibióticos contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Para testar o comportamento da atividade perante a exposição ao LED as placas foram expostas durante 20 minutos a luz azul, 415 nm e depois incubadas a 37°C por 24h. Para controle foram feitas em duplicata, e uma delas não passava por esta exposição. O C1 exibiu melhor atividade contra *S. Aureus*, pois prevaleceu o sinergismo nas condições testadas. C3 e C4 foram promissores contra *E. coli*, pois mostraram sinergismo em associação com os três antibióticos tanto com, quanto sem exposição ao LED. Desta forma, os compostos mostraram atividade bactericida e o LED mostrou potencializar o sinergismo.

Palavras-chave: Resistência aos antibióticos. Atividade bactericida. Fototerapia. Cumarinas.

# Photobiological effect of eugenol-derived 3-benzoylcoumarin associated with led lights against MDR microorganisms

Amanda Karine de Sousa<sup>1</sup> | Janaina Esmeraldo Rocha<sup>2</sup> |  
Thiago Sampaio de Freitas<sup>2</sup> | Priscila Ramos Freitas<sup>2</sup> |  
Raimundo Luiz Silva Pereira<sup>2</sup> | Francisco Nascimento Pereira Júnior<sup>3</sup> |  
Guilherme Andrade Brancaglioni<sup>4</sup> | Daniela Carvalho de Paulo<sup>4</sup> |  
Diogo Teixeira Carvalho<sup>4</sup> | Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>2</sup> |  
Francisco Antonio Vieira dos Santos<sup>5</sup> | Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>2</sup>  |  
Lucindo José Quintans Júnior<sup>6</sup>

<sup>1</sup>University Center Dr. Leão Sampaio (UNILEÃO), Juazeiro do Norte, CE, Brazil

<sup>2</sup>Regional University of Cariri (URCA), Crato, CE, Brazil

<sup>3</sup>Federal University of Cariri (UFCA), Juazeiro do Norte, CE, Brazil

<sup>4</sup>Federal University of Alfenas (UNIFAL), Alfenas, MG, Brazil

<sup>5</sup>CECAPE College, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

<sup>6</sup>Federal University of Sergipe (UFS), Sergipe, SE, Brazil

## Correspondence

Henrique Douglas Melo Coutinho, Regional University of Cariri (URCA), Crato, CE, Brazil.  
Email: hdmcoutinho@gmail.com and hdmutohno@urca.br

Lucindo José Quintans Júnior, Federal University of Sergipe (UFS), Sergipe, SE, Brazil.  
Email: lucindojr@gmail.com

## Funding information

This research received no external funding.

## Abstract

The problem of antibiotic resistance by bacteria threatens human health. Therefore, studies in this area seek alternatives to circumvent it. The study with coumarins and eugenol has already proven that these classes of compounds act against bacteria. In this same aspect, exposure to LED also shows a bactericidal effect. Seeking a possible enhancement of this effect, the present work studied coumarins derived from eugenol in association with LED to investigate the bactericidal effect. Four compounds were tested. For this, minimum inhibitory concentrations (MICs) and modulation with three antibiotics against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria were determined. To test the behavior of the activity against exposure to LED, the plates were exposed for 20 min to blue light, 415 nm and then incubated at 37°C for 24 h. For control, duplicates were made, and one of them did not undergo this exposure. C1 exhibited better activity against *S. aureus*, as synergism prevailed under the conditions tested. C3 and C4 were promising against *E. coli* as they showed synergism in

**Abbreviations:** °C, degrees celsius; ATCC, American Type Culture Collection; BHI, brain heart infusion; C1, Compound 1; C2, Compound 2; C3, Compound 3; µg/mL, microgram per milliliter; µL, microliter; C4, Compound 4; CFU/mL, colony forming unit per milliliter; DMSO, dimethylsulfoxide; DNA, deoxyribonucleic acid; h, hours; LED, light-emitting diode; LMBM, Laboratory of Microbiology and Molecular Biology; LQFar, Pharmaceutical Chemistry Research Laboratory; MDF, medium density fiberboard; MIC, minimum inhibitory concentration; nm, nanometer; ROS, reactive oxygen species; UNIFAL, Federal University of Alfenas; URCA, Regional University of Cariri.

© 2022 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique. Published by John Wiley & Sons Ltd.

Fundam Clin Pharmacol. 2022;1–8.

wileyonlinelibrary.com/journal/fcp | 1

association with the three antibiotics both with and without LED exposure. Thus, the compounds showed bactericidal activity, and LED was shown to enhance synergism.

**KEYWORDS**

antibiotic resistance, bactericidal activity, coumarins, phototherapy

## 1 | INTRODUCTION

Stagnation in the discovery of new antibiotics, coupled with the development of antimicrobial resistance by bacteria, threaten human health. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, and *Acinetobacter baumannii* are pathogens often cited as resistant to a wide variety of antibiotics [1–3].

Furthermore, it is necessary to highlight the high prevalence of *Helicobacter pylori* in the population, as the treatment of infection by this microorganism requires the use of a combination of antibiotics that can contribute to the increase in antimicrobial resistance. This infection could be prevented and improved with lifestyle and diet changes associated with the use of certain known beneficial foods and probiotic bacteria [4].

Another study reports more specifically the effect of using probiotic bacteria as an outlet for the treatment of diseases caused by bacteria that have already shown immunomodulatory effects, improving the immune system's response to bacteria, reducing the use of antibiotics, and may also represent an outlet for antimicrobial resistance [5].

Thus, research is looking for new alternatives to the use of antibiotics to overcome such resistance. Coumarins have already had their bacterial activity previously studied, and their mechanism of action was mainly attributed to their ability to bind to the B subunit of the bacterial DNA gyrase and inhibit DNA supercoiling by blocking the ATPase activity [6,7].

Furthermore, the use of therapeutic association can enhance activities already found in these compounds. Thus, the use of photodynamic antimicrobial chemotherapy associated with compounds with known antibacterial activity is suggested. This type of therapy is based on the activation of photosensitizers, leading to the formation of reactive oxygen species that cause bacterial death. Some classes of molecules showed potentiated bactericidal effects against multiresistant gram-positive and gram-negative bacteria when irradiated with visible light [8,9].

In this type of therapy, light-emitting diode (LED) is already used for various applications, such as anti-inflammatory and healing effects, depending on the wavelength used. It also has bactericidal activity, commonly used in the treatment of acne and dental

biofilms, with blue light (407–420 nm) being the most indicated for its bactericidal effect [10]. That said, this study aimed to verify the antibacterial and modulatory activity of 3-benzoylcoumarins associated with blue LED light.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Obtaining compounds

The substances used were kindly provided by the Pharmaceutical Chemistry Research Laboratory (LQFar), from the Faculty of Pharmaceutical Sciences at Federal University of Alfenas (UNIFAL), Minas Gerais, Brazil. For this study, four substances were tested, namely: compound 1 (C1) to 3-benzoyl-8-methoxy-2H-chromen-2-one; compound 2 (C2) to 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-2H-chromen-2-one; compound 3 (C3) to 8-methoxy-2-oxo-2H-chromen-3-carboxylic acid; and compound 4 (C4) to 3-(4-aminobenzoyl)-8-methoxy-2H-chromen-2-one.

### 2.2 | Microorganisms

Bacteria from standard strains (*E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 25923) and multiresistant strains (*S. aureus* 10 and *E. coli* 06) supplied by the Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM) of the Regional University of Cariri (URCA) were used.

### 2.3 | Minimum inhibitory concentration (MIC)

The determination of MIC was performed using the broth microdilution technique using 96-well sterilized plates with serial dilutions 1:1 [11]. Microbial cultures kept in refrigerated stock agar were subcultured in brain heart infusion (BHI) broth and incubated at 37°C for 24 h. After this period, the inoculum was standardized by preparing a suspension in BHI, whose turbidity is similar to the 0.5 tube of the McFarland scale ( $1 \times 10^8$  CFU/ml). This suspension was diluted  $100\times$  in BHI medium, which corresponds approximately to a suspension containing  $1 \times 10^6$  CFU/ml, from which



100  $\mu$ l was removed and placed in each well with 900  $\mu$ l of BHI, filling the plate column and microdilution with 100  $\mu$ l of the product to be tested until the penultimate well.

Test solutions were prepared using 10 mg of the products solubilized in 9265  $\mu$ l of distilled water and 500  $\mu$ l of dimethylsulfoxide (DMSO), obtaining an initial concentration of 1024  $\mu$ g/ml. The final concentrations of the samples in the culture medium were 512, 256, 128, 64, 32, 16, and 8  $\mu$ g/ml.

The tests were performed in triplicate on the plate columns and on plates in duplicate, since one of them was exposed to LED for 20 min. Plates were incubated at  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  for 24 h. After this period, the plates were developed with a specific dye, resazurin. This solution was prepared in sterile distilled water at a concentration of 0.01% (w/v). After the incubation period, 20  $\mu$ g/mL of the indicator solution was added to the plates in each well, and after 1 h at room temperature, the test reading was performed. This is determined by the coloration of the culture medium, which is considered positive for wells that do not show microbial growth, that is, those with a red color remain blue and negative [12].

The positive control of the test was carried out with the culture media containing the inoculum. The MIC was defined as the lowest concentration capable of completely inhibiting microbial growth in microdilution wells as detected macroscopically.

After determining the MIC, the products were modulated with antibiotics. For this procedure, 1.5 ml Eppendorf®-type tubes are used, of which 150  $\mu$ l are bacterial inoculum, product volume in sub-inhibitory concentration (MIC/8), and the remainder of the volume mean BHI. Subsequently, microdilution is performed with antibiotics, diluting in water or DMSO (depending on the antibiotic solubility) and using 100  $\mu$ l to microdilution in the wells until the penultimate cavity. In this plate, a column is also made containing antibiotic, medium, and inoculum that will be used as modulation control.

## 2.4 | Evaluation of photoactive effect with led exposure

To carry out these tests, the same methodologies were initially used for the test to assess the antibacterial activity by microdilution. Then the plates were subdivided into two groups, first was subjected to blue LED light for 20 min each plate and the second group was not subjected to LED lights. To expose the plates, three devices from the New Estética® brand were used, using a medium density fiberboard (MDF) box covered internally with laminated paper and with three holes in the lid, as an apparatus to isolate each plate from the external light [13]. Plates were incubated at  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  for 24 h.

## 2.5 | Statistical analysis

The central data and standard deviations were obtained according to the methodology of Freitas et al. [14] on microbiological analysis in microdilution plates. Data were analyzed using the statistical program GraphPad Prisma 5.0 through a two-way ANOVA test. Afterwards, a post hoc Bonferroni test was performed (where  $P < 0.05$  was considered significant and  $P > 0.05$  nonsignificant).

## 3 | RESULTS

3-Benzoyl-8-methoxy-2H-chromen-2-one (C1), 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-2H-chromen-2-one (C2), 8-methoxy-2-oxo acid-2H-chromen-3-carboxylic acid (C3), and 3-(4-aminobenzoyl)-8-methoxy-2H-chromen-2-one (C4) (Figure 1) had their activities tested against *S. aureus* and *E. coli* bacteria, standard and multiresistant strains, modulated with the antibiotics norfloxacin, gentamicin, and ampicillin, also used as modulation control. The MIC of these compounds, for the standard and multiresistant strains of the tested bacteria, was greater than or equal to 1024  $\mu$ g/ml in all tests with and without exposure to LED; the only exception was coumarin C3, which exhibited a MIC of 512 with LED exposure, for multiresistant *E. coli* strain (Table 1).

In the modulation tests for *S. aureus* 10 (multiresistant strain) when modulated with norfloxacin, 1,3-benzoyl-8-methoxy-2H-chromen-2-one (C1) showed synergism reducing MIC when compared to the antibiotic alone, but it has not been shown to significantly interfere in the MICs of the antibiotics gentamicin and ampicillin. When associated with LED, the behavior of the antibiotics gentamicin and ampicillin was altered, showing antagonism, both when isolated (control) and associated with the compound. There was synergism only with norfloxacin, which alone when

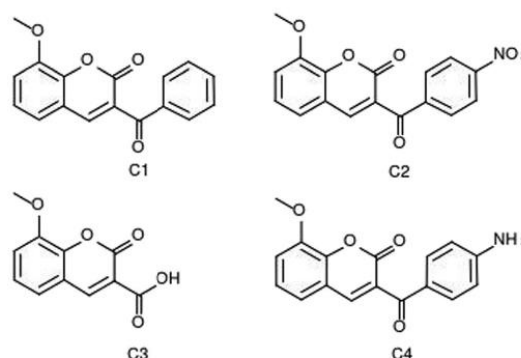


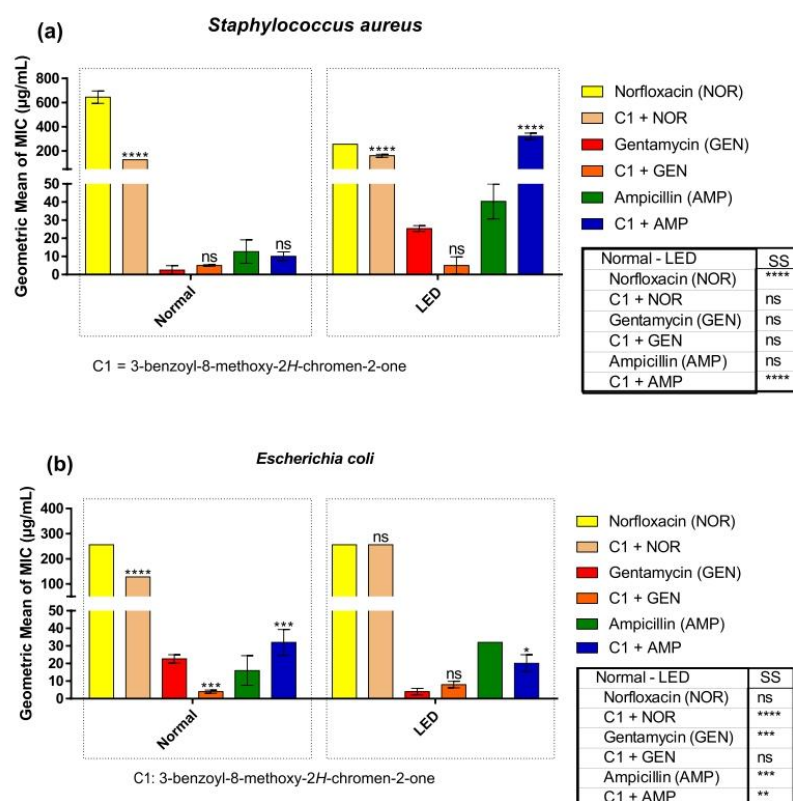
FIGURE 1 Structures of eugenol-derived coumarins

**TABLE 1** Minimum inhibitory concentration (MIC) in microgram per milliliter of eugenol-derived coumarins

Treatment	E.C. ATCC 25922	S.A. ATCC 25923	E.C. 06	S.A. 10
C1	1024	1024	1024	1024
C1 + blue LED	1024	1024	1024	1024
C2	1024	1024	1024	1024
C2 + blue LED	1024	1024	1024	1024
C3	1024	1024	1024	1024
C3 + blue LED	1024	1024	512	1024
C4	1024	1024	1024	1024
C4 + blue LED	1024	1024	1024	1024

Note: MIC values were expressed in microgram per milliliter.

Abbreviations: C1, 3-benzoyl-8-methoxy-2H-chromen-2-one; C2, 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-2H-chromen-2-one; C3, 8-methoxy-2-oxo-2H-chromen-3-carboxylic acid; C4, 3-(4-aminobenzoyl)-8-methoxy-2H-chromen-2-one; E.C., *E. coli*; S.A., *S. aureus*.



**FIGURE 2** Geometric mean minimum inhibitory concentration (MIC) of the modulation of the compound 1,3-benzoyl-8-methoxy-2H-chromen-2-one against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with and without exposure to blue LED. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , and \*\*\*\* $P < 0.0001$  indicate significant difference between the groups.

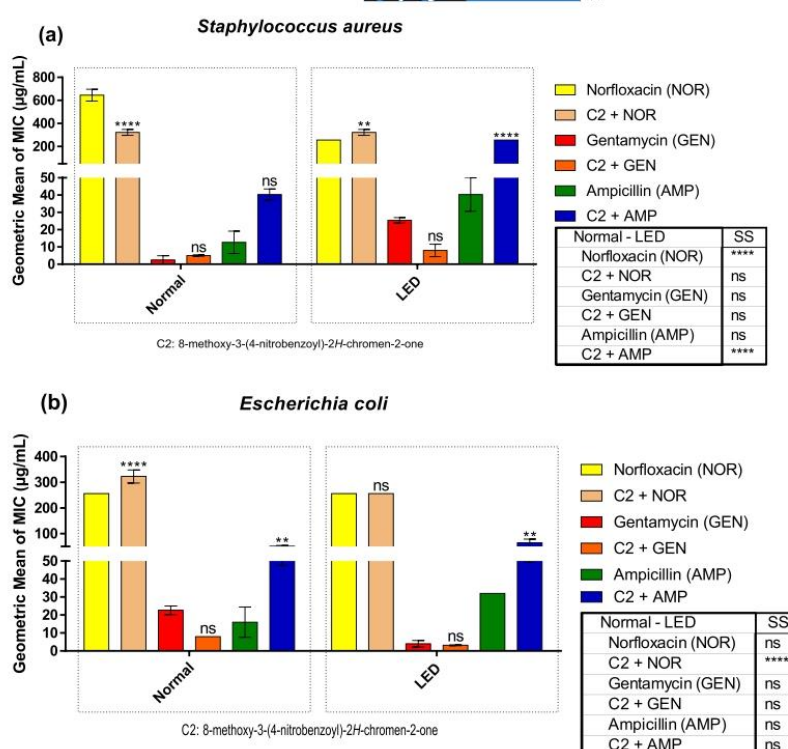
exposed to LED presented a reduction in MIC, responding differently when associated with C1, in which there was no change in MIC (Figure 2a).

The compound 1,3-benzoyl-8-methoxy-2H-chromen-2-one was also tested for the multiresistant strain of *E. coli*. In these tests, C1 showed synergism with norfloxacin, but when associated with LED, there was no significant difference to the control, but it is noted that this was due to the reduction in the MIC of the

antibiotic. Concerning gentamicin, there was also synergism without exposure to LED, and when exposed to it, there was also a reduction in the MIC of the antibiotic and, because of that, there seems to be antagonism. Comparing the modulation of the compound to antibiotics with and without exposure to LED, it is noted that there was a synergistic response with ampicillin in the situation where there was exposure to LED (Figure 2b).



**FIGURE 3** Geometric mean minimum inhibitory concentration (MIC) of the modulation of the compound 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-2H-chromen-2-one against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with and without exposure to blue LED. \*\* $P < 0.05$  and \*\*\*\* $P < 0.0001$  indicates significant difference between groups; ns, non significant.



For the compound 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-2H-chromen-2-one against *S. aureus*, there was synergism in its modulation with norfloxacin. Exposure to LED did not interfere with this response. About gentamicin and ampicillin, there was antagonism (Figure 3a). In the tests of this compound for *E. coli*, the modulation response of the compound with norfloxacin showed antagonism, when associated with LED, the MIC was reduced, but without significant difference. In conjunction with gentamicin, the response was synergistic and antagonistic to ampicillin, both without and with LED exposure. It is also noteworthy that there was a decrease in gentamicin MIC with exposure to blue LED (Figure 3b).

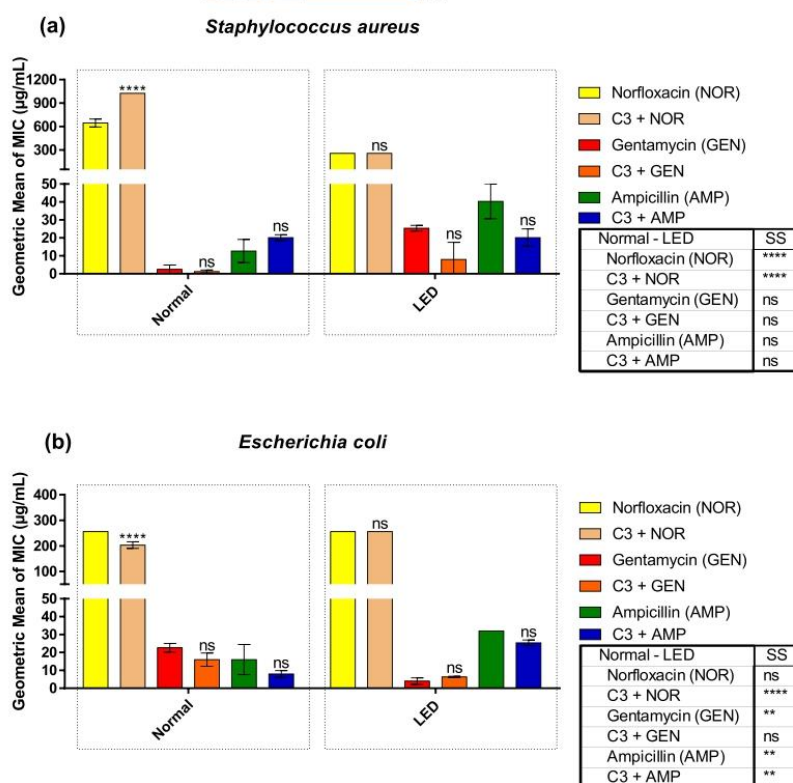
8-Methoxy-2-oxo-2H-chromen-3-carboxylic acid showed synergistic activity to gentamicin and ampicillin for *S. aureus* when exposed to LED and indifferent to norfloxacin activity. It is also noted that in comparison with modulation without exposure to LED, the compound had not shown the same behavior, exhibiting antagonism to norfloxacin and ampicillin, and indifferent to gentamicin (Figure 4a). Regarding the tests with *E. coli*, this same compound showed synergism with the three antibiotics, without exposure to LED. In the plates that were exposed, an indifference in their response associated with norfloxacin and gentamicin

was noted, continuing to exhibit synergism with ampicillin (Figure 4b).

The modulation of 3-(4-aminobenzoyl)-8-methoxy-2H-chromen-2-one against *S. aureus* showed synergism with norfloxacin when exposed to LED and antagonism and indifference to other antibiotics, as well as when without LED exposure (Figure 5a). For *E. coli*, there was synergism with the three antibiotics without exposure to LED, suggesting that the compound has a modulatory activity with an antibacterial response, but with exposure to LED, there was a reduction in the difference between the averages of the MICs, changing the response to ampicillin, for which he showed antagonism (Figure 5b).

## 4 | DISCUSSION

In a study, Vazquez-Rodriguez et al. [15] synthesized coumarin–chalcone hybrid compounds with different patterns of substitution, and performed, among other tests, the activity against human pathogenic bacteria (*E. coli*, *S. aureus*, and *P. aeruginosa*); such compounds were not active against human pathogenic bacteria. This is consistent with the current study regarding 3-benzoylcoumarins, which, in isolation, did



**FIGURE 4** Geometric mean minimum inhibitory concentration (MIC) of the modulation of the compound 8-methoxy-2-oxo-2H-chromen-3-carboxylic acid against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with and without exposure to blue LED. \*\* $P < 0.01$  and \*\*\*\* $P < 0.0001$  indicate significant difference between groups.

not show significant antibacterial activity, with MIC greater than 1024  $\mu\text{g/mL}$ .

The evaluation of four natural coumarins, 5-geranyloxy-7-methoxycoumarin, artanin, isopimpinellin, and fellopterin, was tested for their antibacterial effects in vitro with an emphasis on their potential to restore the activity of conventional antibacterial agents against clinical strains of *S. aureus* resistant to methicillin. These coumarins showed a promising inhibition with MICs of 8 to 64  $\mu\text{g/mL}$ . Furthermore, they also exhibited different degrees of synergism with eight conventional antibacterial agents and against 10 clinical strains of multidrug resistant *S. aureus* [16].

The compounds analyzed in this study had variable effects against *S. aureus* and did not always exhibit synergism with the antibiotics tested, even belonging to the same class as the aforementioned study. However, in some cases, it was possible to observe a potentiation of the antibacterial effect after exposure to LED. The coumarins C1 and C4 stood out to this characteristic, which differ only in the presence of the amino group.

In a similar work, the modulatory activity of the essential oil *Ocimum gratissimum* L. in association with blue, red, and yellow LED lights was tested. Exposure

to LED lights increased the antibacterial effects against *E. coli*. The yellow and red lights caused bacterial growth inhibitions. For *S. aureus*, the study showed an improvement in the antibacterial effect by association with red light, while the blue and yellow lights showed an antagonistic effect [17]. This effect was similar to that observed in the present study regarding the behavior of C1 and C4 against *S. aureus*.

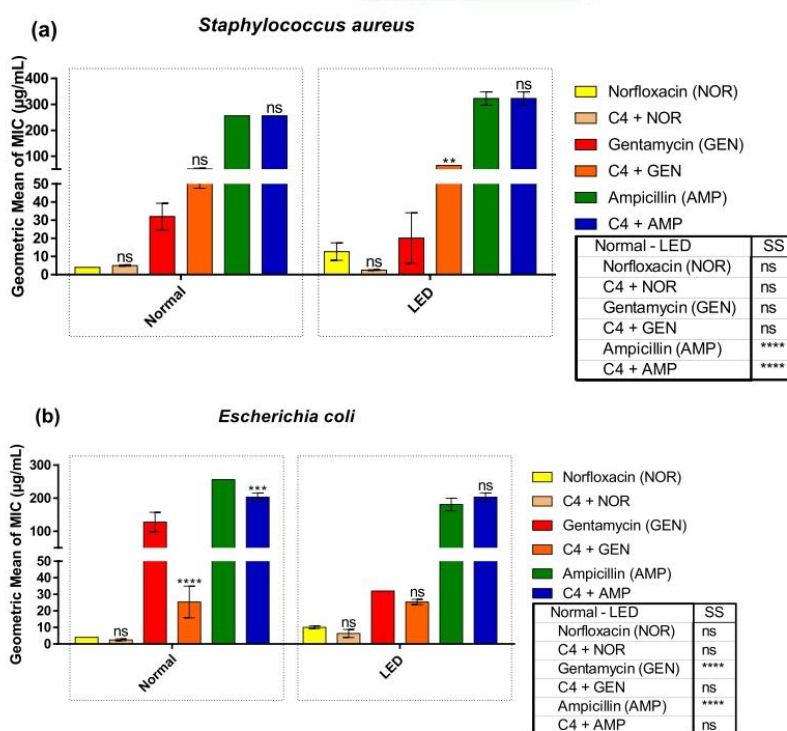
In a previous study, the essential oil of *Eugenia brasiliensis* showed synergism with amikacin and gentamicin against *E. coli*, enhanced by exposure to blue LED light [18]. This response was similar to that presented by compounds C2 and C3 for *E. coli*; however, in this study, there was no improvement in synergism by exposure to LED. Thus, LED activity may behave differently depending on the photosensitizer used.

Blue light is known to be more effective in killing bacteria because the production of reactive oxygen species is higher compared to other wavelengths; thus, blue light kills bacteria more than other lights of different colors [19].

The use of light with a length of 415 nm in this study corroborates the study by Lipovsky et al. [20], who observed a higher production and ROS than in 455 nm light, reducing the colony count of *S. aureus* and



**FIGURE 5** Geometric mean minimum inhibitory concentration (MIC) of the modulation of the compound 3-(4-aminobenzoyl)-8-methoxy-2H-chromen-2-one against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with and without exposure to blue LED. \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , and \*\*\*\* $P < 0.0001$  indicates significant difference between groups.



*E. coli*. In this study, it is also possible to observe different effects of the interaction of this light with the compounds and antibiotics used that may have interfered with the bactericidal activity of blue light, both potentiating (synergistic activity) and preventing (antagonistic activity) cell death.

In this sense, the action of the compounds and their activity when they interact with the LED need to be deepened, considering that these radicals may be formed, as occurs with photosensitizers; and there may be active on other mechanisms, such as barriers of bacterial permeability that governs susceptibility to antibiotics [21].

In a recently studied methodology, Oliveira et al. [22] suggest that the manual methodology of reading by resazurin, used in this study as a revealer of the results, should be reviewed, since there are limitations in the reading performed by the human eye. In this way, the variation in the results would be avoided, which can improve their interpretation and correlation with other studies of similar methodology.

## 5 | CONCLUSIONS

In the analysis of synergistic activity, coumarin C1 exhibited better results against *S. aureus*, both without

and with LED exposure. With this coumarin, it was also possible to see a reversal of the antagonism caused by exposure to LED, when associated with gentamicin for this same class of bacteria, and this same behavior when modulated to ampicillin against *E. coli*.

Coumarins C3 and C4 exhibited promising bactericidal activity against *E. coli*, as there was synergism when associated with the three antibiotics, maintaining this behavior in association with LED in modulation with almost all antibiotics. And although they stood out for this class of bacteria, there was still synergism for *S. aureus* when C3 activity was modulated with gentamicin and C4 when it was associated with norfloxacin and exposed to LED.

In the association of C2 with antibiotics and with LED, the antagonism prevailed; thus, there was no evidence of a good bactericidal activity of this compound. Still, it is worth noting that LED was able to reverse the antagonism of this compound to *S. aureus* when modulated with gentamicin.

Thus, analyzing in general, the study showed a promising bactericidal response of the compounds tested both in modulation and in exposure to LED. Therefore, exposure to LED can give rise to a complementary therapy to the use of antibiotic therapy, improving the response of certain drugs already used traditionally and preventing the emergence of



resistance by new strains to other classes of antibiotics, as has recently been observed in clinical routine.

## AUTHOR CONTRIBUTION

**Conceptualization:** Amanda Karine de Sousa and Henrique Douglas Melo Coutinho. **Methodology:** Janaina Esmeraldo Rocha, Thiago Sampaio de Freitas, Priscila Ramos Freitas, and Raimundo Luiz Silva Pereira. **Software:** Irwin Rose Alencar de Menezes. **Formal analysis:** Francisco Nascimento Pereira Júnior and Lucindo José Quintans Júnior. **Resources:** Guilherme Andrade Brancaglioni, Daniela Carvalho de Paulo, and Diogo Teixeira Carvalho. **Writing—original draft preparation:** Amanda Karine de Sousa, and Lucindo José Quintans Júnior. **Supervision:** Lucindo José Quintans Júnior. **Project administration:** Henrique Douglas Melo Coutinho and All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## ORCID

Henrique Douglas Melo Coutinho  <https://orcid.org/0000-0002-6634-4207>

## REFERENCES

- Laxminarayan R, Matsoso P, Pant S, et al. Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *Lancet*. 2016;387(10014):168-175. doi:10.1016/S0140-6736(15)00474-2
- Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol*. 2010;1. doi:10.3389/fmicb.2010.00134
- Renwick MJ, Simpkin V, Mossialos E, Schippers E. *Targeting Innovation in Antibiotic Drug Discovery and Development The Need for a One Health—One Europe—One World Framework*. Vol. 45;2016.
- Öztekin M, Yılmaz B, Ağagündüz D, Capasso R. Overview of *Helicobacter pylori* infection: clinical features, treatment, and nutritional aspects. *Diseases*. 2021;9(4):66. doi:10.3390/diseases9040066
- Dargahi N, Johnson JC, Apostolopoulos V. Immune modulatory effects of probiotic *Streptococcus thermophilus* on human monocytes. *Biologics*. 2021;1(3):396-415. doi:10.3390/biologics1030023
- Hu CF, Zhang PL, Sui YF, et al. Ethylenic conjugated coumarin thiazolidinediones as new efficient antimicrobial modulators against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorg Chem*. 2020;94. doi:10.1016/j.bioorg.2019.103434
- Ostrowska K. Coumarin-piperazine derivatives as biologically active compounds. *Saudi Pharm J*. 2020;28(2):220-232. doi:10.1016/j.jsps.2019.11.025
- de Oliveira KT, de Souza JM, da Silva Gobo NR, de Assis FF, Brocksom TJ. Basic concepts and applications of porphyrins, chlorins and phthalocyanines as photosensitizers in photonic therapies. *Rev Virtual Quim*. 2015;7(1):310-335. doi:10.5935/1984-6835.20150016
- Maisch T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. *Rev Med Chem*. 2009;9(8):974-983. doi:10.2174/138955709788681582
- Abramovits W, Arrazola P, Gupta A. Light-emitting diode-based therapy. *Skinmed*. 2005;4(1):38-41. doi:10.1111/j.1540-9740.2005.03959.x
- NCCLS. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; NCCLS document M7-A6, Ed.; Approved S.; Wayne, Pennsylvania, 2003; ISBN 1-56238-486-4.
- Salvat A, Antonnacci L, Fortunato RH, Suarez EY, Godoy HM. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. *Lett Appl Microbiol*. 2001;32(5):293-297. doi:10.1046/j.1472-765X.2001.00923.x
- Pereira NLF, Aquino PEA, Júnior JGAS, et al. In vitro evaluation of the antibacterial potential and modification of antibiotic activity of the *Eugenia uniflora* L. essential oil in association with led lights. *Microb Pathog*. 2017;110:512-518. doi:10.1016/j.micpath.2017.07.048
- Freitas TS, Campina FF, Costa MS, et al. UPLC-QTOF-MS/MS analysis and antibacterial activity of the *Manilkara zapota* (L.) P.Royen against *Escherichia coli* and other MDR bacteria. *Cell Mol Biol*. 2021;67(1):116-124.
- Vazquez-Rodríguez S, Lama López R, Matos MJ, et al. Design, synthesis and antibacterial study of new potent and selective coumarin-chalcone derivatives for the treatment of tenacibaculosis. *Bioorg Med Chem*. 2015;23(21):7045-7052. doi:10.1016/j.bmc.2015.09.028
- Zuo GY, Wang CJ, Han J, Li YQ, Wang GC. Synergism of coumarins from the Chinese drug *Zanthoxylum nitidum* with antibacterial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*. 2016;23(14):1814-1820. doi:10.1016/j.phymed.2016.11.001
- do N. Silva Leandro MK, Rocha JE, Bezerra CF, et al. Modulation of antibiotic resistance by the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. in association with light-emitting diodes (LED) lights. *Z Naturforsch*. 2020;75(11-12):377-387. doi:10.1515/znc-2020-0034
- Macedo da Silva RO, Gonçalves Castro JW, de Menezes Dantas Junior O, et al. Photoinduced antibacterial activity of the essential oils from *Eugenia brasiliensis* Lam and *Piper mosenii* C. DC. by blue led light. *Antibiotics*. 2019;8(4). doi:10.3390/antibiotics8040242
- Lubart R, Lipovsky A, Nitzan Y, Friedmann H. A possible mechanism for the bactericidal effect of visible light. *Laser Ther*. 2011;20(1):17-22. doi:10.5978/islsm.20.17
- Lipovsky A, Nitzan Y, Gedanken A, Lubart R. Visible light-induced killing of bacteria as a function of wavelength: implication for wound healing. *Lasers Surg Med*. 2010;42(6):467-472. doi:10.1002/lsm.20948
- Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*. 2004;3(5):436-450. doi:10.1039/b311900a
- Oliveira LCC, Rodrigues FAA, dos Santos Barbosa CR, et al. Antibacterial activity of the pyrogallol against *Staphylococcus aureus* evaluated by optical image. *Biol Theory*. 2022;2(2):139-150. doi:10.3390/biologics2020011

**How to cite this article:** de Sousa AK, Rocha JE, de Freitas TS, et al. Photobiological effect of eugenol-derived 3-benzoylcoumarin associated with led lights against MDR microorganisms. *Fundam Clin Pharmacol*. 2022; 1-8. doi:10.1111/fcp.12838

### 5.1 ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Diante dos últimos relatórios emitidos pela Organização Mundial da Saúde, sabe-se que a resistência antimicrobiana vem tomando proporções cada vez maiores sem perspectivas de controle, uma vez que não há medidas efetivas para o controle eficaz da automedicação utilizando antibióticos, bem como a utilização destes em outras áreas que acaba por selecionar os microrganismos, que infectam o homem.

Essa problemática gera consequências, com repercussões sem precedentes, agravadas ainda mais diante da pandemia vivenciada no último ano. Pois vários tratamentos, sem comprovação científica, foram divulgados amplamente por meios de divulgação em massa, ocasionando o aumento da automedicação e utilização de fármacos antes aplicados para a contenção de infecções por microrganismos, o que pode selecioná-los e trazer danos ainda mais graves futuramente.

Assim, os estudos devem evoluir não somente no sentido de tentar reduzir a resistência, mas também, compreender mecanismos capazes de contornar tal fenômeno, já que este é inevitável. A obtenção de uma terapia eficiente e que ao mesmo tempo seja capaz de acompanhar a evolução das bactérias, pode trazer uma solução para um problema discutido por muitos anos e por diversos pesquisadores.

Uma alternativa que pode preencher essa lacuna científica, pode ser a associação de múltiplas terapias, na tentativa de gerar um mecanismo de ação amplo que consiga abranger as mais diversas formas de resistência desenvolvidas pelas bactérias. Entre as alternativas terapêuticas, os produtos naturais já são há algum tempo muito explorados, uma vez que já apresentam aplicações popularmente conhecidas no tratamento de infecções, diarreias, e outras comorbidades causados por bactérias.

Com base nesse conhecimento popular, vários estudos foram desenvolvidos e os metabólitos secundários dos vegetais passaram a ser explorados, identificados, isolados e manipulados para diversos fins. Muitos desses compostos já possuem suas atividades conhecidas, porém ainda há muito o que se conhecer, em termos de interações entre as moléculas e associações com outras formas de tratamento.

A terapia fotodinâmica com aplicação em infecções bacterianas ainda é uma área em desenvolvimento. Atualmente, as aplicações utilizadas são restritas a áreas já elucidadas, como o tratamento para o câncer. Mas já se sabe que interações da luz com determinados corantes, os

fotossensibilizantes, são capazes de produzir radicais tóxicos para as bactérias, ocasionando sua morte. Além disso, é possível que a partir dessa interação haja também uma alteração da permeabilidade das bactérias a determinados antibióticos. E embora as bactérias gram-positivas exibam várias camadas de peptidoglicano, a parede externa não atua como uma barreira de permeabilidade para os fotossensibilizadores mais comumente usados, cujo peso molecular geralmente não excede 1.500-1.800 Da, portanto esse grupo de bactérias está mais susceptível a ação da fototerapia. É necessário, portanto, revisar estratégias adequadas que aumentem a permeabilidade da parede externa, a fim de tornar as bactérias Gram-negativas sensíveis à ação de processos fotodinâmicos.

As cumarinas são substâncias altamente versáteis com diversas atividades já estabelecidas, entre elas a atividade antibacteriana. Ao serem testadas de maneira isolada através da CIM, as substâncias aqui discutidas não apresentaram atividade bactericida clinicamente significativa, porém ao serem associadas aos antibióticos pelo que chamamos de modulação, elas foram capazes de causar a morte bacteriana, potencializando o efeito dos fármacos já conhecidos e utilizados na terapia de infecções bacterianas.

Substâncias que interajam com o LED e sejam capazes de exibir atividade antibacteriana são denominadas fotossensibilizadoras, essas substâncias agem produzindo espécies reativas de oxigênio que causam a morte bacteriana. Os fotossensibilizadores conhecidos são corantes com composição variável. O LED azul é o mais conhecido por causar este efeito, pois em comparação a outros comprimentos de onda foi aquele que produziu a maior quantidade de ERO's. Sabe-se então que quando expostas ao LED a mistura entre compostos bactericidas e antibióticos poderiam exibir atividade potencializada, sendo capazes de matar as bactérias em concentrações menores do que as já estabelecidas.

Diante do exposto, a pesquisa deve ser contínua na área a fim de explorar outras condições e variáveis, como o meio de cultura, a forma de cultivo, o tempo de exposição ao LED, entre outros fatores que possam vir a interferir e possivelmente fornecer dados para o descarte ou a inclusão dessas e outras substâncias da classe como possíveis precursores terapêuticos.

## 5.2 CONCLUSÕES GERAIS

Os compostos aqui estudados revelaram comportamentos diferentes em relação a exposição ao LED com objetivo antibacteriano. Notou-se que as substâncias testadas exibiram por vezes sinergismo, antagonismo ou indiferença quando moduladas com os antibióticos contra as cepas

testadas, além disso tiveram comportamento diferentes a exposição ao LED, por vezes a mesma substância reagiu diferente de acordo com a bactéria testada.

Os compostos 3-benzoil-8-metoxi-2H-cromen-2-ona, ácido 8-metoxi-2-oxo-6-propil-2H-cromen-3-carboxílico, 3-(hidroxi(4-nitrofenil)metil)-8-metoxi-6-propil-2H-cromen-2-ona e 3-(4-aminobenzoil)-8-metoxi-6-propil-2H-cromen-2-ona se destacaram como as substâncias que mais apresentaram sinergismo com os antibióticos quando analisamos a resposta geral para as duas bactérias testadas. Após a exposição ao LED, o composto ácido 8-metoxi-2-oxo-6-propil-2H-cromen-3-carboxílico apresentou a melhor resposta antibacteriana, seguido pelo 3-(4-aminobenzoil)-8-metoxi-6-propil-2H-cromen-2-ona. Já os compostos 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-2H-cromen-2-ona e 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-cromen-2-ona apresentaram os piores desempenho prevalecendo o antagonismo e indiferença como respostas da modulação. Quando analisamos as respostas isoladas o 8-hidroxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-cromen-2-ona exibiu melhor atividade contra *S. aureus* e para *E. coli* os compostos 3-(4-aminobenzoil)-8-metoxi-2H-cromen-2-ona e ácido 8-metoxi-2-oxo-6-propil-2H-cromen-3-carboxílico apresentaram atividade promissora, prevalecendo o sinergismo.

A literatura já traz alguns trabalhos semelhantes realizados com óleos essenciais e outros grupos de compostos. Além disso, também já há relatos do envolvimento dos grupos funcionais na atividade antibacteriana, porém sem associação ao LED. Cabem então estudos complementares que elucidem de que maneira a estrutura química de cada composto possa estar produzindo esses efeitos, para que assim aqueles que apresentaram efeitos promissores possam ser alvo de estudos no desenvolvimento de novos fármacos em associação a fototerapia.

### 5.3 PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS

Nesse estudo, os compostos reagiram de maneira diferente a cada bactéria testada e sua associação com as classes de antibióticos e o LED azul, por vezes apresentando sinergismo, antagonismo ou sendo indiferentes a essas condições. As substâncias que apresentaram sinergismo podem então ser ponto de partida para estudos mais detalhadas buscando mecanismos que expliquem essa relação, dessa maneira, serem utilizadas como precursoras no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

A maneira como uma substância exibe determinada atividade está intimamente ligada à sua estrutura química, assim sendo, uma vez que uma substância exiba uma atividade desejada, outros compostos com características semelhantes podem também possuir tal efeito, além disso, através de estudos computacionais, *in silico*, pode ser possível entender as interações dessas moléculas com

ligantes celulares e outras moléculas a fim de obter mais dados que elucidem o mecanismo de ação delas.

Assim, sugere-se estudos que mostrem de que forma a estrutura química dessas moléculas associadas às estruturas dos antibióticos testados é afetada pela luz de LED azul, além de observar o comportamento dessas moléculas quando interagindo com moléculas presentes nas membranas das bactérias gram-positivas e gram-negativas. Assim, será possível agrupar moléculas semelhantes e buscar dentro do grupo daquelas que apresentaram melhor desempenho na inibição do crescimento bacteriano.

Dentro dessa mesma perspectiva, novos estudos podem ainda realizar testes *in vivo*, com a indução de infecções bacterianas cutâneas e tratando com produtos originados a partir dessas substâncias associadas exposição da pele do animal infectada à luz de LED azul, observando assim se há ou não uma reversão do quadro infeccioso ocasionado pelas bactérias.

- ABRAMOVITS, M.; PETER ARRAZOLA, B.; ADITYA, K. Light-Emitting Diode-Based Therapy. **Le Jacq**, p. 38–41, fev. 2005.
- AMMAR, H.; FERY-FORGUES, S.; EL GHARBI, R. UV/vis absorption and fluorescence spectroscopic study of novel symmetrical biscoumarin dyes. **Dyes and Pigments**, v. 57, n. 3, p. 259–265, 2003.
- ANUMALA, U. R. et al. Discovery of a Novel Series of Tankyrase Inhibitors by a Hybridization Approach. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 24, p. 10013–10025, 28 dez. 2017.
- BECATTINI, S.; TAUR, Y.; PAMER, E. G. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 6, p. 458–478, 1 jun. 2016.
- BERNARD, L. et al. Comparative analysis and validation of different assays for glycopeptide susceptibility among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Microbiological Methods**, v. 57, n. 2, p. 231–239, maio 2004.
- BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 11 jan. 2015.
- BOYCE, J. M.; PITTET, D. Guideline for hand hygiene in health-care settings: recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, v. 23, n. S12, p. S3–S40, 2002.
- COCULESCU, B. Antimicrobial resistance induced by genetic changes. **Journal of Medicine and Life**, v. 2, n. 2, p. 114–123, 2009.
- 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, ago. 2008.
- COUTINHO, H. D. M. et al. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 6, p. 467–471, dez. 2010.
- DAVIES, S. et al. Annual Report of the Chief Medical Officer: Infection and the Rise of Antimicrobial Resistance. **The Lancet**, v. 381, n. 9878, p. 1642–1652, 2013.
- DE OLIVEIRA, K. T. et al. Basic Concepts and Applications of Porphyrins, Chlorins and Phthalocyanines as Photosensitizers in Photonic Therapies. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 310–335, 1 jan. 2015.
- SOUZA, T. B. et al. Synthesis and antimicrobial activity of 6-triazolo-6-deoxy eugenol glucosides. **Carbohydrate Research**, v. 410, p. 1–8, 17 jun. 2015.
- DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, 2001.
- DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 8, p. 539–548, ago. 2010.
- SANTOS, T. DOS et al. Synthesis and biological evaluation of new eugenol-derived 1,2,3-triazoles as antimycobacterial agents. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 7, p. 1425–1436, 2019.

- SANTOS, W. H. DOS; SILVA-FILHO, L. C. DA. NbCl<sub>5</sub>-Promoted Synthesis of 4-Aryl-3,4-dihydrocoumarins by Multicomponent Reaction. **Synthesis (Germany)**, v. 44, n. 21, p. 3361–3365, 2012.
- ELLIS, M. W. et al. Prevalence of Nasal Colonization and Strain Concordance in Patients with Community-Associated Staphylococcus aureus Skin and Soft-Tissue Infections. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 35, n. 10, p. 1251–1256, out. 2014.
- FAN, N. C. et al. Rise of community-onset urinary tract infection caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Escherichia coli in children. **Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi**, v. 47, n. 5, p. 399–405, 1 out. 2014.
- FREITAS, T. S. et al. UPLC-QTOF-MS/MS Analysis and Antibacterial Activity of the Manilkara zapota (L.) P. Royen against Escherichia coli and other MDR Bacteria. **Cellular and Molecular Biology**, v. 67, n. 1, p. 116–124, 31 jan. 2021.
- GOULENOK, T. et al. Risk factors for developing ESBL E. coli: Can clinicians predict infection in patients with prior colonization? **Journal of Hospital Infection**, v. 84, n. 4, p. 294–299, ago. 2013.
- GOVÊA, K. P. et al. Allelochemical activity of eugenol-derived coumarins on lactuca sativa L. **Plants**, v. 9, n. 4, 1 abr. 2020.
- GRUNDMANN, H. et al. Occurrence of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 153–163, 1 fev. 2017.
- GUACA-GONZÁLEZ, Y. M. et al. Detección y expresión de superantígenos y de resistencia antimicrobiana en aislamientos obtenidos de mujeres portadoras de Staphylococcus aureus que cuidan y alimentan niños. **Biomedica**, v. 38, n. 1, p. 96–104, 2018.
- HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic Therapy: A New Antimicrobial Approach to Infectious Disease? **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436–450, 30 abr. 2004.
- JANG, J. et al. Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 3, p. 570–581, 1 set. 2017.
- JORI, G. et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, n. 5, p. 468–481, jun. 2006.
- JUNG, J. C.; PARK, O. S. Synthetic approaches and biological activities of 4-hydroxycoumarin derivatives. **Molecules**, v. 14, n. 11, p. 4790–4803, nov. 2009.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic Escherichia coli. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, fev. 2004.
- KESERÜ, G. M.; MAKARA, G. M. The influence of lead discovery strategies on the properties of drug candidates. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 3, p. 203–212, 2009.
- KHARB, R.; KARUS, M.; SHARMA, A. Imperative Advances on Antimicrobial Activity of Coumarin Derivatives. **Int J Pharm Sci Rev Res**, v. 20, n. 1, p. 87–94, 2013.
- KOSTOVA, I. Synthetic and Natural Coumarins as Antioxidants. **Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 365–374, 2006.

- LÓPEZ-ROJAS, P. et al. Synthesis and antimicrobial activity of 4-substituted 1,2,3-triazole-coumarin derivatives. **Molecules**, v. 23, n. 1, 2018.
- LUBART, R. et al. A Possible Mechanism for the Bactericidal Effect of Visible Light. **Laser Therapy**, v. 20, n. 1, p. 17–22, 2011.
- MACLEAN, M. et al. Inactivation of bacterial pathogens following exposure to light from a 405-nanometer light-emitting diode array. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 1932–1937, abr. 2009.
- MAISCH, T. A New Strategy to Destroy Antibiotic Resistant Microorganisms: Antimicrobial Photodynamic Treatment. **Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 974–983, 2009.
- MARCHESE, A. et al. **Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. Critical Reviews in Microbiology** Taylor and Francis Ltd, , 2 nov. 2017.
- MEDINA, F. et al. Coumarin heterocyclic derivatives: chemical synthesis and biological activity. **Natural Product Reports**, v. 32, p. 1472–1507, 2015.
- MUNITA, J.; ARIAS, C. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiol Spectr**, v. 42, n. 5, p. 464–472, maio 2016.
- NATHAN, C. Resisting antimicrobial resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 259–260, 1 maio 2020.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. Journal of Natural Products** American Chemical Society, , 25 mar. 2016.
- OU-YANG, S. S. et al. **Computational drug discovery. Acta Pharmacologica Sinica**, 27 set. 2012.
- PAGONA, G.; KATERINOPOULOS, H. E.; TAGMATARCHIS, N. Synthesis, characterization, and photophysical properties of a carbon nanohorn-coumarin hybrid material. **Chemical Physics Letters**, v. 516, n. 1–3, p. 76–81, 7 nov. 2011.
- PAVYDĖ, E. et al. Public knowledge, beliefs and behavior on antibiotic use and self-medication in Lithuania. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 6, p. 7002–7016, 17 jun. 2015.
- PEDROSA, M. DE O. et al. Current Topics in Medicinal Chemistry The international journal for in-depth reviews on Current Topics in Medicinal Chemistry Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae Hybrid Compounds as Direct Multitarget Ligands: A Review. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 1044–1079, 2017.
- PEREIRA, N. L. F. et al. In vitro evaluation of the antibacterial potential and modification of antibiotic activity of the *Eugenia uniflora* L. essential oil in association with led lights. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 512–518, 1 set. 2017.
- PÉREZ, C.; GÓMEZ-DUARTE, O. G.; ARIAS, M. L. Diarrheagenic *Escherichia coli* in children from Costa Rica. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 2, p. 292–297, ago. 2010.
- RASIGADE, J.-P.; VANDENESCH, F. *Staphylococcus aureus*: a pathogen with still unresolved issues. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 21, p. 510–514, jan. 2014.



- RAZAVI, S. Plant Coumarins as Allelopathic Agents. **International Journal of Biological Chemistry**, v. 5, n. 1, 2011.
- REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482–501, 2018.
- ROCA, I. et al. The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. **New Microbes and New Infections**, v. 6, p. 22–29, 1 jul. 2015.
- ROOPE, L. S. J. et al. The challenge of antimicrobial resistance: What economics can contribute. **Science**, v. 364, n. 6435, 5 abr. 2019.
- SANTOS, A. et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar Staphylococcus aureus: visiting a strain of clinical importance. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 6, p. 413–423, 2007.
- SANTOS, W. H. DOS; SIQUEIRA, M.; SILVA-FILHO, L. Síntese de Derivados 4-aril-3,4-di-Hidrocumarínicos Catalisada por NbCl<sub>5</sub>. **Quim. Nova**, v. 36, n. 9, p. 1303–1307, 2013.
- SMALL, C. L. N. et al. Persistent infection with Crohn’s disease-associated adherent-invasive Escherichia coli leads to chronic inflammation and intestinal fibrosis. **Nature Communications**, v. 4, 10 jun. 2013.
- SOUZA, S. G. P. DE et al. Bacteria with a Potential for Multidrug Resistance in Hospital Material. **Microbial Drug Resistance**, v. 27, n. 6, p. 835–842, 1 jun. 2021.
- STRINGLIS, I. A.; JONGE, R.; PIETERSE, C. M. J. The Age of Coumarins in Plant-Microbe Interactions. **Plant and Cell Physiology**, v. 60, n. 7, p. 1405–1419, 1 jul. 2019.
- SUROWIAK, A. K. et al. **Biological activity of selected natural and synthetic terpenoid lactones. International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 1 maio 2021.
- TAYLOR, T. A.; UNAKAL, C. G. **Staphylococcus Aureus**. [s.l.] StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2020.
- UNITED NATIONS. **Report of the United Nations Secretary-Genral’s High-Level Panel on Access to Medicines**. , set. 2016.
- WAINWRIGHT, M. et al. **Photoantimicrobials—are we afraid of the light? The Lancet Infectious Diseases** Lancet Publishing Group, , 1 fev. 2017.
- WHO, W. H. O. **Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics**. , 2017. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>>
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **A crescente ameaça da resistência antimicrobiana: opções de ação**. , 2012.
- YAROVY, J. Y. et al. Epidemiology of Community-Onset Staphylococcus aureus Bacteremia. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. 20, n. 3, p. 438–442, 2019.
- ZHOU, C.-H.; WANG, Y. Recent Researches in Triazole Compounds as Medicinal Drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 239–280, 2012.

### APÊNDICE I – METODOLOGIA EXTENDIDA (METHODX) OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS

As substâncias utilizadas foram cedidas gentilmente pelo Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica – LQFar, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNIFAL, Minas Gerais. Trata-se de cumarinas derivadas de eugenol e dihidroeugenol. Para este estudo foram utilizadas e testadas nove das substâncias disponibilizadas. Foram identificadas como: composto 1 (C1), 3-benzoil-8-metoxi-2H-cromen-2-ona, composto 2 (C2), 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-2H-cromen-2-ona, composto 3 (C3), ácido 8-metoxi-2-oxo-2H-cromen-3-carboxílico e composto 4 (C4), 3-(4-aminobenzoil)-8-metoxi-2H-cromen-2-ona, composto 5 (C5), ácido 8-metoxi-2-oxo-6-propil-2H-cromen-3-carboxílico, composto (C6), 3-(hidroxi(4-nitrofenil)metil)-8-metoxi-6-propil-2H-cromen-2-ona, composto 7 (C7), 8-hidroxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-cromen-2-ona, composto 8 (C8), 3-(4-aminobenzoil)-8-metoxi-6-propil-2H-cromen-2-ona e composto 9 (C9), 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-cromen-2-ona.

### OBTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Foram utilizadas as bactérias de cepas padrão (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e multirresistentes (*Staphylococcus aureus* 10 e *Escherichia coli* 06) fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA).

### CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A determinação da CIM foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo utilizando placas esterilizadas com 96 poços com diluições em série 1:1 (N. C. C. L. S, 2000). Culturas microbianas mantidas em ágar estoque sob refrigeração foram repicadas em caldo de

infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 37°C durante 24 h. Após esse período, foi feita a padronização do inóculo, através da preparação de uma suspensão em BHI, cuja turvação esteja similar ao tubo 0,5 da escala McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Essa suspensão foi diluída 100 vezes, em meio BHI, o que corresponde aproximadamente a uma suspensão contendo  $1 \times 10^6$  UFC/mL, da qual foi retirado 100 µL e colocado em cada poço com 900 µL de BHI, preenchendo a coluna da placa e microdiluído com 100 µL do produto a ser testado até o penúltimo poço.

As soluções testes foram preparadas utilizando 10 mg dos produtos solubilizados em 9265 µL de água destilada e 500 µL de DMSO obtendo uma concentração inicial 1024 µg/mL. As concentrações finais das amostras no meio de cultura foram 512, 256, 128, 64, 32, 16 e 8 µg/mL.

Os testes foram realizados em triplicata nas colunas das placas e em placas em duplicata, uma vez que uma delas foi submetida a exposição ao LED por 20 minutos. As placas foram incubadas a  $35 \pm 2$  °C, durante 24 h. Após esse período, as placas foram reveladas com corante específico, a resazurina. Esta solução foi preparada em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v). Após o período de incubação, 20 µg/mL da solução indicadora foi acrescentada nas placas em cada cavidade e após uma hora em temperatura ambiente, realizada a leitura do teste. Esta é determinada através da coloração do meio de cultura, sendo considerada positiva para os poços que não apresentarem crescimento microbiano, ou seja, permanecerem com a coloração azul e negativa os que obtiveram coloração vermelha (SALVAT *et al.*, 2001).

O controle positivo do teste foi realizado com os meios de cultura contendo o inóculo. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, nos poços de microdiluição conforme detectado macroscopicamente.

Após a determinação da CIM, foi realizada a modulação dos produtos com os antibióticos. Para este procedimento utiliza-se tubos do tipo *Eppendorf*® contendo 1,5 mL, dos quais 150 µL são do inóculo bacteriano, volume do produto em concentração sub-inibitória (CIM/8) e o restante do volume meio BHI. Posteriormente, é feita a microdiluição com os antibióticos, diluindo em água ou DMSO (a depender da solubilidade do antibiótico) e utilizando 100 µL para microdiluir nos poços até a penúltima cavidade. Nessa placa, é feita ainda uma coluna contendo antibiótico, meio e inóculo que será utilizada como controle de modulação.

## AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTOATIVO COM EXPOSIÇÃO AO LED

Para a realização destes testes, inicialmente foram utilizadas as mesmas metodologias referentes ao teste de avaliação da atividade antibacteriana por microdiluição. Depois as placas foram subdivididas em dois grupos, o primeiro foi submetido à luz de LED azul durante vinte minutos cada placa e o segundo grupo não foi submetido às luzes de LED. Para expor as placas foram utilizados três aparelhos da marca New Estética®, utilizando uma caixa em MDF recoberta internamente com papel laminado e com três furos na tampa, como aparato para isolar cada placa da luz externa. (PEREIRA et al., 2017). As placas foram incubadas a  $35 \pm 2$  °C, durante 24h.

### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados centrais e desvios padrões foram obtidos de acordo com a metodologia de (FREITAS et al., 2021), sobre análise microbiológica em placas de microdiluição. Os dados foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prisma 5.0 através de um teste ANOVA de duas vias. Em seguida foi feito um teste de Bonferroni post hoc (onde  $p < 0,05$  foi considerado significativo e  $p > 0,05$  não significativo).