



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

JOYCY FRANCELY SAMPAIO DOS SANTOS

IN VITRO E IN SILICO: INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO DE *Staphylococcus aureus* POR COMPOSTOS FENÓLICOS

CRATO-CE

2022



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA - DQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA

JOYCY FRANCELY SAMPAIO DOS SANTOS

IN VITRO E IN SILICO: INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO DE *Staphylococcus aureus* POR COMPOSTOS FENÓLICOS

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

Orientador: Dr. FRANCISCO DE
ASSIS BEZERRA DA CUNHA

Coorientador: Dr. SAULO RELISON
TINTINO

Crato-CE

2022

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA
UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA**

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

Dos Santos, Joycy Francely Sampaio

D722v IN VITRO E IN SILICO: INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO DE
Staphylococcus aureus POR COMPOSTOS FENÓLICOS / Joycy Francely
Sampaio Dos Santos. Crato - CE, 2022.

109p. il.

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

Orientador(a): Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha

Coorientador(a): Prof. Dr. Saulo Relison Tintino

1.Gram-positiva , 2.Pirogalol , 3.Quercetina, 4.Reversão de resistência; I.Título.

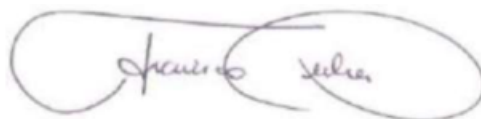
CDD: 572

JOYCY FRANCELY SAMPAIO DOS SANTOS

IN VITRO E IN SILICO: INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO DE *Staphylococcus aureus* POR COMPOSTOS FENÓLICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito para obtenção do Título de Doutora em Química Biológica e aprovado em: 21 de julho de 2022.

BANCA EXAMINADORA



Francisco Assis Bezerra da Cunha

Orientador

Professor Doutor do Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade Regional do Cariri, PPQB/URCA.



Henrique Douglas Melo Coutinho

Membro Titular Interno

Professor Doutor do Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade Regional do Cariri, PPQB/URCA.

Maria Flaviana Bezerra Morais Braga

Maria Flaviana Bezerra Morais Braga

Membro Titular Interno

Professora Doutora do Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade Regional do Cariri, PPQB/URCA.

Jacqueline Cosmo Andrade Pinheiro

Jacqueline Cosmo Andrade Pinheiro

Membro Titular Externo

Professora Doutora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - PPGCS da Universidade Federal do Cariri, UFCA.

Francisco Nascimento Pereira Júnior

Francisco Nascimento Pereira Júnior

Membro Titular Externo

Professor Doutor do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Cariri, PMPQBM/UFCA.

Raimundo Nonato Pereira Teixeira

Raimundo Nonato Pereira Teixeira

Membro Suplente Interno

Professor Doutor do Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade Regional do Cariri, PPQB/URCA.

Fabiola F. Galvão Rodrigues

Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues

Membro Suplente Externo

Professora Doutora do Mestrado em Educação e Mestrado Profissional em Ensino em Saúde
da UNILEÃO.

Dedico este trabalho a minha avó materna Terezinha L. Sampaio (in memoriam), que nos deixou a sete anos, e que sempre fez o possível para que eu tivesse uma ótima educação. Dedico também a todas as vítimas da Covid-19 e aos seus familiares que convivem com a dor da perda.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelas vitórias e aprendizados obtidos até aqui. Por sempre ter me dado força para não desistir. E por sua presença em todas as fases da minha vida. Que toda honra e glória seja dada a ele.

A minha mãe Francinete Sampaio, por sempre lutar pela minha educação e por estar comigo nas horas boas e ruins. Ao meu irmão Franciêudo Sampaio (meu médico favorito), por todo apoio dado desde a graduação até aqui, e por sempre acreditar no meu potencial. Amo vocês!

Ao meu noivo e amigo Júnior Santos, por sempre me incentivar a lutar pelos meus sonhos e objetivos, pelo carinho, amor e compreensão que sempre me demonstrou. Obrigado por tudo amor, amo você!

A minha amiga e irmã de coração, Adriana Tavares, pelos conselhos e palavras de incentivo. Por sempre estar do meu lado sempre que eu preciso.

Ao meu orientador Francisco Assis, pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados dos tempos de iniciação científica até aqui. Agradeço também pelo espaço que o senhor me deu no laboratório, e por proporcionar que este trabalho fosse realizado.

Ao meu coorientador Saulo Relison, pela ajuda na realização da minha pesquisa.

Ao professor Henrique Douglas, que sempre se mostrou muito solícito e atencioso quando precisei, desde a realização dos meus testes microbiológicos no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - LMBM a submissão dos meus manuscritos nas revistas.

Ao professor Irwin Rose, pelos ensaios de Docagem Molecular que tornaram possível a realização deste estudo.

Ao Gabriel Costa da Universidade de Utah nos Estados Unidos, pela parceria e contribuição no meu estudo com a metodologia de Dinâmica Molecular. Obrigada pela atenção e por sempre estar à disposição para ajudar.

A professora Flaviana Bezerra, pelas palavras de carinho e por ser essa pessoa maravilhosa, sempre disposta a ajudar. Obrigada por estar sempre presente ao longo da minha vida acadêmica.

A minha família científica LABSEMA (Laboratório de Bioprospecção do Semiárido e Métodos Alternativos), pelo apoio e carinho de sempre. Sou muito grata a todos vocês. Estarei sempre à disposição para ajudar no que for preciso.

A Cristina Rodrigues, Jackelyne Roberta e Sarah Patrício, eu não tenho palavras suficientes para agradecer toda ajuda de vocês na realização dos meus testes microbiológicos. Infelizmente por limitações de saúde não foi possível estar sempre presente. Saibam que podem sempre contar comigo.

Ao Dárcio Luiz e Zildene Sousa, muitíssimo obrigada por toda ajuda na escrita dos manuscritos, pela amizade de vocês, palavras de incentivo e tantas coisas que levariam horas para descrever. Meu carinho por vocês é enorme!

A Nair Silva, que tem me ajudado muito nesses anos de pós, sou muito grata por tudo que tem feito por mim, pelo carinho e pelas nossas conversas. Estou sempre à sua disposição para tudo que precisar.

Aos meus colegas da pós-graduação, sou muito grata pelos momentos que passamos juntos, dividindo as angústias, as alegrias e vitórias. Desejo a todos vocês muito sucesso, saúde e muita felicidade na vida de todos. Em especial gostaria de agradecer a Luciene Ferreira, pelo carinho e apoio de sempre. A Janaína Esmeraldo, pela amizade desde o mestrado e por nossas conversas (você sempre me deixa alegre e motivada). Ao Thiago Sampaio por me ajudar com a estatística. Ao Roger Henrique por todas as risadas, mesmo nas brigas por política (as vezes ele passa dos limites).

Ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, por todo conhecimento compartilhado e por tornar possível a obtenção do título de doutorado. A Universidade Regional do Cariri - URCA, pelo uso dos laboratórios para a realização da pesquisa. A FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro através da bolsa de doutorado, e pelos recursos usados neste estudo através dos Projetos: BPI3-0139-00077.01.00/18 e BP3-0172-00168.01.00/20 SPU 09673071/2020.

A todos que de forma direta ou indireta tornaram possível minha caminhada e a minha chegada até aqui, que Deus abençoe infinitamente a vida de todos.

“Concedei-nos Senhor, serenidade necessária para aceitar as coisas que não podemos modificar, coragem para modificar aquelas que podemos e sabedoria para distinguirmos umas das outras.” (Oração da Serenidade – Reinhold Niebuhr)

IN VITRO E IN SILICO: INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO DE *Staphylococcus aureus* POR COMPOSTOS FENÓLICOS

RESUMO

A resistência bacteriana aos antibióticos tem tornado o tratamento de infecções mais difícil, contribuindo para o aumento das doses de medicamento, tratamentos adicionais e tem prologado a permanência em hospitais. Essa resistência está associada a diversos mecanismos, dentre eles proteínas que promovem o efluxo ativo, extrudando os antibióticos da célula bacteriana impedindo que cheguem à concentração necessária para a realização do efeito. Na busca da resolução deste problema, diversas substâncias estão sendo investigadas por seu potencial inibidor de bombas de efluxo, dentre elas os compostos fenólicos. O objetivo do presente estudo consiste em avaliar a atividade da quercetina e do pirogalol como possíveis inibidores de bombas de efluxo de cepas de *Staphylococcus aureus*, e verificar a interação desses compostos por metodologias *in silico* como a docagem molecular e dinâmica molecular. Os testes para a obtenção da Concentração Inibitória Mínima - CIM da quercetina e do pirogalol e para a análise da inibição de bomba de efluxo por modificação da CIM dos antibióticos e brometo de etídio, foram feitos pela metodologia de microdiluição em caldo. Também foram realizados ensaios computacionais pelas metodologias de Docagem Molecular e Dinâmica Molecular, com intuito de identificar os mecanismos de interação das substâncias testadas. Nos dados obtidos pela quercetina, houve atividade antibacteriana direta apenas com a cepa IS-58 com o valor de CIM 512 µg/mL, e a inibição da bomba de efluxo foi observada nas cepas IS-58 portadora da bomba Tet(K) e SA-1199B portadora da bomba NorA. A interação da quercetina com a proteína NorA, ocorreu através da ligação de hidrogênio entre o oxigênio da cadeia lateral SER138. Já os resultados obtidos com o pirogalol, mostram sua atividade direta contra a cepa IS-58 (bomba Tet(K)) com o valor de CIM 512 µg/mL, e seu sinergismo pela redução da CIM do antibiótico tetraciclina (128 µg/mL para 45,25 µg/mL). Não houve redução da CIM do brometo de etídio, indicando que o mecanismo de resistência não foi inibido. A simulação de Dinâmica molecular demonstrou que o pirogalol interage apenas com a superfície da membrana. Novos estudos poderiam ser realizados para verificar se a quercetina e o pirogalol podem atuar na inibição de outros tipos de bombas de efluxo.

Palavras-Chave: Gram-positiva. Pirogalol. Quercetina. Reversão de resistência.

Agradecimentos: FUNCAP, URCA.

***IN VITRO AND IN SYLIC: INHIBITION OF *Staphylococcus aureus* EFLUX PUMPS
BY PHENOLIC COMPOUNDS***

ABSTRACT

Bacterial resistance to antibiotics has made the treatment of infections more difficult, contributing to increased drug doses, additional treatments and prolonged hospital stays. This resistance is associated with several mechanisms, including proteins that promote active efflux, extruding antibiotics from the bacterial cell, preventing them from reaching the concentration necessary to achieve the effect. In the search to solve this problem, several substances are being investigated for their potential inhibitor of efflux pumps, among them phenolic compounds. The objective of the present study is to evaluate the activity of quercetin and pyrogallol as possible inhibitors of efflux pumps of *Staphylococcus aureus* strains, and to verify the interaction of these compounds by in silico methodologies such as molecular docking and molecular dynamics. The tests to obtain the Minimum Inhibitory Concentration - MIC of quercetin and pyrogallol and for the analysis of the efflux pump inhibition by modifying the MIC of antibiotics and ethidium bromide, were performed using the broth microdilution methodology. Computational tests were also carried out using the Molecular Docking and Molecular Dynamics methodologies, in order to identify the interaction mechanisms of the substances tested. In the data obtained by quercetin, there was direct antibacterial activity only with the IS-58 strain with a MIC value of 512 µg/mL, and the inhibition of the efflux pump was observed in the IS-58 strains carrying the Tet(K) and SA pump. -1199B carrying the NorA bomb. The interaction of quercetin with the NorA protein occurred through the hydrogen bond between the oxygen of the SER138 side chain. The results obtained with pyrogallol show its direct activity against the IS-58 strain (Tet(K) pump) with a MIC value of 512 µg/mL, and its synergism by reducing the MIC of the antibiotic tetracycline (128 µg/mL to 45.25 µg/mL). There was no reduction in the MIC of ethidium bromide, indicating that the resistance mechanism was not inhibited. Molecular dynamics simulation showed that pyrogallol interacts only with the membrane surface. Further studies could be carried out to verify whether quercetin and pyrogallol can act to inhibit other types of efflux pumps.

Keywords: Gram-positive. Pyrogallol. Quercetin. Reversal of resistance.

Acknowledgements: FUNCAP, URCA.

IMPORTÂNCIA/RELEVÂNCIA PARA A SOCIEDADE

A resistência bacteriana é causada pelo uso indiscriminado de antibióticos, seja com aditivo no ramo agropecuário, e como também no tratamento de enfermidades provocadas por bactérias. Na pandemia por Covid-19 o antibiótico azitromicina foi frequentemente prescrito por profissionais da saúde. Sabemos que o uso de forma abusiva dos antibióticos contribui para a seleção e disseminação de estirpes resistentes. Bactérias como *Staphylococcus aureus* podem causar doenças que vão desde dermatites, até endocardite e choque séptico. Essa bactéria também tem sido associada a infecções resistentes. A resistência bacteriana tem dificultado o tratamento de infecções, contribuindo com a superlotação de hospitais e com aumento da mortalidade. Essa resistência está ligada a vários mecanismos, dentre eles, as bombas de efluxo, que realizam a extrusão de substâncias como os antibióticos para fora da célula bacteriana, interferindo na quantidade necessária desses medicamentos, afetando sua eficácia. Esse estudo buscou investigar a ação de duas substâncias, a quercetina e o pirogalol, comumente encontradas em cereais, frutas, chás e outros, e que podem contribuir com o aumento do efeito de fármacos antibacterianos já utilizados, bloqueando a ação do mecanismo bacteriano já mencionado. Dessa forma, essa tese pode contribuir na descoberta de mecanismos de ação e substâncias capazes que atuar na reversão da resistência bacteriana, que poderão ser base para formulação de novos medicamentos e inovação de tratamentos para infecções bacterianas persistentes.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II: ARTIGO 1 - AUMENTO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA POR MEIO DE QUERCETINA CONTRA BOMBAS DE EFLUXO DE *Staphylococcus aureus*.

Tabela 1 - Valores da concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL. Testes realizados com cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> . CEPA 1 (IS-58/bomba TetK), CEPA 2 (RN-422/bomba MsrA), CEPA 3 (bomba SA-1199B/NorA) e CEPA 4 (selvagem).....	49
Tabela 2- Descrições das interações entre quercetina e NorA.....	53

CAPÍTULO III: ARTIGO 2 - ATIVIDADE INIBITÓRIA INDIRETA DO PIROGALOL CONTRA A BOMBA DE EFLUXO TET(K) POR UM EFEITO DE MEMBRANA: ABORDAGEM IN VITRO E EM SÍLICO.

Tabela 1- Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL de pirogalol e o antibiótico (tetraciclina). Cepa IS-58 que carrega a bomba Tet(K).....	68
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1- Mecanismos de resistência bacterina a drogas antibacterianas.....	27
Figura 2- As principais famílias de Bombas de efluxo.....	29
Figura 3- Estrutura química da quercetina.....	36
Figura 4- Estrutura química do Pirogalol.....	37

CAPÍTULO II: ARTIGO 1 - AUMENTO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA POR MEIO DE QUERCETINA CONTRA BOMBAS DE EFLUXO DE *Staphylococcus aureus*.

- Figura 1- Efeito da inibição da bomba de efluxo pela redução do CIM de antibiótico por quercetina em cepas de *S. aureus* portadoras de bombas de efluxo.....50
- Figura 2- Efeito modulador da quercetina sobre a atividade do Brometo de etídio (EtBr), contra linhagens de *S. aureus* que apresentam bombas de efluxo como um mecanismo de resistência.....50
- Figura 3- A sequência NorA mostrando hélices regularmente intercaladas por lops (na estrutura modelada e hélices transmembranas previstas pela TMPred são representadas como conjuntos acima dos resíduos.....55
- Figura 4- Prováveis locais de ligação de proteínas NorA modelados pela CASTp.....56
- Figura 5- Interação quercetina em sítio de ligação de NorA. A formação de ligação de hidrogênio entre quercetina e Ser138 fornece estabilidade à proteína/complexo de ligação.....57

CAPÍTULO III: ARTIGO 2 - ATIVIDADE INIBITÓRIA INDIRETA DO PIROGALOL CONTRA A BOMBA DE EFLUXO TET(K) POR UM EFEITO DE MEMBRANA: ABORDAGEM IN VITRO E EM SÍLICO.

- Figura 1- Representação da molécula de pirogalol. Os átomos de carbono são retratados em ciano, os oxigenados em vermelho e o hidrogênio são representados como esferas brancas.....67
- Figura 2- Efeito da combinação do pirogalol com o antibiótico tetraciclina e brometo de etídio contra a estirpe IS-58 portadora da bomba de efluxo Tet(K).....69
- Figura 3- Instantâneo do início (A), e do fim (B) da simulação do pirogalol (ciano) com membrana POPG (cinza).....71
- Figura 4- Análise de contatos nativos de moléculas de pirogalol com: (A) glicerol do grupo da cabeça lipídica; (B) íons Na⁺ ao longo de toda a trajetória.....72
-

Figura 5- Análise das propriedades dependentes do tempo: (A) Área por grupo de cabeça lipídica; (B) Parâmetros de ordem de Deutério para as cadeias de oleil (preto) e palmitoyl (vermelho).....72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC:	<i>ATP Binding Cassette</i>
ALA:	Alanina
ATB	<i>Automated Topology Builder</i>
ATP:	Adenosina trifosfato
BHI:	<i>Brain Heart Infusion</i>
CIM:	Concentração Inibitória Mínima
CCCP:	Cianeto de Carbonila m-Clorofenil-Hidrazona
CLSI:	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CPMZ:	Clorpromazina
DM:	Dinâmica Molecular
DMSO:	Dimetilsulfóxido
EtBr:	Brometo de etídio
GLU:	Ácido glutâmico
GLY:	<i>Glycine</i>
HIA:	<i>Heart Infusion Agar slants</i>
Hbond:	Interações de Hidrogênio
IBEs:	Inibidores de bombas de efluxo
ILE:	<i>Isoleucine</i>
LEU:	Leucina
LGA:	Algoritmo Genético Lamarckiano
MATE:	<i>Multidrug and Toxic Compound Extrusion</i>
MDR:	<i>Multi-Drug Resistance</i>
MFS:	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
NCBI:	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
RND:	<i>Resistance-Nodulation-cell Division</i>
PACE:	<i>superfamily and the proteobacterial antimicrobial compound efflux</i>
PA β N:	<i>Phenylalanine-arginine β-naphthylamide</i>
PHE:	Fenilalanina
POPG:	<i>1-palmitoyl-2-Oleoyl-sn-glycero-3-(phosphor-rac-(1glicerol)</i>
PRO:	Prolina

SER: Serina
SMR: *Small Multidrug Resistance*
TRY: *Tyrosine*
UFC: Unidade Formadora de Colônia
VAL: Valina

1.1.	INTRODUÇÃO GERAL	22
1.1	ESTRATÉGIAS DE PESQUISA	22
2.	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GERAL	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
2.3	OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS	24
3.	CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	26
3.1	RESISTÊNCIA BACTERIANA A FÁRMACOS	26
3.2	BOMBA DE EFLUXO.....	28
3.2.1	Superfamília de Divisão de Nodulação de Resistência (<i>Resistance Nodulation Division – RND</i>)	29
3.2.2	Família de Resistência a Multidrogas (<i>Small Multidrug Resistance – SMR</i>).....	29
3.2.3	Superfamília Facilitadora (<i>Major Facilitator Superfamily - MFS</i>).....	30
3.2.4	Família de Extrusão de Compostos Tóxicos e Multidrogas (<i>Multidrug and Toxic Compound Extrusion – MATE</i>).....	31
3.2.5	Superfamília de Cassete de Ligação de Adenosina Trifosfato (ATP) (<i>ATP Binding Cassette - ABC</i>)	31
3.2.6	Superfamília de efluxo de compostos antimicrobianos proteobacterianos (<i>superfamily and the proteobacterial antimicrobial compound efflux - PACE</i>)	31
3.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	32

3.4	INIBIDORES DE BOMBAS DE EFLUXO (IBEs).....	33
3.5	COMPOSTOS FENÓLICOS	34
3.5.1	Quercetina.....	36
3.5.2	Pirogalol.....	37
3.6	DOCAGEM MOLECULAR	38
3.7	SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR.....	38
4.	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	40
4.1	CAPÍTULO 2 - AUMENTO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA POR MEIO DA QUERCETINA CONTRA BOMBAS DE EFLUXO DE <i>Staphylococcus aureus</i> ..	40
4.2	CAPÍTULO 3 - ATIVIDADE INIBITÓRIA INDIRETA DO PIROGALOL CONTRA A BOMBA DE EFLUXO TetK POR UM EFEITO DE MEMBRANA: ABORDAGEM <i>in vitro</i> E <i>in silico</i>	41
	ARTIGO 1	42
	ARTIGO 2	63
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
5.1	ASPCTOS GERAIS DA PRODUÇÃO CIENTIFICA	81
5.2	CONCLUSÕES GERAIS.....	83
5.3	PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS.....	83
6.	REFERÊNCIAS.....	85
7.	ANEXOS E APÊNDICES	98
7.1	APÊNDICES	98
7.1.2	Metodologia estendida (Methodx).....	98
7.2	ANEXO	105

7.2.1	Produção científica vinculada ao doutorado	105
7.2.2	Produção científica não vinculada ao doutorado	106

1.1 ESTRATÉGIAS DE PESQUISA

Dentre os mecanismos bacterianos associados ao problema da resistência aos antibióticos, as bombas de efluxo são um dos principais responsáveis por dificultar o uso de drogas antibióticas no tratamento de diversas infecções bacterianas. O aumento do número de patógenos multirresistentes, tem despertado a necessidade por novas fontes de tratamento, principalmente a busca por novos inibidores de bombas de efluxo (KABRA *et al.*, 2019). Nessa perspectiva, substâncias derivadas de plantas como extratos, óleos essenciais e compostos isolados têm sido investigados quanto as suas propriedades antibacterianas, principalmente relacionadas com a reversão da resistência bacteriana.

Diversas metodologias podem ser empregadas no intuito de verificar a atividade de compostos naturais e sintéticos, dentre elas a metodologia de microdiluição em caldo utilizada na verificação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) proposto por Javadpour *et al.* (1996) e pelo CLSI (2015), que permite a verificação da ação direta da substância avaliada. Para auxiliar na busca por novos inibidores de bomba de efluxo, a metodologia de Coutinho e colaboradores (2008), utiliza a concentração subinibitória (CIM/8), com o objetivo de identificar se a associação das substâncias testadas, auxiliou na potencialização do antibiótico. O brometo de etídio é usado para evidenciar a inibição das bombas de efluxo. E para a confirmação da presença do mecanismo estudado, inibidores padrões como a clorpromazina e o Cianeto de Carbonila m-Clorofenil-Hidrazona - CCCP são utilizados.

Para facilitar a compreensão dos mecanismos de ação que ocasionaram um determinado efeito de uma substância, seja ela um composto natural ou sintético, as simulações computacionais como a Docagem Molecular e a Dinâmica Molecular, são metodologias capazes de verificar as interações a nível molecular, através de cálculos de energia de ligação, acoplamento, dentre outros (LIU *et al.*, 2018; HOLLINGSWORTH; DROR, 2018). Nesse estudo, os cálculos da docagem foram realizados utilizando o DockingServer e as simulações de Dinâmica Molecular foram feitas com o software GROMACS 2019.4. Isto nos permite entender como o composto estudado, como um candidato a inibidor, conseguiu reverter a resistência bacteriana por inibição de bomba de efluxo (SCHWEIZER, 2012).

No intuito de facilitar a compreensão dos leitores, essa tese foi organizada em capítulos. O capítulo I corresponde a fundamentação teórica, onde está contido informações buscadas na

literatura sobre o tema abordado. O capítulo II trata do primeiro artigo publicado, que mostra a ação da quercetina sobre bombas de efluxo de *Staphylococcus aureus*, com também a interação desse composto com a proteína de efluxo NorA. O capítulo III nos trás o segundo artigo publicado, que demonstra a ação do pirogalol sobre a cepa de *S. aureus* portadora da bomba de efluxo Tet(K) e sua interação *in silico* com a membrana bacteriana. A seção de considerações finais está composta pelos aspectos da produção científica, conclusões gerais e perspectivas de investigações futuras. Os anexos mostram a produção científica associada a tese e outras que não estão relacionadas a mesma, e que foi realizada durante o período do doutorado.

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade de inibição de bombas de efluxo de *Staphylococcus aureus* pelos compostos fenólicos quercetina e pirogalol e analisar os mecanismos de interação *in silico*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Verificar a atividade antibacteriana direta da quercetina e do pirogalol por meio do ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM);
- ✓ Averiguar o efeito potencializador dos compostos fenólicos sobre os antibióticos pela redução da CIM;
- ✓ Analisar a inibição das bombas de efluxo de *S. aureus* NorA, TetK, MsrA pela redução da CIM do brometo de etídio;
- ✓ Investigar os mecanismos de interação dos compostos fenólicos pelas metodologias de Docagem Molecular e Dinâmica Molecular;

2.3. OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS

Considerado como um dos maiores problemas de saúde pública em escala mundial, a resistência bacteriana aos antibióticos está relacionada a diversos fatores que vão desde o uso de forma inadequada a falhas de procedimentos de biossegurança, como a higienização das mãos feita de maneira incorreta, falta do uso de equipamentos de proteção individual e outras (OLIVEIRA *et al.*, 2008; LLOR *et al.*, 2014; O'NEILL, 2016). Essa resistência tem sido denominada como uma habilidade de um micro-organismo de tolerar uma substância bacteriostática ou bactericida, mesmo levando em consideração a suscetibilidade específica de uma espécie (VERRAES *et al.*, 2013).

Dentre os mecanismos de resistência utilizados pelas bactérias para interferir no efeito das drogas antibacterianas, as bombas de efluxo (efluxo ativo), capazes de extrudir substâncias tóxicas para o meio extracelular, correspondem a um dos mecanismos de resistência bacteriana

mais investigados pela comunidade científica (MASI *et al.*, 2017; SING *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2019; HASSANZADEH *et al.*, 2020).

Essas bombas de efluxo podem ser encontradas tanto em bactérias Gram-negativas como Gram-positivas (SPENGLER *et al.*, 2017). Podemos destacar como participante deste último grupo, a espécie *Staphylococcus aureus*, encontrada na microbiota humana e causadora de diversas infecções de importância clínica (TASCINI *et al.*, 2020; HAJIKHANI *et al.*, 2021). Infelizmente, com o aumento da exposição a fármacos antibacterianos, esta espécie se tornou resistente a diversas classes de antibióticos comumente utilizados, dificultando o tratamento de doenças causadas pela mesma (AKANBI *et al.*, 2017; GUO *et al.*, 2020).

Com o intuito de reverter o problema da resistência bacteriana aos antibióticos, é imperativa a busca por novas fontes de tratamento. Os inibidores de bombas de efluxo administrados juntamente com drogas antibióticas já utilizadas, podem contribuir para um aumento da eficiência do medicamento, como também na redução da concentração, e dessa forma, auxiliando na diminuição de efeitos colaterais (PRASCH; BUCAR, 2015; SEUKEP *et al.*, 2020).

Diversos metabólitos secundários de plantas já são relatados na literatura por possuírem atividade antibacteriana contra diversos micro-organismos patogênicos. O que inclui alguns trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa, que já verificaram a reversão de mecanismos de resistência por meio de compostos como: ácido gálico, ácido cafeico, carvacrol, timol e terpinoleno (DOS SANTOS *et al.*, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2020; SCHERF *et al.*, 2020). Dentre eles, os compostos fenólicos podem ser destacados por apresentarem diversos mecanismos de ação que levam ao efeito antibacteriano, como: danos à membrana, mudanças na permeabilidade e inibição de bomba de efluxo (LIMA *et al.*, 2019).

Além da verificação das propriedades biológicas e farmacológicas é necessária a investigação do seu mecanismo de interação, que pode ser realizado por metodologias computacionais. A Docagem molecular realiza simulações que determinam a interação receptor e ligande, e verifica se há uma alta afinidade de ligação (LIU *et al.*, 2018). Já a Dinâmica Molecular faz a previsão de movimentos em um sistema molecular, como por exemplo as proteínas, guiando interações (CHEN *et al.*, 2014).

3.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA A FÁRMACOS

A descoberta dos antibióticos se destacou como um dos mais importantes achados médicos do século XX (ALDULAIMI, 2017). Nos anos 40 com o início da utilização clínica da penicilina, houve uma significativa redução da mortalidade por infecções provocadas por *Staphylococcus aureus* em comparação com a registrada na era pré-antibiótica. Entretanto com a adoção deste tratamento, em alguns anos depois, o número de casos relacionados a resistência bacteriana crescia rapidamente (GIULIERI *et al.*, 2020).

Alguns estudos mostram que a bactéria *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), já circulava antes mesmo do uso da meticilina, e que possivelmente tenha sido selecionada pela utilização da penicilina. A disseminação de MRSA nos hospitais contribuiu para várias epidemias comunitárias (HARKINS *et al.*, 2017). Já a resistência a vancomicina ocorreu de forma lenta e pode ter relação com a utilização restrita desse antibiótico depois de diversas ocorrências de infecções por MRSA (GIULIERI *et al.*, 2020).

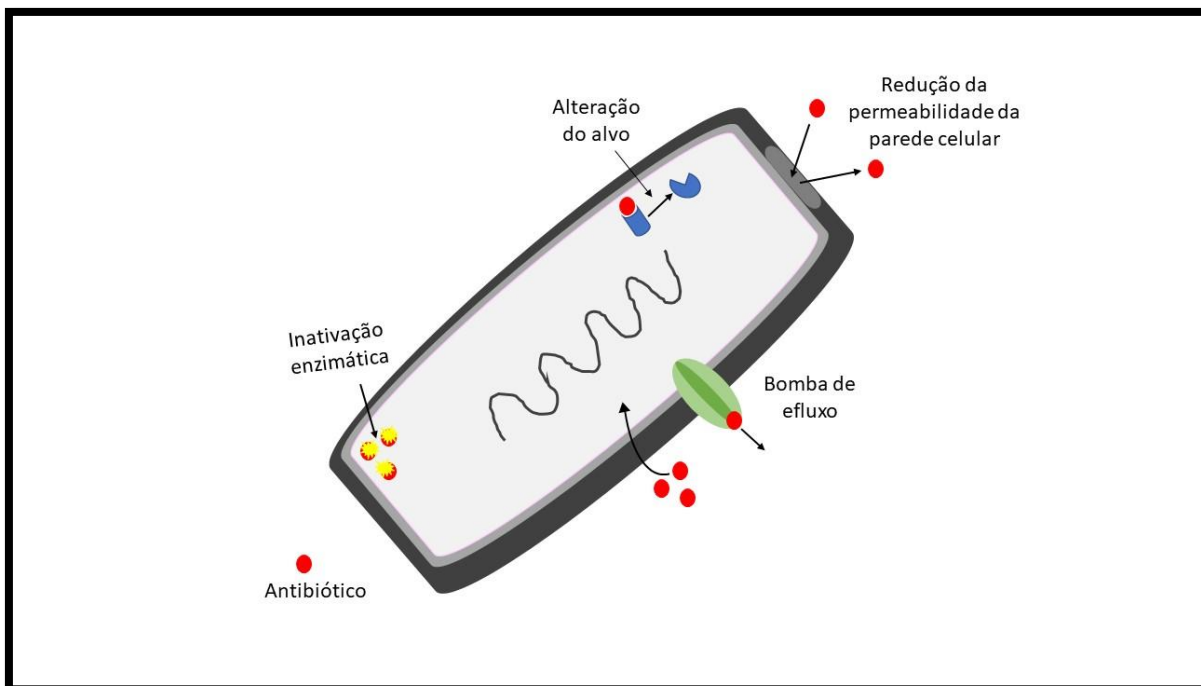
Caracteriza-se a resistência como a ausência da capacidade de um antibiótico de alcançar seu alvo microbiano (MARSHALL; LEVY, 2020). O uso de fármacos antibacterianos de forma descontrolada e inadequada possibilitou a propagação de estirpes bacterianas resistentes, contribuindo diretamente para a ineficiência de várias classes de antibióticos, facilitando a incidência de mecanismos de resistência e colaborando para o aumento de casos de infecções relacionadas a resistência bacteriana (LLOR *et al.*, 2014; LONG *et al.*, 2016; LEVIN-REISMAN *et al.*, 2017).

A resistência pode ser classificada como intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca está associada aos aspectos de função e estrutura específica da própria bactéria. Como exemplo temos bombas de efluxo inespecíficas e enzimas inativadoras (COX; WRIGHT, 2013; PONTES *et al.*, 2018). No caso da adquirida, a obtenção ocorre através da transferência horizontal de genes e plasmídeos. Pela sua fácil transmissão, oferecem um risco maior de disseminação. As bombas de efluxo com substratos específicos, são exemplos de resistência adquirida (VAN HOEK *et al.*, 2011; YILMAZ *et al.*, 2017).

A resistência a drogas antibacterianas tem dificultado o tratamento de infecções bacterianas, tornando necessário o aumento de doses maiores de antibióticos, tratamentos

adicionais e o prolongamento da permanência em ambientes hospitalares (KHAMENEH *et al.*, 2016). Este fenômeno está relacionado ao uso de mecanismos que interferem na eficácia de fármacos existentes, como: a inativação enzimática, redução da permeabilidade da parede celular, alteração do alvo do medicamento e através da expressão das bombas de efluxo (Figura 1) (SABATINI *et al.*, 2012; ALDULAIMI, 2017).

Figura 1: Mecanismos de resistência bacteriana a drogas antibacterianas.



Fonte: adaptado de Nicolsen e Stang (2019).

O mecanismo de inativação enzimática consiste na alteração direta e inativação do antibiótico, que pode acontecer de duas formas: por hidrólise ou por transferência de um grupo químico. Por hidrólise, as β -lactamases são enzimas que atuam nessas modificações, causando resistência aos antibióticos β -lactâmicos (JOHNSON; WOODFORD, 2013). São obtidas através de genes contidos em elementos genéticos móveis (plasmídeos), o que resulta em altos níveis de expressão e resistência (DANTAS; SOMMER, 2012). Já por transferência de grupo químico, a ligação do antibiótico com a proteína alvo é impedida, pela transferência de tiol, fosforilação, acila, glicosilação entre outros. Os aminoglicosídeos são muito suscetíveis a esse processo por causa de seus grupos amina e hidroxila (NORRIS; SERPERSU, 2013).

A redução da permeabilidade da parede celular geralmente acontece pela regulação negativa das porinas ou pela ocorrência de mutações nos genes dessas proteínas (LI *et al.*, 2012). A alteração do alvo do medicamento pode ocorrer de diversas formas: por mutação, modificação e proteção. Nas alterações estruturais, a ligação é impedida, porém, não há

modificação na funcionalidade do alvo. Isso pode ocorrer pelo processo denominado de transformação (BLAIR et al., 2015). No caso da alteração e proteção do alvo, não é necessária a ocorrência de mutações nos genes codificadores das moléculas alvo, apenas modificações pós-transcricionais. Pode haver em alguns casos a presença da ação de enzimas (KUMAR et al., 2014).

3.2 BOMBA DE EFLUXO

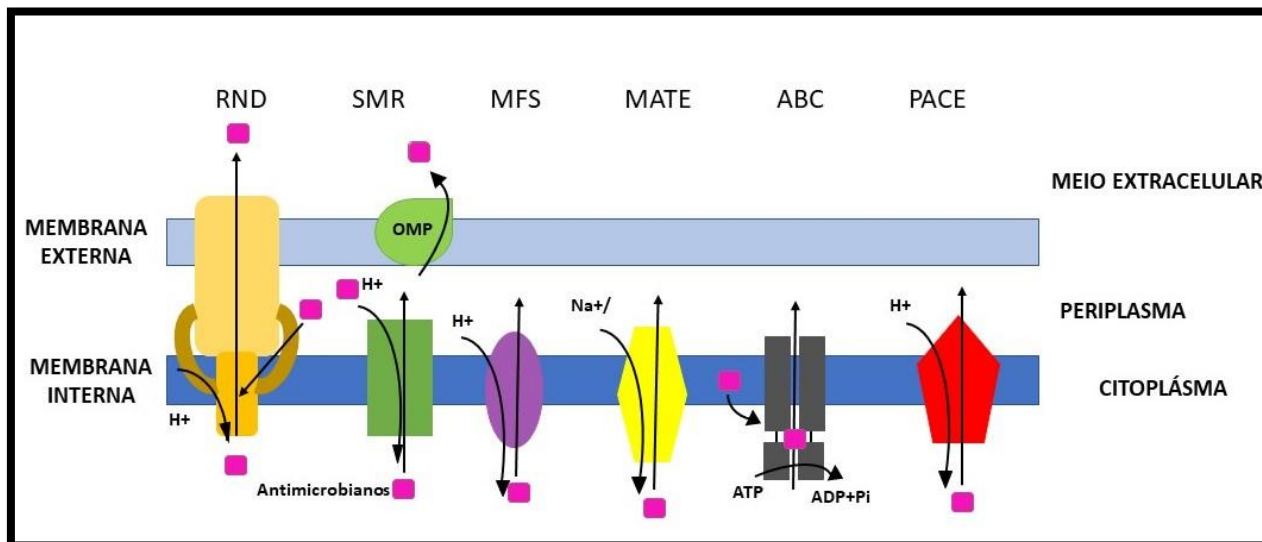
A superexpressão dos sistemas de bombas de efluxo corresponde à extrusão de compostos tóxicos (antibióticos, corantes, biocidas e outros) para o meio externo da célula bacteriana, ocasionando a redução das concentrações e diminuído a sua eficácia (PEREZ et al., 2012; SCHINDLER et al., 2016). Essas bombas de efluxo são proteínas encontradas na membrana citoplasmática das células procarióticas e eucarióticas. São denominadas também como transportadores ativos, e necessitam de uma fonte de energia química para desempenhar sua função (KOSMIDIS et al., 2012; SPENGLER et al., 2017).

De acordo com a fonte de energia utilizada para a expulsar os compostos tóxicos da célula bacteriana, as bombas de efluxo podem ser agrupadas em duas categorias: transportadores ativos primários e secundários. Os transportadores ativos primários usam a energia fornecida através da hidrólise de ATP, como exemplo, temos os transportadores da Superfamília de Cassete de Ligação de Adenosina Trifosfato (ATP) - ABC (SCHINDLER et al., 2016; LEKSHMI et al., 2018). Os secundários utilizam o gradiente de concentração de íons, dentre eles estão as bombas de efluxo que fazem parte das famílias MATE (Família de Extrusão de Compostos Tóxicos e Multidrogas), SMR (Família de Resistência a Multidrogas) e MFS (Superfamília Facilitadora) (ALNASERI et al., 2015).

Há uma grande diversidade de bombas de efluxo classificadas e distribuídas em seis principais famílias conforme as suas características de composição, substratos, número de regiões de transmissão transmembrana e fonte de energia (SUN et al., 2014). Pode-se citar a Superfamília de Divisão de Nodulação de Resistência (*Resistance Nodulation Division* – RND), Família de Resistência a Multidrogas (*Small Multidrug Resistance* – SMR), Superfamília Facilitadora (*Major Facilitator Superfamily* - MFS), Família de Extrusão de Compostos Tóxicos e Multidrogas (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion* - MATE), Superfamília de Cassete de Ligação de Adenosina Trifosfato (ATP) (*ATP Binding Cassette* - ABC) e a Superfamília de Efluxo de Compostos Antimicrobianos Proteobacterianos (*superfamily and the proteobacterial antimicrobial compound efflux* - PACE) (Figura 2) (HASSAN et al., 2015; MUNITA; ARIAS,

2016).

Figura 2: As principais famílias de Bombas de efluxo.



Fonte: Adaptado de KABRA *et al.*, 2019.

Legenda: O quadrado rosa corresponde ao antimicrobiano.

3.2.1 Superfamília de Divisão de Nodulação de Resistência (*Resistance Nodulation Division – RND*)

A superfamília RND é encontrada predominantemente em bactérias Gram-negativas (HANDZLIK; MATYS; KIEĆ-KONONOWICZ, 2013). Essa família catalisa o efluxo através do antiporte substrato/H⁺. Todas as bombas de efluxo RND estudadas até o momento, são transportadores de múltiplas drogas (NIKAIDO, 2011). Conferem resistência a tetraciclina, alguns β-lactâmicos, cloranfenicol, novobiocina, ácido fusídico e fluoroquinolonas. Também podem extrudar vários compostos como sais biliares, corantes catiônicos e desinfetantes (MUNITA; ARIAS, 2016).

3.2.2 Família de Resistência a Multidrogas (*Small Multidrug Resistance – SMR*)

As bombas de efluxo da família SMR podem ser encontradas em bactérias e arqueobactérias e transportam diversos antibióticos e substâncias lipofílicas (SPENGLER *et al.*, 2017). Como exemplo desta família pode-se citar a bomba QacC encontrada em

Staphylococcus aureus, que expulsa para o meio extracelular amônio quaternário e brometo de etídio (WASSENAAR *et al.*, 2015).

3.2.3 Superfamília Facilitadora (*Major Facilitator Superfamily* - MFS)

A MFS é mencionada como a maior família de transportadores secundários ativos, ela possui mais de 10.000 membros com o sequenciamento genético já realizado. Esses transportadores possuem uma grande diversidade de substratos como lipídios, aminoácidos, hidratos de carbono, antibióticos e outras substâncias (LEKSHMI *et al.*, 2018). Estão localizados na membrana citoplasmática das bactérias, auxiliando na prevenção do acúmulo de drogas no meio interno. A codificação genética dessas bombas geralmente é cromossômica, mas algumas são portadoras de plasmídeos (RANAWEERA *et al.*, 2015). Alguns membros desta superfamília são as bombas NorA, TetK e QacA/B.

A bomba de efluxo NorA é formada por cerca de 388 aminoácidos, que compreendem 12 segmentos transmembrana α -hélices., com domínios N- e C-terminais dispostos numa pseudo-dupla simetria (BHASKAR *et al.*, 2016). Está localizada na membrana citoplasmática e corresponde a um sistema de efluxo codificado cromossomicamente cuja ocorrência do acréscimo da resistência às fluoroquinolonas está associado com o aumento da expressão do gene *norA* (NG; TRUCKSIS; HOOPER, 1994). A bomba NorA pode expulsar diversos compostos diferentes, tais como fluoroquinolonas, compostos de amônio quaternário e antissépticos, fenotiazinas, tioxantenos, verapamil, omeprazol, alguns terpenóides, reserpina e corantes como o brometo de etídio (DEMARCO *et al.*, 2007; GERMAN *et al.*, 2008; NARGOTRA *et al.*, 2009; PAPKOU *et al.*, 2020).

A cepa SA-1199B é uma das mais estudadas em relação a expressão de NorA de forma constitutiva e não induzível. Já a cepas SA-1199, descrita como do tipo selvagem expressa NorA de maneira induzível (KAATZ; SEO, 1995; KAATZ; SEO; RUBLE, 1993).

A Bomba Tet(K) é restrita para um tipo de substrato, atuando na diminuição da concentração intracelular da Tetraciclina (PIDDOCK, 2006). Os genes *Tet* que são associados a esta resistência, são móveis geneticamente e realizam a codificação de proteínas ligadas a membrana, possuindo como base os ribossomos que são protegidos através da expulsão da Tetraciclina (CHOPRA; ROBERTS, 2002).

A proteína de efluxo QacA/B encontrada em *S. aureus* é codificada através de plasmídeos. Essa bomba de efluxo pode extrudir a tetraciclina e diversos outros tipos de substâncias, o que comprova sua multirresistência (CHATTERJEE *et al.*, 2016).

3.2.4 Família de Extrusão de Compostos Tóxicos e Multidrogas (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion – MATE*)

As proteínas da família MATE possuem 12 segmentos transmembranares e realizam o antiporte para expulsar substâncias tóxicas, usando o gradiente de ions da membrana, efluindo corantes e fluoroquinolonas (KURODA; TSUCHIYA, 2009).

A bomba de efluxo MepA é codificada pelo gene de origem cromossômica *mepA*. Foi um dos primeiros transportadores da família MATE a ser caracterizado em *Staphylococcus aureus* (KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005). Pode expulsar diversos tipos de compostos como ciprofloxacino, norfloxacino, moxifloxacina, compostos de amônio quaternário, brometo de etídio e outros (KAATZ; DEMARCO; SEO, 2006).

3.2.5 Superfamília de Cassete de Ligação de Adenosina Trifosfato (ATP) (*ATP Binding Cassette - ABC*)

As bombas da família ABC podem ser localizadas nas células de diversas espécies de organismos, com frequência na membrana plasmática, mas podem estar também nas membranas das organelas. Dentre as bombas pertencentes a esta família podemos citar a DrrAB de *Streptomyces peuceticus* e a MsrA encontrada em *S. aureus* e resistente ao antibiótico eritromicina (CANNON *et al.*, 2009). Os membros desta família não expulsam somente antibióticos macrolídeos, mas também lipopeptídeos de membrana externa, protoporfirina, fatores de virulência de polipeptídeos e lipopolissacarídeos (FITZPATRICK *et al.*, 2017).

3.2.6 Superfamília de efluxo de compostos antimicrobianos proteobacterianos (*superfamily and the proteobacterial antimicrobial compound efflux - PACE*)

A família PACE de proteínas de transporte corresponde a uma recente descoberta em relação aos mediadores de efluxo de fármacos. Essa família é restrita em relação aos seus substratos, incluindo biocidas sintéticos como clorexidina e acriflavina (HASSAN *et al.*, 2015).

Porém, as proteínas PACE são mais localizadas em patógenos Gram-negativos oportunistas, como: *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (HASSAN *et al.*, 2018).

3.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é um patógeno Gram-positivo com grande importância em uma ampla série de síndromes clínicas, como doenças cutâneas, pneumonia, endocardite, síndrome do choque tóxico e infecções relacionadas a próteses médicas (WELTE *et al.*, 2019; JANG *et al.*, 2019; TASCINI *et al.*, 2020; HAJIKHANI *et al.*, 2021). É pertencente ao gênero *Staphylococcus* e a família Staphylococcaceae, podendo ser encontrado na microbiota natural humana (ONDUSKO; NOLT, 2018). A sua resistência a diversos tipos de drogas, está relacionada ao fato desse micro-organismo apresentar mecanismos de resistência intrínseca ou adquirida (DURÃO *et al.*, 2018).

A espécie em questão, pode desenvolver resistência a diversos tipos de antibióticos através de diferentes mecanismos, prejudicando a sua eficiência. A obtenção de elementos móveis relacionados a resistência genética por transferência horizontal de genes, superexpressão de bombas de efluxo e mutações de alvos de drogas antibióticas, são os mais relatados na literatura (FOSTER 2017; DADASHI *et al.*, 2020). Foram relatados para *S. aureus*, 14 tipos de bombas de efluxo multidrogas, codificadas nos cromossomos e em plasmídeos (COSTA *et al.*, 2013). As bombas de efluxo mais investigadas na espécie em questão são da família MFS, com exemplo pode-se citar a bomba NorA (MOHAMMED-ALI.; JAMALLUDEEN, 2015; BHASKAR *et al.*, 2016; PAPKOU *et al.*, 2020).

Dentre as cepas de *S. aureus* resistentes mais mencionadas em estudos, as resistentes à meticilina (MRSA) são consideradas de alta prioridade, por causar infecções cutâneas (pele e tecidos moles) e doenças letais invasivas. Isto se deve aos diversos fatores de virulência que essa cepa produz, como também a sua resistência aos β -lactâmicos (LEE *et al.*, 2018). Além disso, as proteínas de transporte de efluxo de múltiplas drogas dificultam a adoção de medidas terapêuticas e de prevenção de novas infecções (DONG *et al.*, 2018).

Desse modo, *S. aureus* é uma bactéria patogênica de importância progressiva, que está relacionada tanto com sua capacidade de causar diversas infecções, como também ao aumento de casos associados a resistência antibiótica (TONG *et al.*, 2015). Isto tem proporcionado a busca, desenvolvimento e identificação de novos agentes, que possam contribuir com a solução do problema da resistência bacteriana (STRYJEWSKI; COREY, 2014; LEE *et al.*, 2018).

3.4 – INIBIDORES DE BOMBAS DE EFLUXO (IBEs)

Os Inibidores de Bombas de Efluxo (IBEs) na língua inglesa *Efflux Pump Inhibitors (EPIs)*, são definidos como moléculas que inibem as bombas de efluxo por um ou mais mecanismos. Isto poderia contribuir com a eficiência de um antibiótico dentro da célula. Eles podem ser utilizados em associação com as drogas antibióticas potencializando a atividade das mesmas, contra patógenos bacterianos que expressam bombas de efluxo (BHARDWAJ; MOHANTY, 2012; SUMITHRA *et al.*, 2012).

De acordo com seus modos de ação, os IBEs podem ser classificados em duas categorias: dissipadores de energia e os que se ligam diretamente à bomba de efluxo. As bombas de efluxo precisam de uma fonte de energia, como o gradiente de próton ou ATP, o modo de ação por dissociação traria a inibição da função proteica (BHATTACHARYYA *et al.*, 2017). O Cianeto de Carbonila m-Clorofenil-Hidrazona (CCCP) age dessa forma, dissipando a força próton-motriz, alterando o potencial eletroquímico da membrana para o íon H⁺. Depois de se ligar de forma reversiva aos prótons, faz o seu transporte através da membrana provocando a despolarização da mesma, com a interferência no gradiente de concentração eletroquímica ocorre a redução do processo de síntese de ATP (YU *et al.*, 2015; ANOUSHIRAVANI *et al.*, 2016; NI *et al.*, 2016).

Outro mecanismo que resulta na inibição das bombas de efluxo é a ligação dos IBEs às bombas de efluxo funcionais, ocasionando a redução da capacidade das bombas de interagir com seus substratos. Esta ligação pode ser do tipo competitiva, onde a substância inibidora compete com os substratos para o mesmo local de ligação. Pode ocorrer também de forma não competitiva, onde a ligação do IBE à bomba provoca a redução na afinidade da bomba com seus substratos. Porém, as bactérias podem alterar suas bombas de efluxo para modificar os locais alvo destes inibidores (SHARMA; GUPTA; PATHANIA *et al.*, 2019). Os IBEs também podem ser agrupados de acordo com sua origem como: inibidores naturais, sintéticos e drogas reposicionadas (KUMAR *et al.*, 2008).

Diversos inibidores naturais citados em muitas pesquisas são originados de plantas (ROY *et al.*, 2012; SHIU *et al.*, 2013; CHOVANOVÁ *et al.*, 2015). Essa origem traz vantagens como o baixo custo de produção e extração, toxicidade reduzida e alto nível de atividade. São classificados de acordo com a sua composição química como flavonoides, terpenos, chalconas, alcalóides e outros (SEUKEP *et al.*, 2020). Um dos primeiros IBEs advindos de plantas foi o

alcalóide reserpina, extraído da planta *Rauwolfia serpentina* L. Esse composto potencializou o efeito das fluoroquinolonas, contribuindo com a inibição da bomba de efluxo NorA em *S. aureus* (KHAMENEH *et al.*, 2019).

Além dos IBEs naturais, existem os inibidores sintéticos derivados de processos químicos artificiais, como o composto peptidomimético PAβN (fenilalanina-arginina β-naftilamida), que consegue inibir vários sistemas de efluxo, principalmente de bactérias Gram-negativas, como por exemplo a bomba AcrAB-TolC de *E. coli* (VARGIU; NIKAIDO, 2012). Mas o PAβN é bastante tóxico, impossibilitando seu uso clínico (SJUTS *et al.*, 2016).

Alguns inibidores de bombas de efluxo são fármacos reposicionados (SABATINE *et al.*, 2012). Comparado com a busca por novas drogas, o redirecionamento ou reposicionamento de medicamentos possui uma maior possibilidade de produzir compostos biodisponíveis e que ofereçam mais segurança. Eles podem ir diretamente para testes clínicos ou serem usados como indicações para otimização de medicamentos, reduzindo os custos e o tempo gasto nos processos de desenvolvimento (MULLARD, 2012). Pesquisas têm identificado alguns efeitos antibacterianos em diversos medicamentos com aprovação para outros fins, como antifúngicos, anticancerígenos, tratamentos cardiovasculares e antipsicóticos (BONCHI *et al.*, 2014; SAVOIA, 2016; RAMPIONI *et al.*, 2017). Dentre as drogas reposicionada utilizadas como inibidores de bombas de efluxo, pode-se citar o verapamil, usado como anti-hipertensivo que aumentou o efeito do ciprofloxacino contra a cepa de *S. aureus* 1199B (HOLLER *et al.*, 2012). Outro exemplo, é o fármaco com funções analgésica e anti-inflamatória celecoxibe, que inibiu o efluxo de brometo de etídio da cepa SA-1199B portadora da bomba NorA (SABATINE *et al.*, 2012).

3.5 – COMPOSTOS FENÓLICOS

Na busca por tratamentos para diversas enfermidades, substâncias derivadas de plantas vêm sendo utilizadas há muitos anos devido aos seus efeitos benéficos. Muitos compostos isolados demonstram atividade antibacteriana sejam utilizados isoladamente ou em combinação com drogas antibacterianas existentes. Isto pode contribuir bastante na procura por soluções capazes de resolver o problema da resistência bacteriana (KYAW *et al.*, 2012; WOJTYCZKA *et al.*, 2013).

Dentre esses, os compostos fenólicos constituem um grande grupo de metabólitos secundários adivindos de diversas espécies de plantas. Em sua estrutura molecular, estes

compostos possuem um anel aromático que pode conter um ou mais grupos hidroxila, podendo ser uma molécula simples ou polimerizada (ZANG *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2019). São distribuídos em várias categorias como taninos, ligninas, flavonoides, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e cumarinas (HSIAO *et al.*, 2011). Possuem diversas atividades biológicas e farmacológicas como: antioxidante, anticâncer, antibacteriana, cardioprotetoras, anti-inflamatórias entre outras (ANDREU *et al.*, 2018; MENG *et al.*, 2018).

Diversos estudos relatam que compostos fenólicos, como flavonoides e ácidos fenólicos, possuem atividades antimicrobianas contra uma grande diversidade de microorganismos e atuam na sensibilização de estirpes multirresistentes aos antibióticos (CHAN *et al.*, 2011; BORGES *et al.*, 2013; LUÍS *et al.*, 2014). Podem auxiliar na inibição da resistência bacteriana, por serem capazes de prejudicar a sua locomoção, aderência à superfície, constituição de biofilmes e formação de determinantes da virulência (WANG *et al.*, 2014). Esses compostos também podem potencializar os efeitos dos antibióticos através de vários mecanismos, como por meio das propriedades farmacocinéticas ou físico-químicas, que contribuem para o aumento da solubilidade dos fármacos, e atividade multialvo ou seja, cada substância atua em um diferente local na célula bacteriana (DAGLIA 2012; ZACCHINO *et al.*, 2017).

Além de atuarem aumentando a eficácia de alguns antibióticos comumente utilizados, estes metabólitos secundários também podem potencializar o efeito antibacteriano de substâncias da mesma classe, como por exemplo, a quercetina, que foi capaz de potencializar o efeito da luteolina (AMIN *et al.*, 2016).

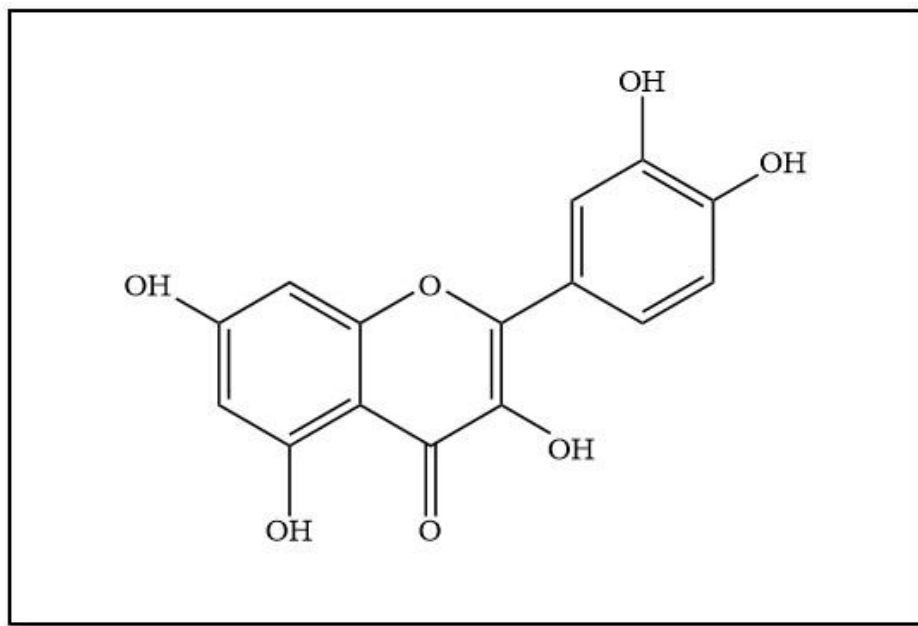
Muitos destes compostos são relatados na literatura por possuírem atividade contra bactérias Gram-positivas, dentre estes podemos citar a luteolina, ácido clorogênico, apigenina e quercetina, que demonstraram efeito antibacteriano contra vinte e nove isolados clínicos de MRSA (SU *et al.*, 2014).

Tratando da atividade antibacteriana por inibição de bombas de efluxo, muitos compostos fenólicos podem ser mencionados. Um derivado do ácido ferúlico em combinação com o ciprofloxacino inibiu a bomba de efluxo NorA e reduziu o crescimento de MRSA (SUNDARAMOORTHY *et al.*, 2018). O flavonoide fisedinitol em associação sinérgica com o Norfloxacino e como brometo de etídio, foi capaz de inibir a bomba de efluxo NorA de *Staphylococcus aureus* (DA SILVA *et al.*, 2020).

3.5.1 Quercetina

O flavonoide quercetina é muito encontrado em cereais e legumes, como também nas folhas de plantas medicinais como *Ginkgo biloba* L. e *Hypericum perforatum* L. (WICZKOWSKI *et al.*, 2008; NABAVI *et al.*, 2012). Sua composição química é representada por 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona, este composto fenólico apresenta diversas propriedades farmacológicas e biológicas, sendo a atividade antioxidante a mais relatada em pesquisas, e que está relacionada com a presença de um grupo hidroxila e ligações duplas (Figura 3). Suas atividades anti-inflamatórias e antioxidante, estão associadas a prevenção e ao tratamento de patologias cardiovasculares e câncer (DHIMAN *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2020). Sua ação antibacteriana já foi mencionada na literatura, atuando na redução da formação de biofilmes, inibindo a expressão gênica relacionada e impedindo o crescimento de bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (QIN *et al.*, 2009; HOSSION *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2018).

Figura 3: Estrutura química da quercetina.



(Fonte: elaborado pela autora usando o programa Chem Draw)

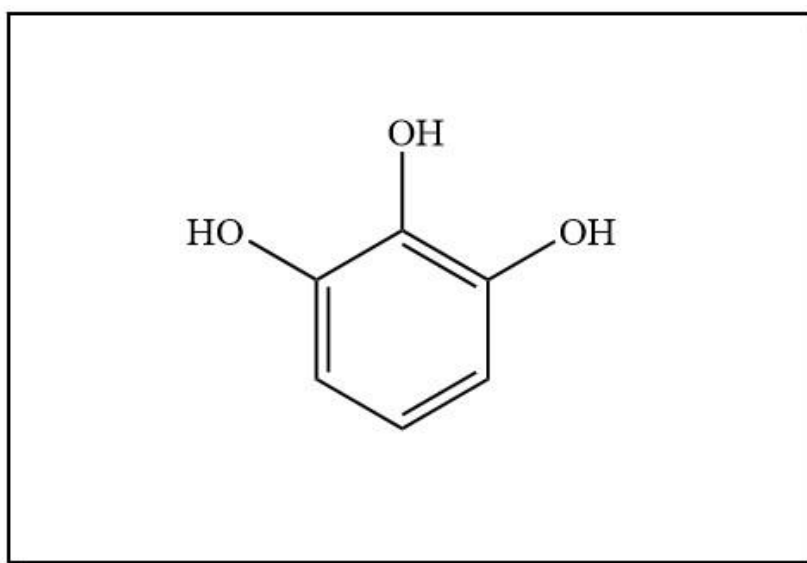
A quercetina pode ter ação antibacteriana direta ou por associação com antibióticos comumente utilizados. No estudo de Abreu e colaboradores (2015), a quercetina reduziu as concentrações inibitórias mínimas dos antibióticos ciprofloxacina, tetraciclina e eritromicina contra algumas cepas de *Staphylococcus aureus*. Já Amin *et al.* (2016) em seu trabalho

desenvolvido com a quercetina evidenciaram a combinação sinérgica deste composto com os antibióticos testados como também com o composto fenólico luteolina, contra cepas de *S. aureus* resistentes a metilina. Os mecanismos de ação antibacteriana da quercetina estão associados a modificação da permeabilidade celular e destruição da parede celular. Também pode prejudicar a expressão e a síntese de proteínas, inibir a síntese do ácido nucleico e diminuir a atividade enzimática (WANG *et al.*, 2018).

3.5.2 Pirogalol

O pirogalol é um polifenol presente em diversas plantas comestíveis, como cacau, nozes, vegetais e cascas de frutas. Sua composição química, consiste em 1,2,3-benzenotriol (Figura 4). Por causa do grupo hidroxila, esse composto consegue formar ligações de hidrogênio e manter interações hidrofóbicas de maneira rápida e robusta. Outra característica importante do pirogalol é a sua forte afinidade com diversos tipos de proteínas (SHIN; PARK; LEE, 2019).

Figura 4: Estrutura química do pirogalol



(Fonte: elaborado pela autora usando o programa Chem Draw)

Esse composto fenólico possui diversas aplicações, como na indústria alimentícia, química, farmacêutica e cosmética (KIM *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2015). Além de ter uma gama de atividades biológicas e farmacêuticas como antibacteriana, antioxidante, anticancerígena e antissépticas (OZTURK SARIKAYA, 2015).

3.6 DOCAGEM MOLECULAR

Quando tratamos da descoberta de novas substâncias capazes de auxiliar no tratamento de enfermidades, a verificação das suas propriedades biológicas e da eficácia do seu efeito são de grande importância. Mas, a compreensão acerca da sua interação com o alvo desejado é bastante necessária (HUGHES *et al.*, 2011). Nesse intuito, a Docagem Molecular, consiste em uma metodologia computacional que simula através de modelagem de homologia a interação entre receptor e ligante, visando obter uma alta afinidade de ligação entre eles (LIU *et al.*, 2018). Com o passar dos anos diversos softwares designados para esta metodologia foram desenvolvidos, dentre eles, os mais utilizados são: o AutoDock, DockThor e AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2010; DE MAGALHÃES *et al.*, 2014).

Essa metodologia permite prever com um ótimo grau de precisão a verificação de acontecimentos moleculares que incluem desde o modo de ligação, liberação energética, local de encaixe a interações de estabilização do complexo ligando-receptor (MENG *et al.*, 2011).

3.7 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR

Os átomos de uma biomolécula estão sempre em movimento, porém, sabe-se que a função molecular e as interações intermoleculares necessitam da dinâmica das moléculas relacionadas. Para compreender tudo isso, faz-se necessário uma metodologia que permitisse verificar essas biomoléculas em ação e observar a forma como respondem (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018). As simulações de Dinâmica Molecular (DM) preveem os movimentos de cada átomo em uma proteína ou em outro sistema molecular, baseando-se em um modelo geral da física que guia interações interatômicas (KARPLUS; Mc CAMMON, 2002).

A DM é uma metodologia ideal e eficiente no estudo dos movimentos físicos dos átomos e moléculas. Esses podem manter interação durante um período fixo, o que demonstra uma visão da evolução dinâmica do sistema. Na maioria das vezes, as trajetórias dos átomos e moléculas podem ser determinadas pela resolução de números das equações de movimento de Newton para um sistema de partículas que interagem (CHEN *et al.*, 2014). As energias potenciais são

submetidas à cálculos utilizando métodos relacionados a mecânica molecular com diferenciação nos campos de força. Geralmente, os campos de força mais utilizados nas áreas de biologia e química são embasados na mecânica molecular e apresentam um tratamento mecânico considerado clássico das interações partícula/partícula que podem reproduzir as alterações de estrutura e conformação (SANTINI; DERREUMAUX, 2004). Quando tratamos da metodologia de experimentação, a simulação de Dinâmica Molecular, não tem como função somente mostrar a alternância estrutural sobre as modificações de ambiente (mutações de resíduos, pH e temperatura), mas pode demonstrar o processo dinâmico de desdobraimento e agregação de proteínas (CAMPOS *et al.*, 2010).

Frequentemente, as simulações DM têm sido utilizadas para auxiliar na identificação do mecanismo de ação das moléculas de drogas, locais potenciais de ligação de drogas em proteínas-alvo, cálculos da energia livre de ligação entre proteínas-alvo e moléculas de drogas (HOU *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2018). Esse método pode auxiliar de diversas formas na realização de pesquisas científicas, pelo fato de poder sondar propriedades moleculares que são difíceis de acessar apenas por experimentos laboratoriais (CHEVALIER *et al.*, 2017). Podemos citar como exemplo a descoberta de novos fármacos (BORHANI; SHAW, 2012).

A DM possibilita que os pesquisadores façam triagens virtuais em bibliotecas químicas, investigando os mecanismos de ação dos possíveis candidatos a drogas, reduzindo a quantidade de substâncias que seriam testadas em experimentos, contribuindo para a redução de custos e principalmente, avaliando a eficácia dessas moléculas no efeito analisado (FORLI *et al.*, 2016; ROSALES *et al.*, 2019; SCHENEIDER; CLARK, 2019).

4. 1 CAPÍTULO 2 – ARTIGO 1: AUMENTO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA POR MEIO DA QUERCETINA CONTRA BOMBAS DE EFLUXO DE *Staphylococcus aureus*.

Journal of Bioenergetics and Biomembranes (2021) 53:157–167.

<https://doi.org/10.1007/s10863-021-09886-4>

Fator de impacto: 2.945 (2022)

Qualis: B2 (Ciências Biológicas II)

Situação: Publicado

SPRINGER NATURE

Thank you for your order!

Dear Dr. Joycy Santos,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.

Order Summary

Licensee: URCA
Order Date: Aug 3, 2022
Order Number: 5361340941554
Publication: Journal of Bioenergetics and Biomembranes
Title: Enhancement of the antibiotic activity by quercetin against Staphylococcus aureus efflux pumps
Type of Use: Thesis/Dissertation
Order Ref: 1
Order Total: 0.00 USD

View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

Tel: +1-855-230-3415 / +1-978-646-2777
customercare@copyright.com
<https://myaccount.copyright.com>



4. 2 CAPÍTULO 3 - ARTIGO 2: ATIVIDADE INIBITÓRIA INDIRETA DO PIROGALOL
CONTRA A BOMBA DE EFLUXO Tet(K) POR UM EFEITO DE MEMBRANA:
ABORDAGEM *in vitro* E *in silico*.

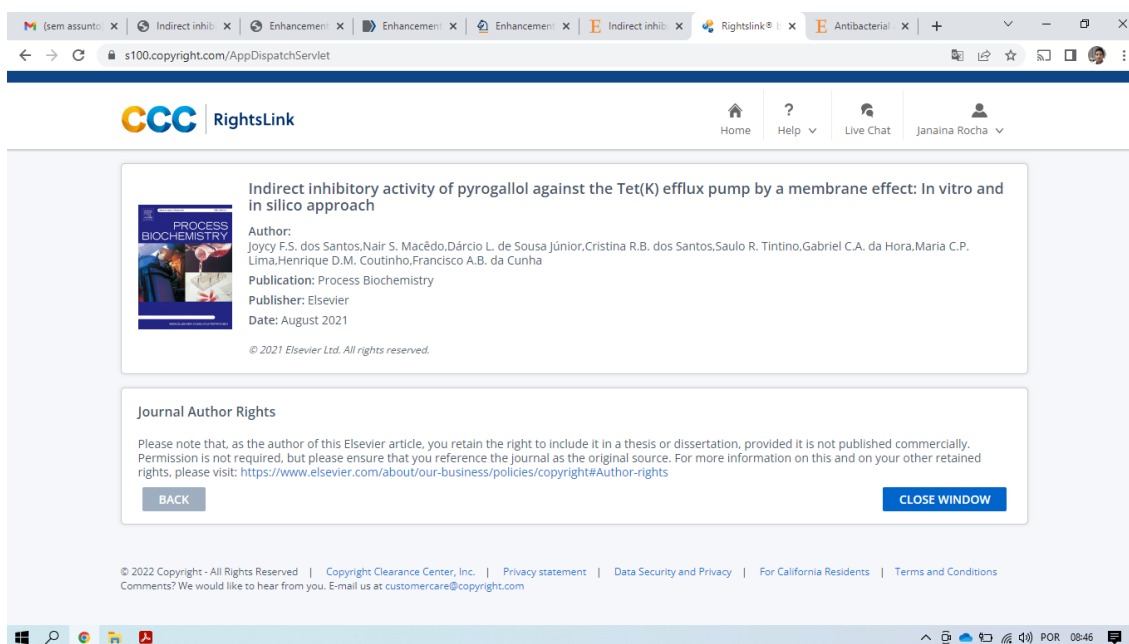
Process Biochemistry (2021) 107: 138-144.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.05.019>

Fator de impacto: 4.885 (2022)

Qualis: B1 (Ciências Biológicas II)

Situação: Publicado



The screenshot shows a web browser window with multiple tabs. The active tab is titled "Rightslink®" and displays a RightsLink window for an article. The article title is "Indirect inhibitory activity of pyrogallol against the Tet(K) efflux pump by a membrane effect: In vitro and in silico approach". The author list includes Joycy F.S. dos Santos, Nair S. Macêdo, Dárcio L. de Sousa Júnior, Cristina R.B. dos Santos, Saulo R. Tintino, Gabriel C.A. da Hora, Maria C.P. Lima, Henrique D.M. Coutinho, and Francisco A.B. da Cunha. The publication is "Process Biochemistry", published by Elsevier in August 2021. Below the article information, there is a section titled "Journal Author Rights" with a disclaimer and a link to the Elsevier copyright policy. At the bottom of the window, there are "BACK" and "CLOSE WINDOW" buttons. The browser's address bar shows "s100.copyright.com/AppDispatchServlet".

Indirect inhibitory activity of pyrogallol against the Tet(K) efflux pump by a membrane effect: In vitro and in silico approach

Author:
Joycy F.S. dos Santos, Nair S. Macêdo, Dárcio L. de Sousa Júnior, Cristina R.B. dos Santos, Saulo R. Tintino, Gabriel C.A. da Hora, Maria C.P. Lima, Henrique D.M. Coutinho, Francisco A.B. da Cunha

Publication: Process Biochemistry
Publisher: Elsevier
Date: August 2021

© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK CLOSE WINDOW

© 2022 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Data Security and Privacy | For California Residents | Terms and Conditions
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customer-care@copyright.com

ARTIGO 1 - AUMENTO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA POR MEIO DA QUERCETINA CONTRA BOMBAS DE EFLUXO DE *Staphylococcus aureus*.

Joycy F. S. dos Santos¹, Saulo R. Tintino², Ana R. P. da Silva², Cristina R. dos S. Barbosa¹, Jackelyne R. Scherf¹, Zildene de S. Silveira¹, Thiago S. de Freitas², Luiz J. de Lacerda Neto¹, Luiz M. Barros¹, Irwin Rose de A. Menezes³, Henrique D.M. Coutinho^{2,4}, José P. Siqueira-Júnior⁵ & Francisco A.B. Cunha¹

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito inibitório da quercetina sobre as bombas de efluxo de *S. aureus*. O CIM da quercetina foi avaliado através do método de microdiluição em caldo, assim como o ensaio de inibição da bomba de efluxo através do método de redução da concentração inibitória mínima dos antibióticos, assim como o do brometo de etídio. A abordagem *in silico* através da bioinformática foi realizada para demonstrar a interação do mecanismo molecular do substrato e da cavidade de ligação. A concentração Inibitória Mínima da quercetina não foi clinicamente relevante. Com relação à inversão do efeito de resistência bacteriana pela inibição da bomba de efluxo, este efeito foi observado com as cepas portadoras das bombas TetK e NorA. Com relação à interação entre o complexo quercetina e a bomba NorA, a estabilidade extra foi proporcionada pelas ligações de hidrogênio produzidas pelo grupo hidroxila.

Palavras-chave: Compostos fenólicos. Drogas antibacterianas. Efluxo ativo.

1. INTRODUÇÃO

As infecções causadas por *Staphylococcus aureus* têm aumentado em de forma preocupante, causando várias mortes por ano (Klevens et al. 2007). É importante ressaltar que a espécie humana é seu principal reservatório, sendo encontrado principalmente nas cavidades nasais, pele, intestinos e garganta (Carvalho et al. 2005). Este micro-organismo está diretamente relacionado à patogênese na comunidade e ambientes hospitalares devido a sua alta capacidade de colonizar seu hospedeiro, expressar seus principais fatores de virulência e sua predisposição para mostrar resistência a drogas (Woodfor e Livermore 2009).

Os mediadores ou transportadores do efluxo podem ser classificados em cinco famílias: Superfamília da Divisão de Resistência-Nodulação-Células (RND), Superfamília Facilitadora

(MFS), Pequena Família de Resistência Multi-Droga (SMR), Superfamília Adenosina Trifosfato (ATP) Cassetes Ligantes (ABC) e a Família de Proteína de Extrusão Multi-Amicrobiana (MATE) (Pao et al. 1998; Van Veen e Konings 1998; Brown et al. 1999). Dentro da família MFS, podemos encontrar a bomba de efluxo NorA, envolvida no efluxo de vários compostos e medicamentos, tais como quinolonas e fluoroquinolonas, entre outros (Yoshida et al. 1990; Kaatz et al. 1993; Neyfakh et al. 1993). Outro exemplo desta família corresponde à bomba TetK, responsável pela redução da concentração intracelular de Tetraciclina (Butaye et al. 2003; Pidcock 2006). Em relação a ABC, uma das bombas que compõem esta família é a MrsA que usa ATP para remover substratos (Kumar e Schweizer 2005).

A redução da resistência bacteriana pela inibição da bomba de efluxo é um mecanismo bem estudado. Várias substâncias têm demonstrado que inibem o crescimento bacteriano ao inibir proteínas de efluxo (Bhardwaj e Mohanty 2012). No entanto, muitas dessas substâncias têm alta toxicidade para o organismo hospedeiro ou não atendem aos requisitos necessários para serem considerados inibidores ideais de acordo com o estudo apontado por Bambeke et al. (2006). Com isto em mente, substâncias extraídas de plantas tais como os compostos fenólicos, têm sido relatados como excelentes alternativas na inversão dos mecanismos de defesa bacteriana (Gomes et al. 2011; Wang et al. 2014).

Os compostos fenólicos são mencionados como um dos grupos mais diversificados de metabólitos secundários de plantas sendo encontrados em frutas, chá verde, legumes, nozes, sementes, caules e flores (Ksouri et al. 2008; Scalbert e Williamson 2000). Eles têm uma variedade de propriedades biológicas, tais como antioxidantes, anti-inflamatórios, antialérgicos, anti-cancerígenos, antitrombóticos, antiviral e antimicrobiano (Ahmed 2010; Guo et al. 2009). Entre os compostos fenólicos estão os flavonoides, que são considerados como os polifenóis mais comumente encontrados na dieta humana (Scalbert e Williamson 2000). Muitos deles agem como potencializadores de alguns antibióticos, inibindo mecanismos de resistência aos medicamentos, como o efluxo ativo de drogas (Abreu et al. 2013; Musumeci et al. 2003).

Uma das estratégias para o estudo da inibição da bomba de efluxo é o uso de bioinformática e modelagem molecular. Abordagens *in silico* podem contribuir efetivamente para a compreensão das pessoas sobre o mecanismo molecular de interação do substrato/cavidade de ligação. Entretanto, em simulações computacionais de proteínas, os problemas correspondem aos segmentos helicoidais flexíveis, locais de ligação de vários ligantes ou ligação de mais de um ligante de cada vez (Sharma et al. 2010). A bomba de efluxo NorA é um membro proteico do principal grupo da superfamília facilitadora, e sua estrutura de cristal ainda não foi resolvida. Entretanto, a previsão de segmentos transmembrana da sequência

de NorA foi feita pela previsão baseada na homologia usando a bomba transportadora de glicerol-3-fosfato (código pbd 1 PW4) (Kalia et al. 2012), transdutor EmrD multidrogas (código pdb 2GFP) (Sharma et al. 2010; Thai et al. 2015), transdutor YajR (código pdb 3 WDO) (Lowrence et al. 2016) ou transportador de proteína permeável à lactose (1PV7 código pdb) (Zhang et al. 2014).

Pesquisas recentes mostram o avanço na busca de substâncias que podem contribuir para a reversão da resistência bacteriana. Sieniawska et al. (2017), evidenciaram a inibição do mecanismo de resistência à *Mycobacterium tuberculosis* aumentando a atividade antimicrobiana de drogas tuberculostáticas, por terpenos naturais como S-limonene, mircene, R-limonene e sabinene. Salaheen et al. (2017) mostraram em seu estudo que a combinação de cinco ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido para-cumárico e ácido protocatecúrico) inibiram o crescimento das cepas de MRSA. Além desses compostos, muitos flavonoides são mencionados em pesquisas devido a sua ação antimicrobiana (Lima et al. 2016).

A quercetina está entre os flavonoides mais comumente encontrados em plantas e tem uma variedade de propriedades farmacológicas, incluindo seu efeito protetor contra o estresse oxidativo, que é diretamente relacionado à sua atividade antioxidante (Boots et al. 2008; Saito et al. 2004). Há estudos que relatam o efeito sinérgico deste composto com antibióticos contra cepas de *S. aureus* RN4220 e 1199B com bombas de efluxo (Abreu et al. 2015). O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade da quercetina na reversão da resistência de *S. aureus* pela inibição das bombas de efluxo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Ensaio microbiológicos

Substâncias

O composto quercetina, resazurina (7-hidroxi-3Hfenoxazina) 3-um 10-óxido), brometo de etídio (EtBr) e os antibióticos eritromicina, tetraciclina e norfloxacina foram obtidos da SIGMA Chemical Co., St. Louis, EUA. O DMSO (dimetilsulfóxido) foi adquirido de Produtos Labsynth para laboratórios Ltda (Diadema, São Paulo, BRASIL).

Cepas bacterianas

Foram utilizadas as seguintes linhagens de *S. aureus*: RN4220 possuindo o plasmídeo pUL5054 (bomba de efluxo MsrA); IS-58, dotado com o plasmídeo PT181 portador do gene da proteína efluxo TetK, resistente a tetraciclina; SA1199B resistente à tensão de fluoroquinolonas hidrofílicas via proteína de efluxo NorA e a cepa selvagem SA1199. As linhagens foram doadas pelo Professor S. Gibbons (Universidade de Londres). Todas as linhagens foram inicialmente mantidas em ágar sangue para confirmar seus respectivos tipos (Laboratórios Difco Ltda., Brasil) e depois transferidas e mantidas em dois estoques, um em Agar de Infusão Cardíaca (HIA, Difco) a 4 °C e outra em glicerol a -80 °C.

Preparação de substâncias

Os antibióticos foram utilizados especificamente para as bombas de cada cepa: Eritromicina para a bomba MsrA contida em a linhagem RN4220; Tetraciclina para a bomba TetK contida na linhagem IS-58; e Norfloxacin para a bomba NorA contida na cepa 1199B e para a cepa do tipo selvagem. Todos os antibióticos, quercetina e EtBr, foram preparados de acordo com as diretrizes do CLSI (2012).

As substâncias foram submetidas a um processo de diluição usando 10 mg/mL de DMSO e posteriormente diluído em água reduzindo sua concentração para 1024 µg/mL, o EtBr foi diluído em água somente.

Preparação e padronização de inóculos

Para todos os ensaios, os inóculos foram preparados a partir dos estoques usando o método padrão determinado pelo CLSI (2012). Os micro-organismos foram cultivados novamente em ágar de infusão de coração e mantida a 37 °C por 24 h. A partir deste meio sólido, o inóculo foi feito utilizando tubos de ensaio contendo solução salina estéril de acordo com a escala Mcfarland 0,5 correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC (Unidade de Formação de Colônias).

Ensaio de concentração inibitória mínima (CIM)

Para o ensaio de concentração inibitória mínima com quercetina, brometo de etídio e antibióticos, o método utilizado foi proposto pelo CLSI (2012) com adaptações. O meio de

distribuição foi preparado em eppendorfs® usando 100 µL do inóculo em 900 µL do meio de cultura líquido BHI. O conteúdo eppendorf® foi então transferido para um poço de 96 poços placa de microdiluição, horizontalmente. 100 µL foram utilizados em cada poço, perfazendo 10 poços. Após esta etapa, a microdiluição das substâncias foi realizada onde a microdiluição em série de 100 µL de cada uma foi feita até a penúltimo poço (1:1). O último poço corresponde ao controle de crescimento. Em concentrações que variam de 512 µg/mL para 1,0 µg/mL. Após 24 h, as placas foram lidas por mudança de cor por visualização do meio, caracterizado pela adição de 20 µL de Resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-uma 10- óxido). A leitura tem como característica a mudança da cor do meio, de azul para vermelho, indicando a presença de bactérias em crescimento e a permanência em azul da ausência de crescimento, como é descrito pelas diretrizes do CLSI (2012). Todas as experiências foram realizadas em triplicatas.

Ensaio de inibição da bomba efluxo por redução do CIM de brometo de etídio

A verificação da redução do efeito CIM do EtBr foi realizada em triplicatas pelo método utilizado por Tintino et al. 2016. Como passo inicial, o meio de distribuição de teste e controle foram preparados em eppendorfs®. No ensaio 150 µL do inóculo mais a substância em uma concentração subinibitória (CIM/8) foram colocados em um eppendorf® e o volume foi preenchido com meio líquido até o volume de 1,5 mL. O controle tem a mesma quantidade de inóculo que os testes e 1350 µL do meio. Estas foram então transferidas para placas de microdiluição de 96 poços, com uma distribuição vertical, pela adição de 100 µL do conteúdo de eppendorf® em cada poço. Depois desta etapa, a microdiluição do EtBr foi realizada com 100 µL adicionado neste meio até a penúltima cavidade (1:1). Na última cavidade, nenhuma das substâncias em avaliação foram adicionados, servindo como um controle de crescimento. Concentrações variaram de 1024 µg/mL a 0,5 µg/mL. Após 24 h, as placas foram lidas pela visualização da mudança de cor do meio, caracterizado pela adição de 20 µL de Resazurina (7-hidroxi- 3H-phenoxazine-3-one 10-oxide). A leitura tem como característica mudança de cor do meio, de azul para vermelho, indicando a presença de crescimento bacteriano e a permanência em azul a ausência de crescimento. A redução do CIM do brometo de etídio ou de um antibiótico específico em cepas portadoras de efluxo bombas é uma indicação de inibição da bomba de efluxo.

Ensaio de inibição da bomba de efluxo por redução da CIM do antibiótico

A verificação da redução do CIM antibiótico foi determinada pela metodologia utilizada por Tintino et al. 2016. Os inoculantes foram utilizados a partir de placas incubadas em um forno durante 24 h a 37 °C. Após esse período, os inóculos foram usados em solução salina de acordo com Mcfarland 0,5 correspondente para $1,5 \times 10^8$ UFC. Como passo inicial, o meio de teste e controle foram preparados em eppendorfs®. No teste, 150 µL do inóculo, mais a substância em uma concentração subinibitória (CIM/8) e o volume de eppendorfs® foram completados para o volume de 1,5 mL. Para o controle, o mesmo inóculo o volume do teste foi colocado em um eppendorf® e o volume foi preenchido a 1,5 mL. Foram então transferidos para placas de microdiluição, com distribuição vertical, caracterizadas através da adição de 100 µL do conteúdo eppendorf® em cada poço. Após esta etapa, a microdiluição do antibiótico foi realizada com 100 µL sendo adicionado a este meio até a penúltima cavidade (1:1). A última cavidade não recebeu o mesmo tratamento que foi usado como controle de crescimento. As concentrações variavam de 1024 µg/mL a 0,5 µg/mL. A solução antibiótica utilizada foi preparada, e para cada estirpe foi preparado um antibiótico específico para cada bomba de efluxo. Após 24 h as placas foram lidas por visualização de mudança de cor do meio caracterizado pela adição de 20 µL de Resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-um-um 10-óxido), como anteriormente mencionado no teste com brometo de etídio. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. A redução da CIM do brometo etídio ou de um antibiótico específico em cepas portadoras de bombas de efluxo é uma indicação da inibição desta bomba.

Análise estatística dos resultados microbiológicos

Os resultados foram preparados em triplicata e apresentados como a média geométrica. Os dados foram submetidos a análise através do programa estatístico GraphPad Prism 6.0. Uma ANOVA bidirecional foi realizada utilizando a média geométrica das triplicatas como os dados centrais \pm desvio padrão da média. Posteriormente, foi realizado o teste pós-hoc de Bonferroni (onde $p < 0,05$ é considerado significativo e $p > 0,05$ não significativo).

Ensaio de *in silico* com a bomba de efluxo NorA

Previsão da estrutura NorA 3D e identificação de potenciais locais de ligação

Neste estudo, a sequência proteica para NorA e todas as outras proteínas similares (PDB ID: 1PV4, 1PV7, 3WDO, 2GFP) foram obtidas no formato FASTA através dos recursos do NCBI. A identidade da sequência de todas as proteínas e a sequência NorA foi de 6,89 %, 5,87 %, 14,80 % e 3,47 % de identidade, respectivamente. A previsão dos segmentos transmembrana da sequência NorA foi obtida usando MODELLER 9,17v (Webb e Sali, 2014) encontrados no servidor ModWeb (<https://modbase.compbio.ucsf.edu/modweb/>) usando a estrutura cristalográfica do YajR.

Como modelo, o transportador de *Escherichia coli* [PDB ID: 3WDO] foi utilizado. A estrutura de forma final foi reconhecida usando o programa PROCHECK (Laskowski et al. 1993) em Ramachandran Plot. A estrutura proteica NorA modelada por homologia de solvente implícita no programa Quimera usando AMBER 8 (Pettersen et al. 2004) campo de força ff99. A topografia estrutural dos bolsos e cavidades pode ser promovida pelo servidor CASTP (<http://cast.engr.uic.edu>) com um valor padrão de 1,4 Angstroms do raio da sonda. Para obter uma melhor compreensão da base molecular das afinidades de ligação da NorA, foram utilizados inibidores potenciais NorA através da identificação dos principais resíduos responsáveis pelas interações de ligação (Dundas et al. 2006). Compostos com boas pontuações de acoplamento foram vistos como compostos afetados pela atividade inibitória da NorA.

Estudos de acoplamento de receptores NorA em sua estrutura 3D prevista

Para os cálculos da docagem, foi utilizado o DockingServer (Bikadi e Hazai 2009). As cargas parciais de Gasteiger foram adicionadas aos átomos de ligante. Os átomos de hidrogênio não-polares foram misturados e os vínculos rotativos foram definidos. Foram feitos cálculos sobre o modelo de proteína com conteúdo de quercetina. Com a ajuda das ferramentas AutoDock, os átomos essenciais de hidrogênio, as cargas do tipo átomo Kollman e a solvatação parâmetros foram adicionados (Morris et al. 1998). A grade de mapas de afinidade de pontos de 0,5 Å e espaçamento de 0,375 Å foram gerados usando o programa Autogrid (Morris et al. 1998). No cálculo de Van der Waals e nos termos eletrostáticos, foram utilizadas as funções de set-parameter e dielétrico dependente da distância da AutoDock, respectivamente. As simulações de acoplamento foram realizadas utilizando o algoritmo genético Lamarckiano (LGA) e o método de busca local Solis e Wets (1981). A definição da posição inicial, orientação

e torções das moléculas de ligante foram aleatórias. Durante a acoplagem, todas as torções rotativas foram liberadas. Cada experiência de acoplamento foi derivada de 10 corridas diferentes que foram definidas para terminar após um máximo de 250.000 classificações de potência. O tamanho da população foi ajustado para 150. Durante o estudo, um passo translacional de 0,2 Å e passos de torção de 5 foram aplicados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio microbiológicos

O presente estudo indicou que as cepas apresentaram resultados clinicamente irrelevantes com os ensaios CIM, exceto para a cepa 1 que obteve uma CIM de 512 µg/mL (Tabela 1). Em relação à reversão da resistência bacteriana por inibição da bomba de efluxo, uma redução do CIM foi observada na associação da quercetina com antibióticos em todos estirpes (Fig. 1). A associação sinérgica entre os antibióticos tetraciclina, eritromicina e norfloxacino e quercetina podem ser identificados através da redução os valores de CIM: cepa 1 (de 1024 a 128 µg/mL), cepa 2 (de 645,08 a 512 µg/mL), cepa 3 (256 a 128 µg/mL) e cepa 4 (32 a 5,03 µg/mL).

Tabela 1: Valores da concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL. Testes realizados com cepas de *Staphylococcus aureus*. CEPA 1 (IS-58/bomba TetK), CEPA 2 (RN-422/bomba MsrA), CEPA 3 (bomba SA-1199B/NorA) e CEPA 4 (selvagem).

Substância	Bactérias Testadas			
	CEPA 1	CEPA 2	CEPA 3	CEPA 4
Quercetina	512	≥1024	≥1024	≥1024

Houve também uma redução no CIM no ensaio de brometo de etídio com algumas cepas com resistência, através da inibição da bomba efluxo somente nas cepas IS-58 portadora da bomba TetK e SA-1199B que contém a bomba NorA (Fig. 2). A concentração de brometo de etídio na linhagem 1 da bomba TetK foi reduzida de 16 para 2,51 µg/mL, enquanto na linhagem 3 contendo a bomba NorA foi reduzida de 64 para 12,69 µg/mL. Com a estirpe 2, não houve inibição da bomba, considerando que o efeito sinérgico observado ocorreu somente com o antibiótico.

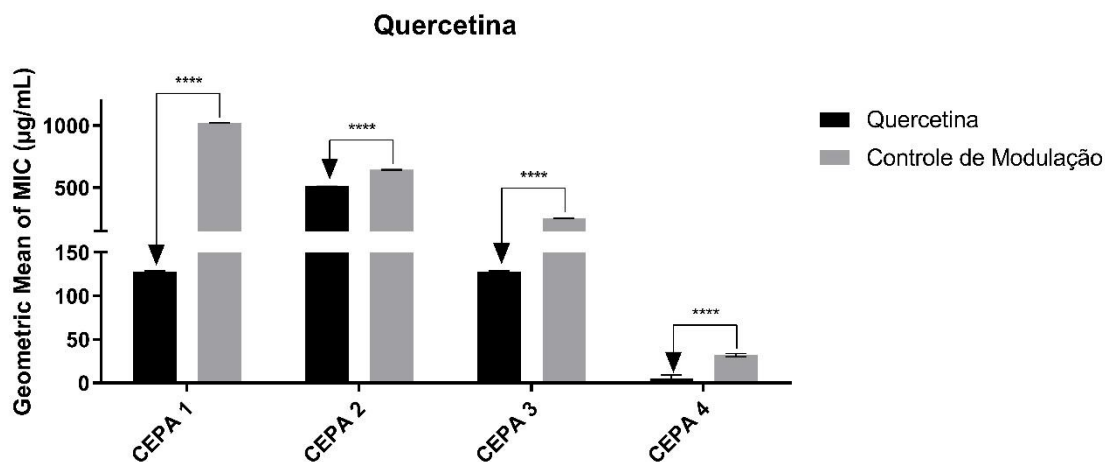


Figura 1: Efeito da inibição da bomba de efluxo pela redução do CIM de antibiótico por quercetina em cepas de *S. aureus* portadoras de bombas de efluxo. CEPA 1 (bomba IS-58/bomba TetK) antibiótico tetraciclina, CEPA 2 (RN-4220/bomba MsrA) antibiótico eritromicina, CEPA 3 (SA-1199B/bomba NorA) antibiótico norfloxacino e CEPA 4 (selvagem) antibiótico norfloxacino. Controle de modulação (quercetina + antibiótico). Valores de redução CIM: CEPA 1 (de 1024 a 128 µg/mL), CEPA 2 (de 645,08 a 512 µg/mL), CEPA 3 (256 a 128 µg/mL) e CEPA 4 (32 a 5,03 µg/mL).

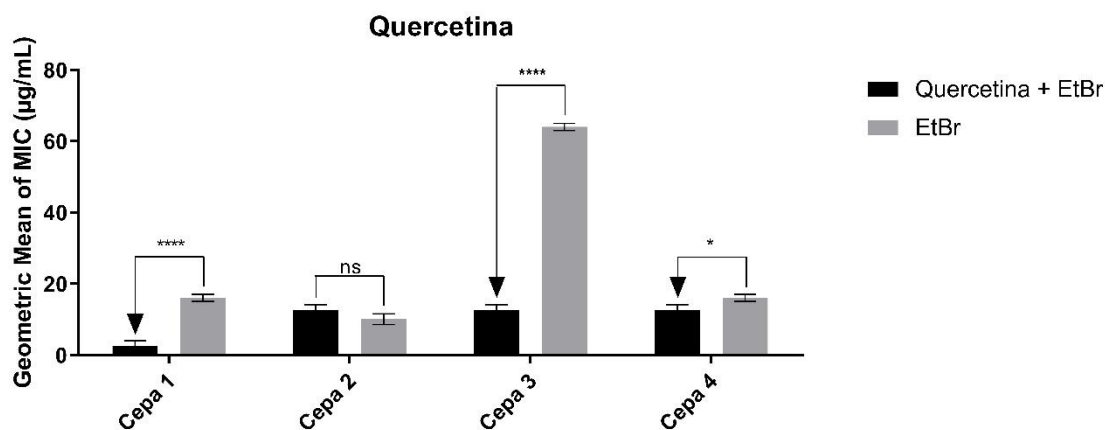


Figura 2: Efeito modulador da quercetina sobre a atividade do Brometo de etídio (EtBr), contra linhagens de *S. aureus* que apresentam bombas de efluxo como um mecanismo de resistência. O número de asteriscos expressa o significado da associação entre quercetina + EtBR quando em comparação com o controle. (****) significa $p < 0,0001$. CEPA 1 (IS-58/bomba TetK), CEPA 2 (RN-4220/bomba MsrA), CEPA 3 (SA-1199B/bomba NorA) e CEPA 4 (selvagem). Valores de redução CIM: CEPA 1 (de 16 a 2,51 µg/mL), CEPA 2 (não significativo de 10,06 a 12,69 µg/mL), CEPA 3 (de 64 a 12,69 µg/mL) e CEPA 4 (de 16 a 12,69 µg/mL).

O uso de brometo de etídio (BrEt) para verificar a inibição de bombas efluxo já é amplamente utilizada (Viveiros et al. 2008). O BrEt é capaz de intercalar-se com o DNA

bacteriano e, como consequência, causa a morte celular. Para reverter esta situação, as proteínas de efluxo são ativadas para expulsar BrEt do interior da célula, uma ação semelhante ocorre com os antibióticos (Banerjee et al. 2014). Substâncias capazes de inibir as bombas de efluxo promovem a permanência do brometo de etídio, antibióticos e outros compostos tóxicos dentro da célula.

Consequentemente, a sobrevivência da bactéria sob estas condições são reduzidas (Patel et al. 2010). Quando se refere à inibição dos sistemas de efluxo causados por produtos naturais ou metabólitos secundários isolados destes, há vários estudos que indicam este efeito causado por extratos ou óleos essenciais, assim como por metabólitos secundários, tais como: taninos, flavonoides, terpenos e outros (Stavri et al. 2007; Prasch e Franz 2015; Miladi et al. 2016; Tintino et al. 2016).

Com relação aos compostos fenólicos, vários estudos anteriores mostraram sua interação com as proteínas de efluxo (Gomes et al. 2011; Maia et al. 2011). Wang et al. (2014) demonstraram em seu trabalho, a ação inibitória do composto genisteína sobre o teste de efluxo de brometo de etídio contra a cepa SA-1199B. No estudo realizado por Smith et al. (2007), o ferruginol inibiu as bombas NorA, TetK e MsrA, potenciando a atividade da norfloxacina, reduzindo a CIM tetraciclina em quatro vezes e aumentando a ação da eritromicina. Tintino et al., (2016) verificou a ação do ácido tânico sobre a proteína de efluxo NorA na linhagem 1199B, através da mesma metodologia utilizada no presente estudo. O mesmo autor mostrou que a inibição deste efluxo ocorreu tanto em associação com o antibiótico e com a EtBr com as cepas IS58 e RN-4220, Gomes et al. (2011) verificaram uma redução de duas vezes do CIM com ambos quando associada à 7,4'-Di-O-methylisoscutelearein, este fato caracterizou a inibição das bombas de efluxo MsrA e TetK, respectivamente.

Os compostos fenólicos já demonstraram mecanismos de interação com bombas de efluxo. Segundo pesquisas de Rothstein et al. (1993), compostos fenólicos como o ácido tânico podem formar complexos com o ferro e impedir sua ação quando necessário, ou seja, causar um empobrecimento do ferro no meio. Sabe-se que o ferro é um co-fator essencial para a funcionalidade de algumas bombas de efluxo, por exemplo, NorA precisa dele para sua expressão, portanto este fato pode justificar uma boa parte da ação dos compostos fenólicos sobre as proteínas de efluxo (Deng et al. 2012). Em outro estudo relativo à bomba TetK, Chan et al. (2013) mostra que a interferência na produção de ATP é provavelmente um mecanismo de ação de flavonoides para este tipo de bomba. Como avaliado no mesmo estudo, o flavonóide diosmetina interferiu na função da bomba TetK dependente de ATP e contribuiu para a ação sinérgica da eritromicina contra a cepa *S. aureus* RN-4220. Farooq et al. (2014) evidenciaram

a capacidade da artonina I de inibir o crescimento de *S. aureus* MDR em combinação com diferentes classes de antibióticos, bem como seu efeito na reversão da resistência através da despolarização da membrana bacteriana e bloqueio de drogas efluxantes.

Em relação ao flavonoide quercetina, apesar de ter um CIM de ≤ 1024 $\mu\text{g/mL}$ para as cepas RN-4220, SA-1199B e 1199 não ser clinicamente relevante, este resultado é promissor no desenvolvimento de um inibidor de bomba de efluxo. Como salientado por Bhardwaj et al., (2012), um inibidor ideal da proteína de efluxo deve estar livre de qualquer atividade antibacteriana. Recentemente, Diniz-Silva et al. (2016) apontaram em suas pesquisas a associação da quercetina com as mesmas cepas analisadas neste estudo, onde os resultados mostraram a inibição da bomba de efluxo, com exceção da cepa com a bomba de efluxo NorA, tanto na associação do brometo como do antibiótico. Este resultado difere dos resultados observados no presente estudo, que, como mencionado anteriormente, inibiu a bomba NorA com a quercetina. Diferente do trabalho citado, a concentração utilizada em associação com o antibiótico e com o brometo foi CIM $\frac{1}{4}$, o que pode justificar os diferentes resultados.

A quercetina é um composto hidrofóbico com $\log P = 1,82 \pm 0,32$ (Rothwell et al. 2005). No entanto, tem um baixo perfil hidrofóbico. Portanto, sua probabilidade de interação com a membrana é menor quando comparada a outros flavonoides (Rothwell et al. 2005). Ao analisar a estrutura química da quercetina, pode ser verificado que também é provável que interage diretamente com os sítios de proteína efluxo, o que pode explicar sua ação com maior clareza (Ohene-Agyei et al. 2014). As bombas de efluxo são proteínas transmembranas anfipáticas, que podem interagir com moléculas que têm uma estrutura química de tamanho compatível com sua estrutura, como a quercetina (Bolla 2014).

Das bombas de efluxo discutidas neste trabalho, a única que apresenta estrutura cristalizada com possível montagem tridimensional é a bomba de efluxo NorA (Zhang et al. 2014). Como pode ser visto neste estudo, a proteína NorA apresenta dois locais de interação com outras moléculas (Fig. 4). Com relação à quercetina, foi observado no estudo que, na análise *in silico*, houve interação de seu grupo hidroxila, através da formação de uma ligação de hidrogênio com o oxigênio da cadeia lateral SER138 da proteína NorA. Esta interação pode inibir a absorção de moléculas tóxicas internas à bactéria, tais como brometo de etídio e antibióticos, corroborando com os resultados obtidos na análise *in vitro*. No estudo de Ohene-Agyei et al. (2014), o acoplamento da quercetina na análise *in silico* mostrou sua capacidade de interagir com a proteína bacteriana Gram-negativa AcrB. Este tipo de interação ocorreu com os aminoácidos prolina e fenilalanina através de ligações de hidrogênio.

Ensaio *in silico*: Identificação de bolsas potenciais obrigatórias de NorA

Alinhamento de sequências múltiplas utilizou o programa CLUSTALW. Cada dupla de proteínas (PDB ID: 1PV4, 1PV7, 3WDO, 2GFP) foi alinhada com base na homologia da proteína de *E. coli*. Uma sequência com a estrutura definida, formando alinhamentos usando informações homólogas disponíveis com estruturas 3D, banco de dados de sequências de busca e previsão de estruturas secundárias (Tabela 2, Fig. 3). Com base nos resultados de Marklevitz e Harris (2016), juntamente com os alinhamentos de sequências múltiplas e árvores filogenéticas, a identificação homóloga, caracterização físico-química, enumeração transmembrana e identificação de domínios similares foram apresentados neste trabalho.

Tabela 2: Descrições das interações entre quercetina e NorA * [distância de interação].

Interações do tipo de ligação			
Hidrofóbica	cation- π	Outros tipos	Outros tipos
C9 (Q) LEU269 [3,76] ⁻ (CD2)	H3 (Q) TYR345 (CB, [3,25] ⁻ CD1, CD2, CE1, CG)	O4 (Q) ALA261 [3,44] ⁻ (CB)	O3 (Q) LEU325 [3,23] ⁻ (CD1)
C11 (Q) LEU269 [3,60] ⁻ (CD2)	H1 (Q) PHE406 [3,76] ⁻ (CE1)	O5 (Q) LEU269 [3,17] ⁻ (CD1, CD2)	H2 (Q) LEU335 [3,12] ⁻ (CB)
C14 (Q) VAL286 [3,27] ⁻ (CG1)	$\pi - \pi$	H2 (Q) LEU269 [3,06] ⁻ (CD2)	O1 (Q) ALA339 [3,44] ⁻ (CB)
C12 (Q) VAL286 [3,16] ⁻ (CG1, CG2)	C8 (Q) TYR282 [3,25] ⁻ (CD2, CE2)	O5 (Q) TYR282 [3,33] ⁻ (CD2, CE2)	O2 (Q) ILE341 [3,88] ⁻ (CG2)
C7 (Q) LEU325 [3,86] ⁻ (CD1)	C9 (Q) TYR282 [3,85] ⁻ (CE2)	O1 (Q) PHE283 [3,23] ⁻ (CD1, CE1)	
C2 (Q) ALA339 [3,46] ⁻ (CB)	C2 (Q) PHE283 [3,35] ⁻ (CE1)	O7 (Q) TYR287 [3,52] ⁻ (CB)	
C8 (Q) ALA339 [3,26] ⁻ (CB)	C3 (Q) PHE283 [3,68] ⁻ (CE1)	O7 (Q) ILE290 [3,85] ⁻ (CG2)	
Ligações de hidrogênio	C8 (Q) PHE283 [3,69] ⁻ (CE1)	H1 (Q) LEU325 [2,55] ⁻ (CD1, CG)	
O1 (Q) SER138 [2,40] ⁻ (O1)	-	O4 (Q) LEU325 [3,66] ⁻ (CD1)	

A identificação da sequência NorA e da sequência modelo do transportador *E. coli* YajR [PDB ID: 3WDO] foi de 14,8 %. Como não há disponibilidade de local na bomba NorA para ligação exata de substratos e inibidores, foi realizada uma análise do mapa do local, onde dois

locais principais de ligação (local 1 e local 2) foram observados na bomba NorA (Fig. 4). O local 1 é cercado por muitos laços transmembrana e está localizado mais profundamente na Bomba de Efluentes, enquanto o local 2 é bastante aberto e está localizado na superfície.

Porque a estrutura de cristal de NorA não está disponível, no entanto, em outros estudos, como Zhang et al., (2014), esta proteína foi prevista com base na modelagem de homologia. Este trabalho foi expresso na estrutura tridimensional de NorA constituída *in silico*, e mostrou que as estabilizações do complexo proteína/ligante são mostrados em anexo a cavidade central da proteína, resultados equivalentes a aqueles apresentados neste estudo.

A abordagem *in silico* foi utilizada para avaliar a capacidade da quercetina de interagir com NorA e para explicar sua atividade biológica no ensaio *in vitro*. A estrutura tridimensional do complexo NorA/quercetina expressou a orientação do ligante dentro do local de ligação (como mostrado na Fig. 4), o que permite que sua cadeia alifática se estenda até a fenda hidrofóbica. O grupo hidroxila da quercetina também conseguiu produzir uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio da cadeia lateral SER138 (Fig. 5) e ajuda com a estabilidade extra ao complexo quercetina/NorA. Estes resultados sugerem que as interações hidrofóbicas e π - π contribuem para a estabilização da quercetina na ligação local com boa afinidade na pontuação de ancoragem de -6,37 kcal/mol.

Em outras pesquisas, o envelope molecular circundante provou que as interações H-bond, fenda hidrofóbica, π - π proporcionam estabilidade ao complexo com diferentes ligandos. Zhang et al., (2014) em Studing ginsenoside20 (S) -Rh2 mostraram interações entre Gln51/ASN340/SER226 e π - π interações entre TYR257/PHE140 colaboram com a estabilidade do complexo Rh2/NorA. Kalia et al., (2012), demonstram que a ligação H entre Arg98 e o grupo hidroxila do grupo aryl de capsaicina pode atribuir estabilidade complementar ao complexo capsaicina/NorA. Estes autores permitem que a cadeia alifática se estenda até a fenda hidrofóbica envolvendo resíduos Pro24, Phe140, Ile244, Gly248 e Phe303, o que permite fortes interações hidrofóbicas devido à proximidade da capsaicina. Um estudo adicional com a bomba de efluxo multi-droga da *Mycobacterium tuberculosis*, Sharma et al., (2010), onde a estrutura tridimensional (3D) do Rv1258c também foi prevista utilizando a abordagem *in silico*, demonstra a interação da piperina com o Rv1258c, revelando que a piperina está envolvida na interação de ligação H (2,06 Å) com Arg141 para produzir um complexo proteína-ligante e o anel heterocíclico His343 está favoravelmente orientado para interagir com uma interação π - π .

Consensus	1	11	21	31	301	311	321	331
Conservation								
RMSD: ca								
RMSD: full								
NoRA_modeler_12_08_16.pdb	1				121			
1pv7_A.pdb, chain A	1				128			
1pw4.pdb, chain A	1				148			
2gfp_A.pdb, chain A	1				117			
3wdo.pdb, chain A	1				127			
Consensus	51	61	71	81	351	361	371	381
Conservation								
RMSD: ca								
RMSD: full								
NoRA_modeler_12_08_16.pdb	9				140			
1pv7_A.pdb, chain A	6				162			
1pw4.pdb, chain A	35				168			
2gfp_A.pdb, chain A	6				133			
3wdo.pdb, chain A	17				146			
Consensus	101	111	121	131	401	411	421	431
Conservation								
RMSD: ca								
RMSD: full								
NoRA_modeler_12_08_16.pdb	31				155			
1pv7_A.pdb, chain A	27				177			
1pw4.pdb, chain A	56				184			
2gfp_A.pdb, chain A	28				148			
3wdo.pdb, chain A	39				161			
Consensus	151	161	171	181	451	461	471	481
Conservation								
RMSD: ca								
RMSD: full								
NoRA_modeler_12_08_16.pdb	51				180			
1pv7_A.pdb, chain A	53				209			
1pw4.pdb, chain A	75				170			
2gfp_A.pdb, chain A	48				187			
3wdo.pdb, chain A	59							
Consensus	201	211	221	231	501	511	521	531
Conservation								
RMSD: ca								
RMSD: full								
NoRA_modeler_12_08_16.pdb	80				201			
1pv7_A.pdb, chain A	82				222			
1pw4.pdb, chain A	104				185			
2gfp_A.pdb, chain A	75				208			
3wdo.pdb, chain A	88							
Consensus	251	261	271	281	551	561	571	581
Conservation								
RMSD: ca								
RMSD: full								
NoRA_modeler_12_08_16.pdb	102				212			
1pv7_A.pdb, chain A	99				230			
1pw4.pdb, chain A	130				246			
2gfp_A.pdb, chain A	100				193			
3wdo.pdb, chain A	110				219			
Consensus	601	611	621	631	901	911	921	931
Conservation								
RMSD: ca								
RMSD: full								
NoRA_modeler_12_08_16.pdb	218				344			
1pv7_A.pdb, chain A	239				366			
1pw4.pdb, chain A	272				396			
2gfp_A.pdb, chain A	220				272			
3wdo.pdb, chain A	225				352			
Consensus	651	661	671	681	951	961	971	981
Conservation								
RMSD: ca								
RMSD: full								
NoRA_modeler_12_08_16.pdb	218				346			
1pv7_A.pdb, chain A	239				367			
1pw4.pdb, chain A	299				421			
2gfp_A.pdb, chain A	251				297			
3wdo.pdb, chain A	225				354			
Consensus	701	711	721	731	1001	1011	1021	1031
Conservation								
RMSD: ca								
RMSD: full								
NoRA_modeler_12_08_16.pdb	245				346			
1pv7_A.pdb, chain A	265				367			
1pw4.pdb, chain A	299				421			
2gfp_A.pdb, chain A	272				297			
3wdo.pdb, chain A	252				354			
Consensus	751	761	771	781	1051	1061	1071	1081
Conservation								
RMSD: ca								
RMSD: full								
NoRA_modeler_12_08_16.pdb	275				376			
1pv7_A.pdb, chain A	295				390			
1pw4.pdb, chain A	348				434			
2gfp_A.pdb, chain A	272				367			
3wdo.pdb, chain A	282				378			
Consensus	801	811	821	831	1101	1111	1121	1131
Conservation								
RMSD: ca								
RMSD: full								
NoRA_modeler_12_08_16.pdb	303				392			
1pv7_A.pdb, chain A	322				417			
1pw4.pdb, chain A	348				438			
2gfp_A.pdb, chain A	272				375			
3wdo.pdb, chain A	311				404			
Consensus	851	861	871	881	1151	1161	1171	1181
Conservation								
RMSD: ca								
RMSD: full								
NoRA_modeler_12_08_16.pdb	322				392			
1pv7_A.pdb, chain A	347				417			
1pw4.pdb, chain A	370				438			
2gfp_A.pdb, chain A	272				375			
3wdo.pdb, chain A	330				463			

Figura 3: A sequência NorA mostrando hélices regularmente intercaladas por lops (na estrutura modelada e hélices transmembranas previstas pela TMPred são representadas como conjuntos acima dos resíduos. Consensus_aa, sequência consensual de aminoácidos; Consensus_ss, estruturas secundárias previstas por consenso; H, estrutura alfa hélice secundária predita por consenso. Fonte: CLUSTALW base de dados de sequências e previsão.

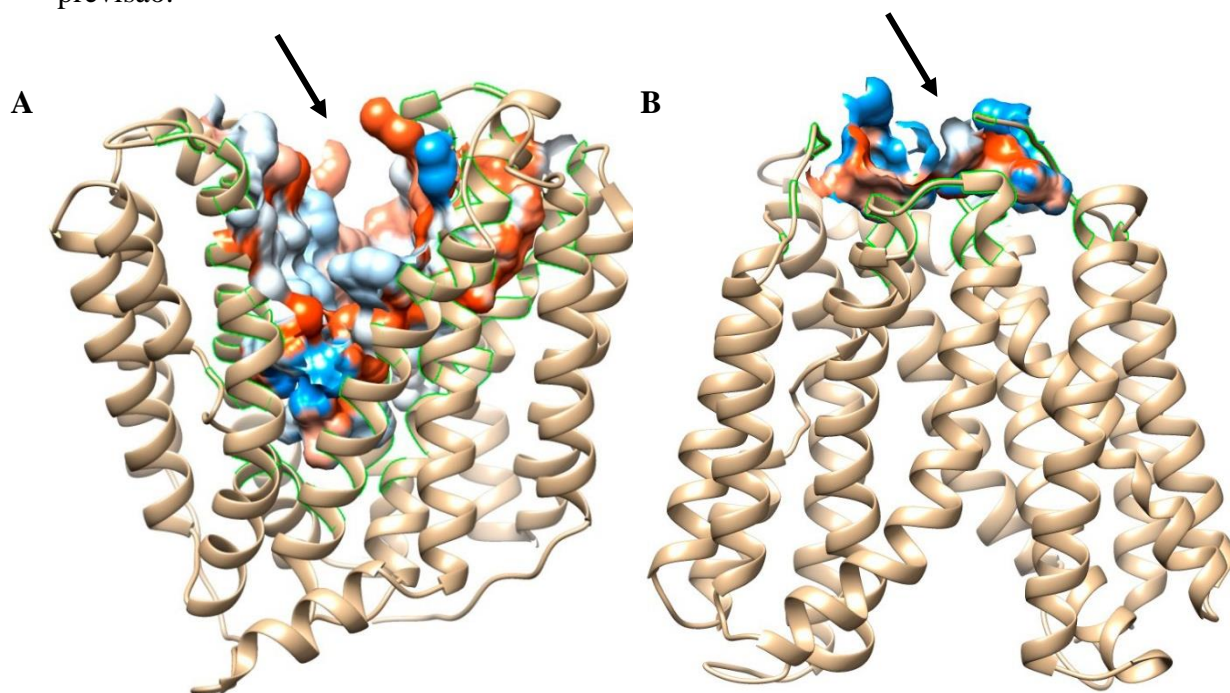


Figura 4: Prováveis locais de ligação de proteínas NorA modelados pela CASTp (os locais de ligação são indicados por setas). **A** O local de ligação NorA 1 (**A**) está na cavidade central voltada para o lado citoplasmático da membrana com 2371,3 bolso MS área. **B** O local de ligação 2 (**B**) com 534,3 bolso MS área. Fonte: Autor.

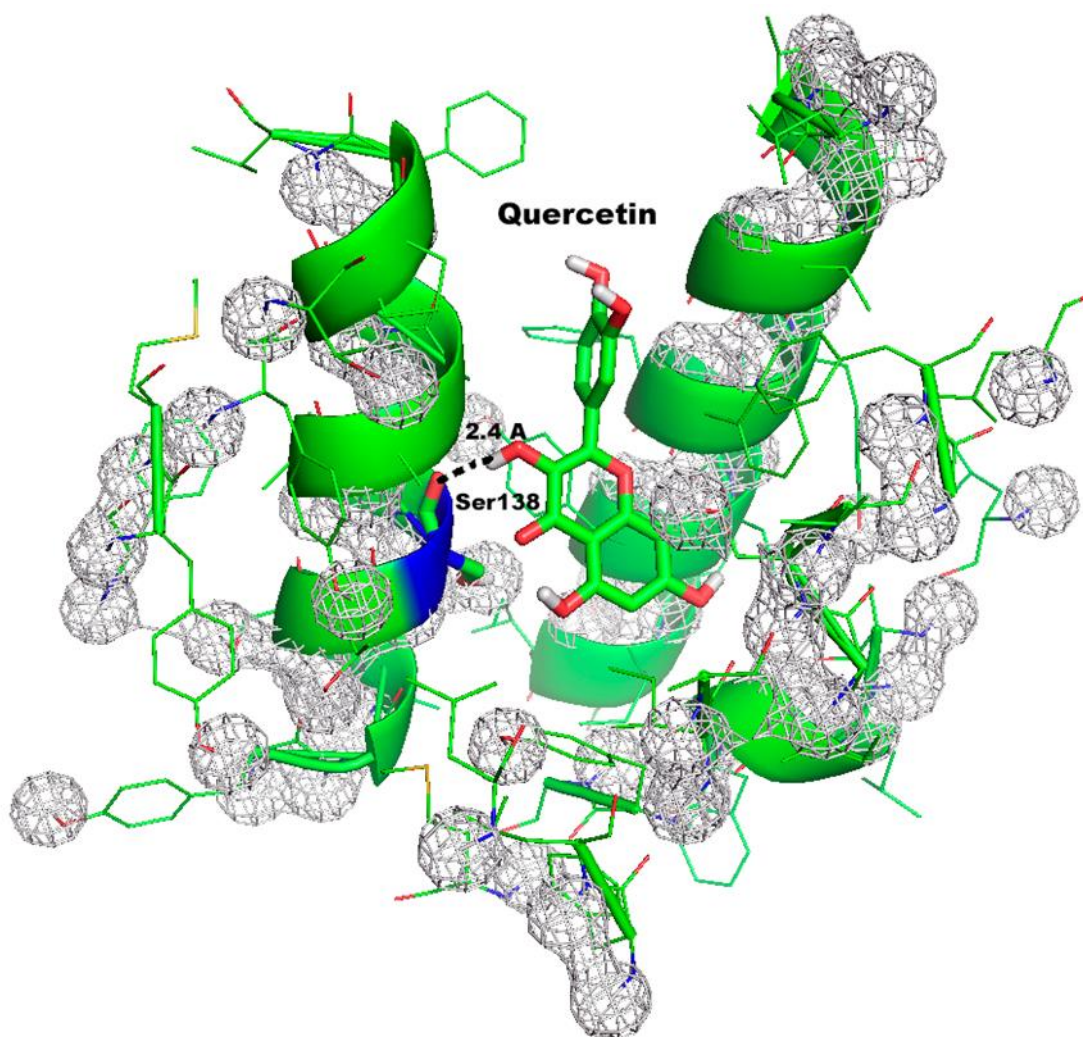


Figura 5: Interação quercetina em sítio de ligação de NorA. A formação de ligação de hidrogênio entre quercetina e Ser138 fornece estabilidade à proteína/complexo de ligação.

4. CONCLUSÃO

Os compostos fenólicos têm várias propriedades biológicas, entre elas a atividade antibacteriana. A quercetina mostrou atividade direta somente com a cepa 1, mas mostrou efeito sinérgico com todos os antibióticos testados. Na associação desta substância com brometo de etídio, houve uma redução dos CIMs nas cepas com a bomba TetK (de 16 a 2,51 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e NorA (de 64 a 12,69 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o que mostra a inibição destes mecanismos. Foi verificado na abordagem *in silico* que a interação da quercetina no sítio de ligação NorA ocorre através do desenvolvimento de uma ligação de hidrogênio entre a quercetina e SER 138 permitindo a estabilidade da proteína/complexo de ligação.

REFERÊNCIAS:

- Abreu AC, Borges A, Simões LC, Saavedra MJ, Simões M (2013) Antibacterial activity of phenyl isothiocyanate on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Med Chem* 9:756–761.
- Abreu AC, Serra SC, Borges A, Saavedra MJ, McBain AJ, Salgado AJ, Simões M (2015) Combinatorial activity of flavonoids with antibiotics against drug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb Drug Resist* 21:600–609.
- Ahmed S (2010) Green tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate in arthritis: progress and promise. *Arthritis Res Ther* 12:208–216.
- Bambeke F, Pagès JM, Lee VJ (2006) Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Recent Pat Anti-Infect Drug Discov* 1:157–175.
- Banerjee A, Majumder P, Sanyal S, Singh J, Jana K, Das C, Dasgupta D (2014) The DNA intercalators ethidium bromide and propidium iodide also bind to core histones. *FEBS Open Bio* 4:251–259.
- Bhardwaj KA, Mohanty P (2012) Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: rejuvenating the antimicrobial chemotherapy. *Recent Patents Anti-infective Drug Discovery* 7:73–89.
- Bikadi Z, Hazai E (2009) Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock. *J Cheminform* 1:1–16.
- Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Micro* 13: 42–51.
- Bolla, J. R., 2014. Bacterial multidrug efflux pumps: Structure, function, and regulation. Doctoral dissertation, Iowa State University, [http:// lib.dr.iastate.edu/etd](http://lib.dr.iastate.edu/etd)
- Boots AW, Haenen GR, Bast A (2008) Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol* 585:325–337.
- BrownMH, Paulsen IT, Skurray RA (1999) The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Mol Microbiol* 31:393–395.
- Butaye P, Cloeckaert A, Schwarz S (2003) Mobile genes coding for efflux - mediated antimicrobial resistance in gram-positive and gram negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 22:205–210.
- Carvalho CE, Berezin EN, Pistelli IP, Mímica L, Cardoso MRA (2005) Sequential microbiological monitoring of tracheal secretion in intubated patients admitted to a pediatric intensive care unit (in portuguese). *J Pediatr* 81:29–33.
- Chan BC, Ip M, Gong H, Lui SL, See RH, Jolivalt C, Fung KP, Leung PC, ReinerNE, Lau CB (2013) Synergistic effects of diosmetin with erythromycin against ABC transporter over-expressed methicillinresistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) RN4220/pUL5054 and inhibition of MRSA pyruvate kinase. *Phytomedicine* 20:611–614.

CLSI (2012) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standard, 9th edn. Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI document M07-A9, Wayne.

Deng X, Sun F, Ji Q, Liang H, Missiakas D, Lan L, He C (2012) Expression of multidrug resistance efflux pump gene *NorA* is iron responsive in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 194:1753–1762.

Diniz-Silva, H. T., Magnani, M., Siqueira, S., Souza, E. L., Siqueira- Júnior, J. P., 2016. Fruit flavonoids as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that overexpresses *NorA*. *LWT-Food Science and Technology*.

Dundas J, Ouyang Z, Tseng J, Binkowski A, Turpaz Y, Liang J (2006) CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Res* 34:116–118.

Farooq S, Wahab A-T, Fozing CD, Rahman AU, Choudhary MI (2014) Artonin I inhibits multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* and potentiates the action of inactive antibiotics *in vitro*. *J Appl Microbiol* 117:996–1011.

Gomes RA, Ramirez RRA, Maciel JKS, Maria de Fátima Agra MF, Souza MFV, Falcão-Silva VS, Siqueira-Junior JP (2011) Phenolic compounds from *Sidastrum micranthum* (a. st.-hil.) Fryxell and evaluation of Acacetin and 7,4'-di-*o*-methylisoscuteellarein as Modulator of bacterial drug Resistance. *Quim. Nova* 34:1385–1388.

Guo W, Kong E, Meydani M (2009) Dietary polyphenols, inflammation, and cancer. *Nutr Cancer* 61:807–810.

Kaatz GW, Seo SM, Ruble CA (1993) Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 37:1086–1094.

Kalia NP, Mahajan P, Mehra R, Nargotra A, Sharma JP, Koul S, Khan IA (2012) Capsaicin, a novel inhibitor of the *NorA* efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 67:2401–2408.

Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Fridkin SK (2007).

Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA* 298:1763–1771.

Ksouri R, Megdiche W, Falleh H (2008) Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of *Tunisian halophytes*. *C R Biol* 331:865–873.

Kumar A, Schweizer HP (2005) Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Ver* 57:1486–1513.

Laskowski MW, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 26:283–291.

Lima VN, Oliveira-Tintino CDM, Santos ES, Morais LP, Tintino SR, Freitas TS, Geraldo YS, Pereira RL, Cruz RP, Menezes IR, Coutinho HD (2016) Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. *Microb Pathog* 99:56–61.

Lowrence RC, Raman T, Makala HV, Ulaganathan V, Subramaniapillai SG, Kuppuswamy AA, Mani A, Neelakantan CS, Nagarajan S (2016) Dithiazole thione derivative as competitive NorA efflux pump inhibitor to curtail multi drug resistant clinical isolate of MRSA in a zebrafish infection model. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:9265–9281.

Maia GLA, Falcão-Silva VS, Aquino PGV, Maia GLA, Falcão-Silva VS, Aquino PGV, Araújo-Júnior JX, Tavares JF, Silva MS, Rodrigues LC, Siqueira-Júnior JP, Barbosa-Filho JM (2011) Flavonoids from *Praxelis clematidea* R.M. King and Robinson modulate bacterial drug resistance. *Molecules* 16:4828–4835.

Marklevitz J, Harris LK (2016) Prediction driven functional annotation of hypothetical proteins in the major facilitator superfamily of *S. aureus* NCTC 8325. *Bioinformatics* 12:254–262.

Miladi H, Zmantar T, Chaabouni Y, Fedhila K, Bakhrouf A, Mahdouani K, Chaieb K (2016) Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens. *Microb Pathog* 99:95–100.

Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem* 19:1639–1662.

Musumeci R, Speciale A, Costanzo R, Annino A, Ragusa S, Rapisarda A, Pappalardo MS, Iauk L (2003) *Berberis aetnensis* C. Presl extracts: antimicrobial properties and interaction with ciprofloxacin. *Int J Antimicrob Agents* 22:48–53.

Neyfakh AA, Borsch CM, Kaatz GM (1993) Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrob Agents Chemother* 37:128–129.

Ohene-Agyei T, Rumana Mowla R, Rahman T, Henrietta Venter H (2014) Phytochemicals increase the antibacterial activity of antibiotics by acting on a drug efflux pump. *Microbiology Open* 3:885–896.

Pao SS, Paulsen IT, Saier MH Jr (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1–34.

Patel D, Kosmidis C, Seo SM, Kaatz GW (2010) Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 5070–5073.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF chimera- a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25:1605–1612.

Pidcock LJV (2006) Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacterial. *Clin. Microbiol Rev* 19:382–402.

- Prasch S, Franz B (2015) Plant derived inhibitors of bacterial efflux pumps: an update. *Phytochem Rev* 14:961–974.
- Rothstein DM, McGlynn M, Bernan V, McGahren J, Zaccardi N, Cekleniak K, Bertrand P (1993) Detection of tetracyclines and efflux pump inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother* 37:1624–1629.
- Rothwell JA, Day AJ, Morgan MR (2005) Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. *J Agric Food Chem* 53:4355–4360.
- Saidijam M, Benedetti G, Ren Q, Xu Z, Hoyle CJ, Palmer SL, Ward A, Bettaney KE, Szakonyi G, Meuller J, Morrison S, Pos MK, Butaye P, Walravens K, Langton K, Herbert RB, Skurray RA, Paulsen IT, O'reilly J, Rutherford NG, Brown MH, Bill RM, Henderson PJ (2006) Microbial drug efflux proteins of the major facilitator superfamily. *Curr Drug Targets* 7:793–811.
- Saito A, Sugisawa A, Umegaki K, Sunagawa H (2004) Protective effects of quercetin and its metabolites on H₂O₂-induced chromosomal damage to WIL2-NS cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:271–276
- Salaheen S, Peng M, Joo J, Teramoto H, Biswas D (2017) Eradication and sensitization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* to methicillin with bioactive extracts of berry Pomace. *Front Microbiol* 8:253.
- Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130:2073–2085.
- Sharma S, Kumar M, Sharma S, Nargotra A, Koul S, Khan IA (2010) Piperine as an inhibitor of Rv1258c, a putative multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 65:1694–1701.
- Sieniawska E, Swatko-Ossor M, Sawicki R, Skalicka-Woźniak K, Ginalska G (2017) Natural Terpenes influence the activity of antibiotics against isolated *Mycobacterium tuberculosis*. *Med Princ Pract* 26:108–112.
- Smith ECJ, Williamson EM, Wareham N, Kaatz GW, Gibbons S. (2007) Antibacterials and modulators of bacterial resistance from the immature cones of *Chamaecyparis lawsoniana*. *Phytochemistry* 68:210–217.
- Solis FJ, Wets RJ-B (1981) Minimization by random search technique. *Math Oper Res* 6:19–30.
- Stavri M, Piddock LJ, Gibbons S (2007) Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J Antimicrob Chemother* 59:1247–1260.
- Thai KM, Ngo TD, Phan TV, Tran TD, Nguyen NV, Nguyen TH, Le MT (2015) Virtual screening for novel *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors from natural products. *Med Chem (Los Angeles)* 11:135–155.
- Tintino SR, Oliveira-Tintino CDM, Fabia F, Campina FF, Silva RL, Costa MS, Menezes IR, Calixto-Júnior JT, Siqueira-Junior JP, Coutinho HD, Leal-Balbino TC, Balbino VQ (2016) Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog* 97:9–13.

- Van Veen HW, Konings WN (1998) The ABC family of multidrug transporters in microorganisms, *Biochim. Biophys Acta* 1365:31–36.
- Viveiros M, Martins A, Paixão L, Rodrigues L, Martins M, Couto I, Fähnrich E, Kern WV, Amaral L (2008) Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. *Int J Antimicrob Agents* 31:458–462.
- Wang SY, Sun ZL, Liu T, Zhang WJ, Qing M (2014) Flavonoids from *Sophora moorcroftiana* and their synergistic antibacterial effects on MRSA. *Phytother Res* 28:1071–1076.
- Webb B, Sali A (2014) Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Bioinformatics* 8:1–32.
- Woodfor N, Livermore DM (2009) Infections caused by gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *J Inf Secur* 59:4–16.
- Yin Y, He X, Szewczyk P, Nguyen T, Chang G (2006) Structure of the multidrug transporter EmrD from *Escherichia coli*. *Science* 312: 741–744.
- Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S, Ubukata K, Konno M (1990) Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* NorA gene, which confers resistance to quinolones. *J Bacteriol* 172:6942–6949.
- Zhang J, Sun Y, Wang Y, Meng L, He J, Liu J, Chen Q, Zhang X, Zhou F, Wang G, Sun X (2014) Non-antibiotic agent ginsenoside 20 (S)- Rh2 enhanced the antibacterial effects of ciprofloxacin in vitro and in vivo as a potential NorA inhibitor. *Eur J Pharmacol* 740:277–284.

ARTIGO 2 - ATIVIDADE INIBITÓRIA INDIRETA DO PIROGALOL CONTRA A BOMBA DE EFLUXO Tet(K) POR UM EFEITO DE MEMBRANA: ABORDAGEM *in vitro* E *in silico*.

Joycy F. S. dos Santos¹, Nair S. Macêdo², Dárcio L. de Sousa Júnior³, Cristina R. B. dos Santos⁴, Saulo R. Tintino⁵, Gabriel C. A. da Hora⁶, Maria C. P. Lima⁷, Henrique D. M. Coutinho⁸, Francisco A. B. da Cunha⁹

Resumo

Diversas atividades farmacológicas e biológicas de compostos fenólicos foram relatadas na literatura. Alguns compostos fenólicos têm propriedades antibacterianas, isoladamente ou em combinação com antibióticos atualmente utilizados. Com um número crescente de casos de infecções bacterianas causadas por bactérias resistentes, a busca por tratamentos mais eficazes tornou-se crucial. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade do pirogalol de reverter a resistência bacteriana através da inibição da bomba de efluxo, bem como validar seu mecanismo de interação usando a dinâmica computacional. Para determinar a Concentração Mínima Inibitória (CIM) do pirogalol, foram realizados testes de microdiluição em caldo. A redução da CIM da tetraciclina e do brometo de etídio confirma a inibição da bomba de efluxo. O pirogalol mostrou atividade direta contra *Staphylococcus aureus*; entretanto, o efeito sinérgico foi observado apenas com o antibiótico testado, reduzindo sua concentração de 128 µg/mL para 45,25 µg/mL, mas este efeito não foi associado com a inibição da bomba de efluxo. De acordo com a dinâmica molecular, este composto interage com a superfície da membrana bacteriana. Entretanto, são necessárias mais pesquisas para identificar mecanismos potenciais de interação com os antibióticos existentes.

Palavras-chave: Resistência bacteriana; Brometo de etídio; Sinérgismo; Bomba Tet(K).

1. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos medicamentos tem sido uma barreira importante no tratamento de infecções bacterianas, pois contribui para o aumento da dose de antibióticos necessária para conter a infecção e a necessidade de tratamentos adicionais, além de prolongar a permanência hospitalar [1]. A resistência bacteriana a medicamentos está associada a várias estratégias bacterianas, incluindo modificação do alvo do medicamento, inativação ou degradação do medicamento, redução da permeabilidade celular e diminuição da concentração intracelular, assim como efluxo ativo [2]. Estes mecanismos de resistência a drogas podem ser

encontrados tanto em bactérias Gam-negativas quanto em bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* [3-4].

Os estafilococos colonizam o corpo humano, o que aumenta o risco de infecções nosocomiais em pacientes hospitalizados e imunocomprometidos [5]. *S. aureus* é um patógeno Gram-positivo que causa uma variedade de doenças tais como infecções de pele, pneumonia, endocardite e síndrome do choque tóxico [6-8]. Sua resistência a múltiplas drogas está associada à capacidade deste micro-organismo de apresentar mecanismos de resistência tanto intrínsecos como adquiridos [9].

As bombas efluxo, que expulsam substâncias tóxicas do meio intracelular e são encontradas em *S. aureus*, representam um dos mecanismos de resistência bacteriana. [10]. Este mecanismo de resistência em cocos Gram-positivos pode exibir amplas e variadas especificidades de substrato, expulsando diversas substâncias como antibióticos, biocidas monovalentes e divalentes, corantes intercalares, sais de amônio quaternário, diamidinas, biguanidinas e metabólitos secundários de plantas [11].

Vários estudos se concentraram em compostos fenólicos ou polifenólicos na busca de substâncias capazes de resolver o problema de resistência bacteriana [12-13]. Este é um grande grupo de compostos de metabolismo secundário derivados de várias espécies vegetais. Estes compostos têm um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila em sua estrutura molecular, e podem ser moléculas simples ou polimerizadas [14-15]. Entre outras coisas, eles têm propriedades antioxidantes, anticancerígenas, antibacterianas, cardioprotetoras e antiinflamatórias [16-17].

O composto fenólico pirogalol (ácido pirogalico, ou 1,2,3-trihidroxibenzeno) tem diversas aplicações nas indústrias alimentícia e agrícola, cosmética e farmacêutica [18] e pode ser encontrado em uma variedade de frutas, incluindo mangas (*Mangifera indica*) [19]. O pirogalol já demonstrou ter atividade antimicrobiana através da inibição enzimática de substâncias oxidantes [20]. Além disso, este composto demonstrou anteriormente atividade antibacteriana contra *S. aureus* [21].

Vários estudos relatam a ação inibitória dos compostos fenólicos nas bombas de efluxo [12-13]. Diniz-Silva et al. [22] relataram um efeito sinérgico da associação do ácido tânico com Norfloxacino, assim como a inibição da bomba de efluxo NorA. Dos Santos et al. [23] em seu estudo, demonstraram a reversão da resistência bacteriana ao inibir as bombas *S. aureus* MrsA e Tet(K) usando ácido cafeico, bem como a bomba de efluxo NorA usando ácido gálico. Pal e Tripathi [24] em seu estudo, demonstraram uma significativa inibição da bomba de efluxo AcrB em bactérias Gram-negativas resistentes a carbapenêmicos por quercetina.

Este estudo procurou avaliar a capacidade do pirogalol de inibir a bomba de efluxo de *S. aureus*, e investigar as interações de hidrofobicidade deste composto fenólico com o modelo de membrana externa bacteriana usando simulação de dinâmica molecular.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Ensaios microbiológicos

2.1.1 Substâncias

As seguintes substâncias foram adquiridas da Sigma-Aldrich Co. Ltd. (San Luis, Missouri, EUA): o antibiótico, Cianeto de Carbonila m-Clorofenil-Hidrazona - CCCP, brometo de etídio (BrEt) e pirogalol. A Clorpromazina (CPMZ) foi adquirida da Aché (Guarulhos, São Paulo, Brasil).

Meios de cultura utilizados: *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco, Detroit, Michigan, EUA) e *Brain Heart Infusion* (BHI, KASVI - Produtos e Equipamentos de Laboratório, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) foram usados como meios de cultura e foram preparados na concentração a 10 %.

2.1.2 Estirpes utilizadas

A seguinte estirpe de *S. aureus* foi utilizada para realizar este estudo: IS-58, dotada do plasmídeo PT181 portador do gene da proteína de efluxo Tet(K) resistente a tetraciclina. A cepa utilizada foi fornecida pelo Professor S. Gibbons (Universidade de Londres). A linhagem IS-58 foi acondicionada em ágar sangue para confirmar seu tipo (Laboratórios Difco, Detroit, Michigan, EUA), e depois transferida e preservada em dois estoques, um em glicerol a -80 °C e outro em Ágar de Infusão Cardíaca (HIA, Difco, Detroit, Michigan, EUA) a 4 °C.

2.1.3 Preparação de substâncias

O antibiótico tetraciclina e o pirogalol foram diluídos em 1 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) e depois em água estéril. A clorpromazina (CPMZ) e o brometo de etídio (BrEt) foram dissolvidos em água estéril destilada, enquanto o Cianeto de Carbonila m-Clorofenil-Hidrazona (CCCP) foi dissolvido em metanol/água. Todas as substâncias foram concentradas a 1024 µg/mL, armazenadas a -20 °C, e protegidas da luz.

2.1.4 Preparação e padronização de inóculos

Para procedimentos microbiológicos, os inóculos foram preparados utilizando a metodologia padrão definida pelo CLSI [25]. As bactérias foram cultivadas em meio sólido *Heart Infusion Agar* e mantidos em 37 °C por 24 horas. Em seguida, o inóculo foi preparado utilizando tubos de ensaio com solução salina estéril de acordo com a escala 0,5 Mcfarland correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC (*Colony Forming Units*).

2.1.5 Ensaios de concentração inibitória mínima (CIM)

Na realização dos testes de concentração inibitória mínima com pirogalol, BrEt e tetraciclina, foi seguida a metodologia proposta por Javadpour et al. [26] com modificações. Os microtubos do tipo Eppendorf foram preparados com 900 µL de meio de cultura líquido BHI e 100 µL de inóculo bacteriano, resultando em um volume final de 1 mL. As placas de microdiluição foram então preenchidas horizontalmente com 100 µL da solução final até que a última fila fosse alcançada. Os compostos foram então microdiluídos (100 µL) até a penúltima linha, com a última linha correspondendo ao controle de crescimento. As concentrações variavam de 512 µg/mL a 8 µg/mL. As placas foram incubadas em uma estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas, com leituras sendo realizadas através da verificação da mudança de cor do meio onde o azul corresponde à ausência de crescimento, e o vermelho à presença de crescimento bacteriano, através da adição de 20 µL de Resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-um 10-óxido) [25].

2.1.6 Inibição da bomba de efluxo pela redução da CIM do antibiótico e do brometo de etídio (EtBr)

Antibióticos e brometo de etídio foram testados em conjunto com pirogalol em concentrações subinibitórias (CIM/8), o que significa que o valor do CIM foi dividido por oito. Isto é feito para avaliar o efeito da inibição da bomba de efluxo, seguindo o método desenvolvido por Tintino et al. [27]. Os microtubos do tipo Eppendorf foram preenchidos com 160 µL do inóculo, assim como os seguintes compostos em concentrações subinibitórias (CIM/8): pirogalol (64 µg/mL), CPMZ (101 µg/mL) e CCCP (2 µg/mL), e complementados com BHI para atingir um volume de 1,6 mL. Ao preparar o controle de modificação, 160 µL do inóculo foram adicionados em 1.440 µL de BHI. As placas de microdiluição foram preenchidas, com as linhas G e H correspondentes aos controles de crescimento microbiano. Os controles de esterilidade foram preparados em placas separadas. Em seguida, foi realizada

a microdiluição com o antibiótico ou brometo de etídio (100 μ L). Finalmente, após 24 h, as placas foram lidas como descrito anteriormente.

2.1.7 Análise estatística dos resultados microbiológicos

Os ensaios antibacterianos foram realizados em triplicata e os resultados obtidos foram expressos como a média das réplicas. Os resultados foram apresentados como a média geométrica. A análise estatística de hipóteses foi aplicada usando uma ANOVA bidirecional seguida pelo teste pós-hoc de Bonferroni usando o software GraphPad Prism 7.0. Os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos.

2.2 Testes de dinâmica molecular

2.2.1 Efeito *in silico* sobre a membrana bacteriana

Uma simulação de 700 ns de Dinâmica Molecular (DM) também foi realizada para entender as interações do pirogalol (Figura 1) com um modelo de membrana externa de bactérias em detalhe atômico. Pesquisas anteriores demonstraram a capacidade da DM de investigar as interações droga-membrana [27-29].

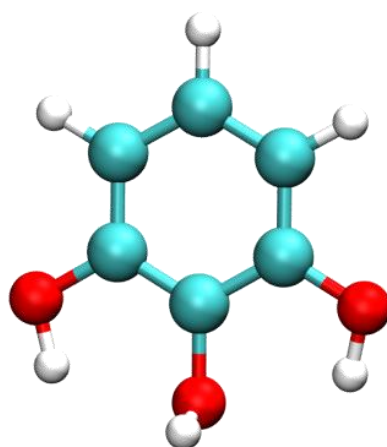


Figura 1: Representação da molécula de pirogalol. Os átomos de carbono são retratados em ciano, os oxigenados em vermelho e o hidrogênio são representados como esferas brancas.

O bico lipídico de POPG (1-palmitoyl-2-Oleoyl-sn-glycero-3-(phospho-rac-(1 glicerol)) foi construído usando 512 unidades do modelo Kukol [30]. A membrana foi balanceada usando o protocolo descrito anteriormente [31]. Para reproduzir a concentração

experimental da CEPA IS-58, 130 moléculas do pirogalol foram distribuídas aleatoriamente em torno de 3,5 Å acima da superfície da membrana (Figura 3a). Os parâmetros do pirogalol para o campo de força GROMOS 54A7 [32] foram adquiridos do Automated Topology Builder (ATB) Repository 3.0 [33]. O modelo de carga de ponto simples de solvente explícito (SPC) [34] foi usado para hidratar o sistema e íons de sódio Na⁺ foram adicionados para neutralizar a carga líquida da caixa. Depois de minimizar principalmente a energia do sistema em mais de 5000 passos, um passo de tempo de 2 fs foi empregado durante as fases de equilíbrio e produção. Para toda a simulação, a pressão foi mantida constante a 1,0 bar usando o termostato Berendsen [35] com acoplamento semi-isótropo a cada 0,1 ps. A temperatura foi ajustada para 298 K e foi controlada com uma constante de tempo de 0,2 ps e um termostato em escala V [36] com componentes acoplados independentemente. Foram aplicadas condições de limite periódicas em todas as direções e as interações de longo alcance e van der Waals foram manipuladas usando o corte Verlet de 1,2 nm. As interações eletrostáticas de longo alcance foram tratadas usando o método Particle-Mesh Ewald (constante dielétrica de 66) [37].

Finalmente, foram examinados os perfis de densidade parcial do sistema, área por grupo de cabeça lipídica, parâmetros de ordem de deutério e contatos nativos dependentes do tempo. Este último foi realizado com a ajuda de um roteiro interno baseado no pacote MDAnalysis python [38-39]. Todas as outras análises e simulações foram realizadas com o software GROMACS 2019.4 [40-41]. VMD 1.9.3 foi utilizado para visualizar e gerar imagens de coordenadas e trajetórias de moléculas [42].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da atividade antibacteriana intrínseca

Os testes de CIM com a estirpe IS-58 mostraram um valor de 512 µg/mL para o pirogalol, indicando relevância clínica através de sua atividade antibacteriana comprovada (Tabela 1). O CIM da tetraciclina correspondeu a 128 µg/mL.

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL de pirogalol e o antibiótico (tetraciclina). Cepa IS-58 que carrega a bomba Tet(K).

SUBSTANCE	IS-58
TETRACYCLINE	128 µg/mL
PYROGALLOL	512 µg/mL

Os compostos isolados têm sido alvo de estudos que avaliam diretamente seu efeito antibacteriano, bem como seu efeito como modificadores de atividade antibiótica, contribuindo assim para aumentar a eficácia e eficiência antibiótica contra cepas bacterianas resistentes a esses medicamentos [43].

Neste estudo, o pirogalol apresentou um valor CIM de 512 $\mu\text{g/mL}$, mostrando atividade antibacteriana direta contra a cepa *S. aureus* IS-58 que carrega a bomba de efluxo Tet(K). Cinthya et al, [44] realizaram testes com esta mesma substância contra *S. aureus* e obtiveram o mesmo valor de CIM (512 $\mu\text{g/mL}$). Este efeito antibacteriano pode estar associado a mecanismos de membrana, tais como os relatados por Wang et al. [45], onde o composto fenólico naringenin reduziu a fluidez da membrana de *S. aureus*, alterando sua composição. Em seu estudo de revisão, Lima et al. [12] relataram vários mecanismos de ação antibacteriana para polifenóis, incluindo mudanças na permeabilidade, danos à membrana, polarização e inibição de efluxo.

3.2 Avaliação da inibição da bomba pelo teste de redução CIM

Em testes combinados com o antibiótico tetraciclina, o pirogalol reduziu o CIM do antibiótico de 128 $\mu\text{g/mL}$ para 45,25 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando um efeito sinérgico. Entretanto, os dados obtidos da associação do pirogalol com brometo de etídio não foram estatisticamente significativos (Figura 2).

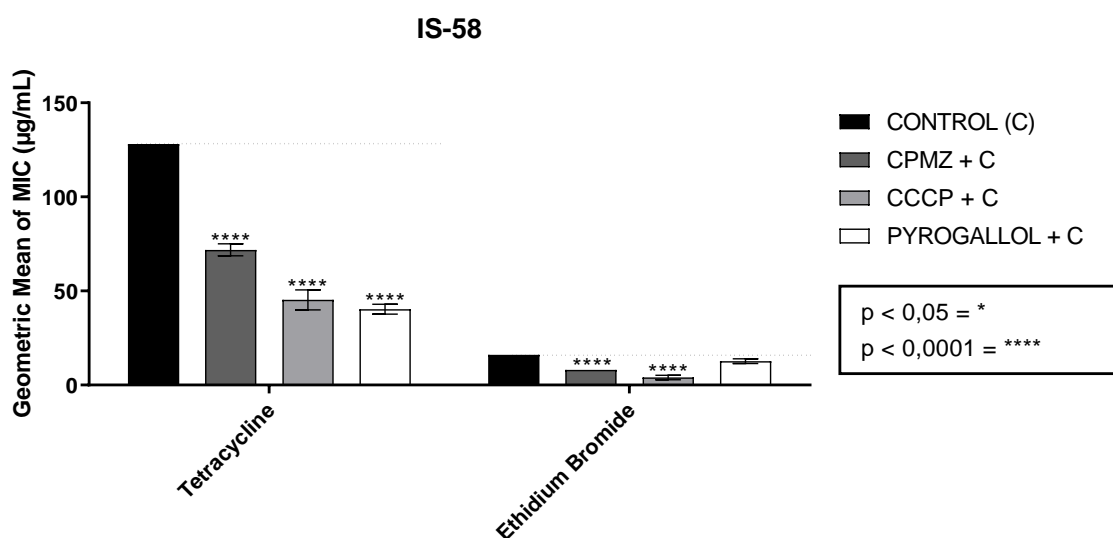


Figura 2: Efeito da combinação do pirogalol com o antibiótico tetraciclina e brometo de etídio contra a estirpe IS-58 portadora da bomba de efluxo Tet(K). Controle(C): antibiótico Tetraciclina. O Cianeto de Carbonila m-Clorofenil-Hidrazona (CCCP) e a clorpromazina (CPMZ) são inibidores padrão.

Os fitoquímicos podem exibir atividade antibacteriana direta e combinada, ajudando a melhorar a eficácia dos antibióticos existentes [46-47]. Por suas propriedades antimicrobianas e modificadoras de resistência, os compostos fenólicos são mencionados entre várias substâncias derivadas de plantas [43]. Em seu estudo utilizando substâncias desta classe, Bouquet et al. [48] demonstraram o efeito sinérgico do Xanthohumol, derivado do lúpulo extraído da planta *Humulus lupulus*, quando combinado com a rifampicina, onde o efeito da rifampicina era oito vezes maior.

No presente estudo, a ação sinérgica da combinação do pirogalol com a tetraciclina pode ser identificada, aumentando assim seu efeito. Entretanto, os dados da associação com brometo de etídio não foram estatisticamente significativos, indicando que o mecanismo da bomba de efluxo não foi inibido. Amin et al. [49], em seu trabalho com compostos fenólicos em combinação com antibióticos contra *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), demonstraram que o flavonóide luteolina aumentou o efeito antibacteriano do imipenem, causando danos à parede celular e à membrana citoplasmática. Os autores atribuíram este efeito a um sinergismo previamente observado com antibióticos que atuam inibindo a biossíntese da parede celular. Em seu estudo, Wang et al. [50] descobriram um efeito sinérgico da silibina em combinação com a ciprofloxacina, com o CIM deste antibiótico sendo reduzido em quatro vezes. No mesmo estudo, a sibilina alterou a expressão das proteínas, possivelmente indicando que o mecanismo da bomba de efluxo nas cepas de MRSA foi inibido.

Além disso, é importante mencionar que o mecanismo de ação dos compostos fenólicos também pode estar envolvido com a inibição da girase de DNA e inibição da proteína quinase, contribuindo assim também para a inibição da resistência das fluoroquinolonas [51-52].

3.3.1 Interação com a membrana

A simulação da Dinâmica Molecular foi realizada para explorar as interações do pirogalol com os fosfolipídeos da bicamada celular e para avaliar seu papel nos ensaios microbiológicos. As moléculas do pirogalol foram posicionadas acima da superfície da membrana e não interagiram com os fosfolipídios no início da simulação (Figura 3A). Como resultado de seus grupos hidroxila (parte hidrofílica), as moléculas fenólicas aproximaram-se da superfície da membrana e começaram a interagir com os grupos de cabeça lipídica (também de caráter hidrofílico).

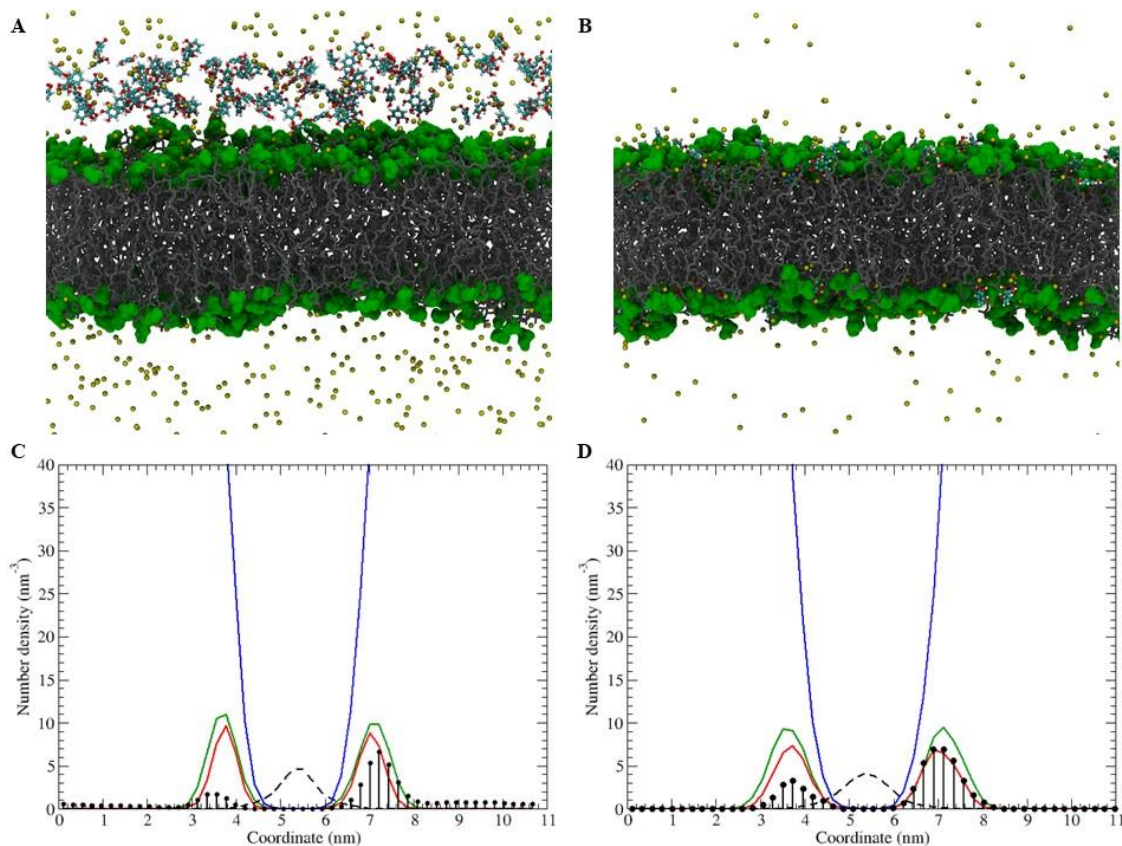


Figura 3: Instantâneo do início (A), e do fim (B) da simulação do pirogalol (ciano) com membrana POPG (cinza). A região hidrofílica é representada pela superfície verde, enquanto o Na⁺ é representado como esferas amarelas. A água foi omitida para melhor visualização. Comparação dos perfis de densidades numéricas para os 10 primeiros nanossegundos (C) e os 10 nanossegundos finais (D). As curvas verde e vermelha (glicerol e grupos PO₄³⁻) correspondem à parte hidrofílica; a linha tracejada preta representa o CH₃ na região hidrofóbica da membrana e as esferas pretas denotam as posições médias das moléculas do pirogalol.

Os perfis de densidades numéricas (Figura 3 C e D) mostraram quase nenhuma diferença na avaliação dos pontos de início e fim da simulação. A interação do pirogalol no folheto abaixo foi causada pela periodicidade da caixa do sistema, não pela permeação através da membrana. O pirogalol mostrou grande estabilidade na região dos grupos lipídicos da cabeça. Esta estabilidade pode ser associada aos vários contêineres de Na⁺ apresentados na superfície da membrana. A carga líquida negativa da superfície do bocal produz uma forte atração eletrostática para os íons sódio, que também se coordena com os grupos hidroxila do pirogalol. A Figura 4 apresenta uma evidência destas interações através da simulação.

Da mesma forma, o mapa de contato mostra que as moléculas de pirogalol começaram na água, mas rapidamente se deslocaram para a interface do filtro de água. Elas continuaram então a interagir com os íons de sódio e grupos de cabeças de lipídios durante a simulação. Finalmente, a área por grupo de cabeça de lipídios e parâmetros de ordem de deutério (Figura 5) foram calculados para estimar a ordem de perturbação causada pelo pirogalol na superfície e nas cadeias da bicamada.

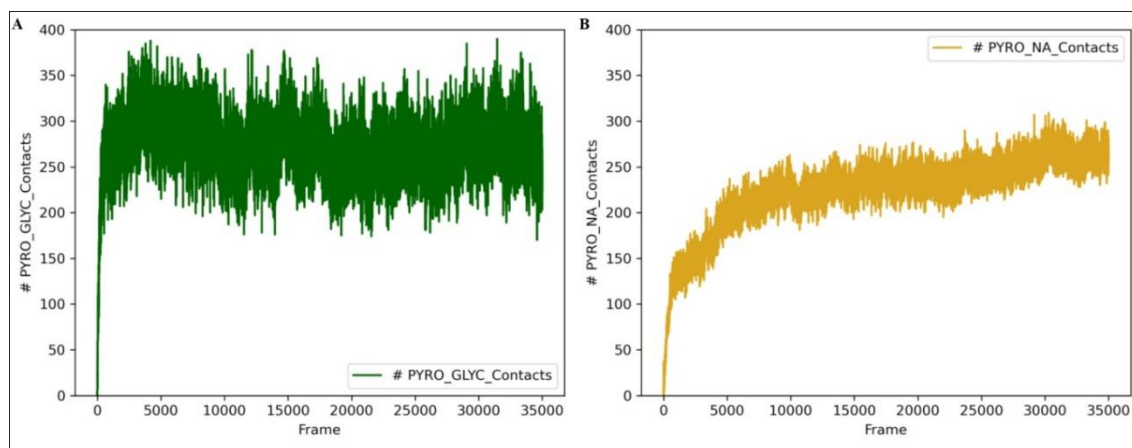


Figura 4: Análise de contatos nativos de moléculas de pirogalol com: (A) glicerol do grupo da cabeça lipídica; (B) íons Na⁺ ao longo de toda a trajetória. O corte do raio estava em 3,0 Å dos grupos de glicerol. As estruturas eram salvas a cada 20 fs (total de 700 ns).

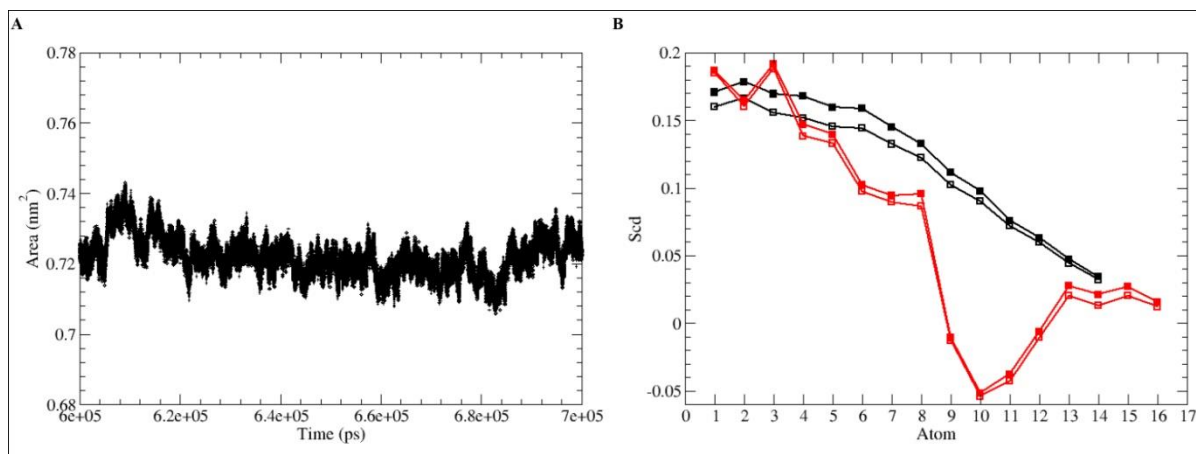


Figura 5: Análise das propriedades dependentes do tempo: (A) Área por grupo de cabeça lipídica; (B) Parâmetros de ordem de Deutério para as cadeias de oleil (preto) e palmitoyl (vermelho). Os quadrados ocios representam os 10 ns iniciais, enquanto os quadrados preenchidos representam os últimos 10 ns da simulação.

Ao final da simulação, a área por grupo de cabeça lipídica teve uma média de 72,2 Å², o que corresponde a um aumento de 6,5 % no valor equilibrado [31]. Este aumento está associado às moléculas de pirogalol que ocupam espaço entre os grupos de cabeça fosfolipídicos, aumentando sua separação. O parâmetro de ordem indica que não há quase nenhuma perturbação nas cadeias hidrofóbicas da bicamada. Isto também era esperado, já que

nenhuma molécula de pirogalol era capaz de permear através da membrana. A permeação de drogas frequentemente requer técnicas de amostragem aprimoradas para superar uma barreira local [53-55]. Os resultados computacionais, quando combinados com os ensaios de inibição da bomba de efluxo, mostram que o pirogalol não causa um transtorno direto na membrana, nem inibe a bomba de efluxo. As moléculas continuam a interagir somente com a superfície da membrana, o que poderia indicar que elas permanecem presas e não se movem para a bomba de efluxo Tet(K).

4. CONCLUSÃO

Neste estudo, o pirogalol mostrou atividade direta contra *S. aureus* portador da bomba de efluxo Tet(K), bem como um efeito sinérgico quando combinado com o antibiótico. No entanto, esta ação não estava relacionada à inibição do mecanismo da bomba de efluxo. O pirogalol não causou mudanças diretas na membrana no teste de dinâmica molecular, ao invés disso, interagiu apenas com a superfície. Como resultado, mais pesquisas são necessárias para demonstrar o mecanismo de interação deste composto, bem como para investigar seu efeito em outros tipos de bombas de efluxo.

REFERÊNCIAS:

1. B. Khameneh, R. Diab, K. Ghazvini, B.S. Fazly Bazzaz, Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them, *Microb Pathog.* 95 (2016) 32-42. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.009>
2. K. Hiramatsu, Y. Katayama, M. Matsuo, T. Sasaki, Y. Morimoto, A. Sekiguchi, T. Baba, Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy, *J. Infect. Chemother.* 20 (2014) 593-601. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.08.001>
3. R. Kumar, S.J.P. Patial, A Review on Efflux Pump Inhibitors of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria from Plant Sources, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 5:6 (2016) 837-855. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.506.092>
4. B.D. Schindler, G.W Kaatz, Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria, *Drug Resist. Updates.* 27 (2016)1-13. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.04.003>

5. M. Miklasinska, M. Kepa, R.D. Wojtyczka, D. Idzik, A. Zdebik, K. Orlewska, T.J. Wasik, Antibacterial activity of protocatechuic acid ethyl ester on *Staphylococcus aureus* clinical strains alone and in combination with antistaphylococcal drugs, *Molecules*. 20 (2015) 13536-13549. <https://doi.org/10.3390/molecules200813536>
6. T. Welte, M. Kantecki, G.G. Stone, J. Hammond, Ceftaroline fosamil as a potential treatment option for *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia in adults, *Int. J. Antimicrob. Agents*. 54:4 (2019) 410-422. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.08.012>
7. Y.R. Jang, T. Kim, M. Kim, H.S. Sung, M. Kim, M.J. Kim, S.H. Kim, S. Lee, S. Choi, J.H. Woo, Y.S. Kim, Y.P. Chong, Sternoclavicular septic arthritis caused by *Staphylococcus aureus*: excellent results from medical treatment and limited surgery, *Infect. Dis. (Lond)*, 51:9 (2019) 694-700. <https://doi.org/10.1080/23744235.2019.1639810>
8. C. Tascini, V. Attanasio, M. Ripa, A. Carozza, C. Pallotto, M. Bernardo, D. Francisci, C. Oltolini, G. Palmiero, P. Scarpellini, Ceftobiprole for the treatment of infective endocarditis: a case series, *J. Glob Antimicrob Resist*, 20 (2020) 56-59. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.07.020>
9. P. Durão, R. Balbontín, I. Gordo, Evolutionary Mechanisms Shaping the Maintenance of Antibiotic Resistance, *Trends in Microbiology*. 26:8 (2018) 677-691. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.01.005>
10. J.M.A. Blair, L.J.V. Piddock, How to measure export via bacterial multidrug resistance efflux pumps, *Mbio*. 7 (2016) 840-916. <https://doi.org/10.1128/mBio.00840-16>
11. P. Blanco, S. Hernando-Amado, J. Reales-Calderon, F. Corona, F. Lira, M. Alcalde-Rico, A. Bernardini, M. Sanchez, J. Martinez, Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants, *Microorganisms*. 4:1 (2016) 14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4010014>
12. M.C. Lima, C. Paiva de Sousa, C. Fernandez-Prada, J. Harel, J.D. Dubreuil, E.L. De Souza, A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential

- antimicrobials against pathogenic bacteria, *Microbial Pathogenesis*, 130 (2019) 259–270. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.03.025>
13. C.S. Rempe, K.P. Burris, S.C. Lenaghan, C.N Stewart-Junior, The Potential of Systems Biology to Discover Antibacterial Mechanisms of Plant Phenolics, *Front Microbiol.* 8 (2017) 422. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00422>
 14. H. Zhang, R. Tsao, Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and antiinflammatory effects, *Curr. Opin. Food Sci.*, 8 (2016) 33–42. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>
 15. E. L. Souza, T. M. R. De Albuquerque, A.S. Dos Santos, N.M.L. Massa, J.L. De Brito Alves, Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health-promoting properties and food functionalities – a review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2018), 1-15. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1425285>
 16. L. Andreu, N. Nuncio-Jáuregui, Á.A. Carbonell-Barrachina, P. Legua, F. Hernández, Antioxidant properties and chemical characterization of *Spanish Opuntia ficus-indica* Mill. cladodes and fruits, *J. Sci. Food Agric.* 98 (2018) 1566–1573. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8628>
 17. X.H. Meng, C. Liu, R. Fan, L. F. Zhu, S.X. Yang, H.T. Zhu, D. Wang, C. R. Yang, Y.J. Zhang, Antioxidative flavan-3-ol dimers from the leaves of *Camellia fangchengensis*, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 247–254. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04572>
 18. M. Sonia, K.P. Sharma, P. Johna, Characterization of Pyrogallol Production from Gallic acid by *Enterobacter* spp. *J. Microbiol. Biotechnol. Res.* 2 (2017) 327-336.
 19. K.K. Gaikwad, Y. S. Lee, Effect of storage conditions on the absorption kinetics of non-metallic oxygen scavenger suitable for moist food packaging. *J. Food Meas. Charact.* 11 (2017) 965–971. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9470-0>
 20. K.K. Gaikwad, Y.S. Lee, Novel natural phenolic compoundbased oxygen scavenging system for active packaging applications, *J. Food Meas. Charact.* 10 (2016) 533-538. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0705-z>

21. V.N. Lima, C.D. Oliveira-Tintino, E.S. Santos, L.P. Morais, S.R. Tintino, T.S. Freitas, Y.S. Geraldo, R.L. Pereira, R.P. Cruz, I.R. Menezes, H.D.M Coutinho, Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol, *Microb. Pathog.* 99 (2016) 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.004>
22. H. T. Diniz-Silva, I.C.S. Cirino, V.S. Falcão-Silva, M. Magnani, E.L. De Souza, J.P. Siqueira-Júnior, Tannic Acid as a Potential Modulator of Norfloxacin Resistance in *Staphylococcus aureus* Overexpressing *norA*, *Chemotherapy.* 61:6 (2016) 319-322. <https://doi.org/10.1159/000443495>
23. J.F.S. Dos Santos, S.R. Tintino, T.S. De Freitas, F.F. Campina, Menezes, I. R. A.; J.P. Siqueira-Júnior, H.D.M. Coutinho, F.A.B Cunha, *In vitro e in silico* evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid, *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases.* 57 (2018) 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.03.001>
24. A. Pal, A. Tripathi, Quercetin inhibits carbapenemase and efflux pump activity among carbapenem-resistant Gram-negative bacteria, *APMIS.* 128:3 (2019) 251-259. <https://doi.org/10.1111/apm.13015>
25. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI document M100-S25. (2015)
26. M.M. Javaderpool, W.C.J. Lo, S.M. Bishop, J.B. Alberty, S.M. Cowell, C.L. Becker, M.A. McLAUGHLIN, De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity, *J. Med. Chem.* 39:1 (1996) 3107-3113. <https://doi.org/10.1021/jm9509410>
27. S. R. Tintino, V.C.A. Souza, J.M.A. Silva, C.D.M. Oliveira-Tintino, P.S. Pereira, T.C. Leal-Balbino, A. Pereira-Neves, J.P. Siqueira-Junior, J.G.M. Costa, F.F.G. Rodrigues, I.R.A. Menezes, G.C.A. da Hora, M.C.P. Lima, H. D. M. Coutinho, V. Q. Balbino, Effect of Vitamin K3 Inhibiting the Function of NorA Efflux Pump and Its Gene

- Expression on *Staphylococcus Aureus*, *Membranes* (Basel). 10:6 (2020) 130.
<https://doi.org/10.3390/membranes10060130>
28. L.N. Silva, G.C.A. Da Hora, T.A. Soares, M.S. Bojer, H. Ingmer, A.J. Macedo, D.S. Trentin, Myricetin Protects *Galleria Mellonella* against *Staphylococcus aureus* Infection and Inhibits Multiple Virulence Factors, *Sci. Rep.* 7:1 (2017) 2823.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-02712-1>
29. M.G. Burton, Q.M. Huang, M. Hossain, J.D. Wade, A.H. Clayton, M.L. Gee, Long-Time-Scale Interaction Dynamics between a Model Antimicrobial Peptide and Giant Unilamellar Vesicles, *Langmuir.* 29:47(2013) 14613-14621.
<https://doi.org/10.1021/la203770j>
30. A. Kukol, Lipid Models for United-Atom Molecular Dynamics Simulations of Proteins, *J. Chem. Theory Comput.* 5:3 (2009) 615-626. <https://doi.org/10.1021/ct8003468>
31. G.C.A. Da Hora, N.L. Archilha, J.L.S. Lopes, D.M. Müller, K. Coutinho, R. Itri, T.A. Soares, Membrane Negative Curvature Induced by a Hybrid Peptide from Pediocin PA-1 and Plantaricin 149 as Revealed by Atomistic Molecular Dynamics Simulations, *Soft Matter.* 12:43 (2016) 8884-8898. <https://doi.org/10.1039/C6SM01714B>
32. N. Schmid, A.P. Eichenberger, A. Choutko, S. Riniker, M. Winger, A.E. Mark, W. F. Van Gunsteren, Definition and Testing of the GROMOS Force-Field Versions 54A7 and 54B7, *Eur. Biophys J.* 40:7 (2011) 843-856. <https://doi.org/10.1007/s00249-011-0700-9>
33. M. Stroet, B. Caron, K.M. Visscher, D.P. Geerke, A.K. Malde, A. E. Mark, Automated Topology Builder Version 3.0: Prediction of Solvation Free Enthalpies in Water and Hexane, *J. Chem. Theory Comput.* 14:11 (2018) 5834–5845.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b00768>
34. J. Hermans, H.J.C. Berendsen, W.F. Van Gunsteren, J.P.M.A Postma, Consistent Empirical Potential for Water-Protein Interactions, *Biopolymers.* 23:8 (1984) 1513-1518. <https://doi.org/10.1002/bip.360230807>
35. H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. Van Gunsteren, A. DiNola, J. R. Haak,

- Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath, *J. Chem. Phys.* 81:8 (1984) 3684. <https://doi.org/10.1063/1.448118>
36. G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello, Canonical Sampling through Velocity Rescaling, *J. Chem. Phys.* 126:1 (2007), 014101. <https://doi.org/10.1063/1.2408420>
37. T. Darden, D. York, L. Pedersen, Particle Mesh Ewald: An N·log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems, *J. Chem. Phys.* 98:12 (1993) 10089. <https://doi.org/10.1063/1.464397>
38. N. Michaud-Agrawal, E.J. Denning, T.B. Woolf, O. Beckstein, MDAAnalysis: A Toolkit for the Analysis of Molecular Dynamics Simulations, *J. Comput. Chem.* 32:10 (2011) 2319-2327. <https://doi.org/10.1002/jcc.21787>
39. R. Gowers, M. Linke, J. Barnoud, T. Reddy, M. Melo, S. Seyler, J. Domański, D. Dotson, S. Buchoux, I. Kenney, O. Beckstein, MDAAnalysis: A Python Package for the Rapid Analysis of Molecular Dynamics Simulations. In Proceedings of the 15th Python in Science Conference. (2016) 98-105.
40. M.J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J.C. Smith, B. Hess, E. Lindahl, Gromacs: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers, *SoftwareX.* 1:2 (2015) 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
41. M.J. Abraham, D. Van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, GROMACS development team, T. GROMACS User Manual version. (2019).
42. W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, {VMD} -- {V}isual {M}olecular {D}ynamics, *J. Mol. Graph.* 14 (1996) 33-38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
43. A.C. Abreu, A.J. Mcbain, M. Simões, Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents, *Nat. Prod. Rep.* 29 (2012) 1007-1021. <https://doi.org/10.1039/c2np20035j>

44. F.I. Cynthia, S. Hery, D. Akhmad, Antibacterial and antioxidant activities of pyrogallol and synthetic pyrogallol dimer, *Research Journal of Chemistry and Environment*. 22:2 (2018) 39-47.
45. L.H. Wang, X.A. Zeng, M.S. Wang, C.S. Brennan, D. Gong, Modification of membrane properties and fatty acids biosynthesis-related genes in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: implications for the antibacterial mechanism of naringenin, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1860 (2018) 481-490. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.11.007>
46. F.K. Touani, J.A. Seukep, D.E. Djeussi, A.G. Fankam, J.A.K. Noumedem, V. Kuete, Antibiotic-potential activities of four Cameroonian dietary plants against multidrug-resistant Gram-negative bacteria expressing efflux pumps, *BMC Complement Altern. Med* 14 (2014) 258. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-258>
47. M.J. Cheesman, A. Ilanko, B. Blonk, I.E. Cock, Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plants extracts/compounds with conventional antibiotics the solution?, *Pharmacogn Rev.* 11:22 (2017) 57-72. https://doi.org/10.4103/phrev.phrev_21_17
48. L. Bocquet, S. Sahpaz, N. Bonneau, C. Beaufay, S. Mahieux, J. Samaillie, V. Roumy, J. Jacquin, S. Bordage, T. Hennebelle, F. Chai, J. Quetin-Leclercq, C. Neut, C. Rivière, Phenolic Compounds from *Humulus lupulus* as Natural Antimicrobial Products: New Weapons in the Fight against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma brucei* Strains, *Molecules* 24:6 (2019) 1024. <https://doi.org/10.3390/molecules24061024>
49. M.U. Amin, M. Khurram, T.A. Khan, H.S. Faidah, Z.U. Shah, S.U. Rahman, A. Haseeb, M. Ilyas, N. Ullah, S.M.U. Khayam, M. Iriti, Effects of Luteolin and Quercetin in Combination with Some Conventional Antibiotics against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Int. J Mol Sci.* 17:11 (2016) 1947. <https://doi.org/10.3390/ijms17111947>

50. D. Wang, K. Xie, D. Zou, M. Meng, M. Xie, Inhibitory effects of silybin on the efflux pump of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Molecular medicine reports*. 18 (2018) 827-8339. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9021>.
51. T. Shakya, P.J. Stogios, N. Waglechner, E. Evdokimova, L. Ejim, J.E. Blanchard, A.G. McArthur, A. Savchenko, G.D. Wright, A small molecule discrimination map of the antibiotic resistance kinome, *Chem. Biol.* 18 (2011) 1591-1601. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.10.018>
52. T. Wu, X. Zang, M. He, S. Pan, X. Xu, Structure-activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase, *J. Agric. Food Chem*, 61(2013) 8185-8190. <https://doi.org/10.1021/jf402222v>
53. R. Sun, J.F. Dama, J.S. Tan, J.P. Rose, G.A. Voth, Transition-Tempered Metadynamics Is a Promising Tool for Studying the Permeation of Drug-like Molecules through Membranes, *J. Chem. Theory Comput.* 12:10 (2016) 5157-5169. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00077>
54. T. Rivel, C. Ramseyer, S. Yesylevskyy, Permeation of Cisplatin through the Membranes of Normal and Cancer Cells: A Molecular Dynamics Study, *BioRxiv*. (2018) 375980. <https://doi.org/10.1101/375980>
55. F. Aydin, R. Sun, J.M.J. Swanson, Mycolactone Toxin Membrane Permeation: Atomistic versus Coarse-Grained MARTINI Simulations, *Biophys. J.* 117:1 (2019) 87-98. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.05.012>

5.1 ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA

A resistência bacteriana ocorre quando micro-organismos como bactérias, se modificam quando expostos a vários medicamentos antibacterianos de tal forma que o fármaco se torna ineficaz. O uso por tempo prolongado, a dosagem indevida, a frequência e a habilidade de evolução, acarretaram o desenvolvimento de resistência contra diversos antibiótico. Bactérias resistentes com *Staphylococcus aureus*, são uma das maiores preocupações de saúde pública no mundo atualmente, pois as infecções causadas por elas, são difíceis de tratar devido à maior duração do tratamento e medicamentos caros. Além disso, os casos de mortalidade ligados a infecções resistentes têm aumentado com o passar dos anos (KABRA *et al.*, 2019; MARSHALL; LEVY, 2020).

Na busca pela resolução desse problema, pesquisadores têm investigado o potencial antibacteriano de várias substâncias. Diversos produtos derivados de plantas são citados na literatura por suas atividades antibacterianas associadas a vários mecanismos de ação. Também são mencionadas por auxiliar no aumento do efeito de antibióticos já utilizados (SHIN *et al.*, 2018). Os compostos fenólicos podem atuar inibindo os fatores de virulência bacteriana, anulando a formação de biofilmes, interagindo com a membrana citoplasmática, revertendo mecanismos de resistência e através da inibição da biossíntese da parede celular (MIKLASÍŃSKA-MAJDANIK *et al.*, 2018; PORRAS *et al.*, 2020).

Como já mencionado na literatura os compostos fenólicos possuem um grande potencial antibacteriano, mediado por vários mecanismos de ação. A quercetina e o pirogalol pertencem a esta classe de metabolitos secundários e já tiveram seu efeito antibacteriano evidenciado. Essa ação pode estar relacionada com a inibição de mecanismos de resistência como as bombas de efluxo. Nesse estudo, os compostos fenólicos quercetina e pirogalol apresentaram atividade direta contra a cepa de *Staphylococcus aureus* IS-58, apresentando o valor de 512 µg/mL. A emodina extraída da planta *Rhamnus alaternus* L. conhecida como aderno-bravo, apresentou atividade antibacteriana inibindo o crescimento de MRSA com a CIM no valor de 15,63 µg/mL (KEOUK *et al.*, 2021). Kepa e colaboradores (2018), em seu estudo com o ácido cafeico com a cepa de *S. aureus* ATCC 25923, obtiveram o valor da CIM de 256 µg/mL.

Quando tratamos da atividade potencializadora de fármacos antibacterianos, a quercetina potencializou os efeitos dos antibióticos tetraciclina, eritromicina e norfloxacino e

reduziu a concentração inibitória mínima do BrEt, o que evidencia a inibição das bombas de efluxo Tet(K) e NorA. O pirogalol atuou na potencialização da tetraciclina. O composto fenólico filantina isolado do extrato etanólico das folhas de *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn, conhecida como quebra-pedra, demonstrou associação sinérgica com o antibiótico norfloxacino reduzindo sua CIM de 64 µg/mL para 12,07 µg/mL. O mesmo sinergismo foi verificado na combinação com o BrEt, evidenciando a inibição da bomba NorA (RIBEIRO *et al.*, 2019).

No estudo de Sing e colaboradores (2017), a boeravinona B reduziu os valores da CIMs do ciprofloxacino nas duas cepas de *S. aureus* testadas 1199B e 1199. A redução da CIM do BrEt na cepa SA-1199B também foi verificada, indicando a inibição da bomba de efluxo NorA. Eumkeb *et al.* (2010), demonstrou em seu trabalho que a combinação da quercetina com a amoxicilina inibiu a síntese de peptídeoglicanos na membrana celular bacteriana, contribuiu inibindo a atividade da β-lactamase aumentando a permeabilidade da membrana e reduziu os ácidos graxos. Alguns compostos fenólicos podem interferir na produção de energia necessária para a expulsão das substâncias tóxicas da célula bacteriana, inibir as bombas de efluxo através da inibição da expressão do RNA mensageiro ou pela ligação com a proteína (LAN *et al.*, 2021).

Nos ensaios *in silico*, a interação entre a quercetina e a proteína de efluxo NorA, acontece pela formação de uma ligação de hidrogênio que proporciona uma maior estabilidade. Sing *et al.* (2017) verificou em seu estudo de modelagem molecular com a bomba NorA, que a boeravinona B liga-se aos resíduos de Ile23 e Glu222 da bomba através de uma ligação de hidrogênio constituída por grupos fenólicos hidroxílicos. No caso do pirogalol, sua interação ocorreu apenas com a superfície da membrana bacteriana.

Os achados desse estudo podem contribuir na busca por substâncias que possam potencializar antibióticos já existentes, pois tanto a quercetina como o pirogalol demonstraram esse efeito na associação com antibióticos. Quanto a inibição do mecanismo de bomba de efluxo, a quercetina se mostrou mais efetiva, inibindo as bombas Tet(K) e NorA de *S. aureus*, indicando que esse composto fenólico poderia contribuir como um coadjuvante na reversão da resistência bacteriana por bomba de efluxo.

5.2 CONCLUSÕES GERAIS

Os objetivos que direcionaram esse estudo contribuíram com as seguintes conclusões:

- ❖ Quercetina e pirogalol, demonstraram atividade direta contra cepas de *Staphylococcus aureus* portadoras de bombas de efluxo. Esses compostos também atuam potencializando alguns antibióticos, aumentando seus efeitos;
- ❖ O composto fenólico quercetina reduziu a concentração do brometo de etídio, revertendo a resistência bacteriana pela inibição das bombas de efluxo NorA e Tet(K);
- ❖ O mecanismo de interação entre a quercetina e a proteína NorA ocorre pela formação de uma ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxila da quercetina e a cadeia lateral serina138, proporcionando estabilidade extra ao complexo quercetina/NorA;
- ❖ O composto pirogalol não inibe o mecanismo de resistência estudado, mas causa efeito na membrana auxiliando na entrada do antibiótico, o que justifica o efeito de potencialização antibiótica.

5.3 PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS

É esperada a realização de testes com a metodologia de PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR), para verificar se a quercetina atua na redução da expressão dos genes das bombas de efluxo NorA e Tet(K), corroborando com os resultados de inibição do mecanismo de resistência obtidos nesse estudo. Testes de inibição de bomba de efluxo em um sistema vivo também seriam interessantes.

Devido a quercetina e o pirogalol apresentarem efeito potencializador em combinação com os antibióticos utilizados, um ensaio de *checkerboard* pode ser feito para verificar o efeito individual do fármaco e a associação com os compostos testados, confirmado a ação sinérgica demonstrada. Os compostos fenólicos são citados na literatura por causarem dano a membrana bacteriana, a Microscopia Eletrônica de Transmissão poderia ser usada para verificar se a quercetina e o pirogalol agem através desse mecanismo.

Poderiam ser realizadas também modificações por adição de grupos químicos nos compostos testados, contribuindo assim para a melhoria do efeito dos mesmos.

Muitos compostos fenólicos são muito encontrados em alimentos comumente inseridos na dieta humana. Mas ainda é necessária a realização de testes de toxicidade *in vivo* para a avaliação do perfil tóxico da quercetina e do pirogalol.

Novos testes com intuito de verificar se a quercetina e o pirogalol podem inibir outros tipos de bombas de efluxo tanto em bactérias Gram-positivas como em Gram-negativas, deveriam ser realizados.

- ABREU, A. C.; SERRA, S. C.; BORGES, A.; SAAVEDRA, M. J.; MCBAIN, A. J.; SALGADO, A. J.; SIMÕES, M. Combinatorial Activity of Flavonoids with Antibiotics Against Drug-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbial Drug Resistance**, v. 21, n. 6, p. 600–609, 2015.
- ALDULAIMI, O. A. General overview of phenolics from plant to laboratory, good antibacterials or not. **Pharmacognosy Reviews**, v.11, n. 22, p.123–127, 2017.
- AKANBI, O. E.; NJOM, H. A.; FRI, J.; OTIGBU, A. C.; CLARKE, A. M. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Recreational Waters and Beach Sand in Eastern Cape Province of South Africa. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 9, p. 1001, 2017.
- ALNASERI, H.; ARSIC, B.; SCHNEIDER, J. E.; KAISER, J. C.; SCINOCCA, Z. C.; HEINRICHS, D. E.; MCGAVIN, M. J. Inducible expression of a resistance-nodulation-division-type efflux pump in *Staphylococcus aureus* provides resistance to linoleic and arachidonic acids. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 11, p. 1893–1905, 2015.
- AMIN, M. U.; KHURRAM, M.; KHAN, T. A.; FAIDAH, H. S.; SHAH, Z. U.; RAHMAN, S. U.; HASEEB, A.; ILYAS, M.; ULLAH, N.; KHAYAM, S. M.U.; IRITI, M. Effects of Luteolin and Quercetin in Combination with Some Conventional Antibiotics against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal Molecular Sciences**, v.17, n. 11, p. 1947, 2016.
- ANDREU, L.; NUNCIO-JÁUREGUI, N.; CARBONELL-BARRACHINA, Á. A.; LEGUA, P.; HERNÁNDEZ, F. Antioxidant properties and chemical characterization of *Spanish Opuntia ficus-indica* Mill. cladodes and fruits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 4, p. 1566–1573, 2018.
- ANOUSHIRAVANI, M.; FALSAFI, T.; NIKNAM, V. Proton motive force-dependent efflux of tetracycline in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1309-1313, 2009.
- BHARDWAJ, A. K.; MOHANTY, P. Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: Rejuvenating the antimicrobial chemotherapy. **Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery**, v.7, p. 73–89, 2012.
- BHASKAR, B. V.; BABU, T. M. C.; REDDY, N. V.; RAJENDRA, W. Homology modeling, molecular dynamics, and virtual screening of NorA efflux pump inhibitors of *Staphylococcus aureus*. **Drug Design, Development and Therapy**, v.10, p. 3237–3252, 2016.
- BHATTACHARYYA, T.; SHARMA, A.; AKHTER, J.; PATHANIA, R. The small molecule ITR08027 restores the antibacterial activity of fluoroquinolones against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* by efflux inhibition. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 50, p. 219-226, 2017.
- BLAIR, J. M.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Nature Review Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

- BORGES, A.; FERREIRA, C.; SAAVEDRA, M. J.; SIMÕES, M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, p. 256–265, 2013.
- BORHANI, D. W.; SHAW, D. E. The future of molecular dynamics simulations in drug discovery. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, p. 15–26, 2012.
- BONCHI, C.; IMPERI, F.; MINANDRI, F.; VISCA, P.; FRANGIPANI, E. Repurposing of gallium-based drugs for antibacterial therapy. **Biofactors**, v. 40, p. 303–312, 2014.
- CAMPOS, S. R. R.; MACHUQUEIRO, M.; BAPTISTA, A. M. Constant-pH molecular dynamics simulations reveal a β -rich form of the human prion protein. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.114, n. 38, p. 12692–12700, 2010.
- CANNON, R. D, LAMPING, E.; HOLMES, A. R.; NIIMI, K.; BARET, P.V.; KENIYA, M. V.; TANABE, K.; NIIMI, M.; GOFFEAU, A.; MONK, B. C. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Review**, v. 22, n. 2, p. 291-321, 2009.
- CHAN, B. C.; IP, M.; LAU, C. B.; LUI, S. L.; JOLIVALT, C.; GANEM-ELBAZ, C.; LITAUDON, M.; REINER, N. E.; GONG, H.; SEE, R. H.; FUNG, K. P.; LEUNG, P. C. Synergistic effects of baicalein with ciprofloxacin against NorA over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and inhibition of MRSA pyruvate kinase. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 767–773, 2011.
- CHATTERJEE, S.; ZAHID, M. S.; AWASTHI, S. P.; CHOWDHURY, N.; ASAKURA, M.; HINENOYA, A.; RAMAMURTHY, T.; IWAOKA, E.; AOKI, S.; YAMASAKI, S. *In Vitro* Inhibition of Cholera Toxin Production in *Vibrio cholerae* by Methanol Extract of Sweet Fennel Seeds and Its Components. **Japanese Journal Infectious Diseases**, v. 69, n.5, p. 384-389, 2016.
- CHEN, W.; KAMP, M. W.; DAGGETT, V. Structural and dynamic properties of the human prion protein. **Biophysical Journal**, v.106, n. 5 p. 1152–1163, 2014.
- CHEVALIER, A.; SILVA, D. A.; ROCKLIN, G. J.; HICKS, D. R.; VERGARA, R.; MURAPA, P.; BERNARD, S. M.; ZHANG, L.; LAM, K. H.; YAO, G. R.; BAHL, C. D.; MIYASHITA, S.; GORESHNIK, I.; FULLER J. T.; KODAY, M. T.; JENKINS, C. M.; COLVIN, T.; CARTER, L.; BOHN, A.; BRYAN C. M.; FERNÁNDEZ-VELASCO, D. A.; STEWART, L.; DONG, M.; HUANG X., JIN, R.; WILSON, I. A.; FULLER, D. H.; BAKER, D. Massively parallel de novo protein design for targeted therapeutics. **Nature**, v. 550, n. 7674, p. 74–79, 2017.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement Clinical and Laboratory Standards Institute**. [S. l.: s. n.]. v. 35, n. 3, 2015.
- CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology Molecular and Biology Reviews**, v. 65, p. 232–260, 2001.
- CHOVANOVÁ, R.; MEZOVSKÁ, J.; VAVERKOVÁ, Š.; MIKULÁŠOVÁ, M. The inhibition the Tet(K) efflux pump of tetracycline resistant *Staphylococcus epidermidis* by

essential oils from three *Salvia* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, p. 58-62, 2015.

COSTA, S. S.; VIVEIROS, M.; AMARAL, L.; COUTO, I. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update. **The Open Microbiology Journal**, v.7, p. 59–71, 2013.

COUTINHO, H. D.; COSTA, J. G.; LIMA, E. O.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, p. 328-330, 2008.

COX, G.; WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, p. 287-292, 2013.

DADASHI, M.; HAJIKHANI, B.; DARBAN-SAROKHALIL, D.; VAN BELKUM, A.; GOUDARZI, M. Mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*: a systematic review and meta-analysis. **Journal Global Antimicrobial Resistance**, v. 20, p. 238–47, 2020.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174–181, 2012.

DANTAS, G.; SOMMER, M. O. A. Context matters - the complex interplay between resistome genotypes and resistance phenotypes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 577-582, 2012.

DA SILVA, H. C.; LEAL, A. L. A. B.; DE OLIVEIRA, M. M.; BARRETO, H. M.; COUTINHO, H. D. M.; DOS SANTOS, H. S.; SANTIAGO, G. M. P.; DE FREITAS, T. S.; LIMA, I. K. C.; TEIXEIRA, A. M. R.; NOGUEIRA, C. E. S. Structural characterization, antibacterial activity and NorA efflux pump inhibition of flavonoid fisetinidol. **South African Journal of Botany**, v. 132, p. 140-145, 2020.

DE MAGALHÃES, C. S.; ALMEIDA, D. M.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E. A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands. **Information Sciences**, v. 289, p. 206–224, 2014.

DEMARCO CE, CUSHING LA, FREMPONG-MANSO E, SEO SM, JARAVAZA TAA, KAATZ GW. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemotherapy**, v. 51, p. 3235-3239, 2007.

DHIMAN P, MALIK N, SOBARZO-SÁNCHEZ E, URIARTE E, KHATKAR A. Quercetin and Related Chromenone Derivatives as Monoamine Oxidase Inhibitors: Targeting Neurological and Mental Disorder. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 418, 2019.

DONG, Y.; GLASER, K.; SPEER, C. P. New threats from an old foe: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in neonates. **Neonatology**, v. 114, n. 2, p.127–134, 2018.

DOS SANTOS, J. F. S.; TINTINO, S. R.; DE FREITAS, T. S.; CAMPINA, F. F.; DE A. MENEZES, I. R.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; COUTINHO, H. D. M.; CUNHA, F. A. B. In vitro e in silico evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 57, n. November 2017, p. 22–28, 2018.

- DURÃO, P.; BALBONTÍN, R.; GORDO, I. Evolutionary Mechanisms Shaping the Maintenance of Antibiotic Resistance. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 677-69, 2018.
- EUMKEB, G.; SAKDARAT, S.; SIRIWONG, S. Reversing β -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. **Phytomedicine**, v. 18, p. 40–45, 2010.
- FITZPATRICK, A. W. P.; LLABRÉS, S.; NEUBERGER, A.; BLAZA, J. N.; BAI, X. C.; OKADA, U.; MURAKAMI, S.; VAN VEEN, H. W.; ZACHARIAE, U.; SCHERES, S. H. W.; LUISI, B. F.; DU, D. Structure of the MacAB-TolC ABC-type tripartite multidrug efflux pump. **Nature Microbiology**, v.15, n. 2, p. 17070, 2017.
- FORLI, S.; HUEY, R.; PIQUE, M. E.; SANNER, M. F.; GOODSSELL, D. S.; OLSON, A. J. Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. **Nature Protocols**, v. 11, p. 905–919, 2016.
- FOSTER T. J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. **FEMS Microbiol Reviews**, v. 41, n. 3, p. 430–49, 2017.
- GERMAN, N.; WEI, P.; KAATZ, G. W.; KERNS, R. J. Synthesis and evaluation of fluoroquinolone derivatives as substrate-based inhibitors of bacterial efflux pumps. **European Journal Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 11, p.2453-2463, 2008.
- GIULIERI, S. G.; TONG, S. Y. C.; WILLIAMSON, D. A. Using genomics to understand meticillin- and vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Microbial Genomics**, v. 6, 2020.
- GUO, Y.; SONG, G.; SUN, M.; WANG, J.; WANG, Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. March, p. 1–11, 2020.
- HAJIKHANI, B.; GOUDARZI, M.; KAKAVANDI, S.; AMINI, S.; ZAMANI, S.; VAN BELKUM, A.; GOUDARZI, H.; DADASHI, M. The global prevalence of fusidic acid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*: a systematic review and meta-analysis. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 10, n.75, 2021.
- HANDZLIK, J.; MATYS, A.; KIEĆ-KONONOWICZ, K. Recent advances in Multi-Drug Resistance (MDR) efflux pump inhibitors of Gram-positive bacteria *S. aureus*. **Antibiotics**, v. 2, n. 1, p. 28-45, 2013.
- HARKINS, C. P.; PICHON, B.; DOUMITH, M.; PARKHILL, J.; WESTH, H.; TOMASZ, A.; DE LENCASTRE, H.; BENTLEY, S. D.; KEARNS, A. M.; HOLDEN, M. T. G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. **Genome Biology**, v. 18, n. 130, 2017.
- HASSAN, K. A.; LIU, Q.; HENDERSON, P. J. F.; PAULSEN, T. Homologs of the *Acinetobacter baumannii* Acel Transporter Represent a New Family of Bacterial Multidrug Efflux Systems. **American Society for Microbiology**, v. 6, n. 1, 2015.
- HASSAN, K. A.; LIU, Q.; ELBOURNE, L. D. H.; AHMAD, I.; SHARPLES, D.; NAIDU, V.; CHAN, C. L.; LI, L.; HARBORNE, S. P. D.; POKHREL, A.; POSTIS, V. L. G.;

- GOLDMAN, A.; HENDERSON, P. J. F.; PAULSEN, I. T. Pacing across the membrane: the novel PACE family of efflux pumps is widespread in Gram-negative pathogens. **Research Microbiology**, v. 169, n. 7-8, p. 450-454, 2018.
- HASSANZADEH, S.; GANJLOO, S.; POURMAND, M. R.; MASHHADI, R.; GHAZVINI, K. Epidemiology of efflux pumps genes mediating resistance among *Staphylococcus aureus*; A systematic review. **Microbial Pathogenesis**, v.139, 2020.
- HOLLER, J. G.; CHRISTENSEN, S. B.; SLOTVED, H. C.; RASMUSSEN, H. B.; GÚZMAN, A.; OLSEN, C. E.; PETERSEN, B.; MØLGAARD, P. Novel inhibitory activity of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump by a kaempferol rhamnoside isolated from *Persea lingue* Nees. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 5, p.1138-1144, 2012.
- HOLLINGSWORTH, S. A.; DROR, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. **Neuron**, v. 99, n. 6, p. 1129-1143, 2018.
- HOSSION, A. M.; ZAMAMI, Y.; KANDAHARY, R. K.; TSUCHIYA, T.; OGAWA, W.; IWADO, A.; SASAKI, K. Quercetin diacylglycoside analogues showing dual inhibition of DNA gyrase and topoisomerase IV as novel antibacterial agents,” **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 3686– 3703, 2011.
- HOU, T.; WANG, J.; LI, Y.; WANG, W. Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 1, p. 69–82, 2011.
- HSIAO, C. W., JULIA, L. B. Polyphenol compounds as antioxidants for disease prevention: Reactive oxygen species scavenging, enzyme regulation, and metal chelation mechanisms in *E. coli* and human cells. In: Andreescu S, Hepel M: Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 1083, p. 99–175, 2011.
- HUGHES, J.P.; REES, S.; KALINDJIAN, S.B.; Philpott, K.L. Principles of early drug discovery. **British Journal of Pharmacology** v.162, n. 6, p.1239–1249, 2011.
- JANG, Y. R.; KIM, T.; KIM, M.; SUNG, H. S.; KIM, M.; KIM, M. J.; KIM, S. H.; LEE, S.; CHOI, S.; WOO, J. H.; KIM, Y. S.; CHONG, Y. P. Sternoclavicular septic arthritis caused by *Staphylococcus aureus*: excellent results from medical treatment and limited surgery. **Infectious Diseases**, v. 51, n. 9, p. 694–700, 2019.
- JAVADPOUR, M. M.; LO, W. C. J.; BISHOP, S. M.; ALBERTY, J. B.; COWELL, S. M; BECKER, C. L.; McLAUGHLIN, M. A., De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 3107-3113, 1996.
- JOHNSON, A. P.; WOODFORD, N. Global spread of antibiotic resistance: The example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 499-513, 2013.
- KAATZ, G. W.; DEMARCO, C. E.; SEO, S. M. MepR, a repressor of the *Staphylococcus aureus* MATE family multidrug efflux pump MepA, is a substrate-responsive regulatory protein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1276-1281, 2006.

KAATZ, G. W.; MCALEESE, F.; SEO, S. M. Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1857-1864, 2005.

KABRA, R.; CHAUHAN, N.; KUMAR, A.; INGALE, P.; SINGH, S. Efflux pumps and antimicrobial resistance: Paradoxical components in systems genomics. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 141, p. 15-24, 2019.

KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature structural biology**, v. 9, p. 646–652, 2002.

KHAMENEH, B.; DIAB, R.; GHAZVINI, K.; FAZLY BAZZAZ, B. S. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. **Microbial Pathogenesis**, v. 95, p. 32-42, 2016.

KHAMENEH, B.; IRANSHAHY, M.; SOHEILI, V.; BAZZAZ, B. S. F. Review on plant antimicrobials: A mechanistic viewpoint. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v.8, p.118, 2019.

KIM, T.; SILVA, J.; JUNG, Y. Enhanced functional properties of tannic acid after thermal hydrolysis. **Food Chemistry**, v.126, n. 1, p.116-120, 2011.

KOSMIDIS, C.; SCHINDLER, B. D.; JACINTO, P. L.; PATEL, D.; BAINS, K.; SEO, S. M.; KAATZ, G. W. Expression of multidrug resistance efflux pump genes in clinical and environmental isolates of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 3, p. 204–209, 2012.

KUMAR, A.; KHAN, I. A.; KOUL, S.; KOUL, J. L.; TANEJA, S. C.; ALI, I.; ALI, F.; SHARMA, S.; MIRZA, Z. M.; KUMAR, M.; SANGWAN, P. L.; GUPTA, P.; THOTA, N.; QAZI, G. N. Novel structural analogues of piperine as inhibitors of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1270-1276, 2008.

KUMAR, N.; RADHAKRISHNAN, A.; WRIGHT, C. C.; CHOU, T. H.; LEI, H. T.; BOLLA, J. R.; TRINGIDES, M. L.; RAJASHANKAR, K. R.; SU, C. C.; PURDY, G. E.; YU, E. W. Crystal structure of the transcriptional regulator Rv1219c of *Mycobacterium tuberculosis*. **Protein Science**, v. 23, n. 4, p. 423-432, 2014.

KUMAR, S.; PESCHEL, A.; HARBARTH, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 31, n. 4, 2018.

KURODA, T.; TSUCHIYA, T. Multidrug efflux transporters in the MATE family. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1794, n. 5, p. 763-768, 2009.

KWPA, M.; MIKLASINSKA-MAJDANIK, M.; WOJTYCZKA, R. D.; IDZIK, D.; KORZENIOWSKI, K.; SMOLEN-DZIRBA, J.; WDSIK, T. J. Antimicrobial Potential of Caffeic Acid against *Staphylococcus aureus* Clinical Strains. **BioMed Research International**, p. 9, 2018.

KYAW, B. M.; ARORA, S.; LIM, C. S. Bactericidal antibiotic-phytochemical combinations against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 938–945, 2012.

- LAN, J.; LI, X.; ZHU, X.; SUN, Z.; HE, J.; ZLOH, M.; GIBBONS, S.; MU, Q. Flavonoids from *Artemisia rupestris* and their synergistic antibacterial effects on drug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Natural Product Research**, v. 35, n. 11, p. 1881-1886, 2021.
- LEE, A. S.; DE LENCASTRE, H.; GARAU, J.; KLUYTMANS, J.; MALHOTRA-KUMAR, S.; PESCHEL, A.; HARBARTH, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature reviews Disease primers**, v. 31, n. 4, 2018.
- LEKSHMI, M.; AMMINI, P.; ADJEI, J.; SANFORD, L. M.; SHRESTHA, U.; KUMAR, S.; VARELA, M. F. Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator superfamily in *Staphylococcus aureus*. **AIMS Microbiology**, v.4, n. 1, p. 1-18, 2018.
- LEVIN-REISMAN, I.; RONIN, I.; GEFEN, O.; BRANISS, I.; SHORESH, N.; BALABAN, N. Q. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. **Science**, v.355, n. 6327, p.826–830, 2017.
- LI, X. Z.; NIKAIDO, H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. **Drugs**, v. 64, n. 2, p. 159-204, 2012.
- LIMA, M. C.; PAIVA DE SOUSA, C.; FERNANDEZ-PRADA, C.; HAREL, J.; DUBREUIL, J. D.; DE SOUZA, E. L. A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 130, p. 259–270, 2019.
- LIU, Y.; ZHANG, Y.; ZHONG, H.; JIANG, Y.; LI, Z.; ZENG, G.; CHEN, M.; SHAO, B.; LIU, Z.; LIU, Y. Application of molecular docking for the degradation of organic pollutants in the environmental remediation: A review. **Chemosphere**, v. 203, 139–150, 2018.
- LI, W.; WANG, C. Biodegradation of gallic acid to prepare pyrogallol by *Enterobacter aerogenes* through substrate induction. **Bio Resources.**, v.10, n. 2, p. 3027-3044, 2015.
- LONG, H.; MILLER, S. F.; STRAUSS, C.; ZHAO, C.; CHENG, L.; YE, Z.; GRIFFIN, K.; TE, R.; LEE, H.; CHEN, C.; LYNCH, M. Antibiotic treatment enhances the genome-wide mutation rate of target cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.113, n. 18, p.2498–2505, 2016.
- LLOR, C.; BJERRUM, L. Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. **Therapeutic Advances Drug in Safety**, v.5, n.6, p.229–241, 2014.
- LUÍS, Â.; SILVA, F.; SOUSA, S.; DUARTE, A. P.; DOMINGUES, F. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids. **Biofouling**, v. 30, n. 1, p. 69–79, 2014.
- MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. **Clinical Microbiology Review**, v. 24, n. 4, 2020.
- MENG, X. Y.; ZHANG, H. X.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current Computer-Aided Drug Designer**, v. 7, n. 2, p. 146-57, 2011.

- MENG, X.; LIU, C.; FAN, R.; ZHU, L. F.; YANG, S.; ZHU, H.; WANG, D.; YANG, C.; ZHANG, Y. Antioxidative flavan-3-ol dimers from the leaves of *Camellia fangchengensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 247–254, 2018.
- MIKLASIŃSKA-MAJDANIK, M.; KEPA, M.; WOJTYCZKA, R. D.; IDZIK, D.; WASIK, T. J. Phenolic Compounds Diminish Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* Clinical Strains. **International Journal of Environmental Research Public Health**, v. 15, p. 2321, 2018.
- MOHAMMED-ALI, M. N.; JAMALLUDEEN, M. Isolation and characterization of bacteriophage against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology & Diagnosis**, v. 5, n. 1, p. 539-546, 2015.
- MULLARD, A. Drug repurposing programmes get lift off. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, p. 505–506, 2012.
- MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, p. 1-37, 2016.
- NABAVI, S. M.; NABAVI, S. F.; ESLAMI, S.; MOGHADDAM, A. H. *In vivo* protective effects of quercetin against sodium fluoride-induced oxidative stress in the hepatic tissue. **Food Chemistry**, v.132, n. 2, p.931-935, 2012.
- NARGOTRA, A.; SHARMA, S.; KOUL, J. L.; SANGWAN, P. L.; KHAN, I. A.; KUMAR, A.; TANEJA, S. C.; KOUL, S. Quantitative structure activity relationship (QSAR) of piperine analogs for bacterial NorA efflux pump inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 10, p. 4128–4135, 2009.
- NG, E. Y.; TRUCKSIS, M.; HOOPER, D. C. Quinolone resistance mediated by *norA*: physiologic characterization and relationship to flqB, a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus aureus* chromosome. **Antimicrob Agents Chemotherapy**, v. 38, p. 1345-1355, 1994.
- NI, W.; LI, Y.; GUAN, J.; ZHAO, J.; CUI, J.; WANG, R.; LIU, Y. Effects of efflux pump inhibitors on colistin resistance in multidrug-resistant gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 3215-3218, 2016.
- NIKAIDO, H. Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 77, p. 1-60, 2011.
- NORRIS, A. L.; SERPERSU, E. H. Ligand promiscuity through the eyes of the aminoglycoside N3 acetyltransferase IIa. **Protein Science**, v. 22, n. 7, p. 916-928, 2013.
- OLIVEIRA, A. C.; SILVA, R. S. Desafios do Cuidar em Saúde Frente à Resistência Bacteriana: Uma Revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, n. 10, v. 1, p. 189-197, 2008.
- O'NEILL, J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. **The Review on Antimicrobial Resistance Chaired**, 2016.
- ONDUSKO, D. S.; NOLT, D. *Staphylococcus aureus*. **Pediatrics in Review**, 2018.

- OZTURK SARIKAYA, S. B. Acetylcholinesterase inhibitory potential and antioxidant properties of pyrogallol. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v.30, p.761-766, 2015.
- PAPKOU, A.; HEDGE, J.; KAPEL, N.; YOUNG, B.; MACLEAN, R. C. Efflux pump activity potentiates the evolution of antibiotic resistance across *S. aureus* isolates. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 3970, 2020.
- PRASCH, S.; BUCAR, F. Plant derived inhibitors of bacterial efflux pumps: an update. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 6, p. 961–974, 2015.
- PEREZ, A.; POZA, M.; FERNANDEZ, A.; FERNANDEZ MDEL, C.; MALLO, S.; MERINO, M.; RUMBO-FEAL, S.; CABRAL, M. P.; BOU, G. Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 2084–2090, 2012.
- PIDDOCK, L. J. Multidrug-resistance efflux pumps not just for resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 629–36, 2006.
- PORRAS, G.; CHASSAGNE, F.; LYLES, J. T.; MARQUEZ, L.; DETTWEILER, M.; SALAM, A. M.; SAMARAKOON, T.; SHABIH, S.; FARROKHI, D. R.; QUAVE, C. L. Ethnobotany and the Role of Plant Natural Products in Antibiotic Drug Discovery. **Chemical Reviews**, v. 121, p. 3495–3560, 2020.
- QIN, X. R.; ZHANG, M. J.; GAO, X. N.; LIN, Y.; LI, M. A.; SI-YI, H. E. Study on the antibacterial activity of quercetin. **Chemistry & Bioengineering**, v. 26, p. 55–57, 2009.
- RAMPIONI, G.; VISCA, P.; LEONI, L.; IMPERI, F. Drug repurposing for antivirulence therapy against opportunistic bacterial pathogens. **Emerging Topics in Life Sciences**, v.1, p.13–22, 2017.
- RANAWEERA, I.; SHRESTHA, U.; RANJANA, K. C.; KAKARLA, P.; WILLMON, T. M.; HERNANDEZ, A. J.; MUKHERJEE, M. M.; BARR, S. R.; VARELA, M. F. Structural comparison of bacterial multidrug efflux pumps of the major facilitator Superfamily. **Trends in Cell & Molecular Biology**, v. 10, p. 131-140, 2015.
- RIBEIRO, A. M. B.; DE SOUSA, J. N.; COSTA, L. M.; OLIVEIRA, F. A. A.; DOS SANTOS, R. C.; NUNES, A. S. S.; DA SILVA, W. O.; CORDEIRO, P. J. M.; LIMA NETO, J. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; KAATZ, G. W.; BARRETO, H. M.; DE OLIVEIRA, A. P. Antimicrobial activity of *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by Phyllanthin. **Microbial Pathogenesis**, v. 130, p. 242–246, 2019.
- ROSALES, A. R.; WAHLERS, J.; LIMÉ, E.; MEADOWS, R. E.; LESLIE, K. W.; SAVIN, R.; BELL, F.; HANSEN, E.; HELQUIST, P.; MUNDAY, R. H. Rapid virtual screening of enantioselective catalysts using CatVS. **Nature Catalysis**, v. 2, p. 41-45, 2019.
- ROY, S. K.; PAHWA, S.; NANDANWAR, H.; JACHAK, S. M. Phenylpropanoids of *Alpinia galangal* as efflux pump inhibitors in *Mycobacterium smegmatis* mc2 155. **Fitoterapia**, v. 83, p. 1248-55, 2012.

- SABATINI, S.; GOSETTO, F.; SERRITELLA, S.; MANFRONI, G.; TABARRINI, O.; IRACI, N.; BRINCAT, J. P.; CAROSATI, E.; VILLARINI, M.; KAATZ, G. W.; CECCHETTI, V. Pyrazolo[4,3-c] [1,2]benzothiazines 5,5-dioxide: A promising new class of *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 7 p. 3568–3572, 2012.
- SANTINI, S.; DERREUMAUX, P. Helix H1 of the prion protein is rather stable against environmental perturbations: molecular dynamics of mutation and deletion variants of PrP (90–231). **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 951–960, 2004.
- SAVOIA, D. New antimicrobial approaches: reuse of old drugs. **Current Drug Targets**, v. 17, p. 731–738, 2016.
- SEUKEP, A. J.; KUETE, V.; NAHAR, L.; SARKER, S. D.; GUO, M. Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification. **Journal Pharmaceutical Analysis**, v.10, p. 277–290, 2020.
- SCHERF, J. R.; BARBOSA DOS SANTOS, C. R.; SAMPAIO DE FREITAS, T.; ROCHA, J. E.; MACÊDO, N. S.; MASCARENHAS LIMA, J. N.; MELO COUTINHO, H. D.; BEZERRA DA CUNHA, F. A. Effect of terpinolene against the resistant *Staphylococcus aureus* strain, carrier of the efflux pump QacC and β -lactamase gene, and its toxicity in the *Drosophila melanogaster* model. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104528, 2020.
- SCHINDLER, B. D.; KAATZ, G. W. Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. **Drug Resistance Updates**, v. 27, p. 1–13, 2016.
- SCHNEIDER, G.; CLARK, D. E. Automated de novo drug design: Are we nearly there yet? **Angewandte Chemie**, v. 131, p. 10906–10917, 2019.
- SCHWARZ, S.; FESSLER, A. T.; HAUSCHILD, T. Plasmid-mediated resistance to protein biosynthesis inhibitors in staphylococci. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1241, p. 82–103, 2011.
- SCHWEIZER, H. P. Understanding efflux in Gram-negative bacteria: opportunities for drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 7, n. 7, p. 633–642, 2012.
- SHARMA, A.; GUPTA, V. K.; PATHANIA, R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. **Indian Journal of Medical Research**, v. 149, n. 2, p. 129-145, 2019.
- SHIN, J.; PRABHAKARAN, V.; KIM, K. The multi-faceted potential of plant-derived metabolites as antimicrobial agents against multidrug-resistant pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 116, p.209–214, 2018.
- SHIU, W. K.; MALKINSON, J. P.; RAHMAN, M. M.; CURRY, J.; STAPLETON, P.; GUNARATNAM, M.; NEIDLE, S.; MUSHTAQ, S.; WARNER, M.; LIVERMORE, D. M.; EVANGELOPOULOS, D.; BASAVANNACHARYA, C.; BHAKTA, S.; SCHINDLER, B. D.; SEO, S. M.; COLEMAN, D.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S. A new plant-derived antibacterial is an inhibitor of efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, p. 513-518, 2013.
- SILVEIRA, Z. S.; MACÊDO, N. S.; DOS SANTOS, J.F. S.; DE FREITAS, T. S.; BARBOSA, C. R. S.; SOUSA JÚNIOR, D. L.; MUNIZ, D. F.; DE OLIVEIRA, L. C. C.;

- SIQUEIRA JÚNIOR, J. P. S.; DA CUNHA, F.A.B.; BALBINO, V. Q.; MARTINS, N. Evaluation of the Antibacterial Activity and Efflux Pump Reversal of Thymol and Carvacrol against *Staphylococcus aureus* and Their Toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Molecules**, v. 25, n. 9, 2020.
- SINGH, S.; KALIA, N. P.; JOSHI, P.; KUMAR, A.; SHARMA, P. R.; KUMAR, A.; BHARATE, S. B.; KHAN, I. A. Boeravinone B, A Novel Dual Inhibitor of NorA Bacterial Efflux Pump of *Staphylococcus aureus* and Human P-Glycoprotein, Reduces the Biofilm Formation and Intracellular Invasion of Bacteria. **Frontiers Microbiology**, v. 8, p. 1868, 2017.
- SJUTS, H.; VARGIU, A. V.; KWASNY, S. M.; NGUYEN, S. T.; KIM, H.; DING, X.; ORNIK, A. R.; RUGGERONE, P.; BOWLIN, T. L.; NIKAIDO, H.; POS, K. M.; OPPERMAN, T. J. Molecular basis for inhibition of AcrB multidrug efflux pump by novel and powerful pyranopyridine derivatives. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 13, p. 3509-3514, 2016.
- SOUZA, E. L.; DE ALBUQUERQUE, T. M. R.; DOS SANTOS, A. S.; MASSA, N. M. L.; DE BRITO ALVES, J. L. Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health-promoting properties and food functionalities – a review, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 10, p. 1645-1659, 2019.
- SPENGLER, G.; AMARAL, L. New Roads Leading to old Destinations: Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 468, 2017.
- STRYJEWSKI, M. E.; COREY, G. R. Methicillin-resistant *staphylococcus aureus*: An evolving pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 1, 2014.
- SU, Y.; MA, L.; WEN, Y.; WANG, H.; ZHANG, S. Studies of the in vitro antibacterial activities of several polyphenols against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 19, p. 12630–12639, 2014.
- SUMITHRA, T. G.; CHATURVEDI, V.; CHERIAN, S.; KRISHNAN, B. B.; JACOB, S. S. Efflux pump inhibitors for antibacterial therapy. **Journal of Indian Veterinary Association**, v. 10, n. 1, p. 69-75, 2012.
- SUN, J.; DENG, Z.; YAN, A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, n. 2, p. 254-267, 2014.
- SUNDARAMOORTHY, N. S.; MITRA, K.; GANESH, J. S.; MAKALA, H.; LOTHAN, R.; BHANUVALLI, S. R.; ULAGANATHAN, V.; TIRU, V.; SIVASUBRAMANIAN, A.; NAGARAJAN, S. Ferulic acid derivative inhibits NorA efflux and in combination with ciprofloxacin curtails growth of MRSA *in vitro and in vivo*. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, p. 54–62, 2018.
- TASCINI, C.; ATTANASIO, V.; RIPA, M.; CAROZZA, A.; PALLOTTO, C.; BERNARDO, M.; FRANCISCI, D.; OLTOLINI, C.; PALMIERO, G.; SCARPELLINI, P. Ceftobiprole for the treatment of infective endocarditis: a case series. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 20, p. 56-59, 2020.

TINTINO, S. R.; OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M.; FABIA, F.; CAMPINA, F. F.; SILVA, R. L.; COSTA, M. S.; MENEZES, I. R.; CALIXTO-JÚNIOR, J. T.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; COUTINHO, H. D.; LEAL-BALBINO, T. C.; BALBINO, V. Q. Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 97, p. 9–13, 2016.

TONG, S. Y. C.; DAVIS, J. S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T. L.; FOWLER, V. G. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603-61, 2015.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 28, p. 455–461, 2010.

VAN HOEK, A. H. A. M.; MEVIUS, D.; GUERRA, B.; MULLANY, P.; ROBERTS, A. P.; AARTS, H. J. M. Acquired antibiotic resistance genes: An overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 203, 2011.

VARGIU, A. V.; NIKAIDO, H. Multidrug binding properties of the AcrB efflux pump characterized by molecular dynamics simulations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 50, p. 20637-20642, 2012.

VERRAES, C.; VAN BOXSTAEL, S.; VAN MEERVENNE, E.; VAN COILLIE, E.; BUTAYE, P.; CATRY, B.; DE SCHAETZEN, M-A. VAN HUFFEL, X.; IMBERECHTS, H.; DIERICK, K.; DAUBE, G.; SAEGERMAN, C.; DE BLOCK, J.; DEWULF, J.; HERMAN, L. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. **International Journal of Environmental Research Public Health**, v. 10, p. 2643–2669, 2013.

WELTE, T.; KANTECKI, M.; STONE, G. G.; HAMMOND, J. Ceftaroline fosamil as a potential treatment option for *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia in adults. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 54 n. 4, p. 410–422, 2019.

WANG, S.; SUN, K.; LIU, T.; GIBBONS, S.; ZANG, W.; QING, M. Flavonoids from *Sophora moorcroftiana* and their Synergistic Antibacterial Effects on MRSA. **Phytotherapy Research**, v.28, n. 7, p.1071–1076, 2014.

WANG, S.; YAO, J.; ZHOU, B.; YANG, J.; CHAUDRY, M. T.; WANG, M.; XIAO, F.; LI, Y.; YIN, W. Bacteriostatic Effect of Quercetin as an Antibiotic Alternative *In Vivo* and Its Antibacterial Mechanism *In Vitro*. **Journal of Food Protection**, v. 8, n. 1, p. 68-78, 2018.

WANG, Y.; LUPALA, C. S.; LIU, H.; LIN, X. Identification of Drug Binding Sites and Action Mechanisms with Molecular Dynamics Simulations. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 27, p. 2268–2277, 2018.

WASSENAAR, T. M.; USSERY, D.; NIELSEN, L. N.; INGMER, H. Review and phylogenetic analysis of qac genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus species*. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 5, n. 1, p. 44-61, 2015.

WICZKOWSKI, W.; ROMASZKO, J.; BUCINSKI, A.; SZAWARA-NOWAK, D.; HONKE, J.; ZIELINSKI, H.; PISKULA, M. K. Quercetin from shallots (*Allium cepa* L. var.

aggregatum) is more bioavailable than its glucosides. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 5, p. 885-888, 2008.

WOJTYCZKA, R. D.; DZIEDZIC, A.; IDZIK, D.; KEPA, M.; KUBINA, R.; KABAŁA-DZIK, A.; SMOLEŃ-DZIRBA, J.; STOJKO, J.; SAJEWICZ, M.; WAŚSIK, T. J. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* clinical isolates to propolis extract alone or in combination with antimicrobial drugs. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9623–9640, 2013.

YANG, D.; WANG, T.; LONG, M.; LI, P. Quercetin: Its Main Pharmacological Activity and Potential Application in Clinical Medicine. **Oxidative Medicine Cellular Longevity**. 2020.

YILMAZ, E. Ş.; ASLANTAŞ, Ö. Antimicrobial resistance and underlying mechanisms in *Staphylococcus aureus* isolates, **Asian Pacific Journal Tropical Medicine**, v. 10, n. 11, 2017, p. 1059–1064.

YU, Z.; CAI, Y.; QIN, W.; LIN, J.; QIU, J. Polymyxin e induces rapid *paenibacillus polymyxa* death by damaging cell membrane while Ca²⁺ can protect cells from damage. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, 2015.

ZACCHINO, S. A.; BUTASSI, E.; LIBERTO, M. D.; RAIMONDI, M.; POSTIGO, A.; SORTINO, M. Plant phenolics and terpenoids as adjuvants of antibacterial and antifungal drugs. **Phytomedicine**, v. 15, p. 27–48, 2017.

ZEOUK, I.; OUEDRHIRI, W.; SIFAOU, I.; BAZZOCCHI, I. L.; PIÑERO, J. E.; JIMÉNEZ, I. A.; LORENZO-MORALES, J.; BEKHTI, K. Bioguided Isolation of Active Compounds from *Rhamnus alaternus* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Panton-Valentine Leucocidin Positive Strains (MSSA-PVL). **Molecules**, v. 26, p. 4352, 2021.

ZHANG, H.; TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and antiinflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 33–42, 2016.

7.1 APÊNDICES

7.1.2 Metodologia estendida (METHODX)

- ❖ Testes microbiológicos
- Substâncias

Para o andamento do estudo, foram adquiridas da Sigma-Aldrich Co. Ltd. (San Luis, Missouri, EUA) as seguintes substâncias: os antibióticos (eritromicina, norfloxacino e tetraciclina), cianeto de carbonilo m-clorofenil hidrazona - CCCP, brometo de etídio (EtBr), e pirogalol. A Clorpromazina (CPMZ) foi adquirida da Aché (Guarulhos, São Paulo, Brasil).

Os meios de cultura utilizados foram: *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco, Detroit, Michigan, EUA) e *Brain Heart Infusion* (BHI, KASVI - Produtos e Equipamentos de Laboratório, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil). Todos foram preparados na concentração a 10 %.

- Estirpes

Nos testes foram utilizadas as seguintes linhagens de *S. aureus*: RN-4220 possuindo o plasmídeo pUL5054 (bomba de efluxo MsrA); IS-58, dotado com o plasmídeo PT181 portador do gene da proteína efluxo TetK, resistente a tetraciclina; SA-1199B resistente à tensão de fluoroquinolonas hidrofílicas via proteína de efluxo NorA e a cepa selvagem SA-1199. As linhagens foram doadas pelo Professor S. Gibbons (Universidade de Londres). Todas foram inicialmente mantidas em ágar sangue para confirmar seus respectivos tipos (Laboratórios Difco Ltda., Brasil) e depois transferidas e mantidas em dois estoques, um em Agar Infusão Cardíaca (HIA, Difco, Detroit, Michigan, EUA) a 4 °C e outra em glicerol a -80 °C.

- Preparação de substâncias

Os antibióticos foram usados de forma específica para as bombas de cada linhagem: eritromicina para a bomba MsrA (RN4220); tetraciclina para a bomba TetK (IS-58); e norfloxacino para a bomba NorA (1199B) e para a cepa do tipo selvagem (1199). Os

antibióticos, a quercetina e o pirogalol, foram diluídos em 0,5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) e depois em água estéril. A clorpromazina (CPMZ) e o brometo de etídio (EtBr) foram dissolvidos em água estéril destilada, enquanto o Cianeto de Carbonila m-Clorofenil-Hidrazona (CCCP) foi dissolvido em metanol/água. Todas as substâncias foram concentradas a 1024 µg/mL, armazenadas a -20 °C e protegidas da luz.

- Preparação e padronização de inóculos

Os inóculos foram preparados utilizando a metodologia padrão definida pelo CLSI (2015). As bactérias foram cultivadas em meio sólido *Heart Infusion Agar slants* e mantidos em 37 °C por 24 horas. Em seguida, o inóculo foi preparado utilizando tubos de ensaio com solução salina estéril de acordo com a escala 0,5 Mcfarland correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC (*Colony Forming Units*).

- Ensaios de concentração inibitória mínima (CIM)

Na realização dos testes de concentração inibitória mínima com pirogalol, quercetina, brometo de etídio, inibidores padrões (clorpromazina e CCCP) e antibióticos, foi seguida a metodologia proposta por Javadpour et al. (1996) com modificações. Os microtubos do tipo Eppendorf foram preparados com 900 µL de meio de cultura líquido BHI e 100 µL de inóculo bacteriano, resultando em um volume final de 1 mL. As placas de microdiluição foram então preenchidas horizontalmente com 100 µL da solução final até que a última fila fosse alcançada. Os compostos foram então microdiluídos (100 µL) até a penúltima linha, com a última linha correspondendo ao controle de crescimento. As concentrações variavam de 512 µg/mL a 8 µg/mL. As placas foram incubadas em uma estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas, com leituras sendo realizadas através da verificação da mudança de cor do meio onde o azul corresponde à ausência de crescimento, e o vermelho à presença de crescimento bacteriano, através da adição de 20 µL de Resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-um 10-óxido) (CLSI, 2015).

- Inibição da bomba de efluxo pela redução da CIM do antibiótico e do brometo de etídio (EtBr)

Os antibióticos, os inibidores e brometo de etídio foram testados em associação com pirogalol e a quercetina em concentrações subinibitórias (CIM/8), o que significa que o valor do CIM foi dividido por oito. Isto é feito para avaliar o efeito da inibição da bomba de efluxo, seguindo o método desenvolvido por Tintino et al. [27]. Os inibidores CCCP e Clorpromazina, são utilizados para evidenciar a presença do mecanismo de bomba de efluxo. Os microtubos do tipo Eppendorf foram preenchidos com 160 μ L do inóculo, com as substâncias mencionadas anteriormente em concentrações subinibitórias e complementados com BHI para atingir um volume de 1,6 mL. Ao preparar o controle de modificação, 160 μ L do inóculo foram adicionados em 1.440 μ L de BHI. As placas de microdiluição foram preenchidas, com as linhas G e H correspondentes aos controles de crescimento microbiano. Os controles de esterilidade foram preparados em placas separadas. Em seguida, foi realizada a microdiluição com o antibiótico ou brometo de etídio (100 μ L). Finalmente, após 24 h, as placas foram lidas como descrito anteriormente.

- Análise estatística dos resultados microbiológicos

Os testes antibacterianos foram feitos em triplicata. Os resultados foram expressos como a média das réplicas e apresentados como a média geométrica. A análise estatística de hipóteses foi aplicada usando uma ANOVA bidirecional, em seguida foi realizado o teste pós-hoc de Bonferroni usando o software GraphPad Prism 7.0. Os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos.

❖ Ensaios de Docagem Molecular com a bomba de efluxo NorA

- Previsão da estrutura NorA 3D e identificação de potenciais bolsas de encadernação de efluxo

No presente estudo, foram obtidas no formato FASTA através dos recursos do NCBI, a sequência proteica para NorA e todas as outras proteínas similares (PDB ID: 1PV4, 1PV7, 3WDO, 2GFP). A identidade sequencial de todas as proteínas e a sequência NorA foi de 6,89

%, 5,87 %, 14,80 % e 3,47 % de identidade, respectivamente. Foi obtida usando MODELLER 9,17v (WEBB; SALI, 2014) encontrada no servidor ModWeb (<https://modbase.compbio.ucsf.edu/modweb/>) utilizando a estrutura cristalográfica do YajR, a previsão dos segmentos transmembrana da sequência NorA.

O transportador de *Escherichia coli* [PDB ID: 3WDO] foi utilizado como modelo. A estrutura de forma final foi reconhecida usando o programa PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1993) em Ramachandran Plot. A estrutura proteica NorA modelada por homologia de solvente implícita no programa Quimera usando AMBER 8 (PETTERSEN *et al.*, 2004) campo de força ff99. A topografia estrutural dos bolsos e cavidades pode ser promovida pelo servidor CASTP (<http://cast.engr.uic.edu>) com um valor padrão de 1,4 Angstroms do raio da sonda. Foram utilizados inibidores potenciais NorA através da identificação dos principais resíduos responsáveis pelas interações de ligação, para obter uma melhor compreensão da base molecular das afinidades de ligação da NorA (DUNDAS *et al.*, 2006). Compostos com boas pontuações de acoplamento foram identificados como compostos afetados pela atividade inibitória da NorA.

- Estudos de acoplamento de receptores NorA em sua estrutura 3D prevista

Para os cálculos da docagem, foi utilizado o DockingServer (BIKADI *et al.*, 2009). As cargas parciais de Gasteiger foram adicionadas aos átomos de ligante. Os átomos de hidrogênio não-polares foram misturados e os vínculos rotativos foram definidos. Foram feitos cálculos sobre o modelo de proteína com conteúdo de quercetina. Com a ajuda das ferramentas AutoDock, os átomos essenciais de hidrogênio, as cargas do tipo átomo Kollman e a solvatação parâmetros foram adicionados. A grade de mapas de afinidade de pontos de 0,5 Å e espaçamento de 0,375 Å foram gerados usando o programa Autogrid (MORRIS *et al.*, 1998). No cálculo de Van der Waals e nos termos eletrostáticos, foram utilizadas as funções de set-parameter e dielétrico dependente da distância da AutoDock, respectivamente. As simulações de acoplamento foram realizadas utilizando o algoritmo genético Lamarckiano (LGA) e o método de busca local Solis e Wets. (1981). A definição da posição inicial, orientação e torções das moléculas de ligante foram aleatórias. Todas as torções rotativas foram liberadas durante a acoplamento. Cada experiência de acoplamento foi derivada de 10 corridas diferentes que foram definidas para terminar após um máximo de 250.000 classificações de potência. O tamanho da população foi ajustado para 150. Durante o teste, foram aplicados um passo translacional de 0,2 Å e passos de torção de 5.

❖ Testes de Dinâmica Molecular

- Efeito *in silico* sobre a membrana bacteriana

Para entender as interações do pirogalol com um modelo de membrana externa de bactérias em detalhe atômico, uma simulação de 700 ns de Dinâmica Molecular (DM) também foi realizada. Estudos realizados anteriormente demonstraram a capacidade da DM de investigar as interações de drogas e outras substâncias com membranas bacterianas (BURTON *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2017 TINTINO *et al.*, 2020).

O bico lipídico de POPG (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-(phospho-rac-(1 glicerol)) foi construído usando 512 unidades do modelo (KUKOL, 2009). O balanceamento da membrana foi realizado usando o protocolo descrito anteriormente (DA HORA *et al.*, 2016). 130 moléculas do pirogalol foram distribuídas aleatoriamente em torno de 3,5 Å acima da superfície da membrana para reproduzir a concentração experimental da CEPA IS-58. Os parâmetros do pirogalol para o campo de força GROMOS 54A7 (SCHMID *et al.*, 2011) foram adquiridos do Automated Topology Builder (ATB) Repository 3.0 (STROET *et al.*, 2018). O modelo de carga de ponto simples de solvente explícito (SPC) (HERMANS *et al.*, 1984) foi usado para hidratar o sistema e íons de sódio Na⁺ foram adicionados para neutralizar a carga líquida da caixa. Um passo de tempo de 2 fs foi empregado durante as fases de equilíbrio e produção, depois de minimizar principalmente a energia do sistema em mais de 5000 passos. Durante toda a simulação, a pressão foi mantida constante a 1,0 bar usando o termostato Berendsen (BERENDSEN *et al.*, 1984) com acoplamento semi-isótropo a cada 0,1 ps. A temperatura foi ajustada para 298 K e foi controlada com uma constante de tempo de 0,2 ps e um termostato em escala V (BUSSI *et al.*, 2007) com componentes acoplados independentemente. Condições de limite periódicas foram aplicadas em todas as direções e as interações de longo alcance de Van Der Waals foram manipuladas usando o corte Verlet de 1,2 nm. As interações eletrostáticas de longo alcance foram passaram por tratamento usando o método Particle-Mesh Ewald (constante dielétrica de 66) (DARDEN *et al.*, 1993).

Foram examinados os perfis de densidade parcial do sistema, área por grupo de cabeça lipídica, parâmetros de ordem de deutério e contatos nativos dependentes do tempo. Este último passo foi feito com a ajuda de um roteiro interno baseado no pacote MDAnalysis python (MICHAUD-AGRAWAL *et al.*, 2011; GOWERS *et al.*, 2016). O software GROMACS 2019.4 foi usado para todas as outras análises e simulações (ABRAHAM *et al.*, 2015; 2019). Para visualizar e gerar imagens de coordenadas e trajetórias de moléculas, o VMD 1.9.3 foi utilizado (HUMPHREY *et al.*, 1996).

Referências (Metodex):

ABRAHAM, M. J.; MURTOLA, T.; SCHULZ, R.; PÁLL, S.; SMITH, J. C.; HESS, B.; LINDAHL, E. Gromacs: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers. **SoftwareX**, v. 1, n. 2, p. 19-25, 2015.

ABRAHAM, M. J.; VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B. **GROMACS development team, T. GROMACS User Manual version** (2019).

BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; VAN GUNSTEREN, W. F.; DINOLA, A.; HAAK, J. R. Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. **The Journal Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684, 1984.

BIKADI, Z.; HAZAI, E. Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock. **Journal of Cheminformatics**, v. 1, p. 1–16, 2009.

BURTON, M. G.; HUANG, Q. M.; HOSSAIN, M.; WADE, J. D.; CLAYTON, A. H.; GEE, M. L. Long-Time-Scale Interaction Dynamics between a Model Antimicrobial Peptide and Giant Unilamellar Vesicles. **Langmuir**, v. 29, n. 47, p. 14613-14621, 2013.

BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical Sampling through Velocity Rescaling. **The Journal Chemical Physics**, v. 126, n. 1, p. 014101, 2007.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement Clinical and Laboratory Standards Institute**. [S. l.: s. n.]. v. 35, n. 3, 2015.

DA HORA, G. C. A.; ARCHILHA, N. L.; LOPES, J. L. S.; MÜLLER, D. M.; COUTINHO, K.; ITRI, R.; SOARES, T. A. Membrane Negative Curvature Induced by a Hybrid Peptide from Pediocin PA-1 and Plantaricin 149 as Revealed by Atomistic Molecular Dynamics Simulations. **Soft Matter**, v. 12, n. 43, p. 8884-8898, 2016.

DUNDAS, J.; OUYANG, Z.; TSENG, J.; BINKOWSKI, A.; TURPAZ, Y.; LIANG, J. CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Research*, v. 34, p. 116–118, 2006.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle Mesh Ewald: An N·log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. **The Journal Chemical Physics**, p. 98 n. 12, p. 10089, 1993.

GOWERS, R.; LINKE, M.; BARNOUD, J.; REDDY, T.; MELO, M.; SEYLER, S.; DOMAŃSKI, J.; DOTSON, D.; BUCHOUX, S.; KENNEY, I.; BECKSTEIN, O. MDAnalysis: A Python Package for the Rapid Analysis of Molecular Dynamics Simulations. **In Proceedings of the 15th Python in Science Conference**. p. 98-105, 2016.

HERMANS, J.; BERENDSEN, H. J. C.; VAN GUNSTEREN, W. F.; POSTMA, J. P. M. A. Consistent Empirical Potential for Water-Protein Interactions, **Biopolymers**, v. 23, n. 8, p. 1513-1518, 1984.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD visual Molecular Dynamics. **Journal of Molecular Graphics and modelling**, v. 14, p. 33-38, 1996.

JAVADPOUR, M. M.; LO, W. C. J.; BISHOP, S. M.; ALBERTY, J. B.; COWELL, S. M.; BECKER, C. L.; McLAUGHLIN, M. A., De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 3107-3113, 1996.

KUKOL, A. Lipid Models for United-Atom Molecular Dynamics Simulations of Proteins. **Journal Chemical Theory and Computation**, v. 5, n. 3, p. 615-626, 2009.

LASKOWSKI, M. W.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, p. 283-291, 1993.

MICHAUD-AGRAWAL, N.; DENNING, E. J.; WOOLF, T. B.; BECKSTEIN, O. MDAnalysis: A Toolkit for the Analysis of Molecular Dynamics Simulations, **The Journal Chemical Physics**, v. 32, p. 10, p. 2319-2327, 2011.

MORRIS, G. M.; GOODSSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal Computational Chemistry**, v. 19, p. 1639-1662, 1998.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF chimera- a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal Computational Chemistry**, v.25, p. 1605-1612, 2004.

SCHMID, N.; EICHENBERGER, A. P.; CHOUTKO, A.; RINIKER, S.; WINGER, M.; MARK, A. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. Definition and Testing of the GROMOS Force-Field Versions 54A7 and 54B7. **European Biophysics Journal**, v. 40, n. 7, p. 843-856, 2011.

SILVA, L. N.; DA HORA, G. C. A.; SOARES, T. A.; BOJER, M. S.; INGMER, H.; MACEDO, A. J.; TRENTIN, D. S. Myricetin Protects *Galleria Mellonella* against *Staphylococcus aureus* Infection and Inhibits Multiple Virulence Factors. **Scientific Reports**, v. 7, n.1, p. 2823, 2017.

SOLIS, F. J.; WETS, R.J-B. Minimization by random search technique. **Mathematics of Operations Research**, v. 6, p. 19-30, 1981.

STROET, M.; CARON, B.; VISSCHER, K. M.; GEERKE, D. P.; MALDE, A. K.; MARK, A. E. Automated Topology Builder Version 3.0: Prediction of Solvation Free Enthalpies in Water and Hexane. **Journal Chemical Theory and Computation**, v. 14, n. 11, p. 5834-5845, 2018.

TINTINO, S. R.; SOUZA, V.C.A.; SILVA, J. M. A.; OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M.; PEREIRA, P. S.; LEAL-BALBINO, T. C.; PEREIRA-NEVES, A.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; MENEZES, I. R. A.; DA HORA, G. C.A.; LIMA, M. C. P.; COUTINHO, H. D. M.; BALBINO, V. Q. Effect of Vitamin K3 Inhibiting the Function of NorA Efflux Pump and Its Gene Expression on *Staphylococcus aureus*. **Membranes**, v. 10, n. 6, p. 130, 2020.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 8, p. 1-32, 2014.

7.2 ANEXO

7.2.1 Produção científica vinculada ao doutorado

- Primeiro artigo

- Enhancement of the antibiotic activity by quercetin against *Staphylococcus aureus* efflux pumps.

Journal of Bioenergetics and Biomembranes (2021) 53:157–167. (Springer)

<https://doi.org/10.1007/s10863-021-09886-4>

Journal of Bioenergetics and Biomembranes (2021) 53:157–167
<https://doi.org/10.1007/s10863-021-09886-4>



Enhancement of the antibiotic activity by quercetin against *Staphylococcus aureus* efflux pumps

Joycy F. S. dos Santos¹ · Saulo R. Tintino² · Ana R. P. da Silva² · Cristina R. dos S. Barbosa¹ · Jackelyne R. Scherf¹ · Zildene de S. Silveira¹ · Thiago S. de Freitas² · Luiz J. de Lacerda Neto¹ · Luiz M. Barros¹ · Irwin Rose de A. Menezes³ · Henrique D.M. Coutinho^{2,4} · José P. Siqueira-Júnior⁵ · Francisco A.B. Cunha¹

- Segundo artigo

- Indirect inhibitory activity of pyrogallol Against the Tet(K) efflux pump by a membrane effect: *in vitro* and *in silico* approach.

Process Biochemistry (2021) 17: 138-144. (Elsevier)

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.05.019>



Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

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



Indirect inhibitory activity of pyrogallol against the Tet(K) efflux pump by a membrane effect: *In vitro* and *in silico* approach

Joycy F.S. dos Santos^a, Nair S. Macêdo^b, Dárcio L. de Sousa Júnior^a, Cristina R.B. dos Santos^a, Saulo R. Tintino^c, Gabriel C.A. da Hora^d, Maria C.P. Lima^e, Henrique D.M. Coutinho^{c,*}, Francisco A.B. da Cunha^a

7.2.2 Produção científica não vinculada ao doutorado

- Cytoprotective effect of *Eugenia uniflora* L. Against the waste contaminant mercury chloride.

Arabian Journal of Chemistry (2019)

<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.04.018>



ORIGINAL ARTICLE

Cytoprotective effect of *Eugenia uniflora* L. against the waste contaminant mercury chloride

Francisco A.B. Cunha^{a,b}, Antonio I. Pinho^{a,b}, Joycy F.S. Santos^a,
Celestina E. Sobral-Souza^c, Rosimeire S. Albuquerque^c, Edinaldo F.F. Matias^c,
Nadghia F. Leite^c, Saulo R. Tintino^c, José G.M. Costa^c, Aline A. Boligon^b,
Emily P. Waczuk^b, João B.T. Rocha^b, Thais Posser^b, Henrique D.M. Coutinho^{c,*},
Lucindo J. Quintans-Júnior^d, Jeferson L. Franco^b

- Evaluation of the Antibacterial Activity and Efflux Pump Reversal of Thymol and Carvacrol Against *Staphylococcus aureus* and Their Toxicity in













Drosophila melanogaster.

Molecules (2020) 25: 2103.

<https://doi:10.3390/molecules25092103>

Article

Evaluation of the Antibacterial Activity and Efflux Pump Reversal of Thymol and Carvacrol against *Staphylococcus aureus* and Their Toxicity in *Drosophila melanogaster*

Zildene de Sousa Silveira ^{1,2}, Nair Silva Macêdo ^{1,2}, Joycy Francely Sampaio dos Santos ¹,
Thiago Sampaio de Freitas ³, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa ³,
Dárcio Luiz de Sousa Júnior ¹, Débora Feitosa Muniz ³, Lígia Claudia Castro de Oliveira ¹,
José Pinto Siqueira Júnior ⁴, Francisco Assis Bezerra da Cunha ¹,
Henrique Douglas Melo Coutinho ^{3,*}, Valdir Queiroz Balbino ² and Natália Martins ^{5,6,*}

- Effect of Carvacrol and Thymol on NorA efflux pump inhibition in multidrug-resistant (MDR) *Staphylococcus aureus* strains.

Journal of Bioenergetics and Biomembranes (2021) 53:489–498.

<https://doi.org/10.1007/s10863-021-09906-3>

Journal of Bioenergetics and Biomembranes (2021) 53:489–498
<https://doi.org/10.1007/s10863-021-09906-3>



Effect of Carvacrol and Thymol on NorA efflux pump inhibition in multidrug-resistant (MDR) *Staphylococcus aureus* strains

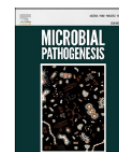
Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa¹ · Jackelyne Roberta Scherf¹ · Thiago Sampaio de Freitas² · Irwin Rose Alencar de Menezes³ · Raimundo Luiz Silva Pereira² · Joycy Francely Sampaio dos Santos¹ · Sarah Silva Patrício de Jesus¹ · Thais Pereira Lopes¹ · Zildene de Sousa Silveira¹ · Cícera Datiane de Morais Oliveira-Tintino⁶ · José Pinto Siqueira Júnior⁵ · Henrique Douglas Melo Coutinho⁴ · Saulo Relison Tintino⁴ · Francisco Assis Bezerra da Cunha¹

Received: 3 May 2021 / Accepted: 14 June 2021 / Published online: 22 June 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

- Evaluation of isoeugenol in inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps and their toxicity using *Drosophila melanogaster* model.

Life Sciences (2021) 285: 119940.

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119940>



Antibacterial activity of eugenol on the IS-58 strain of *Staphylococcus aureus* resistant to tetracycline and toxicity in *Drosophila melanogaster*

Suieny Rodrigues Bezerra^a, Antonio Henrique Bezerra^a, Zildene de Sousa Silveira^{a,b}, Nair Silva Macedo^{a,b}, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa^{a,c}, Debora Feitosa Muniz^d, Joycy Francely Sampaio dos Santos^{a,c}, Henrique Douglas Melo Coutinho^{c,d,*}, Francisco Assis Bezerra da Cunha^{a,c}

^a Laboratory of Bioprospecting in the Semi-Arid and Alternative Methods (LABSEMA), Regional University of Cariri - URCA, Crato, 63105-000, CE, Brazil

^b Biological Sciences Pos Graduate Program - PPGCB, Federal University of Pernambuco - UFPE, Recife, 50670-901, PE, Brazil

^c Biological Chemistry Pos Graduate Program, Regional University of Cariri - URCA, Crato, 63105-000, CE, Brazil

^d Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Regional University of Cariri - URCA, Crato, 63105-000, CE, Brazil

- HPLC – DAD analysis and antimicrobial activities of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae).

3 Biotech. (2022) 12(3): 61.

<https://doi.org/10.1007/s13205-022-03126-1>

3 Biotech (2022) 12:61
<https://doi.org/10.1007/s13205-022-03126-1>

ORIGINAL ARTICLE



HPLC–DAD analysis and antimicrobial activities of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae)

Maria Audilene de Freitas¹ · Rafael Pereira da Cruz² · Antonia Thassya Lucas dos Santos² · José Weverton Almeida-Bezerra² · Antonio Júdson Targino Machado² · Joycy Francely Sampaio dos Santos² · Janaina Esmeraldo Rocha² · Aline Augusti Boligon³ · Camila Fonseca Bezerra¹ · Thiago Sampaio de Freitas² · Maria Karollyna do Nascimento Silva² · Ana Cleide Alcântara Moraes Mendonça² · José Galberto Martins da Costa² · Henrique Douglas Melo Coutinho² · Francisco Assis Bezerra da Cunha² · Jaime Ribeiro Filho⁴ · Maria Flaviana Bezerra Moraes-Braga²

Received: 15 March 2021 / Accepted: 23 January 2022
 © King Abdulaziz City for Science and Technology 2022

- Evaluation of isoeugenol in inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps and their toxicity using *Drosophila melanogaster* model Microbial Pathogenesis.

Life Sciences 285 (2021) 119940.



Evaluation of isoeugenol in inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps and their toxicity using *Drosophila melanogaster* model

Dárcio Luiz de Sousa Júnior^a, Paula Patrícia Marques Cordeiro^a,
Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa^a, Débora Feitosa Muniz^b, Zildene de Sousa Silveira^c,
Nair Silva Macêdo^c, Luiz Jardelino de Lacerda Neto^a, Thiago Sampaio de Freitas^d,
Joycy Francely Sampaio dos Santos^a, Henrique Douglas Melo Coutinho^{b,*},
Lígia Cláudia Castro de Oliveira^a, Francisco Assis Bezerra da Cunha^a

^a Semiárid Bioprospecting Laboratory, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, Ceará, Brazil

^b Microbiology and Molecular Biology Laboratory, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, Ceará, Brazil

^c Graduate Program in Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

^d Simulation and Molecular Spectroscopy Laboratory, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, Ceará, Brazil

➤ Antibacterial Activity of the Pyrogallol against *Staphylococcus aureus* Evaluated by Optical Image.

Biologics 2022, 2(2), 139-150.

<https://doi.org/10.3390/biologics2020011>



Article

Antibacterial Activity of the Pyrogallol against *Staphylococcus aureus* Evaluated by Optical Image

Lígia C. C. Oliveira¹, Francisco A. A. Rodrigues², Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa³,
Joycy Francely Sampaio dos Santos³, Nair Silva Macêdo⁴, Zildene de Sousa Silveira⁴,
Henrique Douglas Melo Coutinho^{1,*} and Francisco Assis Bezerra da Cunha³

¹ Laboratory of Spectroanalytical, Biological and Environmental Chemistry—LEQBA, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato 63105-000, Brazil; ligiaclaudia@yahoo.com.br

² Science and Technology Center, Universidade Federal do Cariri—UFCA, Juazeiro do Norte 63048-080, Brazil; alixandre.avila@ufca.edu.br

³ Laboratory of Bioprospection of Semiárid and Alternative Methods—LABSEMA, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato 63105-000, Brazil; cristina.rodrigues@urca.br (C.R.d.S.B.); joycy.sampaio22@gmail.com (J.F.S.d.S.); cunha.urca@gmail.com (F.A.B.d.C.)

⁴ Graduate Program in Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife 50670-901, Brazil; naiirmacedo@gmail.com (N.S.M.); zildenesousa15@gmail.com (Z.d.S.S.)

* Correspondence: hdmcoutinho@urca.br