



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

ISYDÓRIO ALVES DONATO

**SÍNTESE QUÍMICA, ESTUDOS *in silico* E *in vitro* PARA AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE AMINOCHALCONAS EM CEPAS DE
Staphylococcus aureus PORTADORAS DE BOMBA DE EFLUXO**

Crato - CE

2025



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

ISYDÓRIO ALVES DONATO

SÍNTESE QUÍMICA, ESTUDOS *in silico* E *in vitro* PARA AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE AMINOCHALCONAS EM CEPAS DE
***Staphylococcus aureus* PORTADORAS DE BOMBA DE EFLUXO**

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

Orientador: Francisco Assis Bezerra da Cunha
Coorientador: Saulo Relison Tintino

Crato – CE

2025

ISYDÓRIO ALVES DONATO

**SÍNTESE QUÍMICA, ESTUDOS *in silico* E *in vitro* PARA AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE CHALCONAS EM CEPAS PORTADORAS DE
BOMBA DE EFLUXO**

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

Relatório de Tese defendida e aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha
Orientador - (URCA).

Profa. Dra. Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga
Membro Titular Interno – (URCA)

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
Membro Titular Interno – (URCA)

Profa. Dra. Roseli Barbosa
Membro Suplente Interno – (URCA)

Prof. Dr. Francisco Nascimento Pereira Júnior
Membro Titular Externo - (UFCA)

Profa. Dra. Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino
Membro Titular Externo ao PPQB – (URCA)

Profa. Dra. Priscilla Ramos Freitas Alexandre
Membro Suplente Externo ao PPQB - (URCA)

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus Pai por me conceder o dom da vida, prover-me com saúde e com o conhecimento necessário para a realização deste trabalho, mesmo sendo de uma área diferente.

Expresso minha gratidão ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica (PPQB) da Universidade Regional do Cariri (URCA) e a todos os professores do programa pela dedicação e empenho na transmissão dos ensinamentos, pela paciência ao repetir explicações e pela adaptação das estratégias de ensino para garantir que todos os alunos compreendam os conceitos essenciais para a formação. Guardo com carinho as inúmeras ocasiões em que, por não ser da área, fiz muitas perguntas e fui gentilmente atendido por Henrique Douglas, Galberto, Raimundo, Roseli, Irwin, Flaviana, Hécio, Carlos Emídio, Diniz e Alexandre Magno.

Agradeço também aos coordenadores dos laboratórios, que permitiram o acesso às instalações para a realização dos ensaios, muitas vezes disponibilizando recursos escassos para viabilizar os testes.

Aos meus colegas do doutorado e dos laboratórios, minha sincera gratidão pela paciência, dedicação, parceria e suporte na execução dos ensaios, no esclarecimento de dúvidas (Cristina Rodrigues, Henrique, Suyane, Zildene de Sousa, Janaina Esmeraldo, Ana Carolina Ferreira, Nair Macêdo, Débora, Cícera Datiane, Isaac e Ray) e na síntese de chalconas (Francisco Rogênio).

Ao meu coorientador, Professor Dr. Saulo Relison Tintino, agradeço imensamente pelo engajamento no planejamento dos ensaios, pelas revisões textuais, pelo apoio e pela parceria na concepção dos resultados deste doutorado.

Minha gratidão profunda ao meu orientador, Professor Dr. Francisco de Assis Cunha, por incentivar meu ingresso no programa, auxiliar na elaboração das estratégias de estudo, disponibilizar os recursos necessários e, acima de tudo, por acreditar no meu potencial.

Durante minha trajetória no programa de pós-graduação, dediquei grande parte do meu tempo às aulas, ensaios laboratoriais, leituras, escrita e demais atividades acadêmicas. Esse tempo, muitas vezes, foi retirado do convívio com minha família, que sempre compreendeu os motivos e me apoiou incondicionalmente. Por isso, do fundo do coração, agradeço profundamente a Dayse Karine, Pedro e Alice.

Figura 0-1: Esquema da síntese da chalcona 4Cl.....	16
Figura 0-2: Diagrama com a organização geral da estrutura da tese.	17
Figura 0-1: Principais mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos.....	23
Figura 0-2: Principais superfamílias de bombas de efluxo.	24
Figura 0-3: Representação 3D da estrutura da bomba de efluxo NorA.	26
Figura 0-4: Representação 3D da estrutura da bomba de efluxo MepA.	27

Capítulo I

Figura I- 1: Avaliação da capacidade de inibir a bomba de efluxo NorA pelo CMA4DMA contra a cepa <i>S. aureus</i> 1199, em associação com Norfloxacin e EtBr.....	38
Figura I- 2: Avaliação da capacidade de inibir a bomba de efluxo NorA pelo CMA4DMA contra a cepa <i>S. aureus</i> 1199B, em associação com Norfloxacin e EtBr..	39
Figura I- 3: Avaliação da inibição da bomba de efluxo NorA pelo CMA4DMA nas concentrações de 200 µg/mL e 100 µg/mL..	40
Figura I- 4: Avaliação da ação do CMA4DMA sobre a permeabilidade da membrana.	41
Figura I- 5: Representação tridimensional do <i>docking</i>	42
Figura I- 6: Estrutura tridimensional da bomba de efluxo NorA da cepa <i>S. aureus</i> 1199B. ..	43
Figura I- 7: Alinhamento entre a permeabilidade e outros parâmetros.	45
Figura I- 8: Mapa de potencial de lipofilicidade molecular e outros parâmetros	47
Figura I- 9: Mapa de reatividade 2D e outros parâmetros	48
Figura I- 10: Estrutura da chalcona (2E)-1-(3'-aminofenil)-3-(4-dimetilaminofenil) prop-2-en-1-ona (CMA4DMA).....	54

Tabela I- 1: Concentração inibitória mínima (CIM) da Norfloxacin e do EtBr isoladamente e em combinação com CMA4DMA e CCCP, contra as cepas <i>S. aureus</i> 1199 e 1199B.....	39
Tabela I- 2: Percentual médio de fluorescência do EtBr para cada grupo..	40
Tabela I- 3: Percentual médio de fluorescência do SYTOX Green para cada grupo.....	41
Tabela I- 4: Dados das interações ligante–receptor observadas nas simulações de <i>docking</i> molecular entre a chalcona CMA4DMA e os ligantes de controle.	43
Tabela I- 5: Propriedades físico-químicas calculadas para CMA4DMA e aplicadas ao critério de estimativa quantitativa de “ <i>druglikeness</i> ” (QED) ¹	45
Tabela I- 6: Propriedades farmacocinéticas preditas do CMA4DMA por meio da abordagem multiplataforma de predição ADMET.....	47

Capítulo II

Figura II 1: Fórmula estrutura da (2E)-1-(3'-aminofenil)-3-(4-clorofenil)-prop-2-en-1-ona.	75
Figura II 2: Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de (MAAp-ClB).	76
Figura II 3: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz).....	76
Figura II 4: <i>Docking</i> da chalcona 4Cl com a proteína de efluxo NorA.	77
Figura II 5: Representação das interações moleculares entre a chalcona 4Cl e a proteína de efluxo NorA.....	77
Figura II 6: <i>Docking</i> da chalcona 4Cl com a proteína de efluxo MepA.....	78
Figura II 7: Representação das interações moleculares entre a chalcona 4Cl e a proteína de efluxo MepA.....	79
Figura II 8: Mapa radar (propriedades físico-químicas da Chalcona 4Cl).	80

Figura II 9: Avaliação da inibição da bomba de efluxo NorA pela Chalcona 4Cl contra a cepa <i>S. aureus</i> 1199.....	82
Figura II 10: Avaliação da inibição da bomba de efluxo NorA pela Chalcona 4-Cl contra a cepa <i>S. aureus</i> 1199B.	83
Figura I 11: Avaliação da inibição da bomba de efluxo MepA pela Chalcona 4-Cl contra a cepa <i>S. aureus</i> K2068..	83
Figura II 12: Avaliação da inibição das bombas de efluxo NorA e MepA pela Chalcona 4-Cl nas concentrações de 200 µg/mL e 100 µg/mL.....	84
Figura II 13: Avaliação da ação da Chalcona 4-Cl sobre a permeabilidade da membrana.. ..	85

Tabela II 1: Dados de RMN de ¹ H (500 MHz) e de ¹³ C (125 MHz) em (CDCl ₃), δ ppm, J/Hz.....	75
---	----

Apêndices e Anexos:

APÊNDICE A: Relatório completo da análise ADMET	1
ANEXO 1: Produções Científicas	11

Símbolo, sigla ou abreviatura	Significado
ABC	Família do cassete de ligação ao ATP
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
AME	Aminoglicosídeos
AMES	Parâmetro de risco para mutagenicidade
ARG	Arginina
ASN	Asparagina
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	Infusão sólida de cérebro e coração em ágar
CCCP	Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CPA4Cl	Chalcona 4Cl ((2E)-1-(3'-aminofenil)-3-(4-clorofenil)-prop-2-en-1-ona)
CMA4DMA	Chalcona (2E)-1-(3'-aminofenil)-3-(4-dimetilaminofenil) prop-2-en-1-ona
cryo-EM	Criomicroscopia eletrônica
DILI	Parâmetro ADMET (risco de lesão hepática induzida por drogas)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOAJ	Diretório de Revistas de Acesso Aberto
EA	Energia de Afinidade
EPM	Labirinto em cruz elevado
EPSs	<i>Extracellular Polymeric Substances</i>
EtBr	Brometo de etídio
Fabs	Fragmentos de anticorpos sintéticos
fChar	Parâmetro ADMET (proporção de moléculas que estão carregadas)
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLU	Ácido glutâmico
HBD	Doador de Ponte de Hidrogênio
HGT	Transferência horizontal de genes (<i>Horizontal Gene Transfer</i>)
HIA	Parâmetro ADMET (Absorção Intestinal Humana)

HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IBE/IBEs	Inibidores de bomba de efluxo (forma plural de IBEs)
ILE	Isoleucina
LEU	Leucina
logD	Parâmetro ADMET (distribuição)
LogP	Parâmetro ADMET (lipofilicidade)
logS	Parâmetro ADMET (solubilidade)
MATE	Extrusão de Compostos Tóxicos e Multidrogas
MDPI	Instituto Multidisciplinar de Publicação Digital
MET	Metionina
MFS	Facilitadores Principais
MIC	Concentração Mínima Inibitória
MLP	Parâmetro ADMET (Potencial de Lipofilicidade Molecular)
MMR	Sistema de reparo de incompatibilidades (<i>Mismatch Repair</i>)
MRSA	Multirresistentes de <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Espectrometria de massa
MW	Parâmetro ADMET (peso molecular)
NaOH	Hidróxido de sódio
NBDs	Domínios de ligação de nucleotídeos
nHA	Parâmetro ADMET (nº de pontes de hidrogênio)
nHD	Parâmetro ADMET (nº de doadores de pontes de hidrogênio)
nHet	Parâmetro ADMET (nº de heteroátomos)
nRig	Parâmetro ADMET (nº ligações em aneis)
nRing	Parâmetro ADMET (nº de aneis)
nRot	Parâmetro ADMET (nº de ligações rotacionais)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PACE	Efluxo de Composto Antimicrobiano Proteobacteriano
PAβN	Fenilalanina-arginina β-naftilamida
PBS	Parâmetro ADMET (Alta Ligação a Proteínas Plasmáticas)
PDB	Banco de dados de proteínas
P-gp	P-glicoproteína
PHE	Fenilalanina
PMF	Força motriz do próton
PVL	Leucocidina de Panton-Valentine

QQ	<i>Quorum quenching</i>
QS	<i>Quorum sensing</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMSD	Desvio Quadrático Médio
RND	Nodulação de Resistência e Divisão Celular
SD	Desvio padrão
SMILES	<i>Simplified Molecular Input Line Entry System</i>
SMR	Resistência a Multidroga Pequena
TLA	Acrônimo de três letras
TPSA	Parâmetro ADMET (Área de superfície polar topológica)
TYR	Tirosina
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitro
URCA	Universidade Regional do Cariri
VAL	Valina
VRE	Resistente à vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina
δ_C	Deslocamento do Carbono
δ_H	Deslocamento do Hidrogênio
ΔpH	Variação da acidez
$\Delta\Psi$	potencial de membrana

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1 ESTRATÉGIAS DE PESQUISA	14
1.2 ESTRUTURA DA TESE	17
2 OBJETIVOS	18
2.1. OBJETIVO GERAL	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1 CHALCONAS	19
3.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM BACTÉRIAS E O CENÁRIO ATUAL DA MULTIRRESISTÊNCIA	20
3.2.1 MECANISMO DE EFLUXO ATIVO EM BACTÉRIAS	23
3.2.1.1 Fontes de Energia no Transporte Ativo	24
3.3 INIBIDORES DE BOMBAS DE EFLUXO: MECANISMOS, APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS E DESAFIOS	28
3.4 <i>Staphylococcus aureus</i> : PATOGENICIDADE, RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E PAPEL DAS BOMBAS DE EFLUXO	31
4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA	34
CAPÍTULO I: Avaliação da atividade da aminochalcona contra cepas de <i>Staphylococcus</i> portadoras de bombas de efluxo	34
CAPÍTULO II: Síntese química e avaliação da atividade antibacteriana da chalcona CPA4Cl em cepas portadoras de bomba de efluxo	67
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
5.1 ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA	96
5.2 CONCLUSÕES GERAIS	96
5.3 PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS	98
6 REFERÊNCIAS	100
7 ANEXOS e APÊNDICES	1
APÊNDICE A: Relatório completo da análise ADMET	1
ANEXO 1: Produções Científicas	11

Síntese Química, Estudos *In Silico* e *In Vitro* para Avaliação da Atividade Antibacteriana de Chalconas em Cepas Portadoras de Bomba de Efluxo

Introdução: A resistência bacteriana aos antibióticos representa uma grave ameaça à saúde pública global, exigindo o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Este trabalho investigou o potencial de duas aminochalconas como inibidoras das bombas de efluxo NorA e MepA em cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* (MRSA). O estudo combinou abordagens *in silico* e *in vitro* para avaliar a síntese, interações moleculares, propriedades farmacocinéticas e eficácia antimicrobiana das chalconas. **Objetivo:** Avaliar o potencial das chalconas como inibidoras de bombas de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus* e sua capacidade de reverter a resistência antimicrobiana mediada por essas proteínas. **Metodologia:** As chalconas foram sintetizadas via condensação aldólica de Claisen-Schmidt e caracterizada por RMN de ^1H e ^{13}C e HPLC. Ensaios de *docking* molecular foram realizados para prever interações com as bombas NorA (PDB: 7LO7) e MepA (AlphaFold: Q2G140). As propriedades ADMET foram avaliadas para prever segurança e viabilidade terapêutica do composto. Testes *in vitro* incluíram determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), ensaios de modulação da resistência com antibióticos (norfloxacin e ciprofloxacina) e brometo de etídio (EtBr), além de avaliação da permeabilidade membranar com SYTOX Green. **Resultados e Discussões:** A chalcona 4Cl foi obtida com pureza de 99,9%, confirmada por técnicas espectroscópicas. O *docking* molecular revelou alta afinidade por resíduos críticos das bombas NorA (Glu222) e MepA (Tyr35, Asn39), com energias de ligação favoráveis. No entanto, análises ADMET indicaram alertas para cardiotoxicidade e mutagenicidade para a chalcona 4Cl. As aminochalconas não demonstraram atividade antibacteriana direta ($\text{CIM} \geq 1024 \mu\text{g/mL}$), mas reduziram significativamente a CIM de antibióticos em cepas resistentes (até 3 vezes para ciprofloxacina). Ensaios de fluorescência confirmaram sugerem das bombas de efluxo (aumento na retenção de EtBr para NorA) e alteração na permeabilidade membranar (aumento na fluorescência do SYTOX Green). **Conclusões:** As chalconas mostraram potencial como adjuvante terapêutico para reverter a resistência bacteriana mediada por bombas de efluxo, atuando sinergicamente com antibióticos. Contudo, o perfil toxicológico demanda otimizações estruturais para aplicação clínica. Estudos futuros devem focar em modificações moleculares para reduzir efeitos adversos e validar a eficácia *in vivo*.

Palavras-Chave: *Staphylococcus aureus*, chalconas, resistência bacteriana, bombas de efluxo, *docking* molecular, ADMET.

Chemical Synthesis, *In Silico* and *In Vitro* Studies to Evaluate the Antibacterial Activity of Chalcones in Efflux Pump-Harboring Strains

Introduction: Bacterial resistance to antibiotics represents a serious global public health threat, requiring the development of new therapeutic strategies. This study investigated the potential of two aminochalcones as inhibitors of the NorA and MepA efflux pumps in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. The research combined *in silico* and *in vitro* approaches to evaluate the synthesis, molecular interactions, pharmacokinetic properties, and antimicrobial efficacy of the chalcones. **Objective:** To assess the potential of chalcones as efflux pump inhibitors in *Staphylococcus aureus* strains and their ability to reverse antimicrobial resistance mediated by these proteins. **Methodology:** The chalcones were synthesized via Claisen–Schmidt aldol condensation and characterized by ^1H and ^{13}C NMR and HPLC. Molecular docking assays were performed to predict interactions with the NorA (PDB: 7LO7) and MepA (AlphaFold: Q2G140) pumps. ADMET properties were evaluated to predict compound safety and therapeutic feasibility. *In vitro* assays included determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), resistance modulation tests with antibiotics (norfloxacin and ciprofloxacin) and ethidium bromide (EtBr), as well as membrane permeability assessment using SYTOX Green. **Results and Discussion:** The 4Cl chalcone was obtained with 99.9% purity, confirmed by spectroscopic techniques. Molecular docking revealed high affinity for key residues of the NorA (Glu222) and MepA (Tyr35, Asn39) pumps, with favorable binding energies. However, ADMET analyses indicated potential cardiotoxicity and mutagenicity alerts for the 4Cl chalcone. The aminochalcones did not exhibit direct antibacterial activity ($\text{MIC} \geq 1024 \mu\text{g/mL}$) but significantly reduced the MIC of antibiotics in resistant strains (up to threefold for ciprofloxacin). Fluorescence assays confirmed efflux pump inhibition (increased EtBr retention for NorA) and changes in membrane permeability (increased SYTOX Green fluorescence). **Conclusions:** The chalcones demonstrated potential as therapeutic adjuvants to reverse efflux pump-mediated bacterial resistance, acting synergistically with antibiotics. However, their toxicological profile requires structural optimization for clinical application. Future studies should focus on molecular modifications to minimize adverse effects and validate *in vivo* efficacy.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, chalcones, bacterial resistance, efflux pumps, molecular docking, ADMET.

A resistência bacteriana representa uma ameaça crescente à saúde pública global, agravada pela escassez de novos antibióticos. Diante do desinteresse da indústria farmacêutica, a pesquisa acadêmica assume papel crucial na busca por compostos que restaurem a eficácia dos antimicrobianos existentes. Este estudo investigou duas aminochalconas com potencial para combater a resistência bacteriana, atuando especialmente sobre os mecanismos de resistência em cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* (MRSA). Por meio da síntese dos compostos, triagem computacional (*in silico*) e testes laboratoriais (*in vitro*), observou-se que eles podem atuar de forma sinérgica com antibióticos, sugerindo seu possível uso como coadjuvantes no tratamento de infecções resistentes a medicamentos. A relevância deste trabalho reside na contribuição para o avanço do conhecimento científico sobre compostos com potencial antimicrobiano, fornecendo subsídios para futuras pesquisas pré-clínicas e para o desenvolvimento de novas estratégias de combate à resistência bacteriana.

1.1 ESTRATÉGIAS DE PESQUISA

Esta pesquisa combinou abordagens computacionais e experimentais para investigar os efeitos de duas aminochalconas: 3-aminochalcona-4-clorobenzaldeído (CPA4Cl, denominada Chalcona 4Cl) e 3-aminoacetofenona 4-(dimetilamino)benzaldeído (CMA4DMA), sobre cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, com ênfase na inibição do mecanismo de resistência e mediado pelas proteínas de efluxo. Inicialmente, foi realizada uma triagem por *docking* molecular, com o objetivo de caracterizar a interação da molécula com essas bombas e prever seu potencial inibitório. Em seguida, análises ADMET foram conduzidas para avaliar o perfil farmacocinético e toxicológico das chalconas, visando à sua viabilidade terapêutica. Posteriormente, ensaios *in vitro* foram aplicados para validar a hipótese de reversão da resistência bacteriana, testando a eficácia sinérgica da chalcona em combinação com antibióticos frente a cepas multirresistentes. Cada uma dessas etapas é detalhada a seguir.

O *docking* molecular é uma ferramenta computacional de baixo custo amplamente utilizada no desenvolvimento de novos fármacos, permitindo reduzir significativamente o tempo necessário para a triagem de moléculas candidatas. Esta técnica baseia-se no princípio de que uma substância candidata (ligante) pode se ligar especificamente a um alvo molecular (receptor), formando um complexo estável (CHAUDHARY; TYAGI, 2024).

As proteínas de efluxo (receptores) analisadas neste estudo foram NorA e MepA. A estrutura da proteína NorA foi obtida a partir do RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) e determinada por criomicroscopia eletrônica (cryo-EM), utilizando a técnica de *single-particle analysis*, em complexo com fragmentos de anticorpos sintéticos (Fabs) (BRAWLEY et al., 2022). Já a estrutura da MepA foi obtida do banco de dados AlphaFold (JUMPER et al., 2021; VARADI et al., 2024), tendo sido originalmente caracterizada por Kaatz e colaboradores (2005).

A estrutura bidimensional das chalconas foram desenhadas e convertida para o formato tridimensional utilizando o software ChemAxon MarvinSketch (versão 22.2, licença acadêmica). Em seguida, a geometria molecular foi otimizada no UCSF Chimera (versão 1.15). A preparação dos receptores e dos ligantes foi realizada no AutoDockTools (versão 1.5.7), e as simulações de *docking* molecular foram conduzidas no AutoDock Vina (versão 1.2.7).

O posicionamento da *grid box* para as simulações foi definido com base em uma análise criteriosa da literatura científica, priorizando estudos prévios envolvendo as proteínas NorA

(BRAWLEY et al., 2022) e MepA (BENTO et al., 2024; DA SILVA et al., 2021; REZENDE-JÚNIOR et al., 2020; ROCHA et al., 2021). Essa análise permitiu identificar resíduos-chave envolvidos na interação com ligantes e correlacionar esses sítios com valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) previamente descritos.

As simulações geraram múltiplas conformações, que foram classificadas com base na energia livre de ligação. A conformação com menor energia foi selecionada para análise detalhada das interações, utilizando o BIOVIA Discovery Studio Visualizer (Dassault Systèmes®, versão 21.1.0.20298), com o objetivo de inferir a viabilidade dos testes subsequentes (DA SILVA et al., 2021).

A partir das estruturas das aminochalconas, gerada na etapa de *docking* molecular, obteve-se a sequência SMILES, usada como entrada para os cálculos das propriedades ADMET na plataforma ADMETLab 3.0 (<https://admetlab3.scbdd.com/server/evaluation>). Os parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos, incluindo solubilidade, permeabilidade, metabolismo e toxicidade, foram estimados por meio de modelos preditivos validados, sendo os resultados interpretados à luz de valores de referência disponíveis na literatura científica (TEMPONE et al., 2022). Os dados obtidos foram sistematizados em tabelas e gráficos, permitindo uma análise robusta do perfil de aplicabilidade terapêutica e segurança das chalconas.

As duas chalconas foram obtidas via condensação aldólica de Claisen-Schmidt em meio básico. Para chalcona 4Cl, uma solução etanólica de 3-aminocetofenona (2 mmol) foi misturada a 4-clorobenzaldeído (2 mmol), seguida pela adição de NaOH aquoso (50% m/v, 1 mL), conforme ilustrado na Figura 1. A reação foi mantida sob agitação por 48 h a 32 °C. O produto foi filtrado a vácuo, lavado com água fria, seco e recristalizado em etanol, a pureza do composto (99,9%) foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Agilent 1260 Infinity), utilizando coluna de fase reversa C-18 (Eclipse Plus: 3,5 µm, 4,6 × 100 mm). A confirmação estrutural foi realizada por ressonância magnética nuclear (RMN de ¹H e ¹³C) em espectrômetro Bruker DPX-300 (300 MHz para ¹H, 75 MHz para ¹³C) e por espectroscopia no infravermelho (IV) com espectrômetro Bruker VERTEX 70 V equipado com laser HeNe (λ = 633 nm). A mesma técnica foi adotada para sintetizar aminochalcona CMA4DMA, utilizando como reagentes de partida a utilizando 3-aminoacetofenona e 4-(dimetilamino)benzalaldeído, conforme metodologia descrita por Mendes *et al.* (2023).

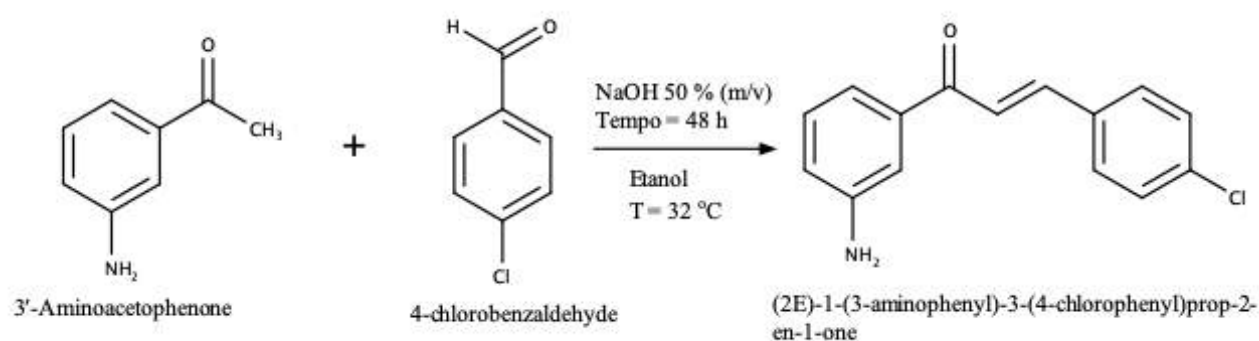


Figura 0-1: Esquema da síntese da chalcona 4Cl

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) das chalconas foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, seguindo as diretrizes de Javadpour *et al.*, (1996). Esse ensaio permitiu identificar a menor concentração do composto capaz de inibir visivelmente o crescimento bacteriano, fornecendo um ponto de partida para a avaliação do potencial como modulador da resistência antimicrobiana. A determinação da CIM é um procedimento amplamente utilizado na microbiologia, consistindo na exposição dos microrganismos a diferentes concentrações do agente testado, sendo considerada CIM o menor valor que impede o crescimento visível (BELANGER; HANCOCK, 2021; KOWALSKA-KROCHMAL; DUDEK-WICHER, 2021).

Para avaliar a possível inibição das bombas de efluxo, foram realizados ensaios de modulação da CIM de antibióticos e do brometo de etídio (EtBr) na presença das chalconas estudadas e do inibidor padrão carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP). Este último atua como desacoplador da força próton-motriz, principal fonte de energia das células bacterianas, resultando na inibição da atividade das bombas de efluxo (MONTVILLE; BRUNO, 1994; ZOAITER *et al.*, 2023). A redução da CIM nessas condições foi interpretada como indicativa de inibição dessas bombas, impedindo a expulsão dos antibióticos e aumentando sua concentração intracelular (ALMATAR *et al.*, 2021; KUMAR *et al.*, 2023). Diversos estudos com compostos naturais corroboram essa abordagem, como os derivados de ácido ferúlico e hidroxiaminas, que reduziram a CIM da eritromicina e da tetraciclina por inibição das bombas TetK e MsrA (FIGUEREDO *et al.*, 2021; PINHEIRO *et al.*, 2022), e os monoterpenos carvacrol e timol, que reduziram a CIM da norfloxacin via inibição da bomba NorA (DOS SANTOS BARBOSA *et al.*, 2021).

Para complementar os resultados, foi realizada a análise da permeabilidade da membrana bacteriana por meio de ensaio de fluorescência com o corante *SYTOX Green*,

conforme descrito por Yuen *et al.*,(2023). Esse corante é impermeável a células intactas, mas fluoresce ao se ligar ao DNA quando a membrana celular está comprometida. Essa metodologia é relevante, pois a absorção de antibióticos também depende da integridade da membrana e da ação de sistemas de transporte seletivo, como bombas de efluxo e canais de porina (ZHANG *et al.*, 2024). Assim, alterações na estabilidade e permeabilidade da membrana não apenas reduzem os mecanismos de defesa bacteriana, como também facilitam a entrada e retenção de antimicrobianos no interior celular (VEIKO *et al.*, 2023).

Por fim, a fim de corroborar os achados deste estudo, a atividade das bombas de efluxo foi avaliada por meio de ensaios de fluorescência com brometo de etídio (EtBr), um método confiável, sensível e de baixo custo, amplamente empregado na identificação de inibidores dessas bombas. (MENEZES DANTAS *et al.*, 2025; RODRIGUES DOS SANTOS BARBOSA *et al.*, 2023; TINTINO *et al.*, 2016). O EtBr é um substrato clássico de proteínas como MepA e NorA (ROCHA *et al.*, 2023), permitindo a avaliação do acúmulo intracelular do corante. Seguindo o protocolo de Oliveira-Tintino *et al.*,(2023), foi medida a fluorescência emitida pelo EtBr intercalado ao DNA, antes e após sua adição. O aumento da fluorescência foi interpretado como indicativo de inibição do efluxo ativo (BLAIR; PIDDOCK, 2016), fortalecendo a hipótese de que as aminochalconas estudadas possam atuar como inibidoras dessas bombas.

1.2 ESTRUTURA DA TESE

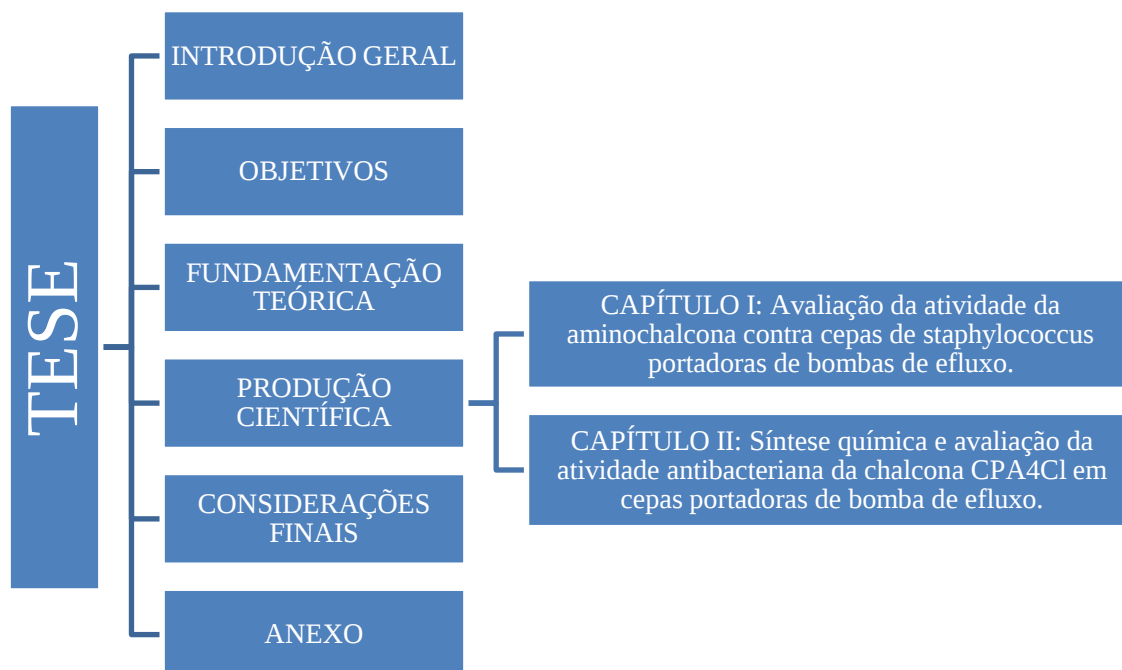


Figura 0-2: Diagrama com a organização geral da estrutura da tese.

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana e a ação inibitória de duas aminochalconas sobre os mecanismos de resistência mediados pelas bombas de efluxo MepA e NorA em *Staphylococcus aureus*, por meio de análises microbiológicas *in vitro*, moleculares e *in silico*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o processo de síntese da 3-aminochalcona-4-clorobenzaldeído, incluindo os métodos e parâmetros reacionais utilizados.
- Realizar o *docking* molecular entre as chalconas e as bombas de efluxo MepA e NorA, visando compreender as interações moleculares envolvidas.
- Avaliar as propriedades físico-químicas e as propriedades farmacocinéticas das chalconas por meio de análises *in silico* (ADMET).
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das chalconas frente a cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*.
- Avaliar os efeitos modulador das aminochalconas sobre antibióticos, por meio da análise da modificação das CIMs em cepas de *S. aureus* portadoras de bombas de efluxo.
- Investigar a capacidade das chalconas de inibir as bombas de efluxo MepA e NorA, por meio da análise da modificação da CIM do brometo de etídio (EtBr).
- Avaliar a inibição das bombas de efluxo MepA e NorA por meio de ensaios de emissão de fluorescência com EtBr.
- Analisar os efeitos das chalconas sobre a permeabilidade da membrana em cepas de *S. aureus* 1199B e K2068.

3.1 CHALCONAS

As chalconas são compostos bioativos, naturais ou sintéticos, pertencentes à classe dos flavonoides, caracterizados por uma estrutura química que consiste em dois anéis aromáticos (A e B) conectados por uma cadeia alifática de três carbonos contendo uma ligação dupla conjugada (FERREIRA et al., 2018). Chalconas podem ser sintetizadas por meio da reação de condensação aldólica entre aldeídos aromáticos e cetonas, seguida de caracterização estrutural por técnicas como ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , espectrometria de massa (MS) e infravermelho (FTIR) (DOS SANTOS et al., 2023; FREITAS et al., 2021; MENDES et al., 2023; TEMPONE et al., 2022). Essa estrutura básica permite a introdução de diversos substituintes nos anéis aromáticos, o que amplia significativamente sua diversidade química e atividade biológica. As chalconas podem ser isoladas de fontes naturais ou sintetizadas por métodos químicos, como a reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt (FREITAS et al., 2021; TEMPONE et al., 2022). Devido à sua versatilidade estrutural e farmacológica, as chalconas têm sido amplamente investigadas como esqueletos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos (MENDES et al., 2023).

As chalconas apresentam uma ampla gama de aplicações terapêuticas, incluindo atividades antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória, anticâncer e ansiolítica (FERREIRA et al., 2018; MENDES et al., 2023). Um dos principais focos de pesquisa envolve seu potencial como inibidores de bombas de efluxo bacterianas, como NorA e MepA, responsáveis pela resistência a múltiplos fármacos (MDR) em bactérias Gram-positivas, particularmente *Staphylococcus aureus* (FREITAS et al., 2021; TEMPONE et al., 2022). Além disso, estudos demonstraram que algumas chalconas modulam receptores neuroquímicos, como GABA e serotoninérgicos, exibindo efeitos ansiolíticos promissores (FERREIRA et al., 2018; MENDES et al., 2023). Essas propriedades tornam as chalconas candidatas valiosas para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos e psicofarmacológicos.

Em relação à atividade antimicrobiana, os experimentos foram conduzidos utilizando o método de microdiluição em caldo contra cepas padrão e multirresistentes de bactérias, como *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (FREITAS et al., 2021; TEMPONE et al., 2022). Os resultados mostraram que algumas chalconas apresentaram atividade direta contra cepas Gram-positivas, com concentrações inibitórias mínimas (CIM) variando entre 64 e 512 $\mu\text{g/mL}$ (FREITAS et al., 2021). No entanto, a eficácia

contra cepas Gram-negativas foi limitada, com CIMs frequentemente superiores a 1.024 µg/mL (DOS SANTOS et al., 2023). Além disso, os compostos demonstraram capacidade de modular a resistência antimicrobiana ao potencializar a atividade de antibióticos convencionais, como ciprofloxacina e norfloxacina, indicando inibição das bombas de efluxo (FREITAS et al., 2021; TEMPONE et al., 2022).

O efeito ansiolítico das chalconas foi avaliado em modelos animais, como peixes-zebra adultos, utilizando testes comportamentais, como o labirinto em cruz elevado (EPM) e o teste do tanque novo os resultados revelaram que as chalconas aumentaram o tempo gasto nas áreas abertas do EPM e reduziram comportamentos de evitação no teste do tanque novo, indicando um efeito ansiolítico dependente da dose. Estudos adicionais com antagonistas seletivos (bicuculina para GABA_A e ondansetrona para receptores serotoninérgicos) confirmaram que esses compostos modulam sistemas neuroquímicos específicos (MENDES et al., 2023).

Análises *in silico* foram realizadas para prever propriedades farmacocinéticas e toxicológicas das chalconas. Ferramentas computacionais, como SwissADME e ADMETLab, foram utilizadas para avaliar parâmetros como absorção intestinal, distribuição, metabolismo e penetração na barreira hematoencefálica (BBB) (FREITAS et al., 2021; MENDES et al., 2023). Os resultados sugeriram que as chalconas apresentam propriedades farmacocinéticas adequadas, com boa absorção intestinal e baixa toxicidade, embora alguns compostos tenham apresentado moderada lipofilicidade, necessitando de otimizações futuras (DOS SANTOS et al., 2023; FREITAS et al., 2021).

Foi realizada uma busca na literatura por estudos envolvendo as aminochalconas avaliadas neste trabalho, não sendo encontrados relatos sobre a chalcona 4Cl (CPA4Cl). Por outro lado, a chalcona CMA4DMA foi previamente investigada frente a cepas de *Staphylococcus aureus* K2068, portadoras da bomba de efluxo MepA, e K4100, portadoras do gene *qacC* e β-lactamases. Os resultados indicaram ausência de atividade antibacteriana intrínseca (MIC ≥ 1024 µg/mL) e ausência de inibição da β-lactamase, porém com reduções significativas nos valores de MIC da ciprofloxacina e do brometo de etídio. Estudos de *docking* molecular demonstraram que a chalcona é capaz de se ligar ao mesmo sítio ocupado pelo inibidor padrão clorpromazina, interagindo com resíduos proteicos essenciais e corroborando seu potencial como inibidor da MepA (DA SILVA et al., 2024).

3.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM BACTÉRIAS E O CENÁRIO ATUAL DA MULTIRRESISTÊNCIA

Nas últimas décadas, os antibióticos tornaram-se ferramentas indispensáveis para o progresso da medicina moderna e para o crescimento de setores como a agropecuária, ao contribuírem significativamente para o controle de infecções, a melhoria dos cuidados de saúde e o aumento da produtividade animal (BUNDUKI *et al.*, 2024; GULUMBE *et al.*, 2023; KARNWAL *et al.*, 2025). Entretanto, a má aplicação de agentes antibacterianos para tratar e prevenir infecções impulsionou uma resposta evolutiva em microrganismos, levando ao surgimento da resistência a esses medicamentos, ocasionando insucesso em tratamentos, maior incidência de enfermidades e elevação dos custos no sistema de saúde (KARNWAL *et al.*, 2025).

Dados de 2018 revelam um cenário preocupante: cerca de 76.704 toneladas de antibióticos foram utilizadas na produção animal globalmente (ARDAKANI; ARAGRANDE; CANALI, 2024; DE LAGARDE *et al.*, 2022; JI *et al.*, 2023), enquanto o consumo humano foi de 14,3 doses diárias definidas por mil habitantes por dia (ZHANG *et al.*, 2023). Paralelamente, as bactérias resistentes aos antibióticos são hoje responsáveis por mais de um quarto das infecções hospitalares, refletindo o impacto direto da resistência nos ambientes clínicos (KARNWAL *et al.*, 2025).

Estima-se que, se nenhuma ação efetiva for implementada, o número de mortes atribuídas às bactérias multirresistentes poderá atingir a marca de 10 milhões por ano até 2050 (ASMARE *et al.*, 2024; KARNWAL *et al.*, 2025). Diante desse panorama, é fundamental adotar medidas que reduzam o uso indiscriminado de antibióticos em todos os contextos (humano, veterinário, alimentar e ambiental) como forma de limitar a propagação da resistência microbiana. Tais medidas são essenciais para salvaguardar a eficácia dos tratamentos antimicrobianos e proteger a saúde pública global.

Nesse contexto, a atenção volta-se para grupos bacterianos considerados de alta prioridade pela Organização Mundial da Saúde (OMS), os quais representam uma ameaça crescente devido à sua resistência a múltiplas classes de antibióticos e ao impacto clínico relevante. De acordo com o relatório elaborado por Melchiorri *et al.* (2025) a pedido da OMS, a lista atualizada em 2024 inclui patógenos como *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e à vancomicina (VRSA), *Helicobacter pylori* resistente à claritromicina, além de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. resistentes a fluoroquinolonas, e *Neisseria gonorrhoeae* resistente a cefalosporinas e fluoroquinolonas (MELCHIORRI *et al.*, 2025). Esses microrganismos estão frequentemente associados a infecções hospitalares e comunitárias de difícil tratamento além disso, sua disseminação contínua e sua elevada plasticidade genética reforçam a necessidade de vigilância

intensificada e investimentos em pesquisa, a fim de evitar futuras crises sanitárias de escala global (HO et al., 2024; MUTTEEB et al., 2023).

Diante desse cenário, torna-se essencial compreender os diferentes mecanismos envolvidos, os quais incluem a resistência intrínseca, adquirida e adaptativa. Esses mecanismos refletem estratégias evolutivas complexas que envolvem adaptações genéticas, bioquímicas e fisiológicas, permitindo a sobrevivência das bactérias frente à ação de agentes antimicrobianos.

A resistência intrínseca é característica de determinadas espécies bacterianas e decorre de propriedades estruturais ou funcionais naturais, como a baixa permeabilidade da membrana externa, a ausência de alvos específicos para determinados antimicrobianos ou a presença constitutiva de bombas de efluxo. Essas características conferem uma proteção basal contra classes específicas de antibióticos, tornando certas bactérias naturalmente resistentes a esses fármacos (SMITH; FERNANDO; KING, 2024).

Por outro lado, a resistência adquirida ocorre em decorrência de alterações genéticas, frequentemente mediadas por mecanismos de transferência horizontal de genes, como plasmídeos, transposons e integrons. Essa forma de resistência possibilita que cepas previamente sensíveis adquiram genes de resistência de outros microrganismos, ampliando a disseminação do fenótipo resistente em ambientes clínicos e naturais (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2019).

Além dessas formas consolidadas de resistência, destaca-se a resistência adaptativa, que se caracteriza como um fenômeno transitório e induzido por condições ambientais específicas, como a exposição ao estresse antimicrobiano ou a formação de biofilmes. Nesse contexto, as bactérias ativam mecanismos regulatórios que modulam a expressão gênica, conferindo uma tolerância temporária aos antimicrobianos. Esse tipo de resistência não está associado a modificações permanentes no genoma, mas pode favorecer a seleção de variantes geneticamente resistentes (KHAN, 2025).

No que se refere aos mecanismos moleculares envolvidos na resistência aos antibióticos, quatro estratégias principais são frequentemente observada, Figura 3: (i) inativação do antibiótico, por meio da produção de enzimas que modificam ou degradam a estrutura do fármaco, como as β -lactamases e as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos – AMEs (GERA et al., 2024; RAHMAN et al., 2018); (ii) modificação do alvo, em que alterações nos locais de ação do antibiótico reduzem sua afinidade, como ocorre com mutações na subunidade GyrA que conferem resistência às fluoroquinolonas (ALABDALI *et al.*, 2024); (iii) efluxo ativo, através de bombas de efluxo que extrusam o antibiótico do interior da célula, diminuindo

sua concentração intracelular (RAMPACCI *et al.*, 2023); e (iv) redução da permeabilidade, provocada por alterações em porinas ou perda da expressão dessas proteínas, o que limita a entrada do fármaco na célula (KUMAR VASAN *et al.*, 2021). A compreensão detalhada desses mecanismos é fundamental para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e estratégias de contenção, especialmente em um contexto global de crescente ineficácia dos antibióticos disponíveis.

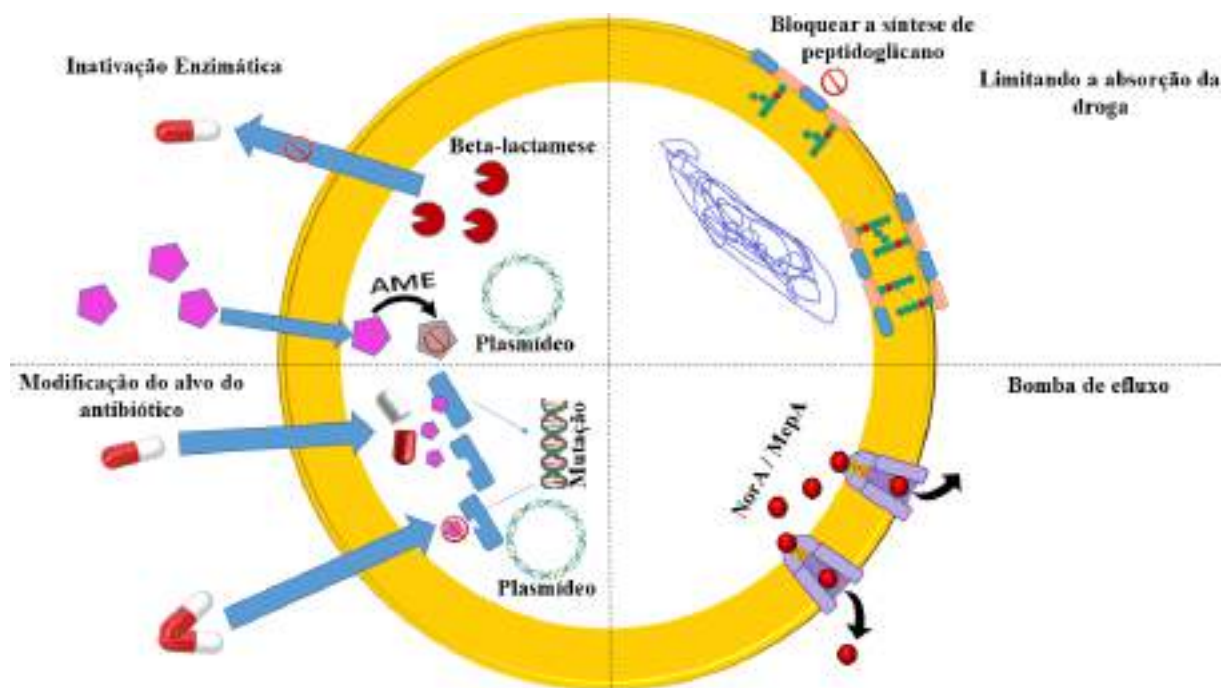


Figura 0-1: Principais mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos.
Fonte: Adaptado de (RAJPUT; NAHAR; RAHMAN, 2024).

3.2.1 MECANISMO DE EFLUXO ATIVO EM BACTÉRIAS

Entre os mecanismos que algumas bactérias utilizam para se proteger dos antibióticos, destaca-se a capacidade de bloquear sua entrada ou expulsá-los ativamente do ambiente intracelular. Esse processo é mediado por proteínas transmembrana especializadas chamadas bombas de efluxo (ALMATAR *et al.*, 2021). Em microrganismos bacterianos, os genes que codificam essas bombas podem estar inseridos tanto no DNA cromossômico quanto em elementos genéticos móveis, como os plasmídeos. Essas proteínas atuam como mecanismos de defesa, expulsando substâncias potencialmente tóxicas como antibióticos, detergentes, corantes, toxinas e metabólitos residuais, reduzindo a concentração intracelular dessas substâncias a níveis subinibitórios (BLAIR; PIDDOCK, 2016; CHETRI, 2023). Com isso, as bactérias aumentam as chances de sobrevivência frente à ação dos antibióticos.

Entre essas, a família ABC se destaca por utilizar diretamente a energia química proveniente da hidrólise de ATP. A hidrólise de ATP é essencial para a atividade dessas proteínas, como a P-glicoproteína (P-gp/ABCB1) e a Pdr5, atuando no controle das mudanças conformacionais envolvidas no transporte de substratos. Estudos indicam que a P-gp humana necessita da ligação de duas moléculas de ATP, coordenadas por íons Mg^{2+} , para induzir a transição para uma conformação voltada para o exterior (*outward-facing*) (FUTAMATA *et al.*, 2019). A hidrólise sequencial do ATP nos domínios de ligação de nucleotídeos (NBDs), seguida da liberação de fosfato inorgânico, permite o retorno ao estado voltado para o interior da célula (*inward-facing*), completando o ciclo de transporte. Mutações nos motivos conservados Walker A e Walker B, que afetam respectivamente a ligação e a hidrólise de ATP, têm sido utilizadas para elucidar esse mecanismo, sugerindo que a ligação do ATP promove a dimerização dos NBDs, enquanto sua hidrólise é necessária para o retorno à conformação inicial (ERNST *et al.*, 2010; SZABÓ *et al.*, 1998; TOMBLINE *et al.*, 2004; URBATSCH *et al.*, 1995).

Em contraste com a família ABC, as demais superfamílias empregam uma forma de energia distinta: a força motriz do próton (PMF), um gradiente eletroquímico formado por dois componentes principais: o gradiente de pH (ΔpH) e o potencial de membrana ($\Delta \Psi$) (GERRY *et al.*, 2025). O ΔpH é originado pela diferença na concentração de prótons entre o periplasma, que apresenta pH mais ácido, e o citoplasma, mais alcalino, enquanto o $\Delta \Psi$ corresponde à diferença de voltagem através da membrana, com o meio extracelular sendo mais positivo em relação ao interior celular (WAN *et al.*, 2024). Esses componentes atuam em conjunto para fornecer a energia necessária ao transporte ativo de moléculas.

Um exemplo representativo desse tipo de transporte pode ser observado nas bombas da família RND (nodulação de resistência e divisão celular), cujo funcionamento envolve uma sequência coordenada de eventos moleculares. Inicialmente, o substrato liga-se a um sítio específico na porção intracelular da bomba. Em seguida, o fluxo de prótons proveniente do periplasma promove uma mudança conformacional que expõe o sítio de ligação ao meio extracelular, permitindo a liberação do substrato e a finalização do ciclo de transporte (GERRY *et al.*, 2025; WAN *et al.*, 2024).

Estudos recentes indicam que a eficiência do efluxo não depende apenas da afinidade da bomba pelo substrato. Wan *et al.* (2024) observaram que o pH periplasmático influencia significativamente a atividade dessas bombas, sendo que condições mais ácidas favorecem a expulsão de substratos de menor afinidade. Além disso, variações no potencial de membrana

também modulam a taxa de efluxo, demonstrando uma interação funcional entre os componentes da PMF (GERRY *et al.*, 2025).

A capacidade das bombas de efluxo em transportar uma ampla gama de compostos tem sido associada à plasticidade funcional desses sistemas. Essa característica contribui para a resistência a múltiplos antimicrobianos. Estratégias terapêuticas que visam perturbar o gradiente de prótons vêm sendo investigadas, incluindo o uso de compostos dissipadores de PMF e inibidores específicos de bombas, que podem potencializar a atividade de antibióticos convencionais (LI *et al.*, 2024; PATIL *et al.*, 2025; YANG *et al.*, 2023). No entanto, aspectos como a redundância de sistemas de efluxo e a seletividade dos inibidores ainda representam desafios relevantes para a aplicação clínica dessas abordagens (SPENGLER *et al.*, 2017b). Portanto, compreender os tipos de energia que sustentam a atividade das bombas de efluxo é crucial não apenas para o entendimento da fisiologia bacteriana, mas também para o desenvolvimento de estratégias eficazes para mitigar a resistência aos antibióticos.

A superfamília *Major Facilitator Superfamily* (MFS) compreende uma ampla variedade de proteínas de efluxo, incluindo transportadores da subfamília Nor, como NorA, NorB e NorC. As proteínas dessa superfamília geralmente são compostas por 12 segmentos transmembranares α -hélice, com as extremidades N- e C- localizadas no lado citoplasmático da membrana plasmática. Exemplos dessas proteínas são a NorA e NorB presentes em *S. aureus*. A bomba de efluxo NorA (Figura 5) foi descrita pela primeira vez em 1986 e, desde então, tem se destacado entre as proteínas de efluxo por ser uma das mais estudadas como alvo para o desenvolvimento de inibidores de bombas de efluxo (KUMAR *et al.*, 2020; UBUKATA; ITOH-YAMASHITA; KONNO, 1989).

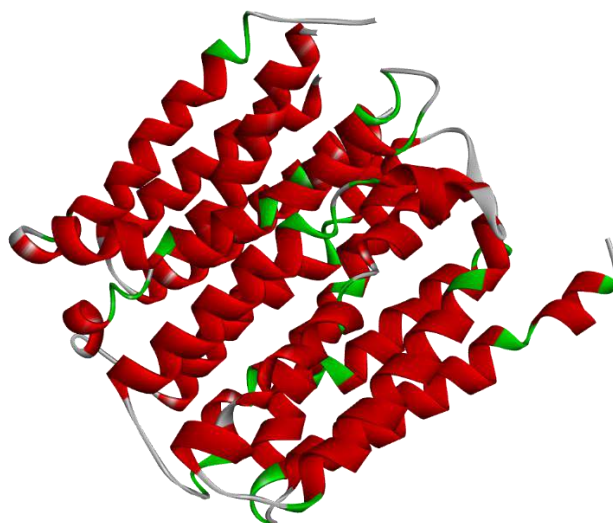


Figura 0-3: Representação 3D da estrutura da bomba de efluxo NorA.

Essa proteína é codificada cromossomicamente pelo gene *norA* e é constituída por 388 aminoácidos organizados em 12 segmentos transmembranares em α -hélice, dispostos em pseudo-dupla simétrica, com os terminais N- e C- voltados para o citoplasma bacteriano (BHASKAR *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2019). NorA foi a primeira bomba de efluxo associada à resistência às fluoroquinolonas descrita em *S. aureus*, sendo capaz de transportar uma ampla gama de compostos antimicrobianos. Por esse motivo, é frequentemente utilizada como modelo experimental em estudos voltados ao desenvolvimento de inibidores de bombas de efluxo, especialmente considerando sua expressão frequente em cepas resistentes isoladas globalmente (BHASKAR *et al.*, 2016; DENG *et al.*, 2012; MARQUEZ, 2005).

O mecanismo de transporte da NorA baseia-se no uso da força próton-motriz, mediada pelo gradiente eletroquímico de íons hidrogênio (H^+), permitindo o efluxo ativo de diversos substratos. Entre os compostos extrusados por essa proteína destacam-se: puromicina, fluoroquinolonas como norfloxacin e ciprofloxacina, omeprazol, reserpina, corantes como o brometo de etídio, terpenóides, compostos de amônio quaternário, acridinas, pentamidinas e outros antibióticos de amplo espectro (DANTAS *et al.*, 2018; DEMARCO *et al.*, 2007; KAATZ *et al.*, 2003; NARGOTRA *et al.*, 2009; PAPKOU *et al.*, 2020; SANGWAN *et al.*, 2008).

A família de extrusão de compostos tóxicos (MATE) possui como uma de suas representantes a bomba de efluxo MepA (Figura 6). A primeira bomba a ser identificada dessa família foi a NorM (em *Vibrio parahaemolyticus*) possuindo a capacidade de conferir fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR). A proteína de efluxo MepA é bem conhecida por ser superexpressada em cepas de *S. aureus* e outras bactérias de Gram positivo (HUET *et al.*, 2008; MCALEESE *et al.*, 2005; MORITA *et al.*, 1998; OMOTE *et al.*, 2006).



Figura 0-4: Representação 3D da estrutura da bomba de efluxo MepA. (Estrutura resolvida por meio de IA.)

O gene *mepA* integra o operon *mepRAB*, que também possui o gene *mepR*, que é responsável pela regulação negativa de *mepA*. A proteína codificada por *mepR* atua como repressora da bomba de efluxo ativo MepA por meio de sua ligação específica diretamente na região promotora do gene *mepA*, inibindo assim a transcrição desse gene. Algumas mutações específicas no gene *mepR* podem reduzir a afinidade pelo DNA, ocasionando na superexpressão da bomba MepA (DASHTBANI-ROOZBEHANI; BROWN, 2021; MCALEESE *et al.*, 2005; SCHINDLER *et al.*, 2013).

Essa bomba é codificada pelo gene cromossômico *mepA* conferindo resistência a cepas de *S. aureus*. Sua estrutura é configurada por 451 aminoácidos compondo 12 segmentos transmembranares. MepA utiliza o gradiente de prótons como íons de sódio (Na^+) para realizar o transporte ativo de diversos substratos. Esse tipo de transporte usando íons de Na^+ é uma característica presente em outras bombas da família de efluxo ativo MATE (KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005; KURODA; TSUCHIYA, 2009).

MepA realiza a extrusão de uma variedade de substratos, entre eles: fluoroquinolonas hidrofílicas e hidrofóbicas, norfloxacin, ciprofloxacina, biocidas monovalentes e divalentes e corantes como o brometo de etídio, tornando cepas de *S. aureus* resistentes a um amplo perfil de substratos (ARGUDÍN *et al.*, 2016; KAATZ, DEMARCO E SEO, 2006; KAATZ, MCALEESE e SEO, 2005).

Tendo em vista a elevada incidência de infecções causadas por *S. aureus*, principalmente aquelas causadas por cepas que expressam bombas de efluxo como MepA, NorA, entre outras, torna-se necessário a realização de pesquisas visando à síntese de novas substâncias capazes de inibir os mecanismos de resistência bacteriana restaurando a eficácia de fármacos atualmente disponíveis no mercado (DE LIMA SILVA *et al.*, 2022; SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013).

3.3 INIBIDORES DE BOMBAS DE EFLUXO: MECANISMOS, APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS E DESAFIOS

Diante da problemática da resistência bacteriana mediada por bombas de efluxo, uma estratégia promissora tem sido o uso de substâncias capazes de inibir a atuação dessas proteínas de transporte (ZHANG *et al.*, 2024). Esses inibidores atuam interferindo em um ou mais mecanismos responsáveis pela extrusão de fármacos, o que pode resultar na interrupção do transporte ativo de antibióticos. Quando utilizados como agentes adjuvantes, esses compostos podem potencializar a eficácia dos antimicrobianos frente a cepas que expressam bombas de

efluxo e restaurar a atividade de antibióticos previamente ineficazes contra determinados patógenos (SHARMA; GUPTA; PATHANIA, 2019).

Ao promoverem o acúmulo intracelular simultâneo de diversos antibióticos, os inibidores aumentam a suscetibilidade das bactérias aos agentes antimicrobianos (BLANCO *et al.*, 2018). Os efeitos decorrentes dessa ação são geralmente duplos: por um lado, contribuem para a ressensibilização de microrganismos resistentes aos antibióticos atualmente utilizados; por outro, diminuem as chances de seleção de mutantes resistentes. Esses inibidores podem ser obtidos a partir de uma ampla variedade de fontes, incluindo compostos naturais e substância sintéticas (BLANCO *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2024; ZHANG; WANG; AHN, 2023).

Para que um inibidor de bomba de efluxo (IBE) seja eficaz, ele deve apresentar características específicas que maximizem sua capacidade de combater a resistência antimicrobiana sem induzir resistência adicional (DHANDA; ACHARYA; HALDAR, 2023). Idealmente, um IBE deve ser desprovido de atividade antimicrobiana direta, para evitar o desenvolvimento de resistência contra ele próprio (BHARDWAJ; MOHANTY, 2012). Além disso, IBEs deve agir de maneira específica nas bombas de efluxo, minimizando mecanismos colaterais que possam afetar outras funções celulares e causar citotoxicidade (ZHANG; WANG; AHN, 2023).

Os IBEs podem ser classificados como competitivos ou não competitivos: os competitivos se ligam aos transportadores de efluxo e podem induzir a superexpressão desses transportadores, enquanto os não competitivos, afetam o transporte de bombas de efluxo de maneira independente do substrato. Outro aspecto importante é a capacidade do IBE de superar a barreira da membrana externa das bactérias Gram-negativas, que é crucial para permitir o acúmulo de antibióticos dentro da célula sem comprometer a integridade da membrana, o que pode resultar em efeitos citotóxicos indesejáveis. Assim, IBEs eficazes devem ser capazes de penetrar na membrana sem prejudicá-la, oferecendo um potencial terapêutico sustentável e de longo prazo no combate à resistência a antibióticos (LAMUT *et al.*, 2019; LAWS; SHAABAN; RAHMAN, 2019; ZHANG *et al.*, 2023).

Os IBEs têm se destacado não apenas por potencializarem a ação de antimicrobianos, mas também por exercerem múltiplos efeitos benéficos no controle da resistência bacteriana. Um dos seus principais efeitos é a ação antivirulência, comprometendo a capacidade dos patógenos de causar infecção (ZHANG *et al.*, 2024). Dentre os IBEs mais conhecidos, destaca-se o PA β N (fenilalanina-arginina β -naftilamida), um potente inibidor da bomba do tipo RND em *Pseudomonas aeruginosa*, capaz de reduzir características de virulência como motilidade e aquisição de micronutrientes (ferro e fosfato), além de diminuir a expressão de genes regulados

por quorum sensing, como *lasB*, *toxA* e *pelA*, tornando cepas clínicas menos virulentas (RAMPIONI *et al.*, 2017).

Os IBEs desempenham um papel relevante na redução da formação de biofilmes, uma vez que as bombas estão associadas a múltiplos aspectos desse processo, como a produção da matriz extracelular (EPSs), o transporte de moléculas sinalizadoras relacionadas ao *quorum sensing* (QS) e *quorum quenching* (QQ), o controle indireto da expressão de genes associados à formação do biofilme e a adesão celular, que afeta a agregação bacteriana (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018). A inibição dessas bombas compromete a integridade dos biofilmes e aumenta a eficácia dos antimicrobianos. Estudos demonstram que a combinação de IBEs com antibióticos pode reduzir significativamente tanto a formação inicial quanto a biomassa de biofilmes maduros (ZHANG *et al.*, 2024). Por exemplo, a associação do inibidor de efluxo nilotinib com ciprofloxacina reduziu em até 66% a formação de biofilmes e em 33% a biomassa de biofilmes maduros de *Staphylococcus aureus*, com evidências de redução da viabilidade e espessura do biofilme identificadas por microscopia confocal (ZIMMERMANN *et al.*, 2019).

Além disso, os IBEs demonstram eficácia na redução da formação de células persistentes, que exibem tolerância fenotípica a antibióticos e estão frequentemente associadas à superexpressão de genes de efluxo (ZHANG *et al.*, 2024). A bomba AcrAB-TolC, por exemplo, está fortemente relacionada à persistência em bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*. Estudos indicam que a combinação de PA β N com a delafloxacina resulta em uma drástica redução da sobrevivência dessas células, destacando o potencial terapêutico da associação entre inibidores de efluxo e antibióticos para a erradicação de infecções crônicas (BYRD *et al.*, 2021).

Outro efeito relevante dos IBEs é a sua atuação na limitação da aquisição de resistência bacteriana. Bombas como a AcrAB-TolC participam da transferência horizontal de genes (HGT), favorecendo a manutenção de plasmídeos com genes de resistência, como *tetA*, ao permitirem a expressão inicial das proteínas responsáveis pela resistência. A inibição do efluxo, nesse contexto, pode interromper esse processo, limitando a disseminação de determinantes genéticos de resistência durante terapias antimicrobianas (NOLIVOS *et al.*, 2019; POVOLO; ACKERMANN, 2019).

Adicionalmente, os IBEs podem contribuir para a restauração de mecanismos celulares de reparo genético, como o sistema de reparo de incompatibilidades (MMR) (ZHANG *et al.*, 2024a). A superexpressão da bomba AcrAB-TolC está associada à supressão do gene *mutS*, essencial para o funcionamento do MMR, tornando as células mais propensas ao acúmulo de mutações e ao surgimento de resistência permanente (BUSSETI *et al.*, 2022). Ao reduzirem a

expressão de *acrAB*, os IBEs favorecem a recuperação da atividade do MMR, prevenindo alterações genéticas e reforçando seu papel na contenção da resistência antimicrobiana (EL MEOUCHE; DUNLOP, 2018).

Atualmente, a maioria dos inibidores de bombas de efluxo permanece em fase pré-clínica ou restrita a ensaios *in vitro*, enfrentando diversos obstáculos que dificultam sua translação para a prática clínica. Entre os principais desafios estão a baixa estabilidade química, a limitada seletividade para alvos bacterianos e a elevada citotoxicidade para células eucarióticas, fatores que, até o momento, têm impedido sua aplicação no tratamento de infecções bacterianas (THEURETZBACHER, 2025). No entanto, o potencial terapêutico desses compostos não deve ser subestimado. A introdução de inibidores de efluxo no arsenal farmacêutico representa uma estratégia promissora para a saúde global, considerando sua capacidade de contornar mecanismos de resistência e restaurar a eficácia de antibióticos previamente comprometidos (DHANDA; ACHARYA; HALDAR, 2023; ZHANG et al., 2024). Atuando como agentes adjuvantes, esses inibidores podem não apenas potencializar a ação de antimicrobianos, mas também contribuir significativamente para a contenção da resistência bacteriana.

3.4 *Staphylococcus aureus*: PATOGENICIDADE, RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E PAPEL DAS BOMBAS DE EFLUXO

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva amplamente reconhecida pela sua capacidade de causar diversas infecções em humanos, caracterizando-se por sua elevada capacidade de proliferação e disseminação, tornando-o um patógeno versátil e adaptável e com elevada taxa de replicação, juntamente com a sua capacidade de colonizar diversas partes do corpo (MENEZES DANTAS et al., 2025; SINHA; AGGARWAL; SINGH, 2024). Essa característica a torna um relevante problema de saúde pública em escala global (OMS, 2024).

Frequentemente, *Staphylococcus aureus* ocorre de forma comensal na pele, nos tecidos moles e na mucosa nasal de adultos e crianças saudáveis. No entanto, trata-se de um microrganismo oportunista cuja patogenicidade é potencializada em situações de comprometimento das barreiras biológicas do hospedeiro, como em procedimentos cirúrgicos ou no uso de dispositivos invasivos, a exemplo de cateteres, podendo causar infecções locais ou sistêmicas. Além disso, em condições de imunossupressão, *S. aureus* pode transitar do estado comensal para o patogênico (FERREIRA et al., 2015; TINTINO, 2018). Entre as principais manifestações clínicas associadas à sua infecção destacam-se as infecções cutâneas

e de tecidos moles, como furúnculos e abscessos, além de bacteremia, artrite séptica, osteomielite e pneumonia necrosante, frequentemente relacionada a cepas produtoras de toxinas (BARBOSA *et al.*, 2023).

A maior ocorrência das infecções por *S. aureus* está diretamente relacionada à disseminação de cepas resistentes à maioria dos antibióticos disponíveis para uso clínico atualmente. Essa resistência representa um dos grandes desafios clínicos da atualidade, principalmente no que diz respeito às infecções hospitalares, onde o uso de muitos antibióticos contribui para a seleção das cepas multirresistentes. A referida resistência abrange diversos grupos farmacológicos, incluindo fluoroquinolonas, penicilinas, vancomicina, tetraciclina e antibióticos β -lactâmicos, entre outros (PAL *et al.*, 2020).

A resistência antimicrobiana em *S. aureus* pode ser mediada por mecanismos intrínsecos e adquiridos. A resistência intrínseca decorre, em geral, de mutações que alteram o sítio de ação dos antibióticos. Já os mecanismos adquiridos envolvem a incorporação de genes de resistência por meio da transferência horizontal de material genético, processo esse frequentemente mediado por plasmídeos e transposons, que contribuem para a disseminação de determinantes de resistência entre diferentes cepas ou até mesmo entre diferentes espécies bacterianas, o que resulta na inativação ou degradação do antibiótico ou de outro agente antimicrobiano, por exemplo (ALÓS, 2015; RODRÍGUEZ-NORIEGA *et al.*, 2013).

A linhagem de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA, do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) é notoriamente conhecida por sua ampla distribuição mundial, sendo frequentemente associada a infecções hospitalares (COSTA *et al.*, 2016). As cepas de MRSA possuem múltiplos genes de resistência, incluindo aqueles que codificam proteínas transmembranares com função de efluxo ativo, capazes de expelir antibióticos e outros compostos tóxicos do interior da célula, contribuindo tanto para sua resistência quanto para a virulência, facilitando sua sobrevivência mesmo em ambientes mais hostis (COSTA *et al.*, 2016).

Diversas cepas de *S. aureus* expressam mecanismos de efluxo ativo mediados por bombas de efluxo, proteínas transmembranares que conferem resistência e favorecem a sobrevivência, disseminação e virulência do patógeno (TINTINO *et al.*, 2016). Entre as principais proteínas de efluxo presentes em *S. aureus* destacam-se: MepA pertencente a *Multidrug And Toxic compound Extrusion (MATE)*, presente em cepas como RN4220 e K2068, garantindo a resistência a diversos compostos como norfloxacin (BEZERRA *et al.*, 2021; DE SOUSA JÚNIOR *et al.*, 2021), bomba de efluxo NorA pertencente à família *Major Facilitator Superfamily (MFS)*, presente na cepa 1199 e altamente expressa na cepa 1199B (superexpressa

a bomba) conferindo resistência a quinolonas (COÊLHO *et al.*, 2016), bomba QacC pertencente a família *Small Multidrug Resistance (SMR)*, presente em K4100 e K4414 (DE SOUSA JÚNIOR *et al.*, 2021; SCHERF *et al.*, 2020) e a bomba TetK da família *MFS*, presente em IS-58 e codificada por plasmídeos, conferindo resistência as tetraciclinas (MACEDO *et al.*, 2022).

A presença isolada ou simultânea desses mecanismos de resistência presentes em *S. aureus*, como as bombas de efluxo, alteração de alvos moleculares e produção de enzimas degradadoras a conferem uma capacidade de adaptação frente à pressão imposta pelo uso de antimicrobianos, esse fato torna urgente a busca por novas estratégias de controle desse patógeno (DE LIMA SILVA *et al.*, 2022).

CAPÍTULO I: Avaliação da atividade da aminochalcona contra cepas de *Staphylococcus* portadoras de bombas de efluxo (Publicado em 28 de outubro de 2025 – Pharmaceuticals 2025, 18, 1629 - <https://www.mdpi.com/1424-8247/18/11/1629>)

Autores e afiliação:

Isydório Alves Donato¹, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa¹, Antonio Henrique Bezerra¹, Suieny Rodrigues Bezerra¹, Ray Silva Almeida², Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino², Isaac Moura Araújo², Ewerton Yago de Sousa Rodrigues¹, Maria Yasmin Cândido de Oliveira¹, Francisco Ferdinando Cajazeiras³, Jayza Maria Lima Dias³, Jesyka Macedo Guedes³, Jéssica Híade Silva Cristino⁴, Emmanuel Silva Marinho⁴, Márcia Machado Marinho⁴, Hécio Silva dos Santos³, Henrique Douglas Melo Coutinho², Saulo Relison Tintino¹, Irwin Rose Alencar de Menezes^{5,*}, Francisco Assis Bezerra da Cunha^{1,*}

1. **Laboratório de Bioprospecção do Semiárido (LABSEMA), Universidade Regional do Cariri (URCA), Crato, 63105-000, CE, Brasil;** isydorio.donato@urca.br (I.A.D.); cristinase75@gmail.com (C.R.S.B); henriquebezerra.urca@gmail.com (A.H.B); suieny.urca@gmail.com (S.R.B.); ewerton.sousarodrigues@urca.br (E.Y.S.R.); yasmim.oliveira@urca.br (M.Y.C.O.); saulo.tintino@urca.br (S.R.T.)
 2. **Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Departamento de Biologia Química, Universidade Regional do Cariri (URCA), Crato, 63105-000, CE, Brasil;** ray.almeida@urca.br (R.S.A.); datianemorais@hotmail.com (C.D.M.O.T.); isaac.moura@urca.br (I.M.A.); hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M.C.)
 3. **Programa de Química, Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), Sobral, CE, 62040-370, Brasil;** ferdinandocajazeiras@gmail.com (F.F.C.); jaizadiaz48@gmail.com (J.M.L.D.); jesyka.mg@gmail.com (J.M.G.); helciodossantos@gmail.com (H.S.S.); jessica.hiade@aluno.uece.br (J.H.S.C.)
 4. **Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, 60714-903, Brasil;** emmanuel.marinho@uece.br (E.S.M.); marinho.marcia@gmail.com (M.M.M.)
 5. **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Complexo Econômico-Industrial da Saúde (iCEIS); Laboratório de Farmacologia e Química Molecular, Departamento de Biologia Química, Universidade Regional do Cariri (URCA), Crato, 63105-000, CE, Brasil.**
- * **Correspondência:** irwin.alencar@urca.br (I.R.A.M.); Tel.: +55-88-98829724; cunha.urca@gmail.com (F.A.B.C.)

Resumo

Contexto/Objetivos: A crescente prevalência de *Staphylococcus aureus* multirresistente representa um grande desafio clínico, principalmente devido à aquisição de múltiplos mecanismos de resistência. Entre esses, bombas de efluxo como NorA desempenham um papel crucial na resistência a quinolonas, promovendo a extrusão ativa do fármaco e reduzindo os níveis intracelulares de antibiótico. Este estudo avaliou a chalcona sintética CMA4DMA como potencial inibidor da bomba de efluxo NorA e modulador da resistência bacteriana. **Métodos:** Ensaios de susceptibilidade antimicrobiana foram conduzidos contra as cepas *S. aureus* SA1199 (tipo selvagem) e SA1199B (superexpressando NorA). A concentração inibitória mínima (CIM) da CMA4DMA e seus efeitos moduladores sobre a norfloxacin e o brometo de etídio foram determinados. A inibição do efluxo foi avaliada por acúmulo de brometo de etídio

e ensaios com *SYTOX Green*. Análises de *docking* molecular e ADMET *in silico* foram realizadas para prever afinidade de ligação e parâmetros farmacocinéticos. **Resultados:** CMA4DMA não apresentou atividade antibacteriana intrínseca (CIM ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$), mas reduziu a CIM da norfloxacin de 32 para 8 $\mu\text{g/mL}$ e do brometo de etídio de 32 para 8 $\mu\text{g/mL}$ em SA1199. Em SA1199B, observaram-se reduções de 64 para 16 $\mu\text{g/mL}$ e de 64 para 32 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A fluorescência aumentou 15% sem afetar a integridade da membrana. O *docking* revelou afinidade de ligação de $-7,504$ kcal/mol, mais forte que a da norfloxacin ($-7,242$ kcal/mol), envolvendo resíduos-chave Leu218, Ile309, Arg310 e Ile313. Dados de ADMET indicaram alta absorção intestinal (88,76%) e permeabilidade ($P_{app} = 1,38 \times 10^{-5}$ cm/s). **Conclusões:** CMA4DMA restaurou efetivamente a susceptibilidade à norfloxacin em cepas resistentes de *S. aureus*, destacando seu potencial como um esqueleto promissor para o desenvolvimento de novos inibidores de bombas de efluxo e adjuvantes antibióticos.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; chalcona; resistência bacteriana; bomba de efluxo; *docking*; ADMET

1. Introdução

A resistência aos antibióticos constitui um dos maiores desafios contemporâneos à saúde pública, impactando a mortalidade relacionada a infecções, prolongando a evolução das doenças, aumentando os custos de tratamento e reduzindo a produtividade social. Além disso, compromete a eficácia de intervenções médicas que dependem de antimicrobianos, como cirurgias profiláticas e quimioterapia (CHINEMEREM NWOBODO et al., 2022; LAZAR; OPREA; DITU, 2023; MUTEEB et al., 2023; TAHMASEBI et al., 2025). O surgimento da resistência resulta, em grande parte, da capacidade adaptativa das populações bacterianas, intensificada pelo uso indiscriminado de antibióticos, que favorece a aquisição e a disseminação de mecanismos de resistência.

Entre os patógenos multirresistentes, *S. aureus* se destaca devido à sua alta virulência, capacidade de evadir respostas imunes e crescente resistência a antimicrobianos (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021; GAJDÁCS, 2019; HORSWILL; JENUL, 2019; HORSWILL; KWIECINSKI, 2020). Esse microrganismo versátil pode causar desde lesões cutâneas leves até doenças graves, como sepse, pneumonia e síndrome do choque tóxico, por meio da produção de múltiplos fatores de virulência, incluindo toxinas, proteínas de adesão e sistemas de evasão imunológica, como a proteína A, toxinas superantigênicas e o sistema de agr de detecção de

quorum (ENANY; ALEXANDER, 2017).

A resistência em *S. aureus* surge tanto por mutações genéticas espontâneas quanto pela aquisição de genes de resistência via transferência horizontal. Elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons, ilhas patogênicas (SaPIs) e cassetes cromossômicos estafilocócicos (SCCs), permitem a rápida disseminação de determinantes de resistência (CHEN et al., 2015). Entre os mecanismos mais importantes estão a inativação enzimática de antibióticos, modificação de alvos moleculares, redução da permeabilidade da membrana e ativação de bombas de efluxo (DARBY *et al.*, 2023; HAQ. *et al.*, 2018; MUNITA; ARIAS, 2016). Processos como conjugação, transformação natural e transdução mediada por fagos contribuem para o surgimento de cepas altamente virulentas e resistentes.

Entre esses mecanismos, as bombas de efluxo se destacam como sistemas centrais de resistência, promovendo a extrusão ativa de antibióticos e outros compostos tóxicos (Khan, 2025). Estudos indicam que o genoma de *S. aureus* codifica pelo menos 31 bombas de efluxo multirresistentes distribuídas entre as principais famílias de transportadores (SCHINDLER *et al.*, 2015). A superfamília dos maiores facilitadores (MFS) tem recebido atenção especial, especialmente a bomba NorA, responsável pela extrusão de fluoroquinolonas e outros fármacos. Sua função opera por um mecanismo antiporte próton/fármaco, podendo ser expressa constitutivamente ou induzida pela exposição a antimicrobianos (COSTA *et al.*, 2013; NEYFAKH; BORSCH; KAATZ2, 1993; TRUONG-BOLDUC *et al.*, 2005).

Dada a escassez de novos antimicrobianos, estratégias alternativas têm sido exploradas, incluindo o uso de inibidores de bombas de efluxo (EPIs) (ZHANG *et al.*, 2024b). Esses compostos bloqueiam a extrusão de fármacos, potencialmente revertendo a resistência mediada por efluxo, reduzindo doses necessárias, minimizando efeitos adversos e restaurando a eficácia de antibióticos previamente ineficazes (PRASCH; BUCAR, 2015; SEUKEP et al., 2020; SPENGLER et al., 2017; ZHANG et al., 2024). Os EPIs podem ser naturais ou sintéticos, e compostos derivados de plantas medicinais, como as chalconas, têm mostrado potencial devido à sua diversidade estrutural e amplo espectro de atividades biológicas (SEUKEP et al., 2020; SHARMA; GUPTA; PATHANIA, 2019).

A literatura descreve diversos inibidores de bombas de efluxo, tanto sintéticos quanto naturais, capazes de restaurar a eficácia de antibióticos contra cepas resistentes. Entre os inibidores sintéticos, destaca-se o PAβN (fenilalanil-arginil-β-naftilamida), que atua por inibição competitiva e regulação gênica (BHATTACHARYYA *et al.*, 2017; LAMERS RYAN P. AND CAVALLARI, 2013); CCCP (carbonil cianeto-m-clorofenilhidrazona), que interfere na síntese de ATP (STRAHL; HAMOEN, 2010); NMP (1-(1-naftilmetil)-piperazina), que

prejudica a montagem adequada das bombas (SCHUMACHER *et al.*, 2006); e MBX2319, um derivado de pirazolopiridina com atividade comprovada contra *E. coli* (J *et al.*, 2014).

No grupo de inibidores naturais, destacam-se a silibina, que reduz a expressão dos genes NorA e qacA/B em *S. aureus* (WANG *et al.*, 2018); boeravinona B, que potencializa a ação da ciprofloxacina (SINGH *et al.*, 2017); curcumina, inibidora da bomba TetK (CHAN *et al.*, 2011); berberina e columbamina, que interferem na síntese de ATP (GUEFACK *et al.*, 2022); e reserpina, que se liga diretamente a proteínas de transporte (NEYFAKH; BIDNENKO; CHEN, 1991). Além disso, óleos essenciais de orégano e nigela mostraram potencial na modulação da expressão de genes de efluxo e alteração da permeabilidade da membrana bacteriana (CIRINO *et al.*, 2015; MOUWAKEH *et al.*, 2019).

Embora numerosos compostos naturais e sintéticos tenham sido descritos como inibidores de bombas de efluxo, a busca por moléculas eficazes, seguras e estruturalmente versáteis ainda representa um desafio significativo no combate à resistência bacteriana (SPENGLER *et al.*, 2017). Nesse contexto, as chalconas se destacam pelo amplo espectro de atividades biológicas e pela capacidade de modular mecanismos de resistência (DA SILVA *et al.*, 2022). Essas moléculas, amplamente distribuídas em flores, folhas, frutos e raízes, podem ser obtidas por síntese química ou semissintética (DE BRITO *et al.*, 2022), apresentam baixa toxicidade, coloração amarela característica e atuam como precursores de diversos compostos bioativos (DE SOUZA *et al.*, 2024; QUAN *et al.*, 2025). Estudos indicam que as chalconas exibem atividades antioxidante, anti-inflamatória (CHAVAN *et al.*, 2023), antimicrobiana (DE SOUZA *et al.*, 2024), anticancerígena (QUAN *et al.*, 2025) e antiviral (KIRTON *et al.*, 2025), além de potencializar a ação de antibióticos e reduzir fatores de virulência, como a formação de biofilme e a produção de toxinas (MAURYA; AGRAWAL, 2024; NAWAZ *et al.*, 2024; NAWAZ; TAJAMMAL; QURASHI, 2023).

No entanto, investigações envolvendo derivados sintéticos específicos, como a chalcona CMA4DMA, ainda são escassas. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial da chalcona sintética CMA4DMA como inibidora da bomba de efluxo NorA em *S. aureus* por meio de uma abordagem integrada *in vitro* e *in silico*, visando contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra infecções bacterianas resistentes.

2. Resultados

2.1. Atividade Antibacteriana In Vitro

2.1.1. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Ao analisar a atividade antibacteriana direta, observou-se que a chalcona não apresentou atividade direta no ensaio *in vitro* de concentração inibitória mínima (CIM), com valores iguais ou superiores a 1024 µg/mL para todas as cepas, considerados irrelevantes para avanços em estudos clínicos. Quanto ao inibidor padrão de bombas de efluxo Carbonyl Cyanide M-Chlorophenyl Hydrazone (CCCP), foram identificados valores de CIM de 8 µg/mL para a cepa 1199 e 16 µg/mL para a cepa 1199B.

2.1.2. Inibição de Bombas de Efluxo por Modulação da CIM de Antibióticos e Brometo de Etídio

Na análise de possíveis alterações da CIM de antibióticos e do brometo de etídio na cepa 1199 tipo selvagem, observou-se que a chalcona foi capaz de reduzir a CIM tanto do antibiótico quanto do brometo de etídio. A CIM do antibiótico diminuiu de 32 µg/mL para 8 µg/mL e, quando a atividade do brometo de etídio foi avaliada em combinação com o adjuvante, observou-se redução semelhante, de 32 µg/mL para 8 µg/mL. O controle positivo também reduziu a CIM de 32 µg/mL para 0,5 µg/mL em ambas as associações, conforme mostrado na Figura 1 e na Tabela 1.

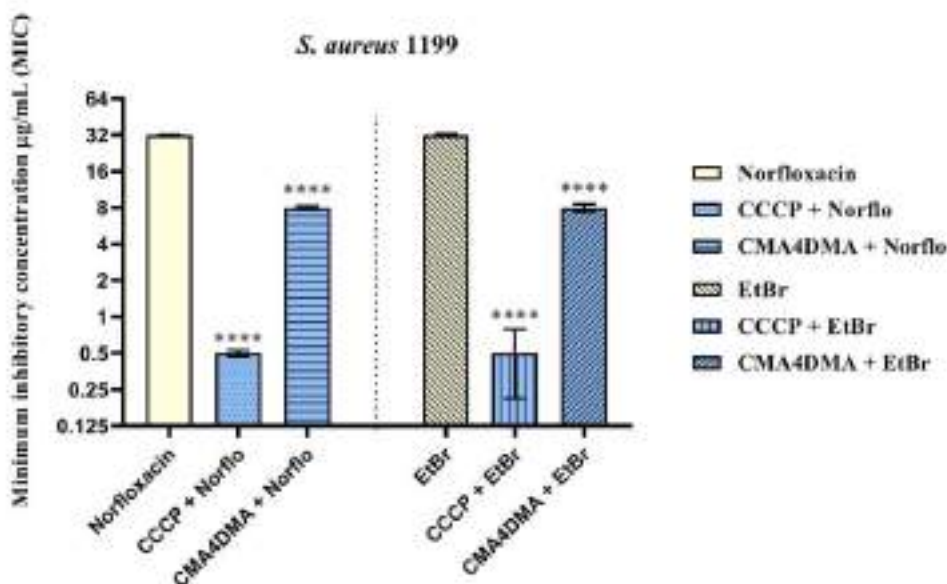


Figura I- 1: Avaliação da capacidade de inibir a bomba de efluxo NorA pelo CMA4DMA contra a cepa *S. aureus* 1199, em associação com Norfloxacina e EtBr. Os valores representam a média geométrica ± DP (desvio padrão). A análise foi realizada usando ANOVA *one-way*, seguida pelo teste de Tukey. **** = $p < 0,0001$ vs. controle.

Quanto às alterações da CIM na cepa 1199B, superexpressora de NorA, observou-se que a chalcona, como adjuvante, foi capaz de reduzir a CIM tanto do antibiótico quanto do brometo de etídio: de 64 µg/mL para 16 µg/mL para o antibiótico e de 64 µg/mL para 32 µg/mL

para o brometo de etídio. O controle positivo CCCP reduziu a CIM de 64 µg/mL para 16 µg/mL tanto para o antibiótico quanto para o brometo de etídio, conforme mostrado na Figura 2 e Tabela 1.

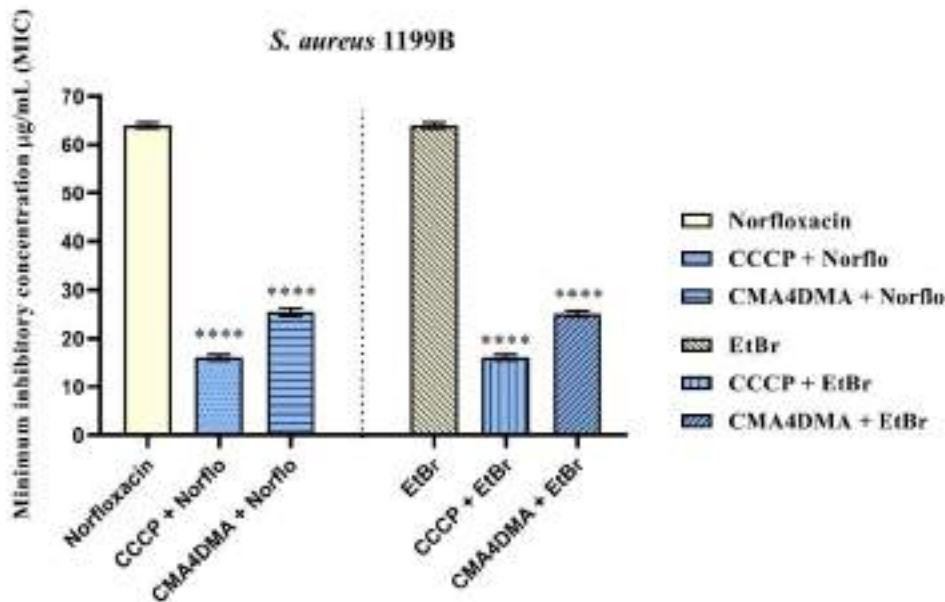


Figura I- 2: Avaliação da capacidade de inibir a bomba de efluxo NorA pelo CMA4DMA contra a cepa *S. aureus* 1199B, em associação com Norfloxacina e EtBr. Os valores representam a média geométrica $\pm$ DP (desvio padrão). A análise foi realizada usando ANOVA *one-way*, seguida pelo teste de Tukey. **** = $p < 0,0001$ vs. controle.

Tabela I- 1: Concentração inibitória mínima (CIM) da Norfloxacina e do EtBr isoladamente e em combinação com CMA4DMA e CCCP, contra as cepas *S. aureus* 1199 e 1199B. Os valores representam a média geométrica em µg/mL.

	<i>S. aureus</i> 1199	<i>S. aureus</i> 1199B
Norfloxacina	32 µg/mL $\pm$ 1	64 µg/mL $\pm$ 1
Norfloxacina + CCCP	0.5 µg/mL $\pm$ 1	16 µg/mL $\pm$ 1
Norfloxacina + CMA4DMA	8 µg/mL $\pm$ 1	25 µg/mL $\pm$ 1.5
EtBr	32 µg/mL $\pm$ 1	64 µg/mL $\pm$ 1
EtBr + CCCP	0.5 µg/mL $\pm$ 1	16 µg/mL $\pm$ 1
EtBr + CMA4DMA	8 µg/mL $\pm$ 1	25 µg/mL $\pm$ 1.5

2.1.3. Avaliação da Inibição da Bomba de Efluxo NorA pela Medição da Fluorescência do Brometo de Etídio

Na avaliação do acúmulo de brometo de etídio (EtBr) em *S. aureus* 1199B, o CMA4DMA na concentração de 200 µg/mL causou um aumento significativo de 15% na fluorescência do EtBr em comparação ao controle negativo. Um resultado semelhante e significativo foi observado com o inibidor padrão de bombas de efluxo CCCP, que aumentou a

fluorescência em 21% na cepa 1199B (Figura 3; Tabela 2).

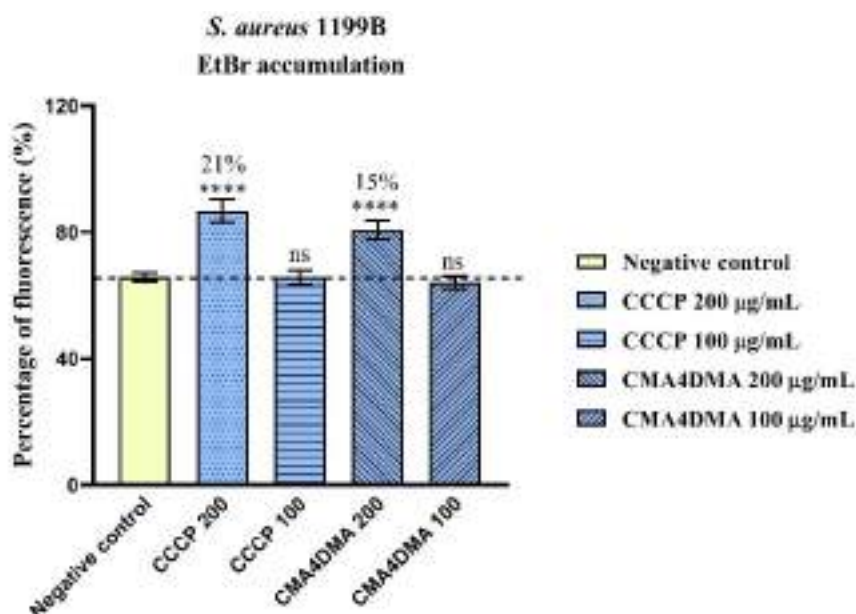


Figura I- 3: Avaliação da inibição da bomba de efluxo NorA pelo CMA4DMA nas concentrações de 200 µg/mL e 100 µg/mL. Avaliada pela medição da fluorescência do EtBr em *S. aureus* 1199B. Os resultados são expressos como percentual de fluorescência. **** = $p < 0,0001$ vs. controle negativo; ns = não significativo.

Tabela I- 2: Percentual médio de fluorescência do EtBr para cada grupo. As abreviações a, b e c indicam diferenças estatísticas entre os grupos.

Grupos	Média e Desvio Padrão
Controle Negativo	65.9 ± 1.5 ^a
CCCP 200 µg/mL	86.8 ± 3.6 ^b
CCCP 100 µg/mL	65.7 ± 2.3 ^a
CMA4DMA 200 µg/mL	80.8 ± 3 ^c
CMA4DMA 100 µg/mL	64 ± 2 ^a

2.1.4. Avaliação do Aumento da Permeabilidade da Membrana Bacteriana

Observou-se que o CMA4DMA, nas concentrações de 200 µg/mL e 100 µg/mL, não aumentou a intensidade da fluorescência do *SYTOX Green* em comparação ao controle negativo nas cepas testadas, não apresentando diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo. Isso indica que o composto não afeta a permeabilidade da membrana. O controle positivo, polimixina B nas concentrações de 200 µg/mL e 100 µg/mL, aumentou significativamente a intensidade da fluorescência em 39% e 29% na cepa *S. aureus* 1199B. As medições de fluorescência do *SYTOX Green* não mostraram alterações estatisticamente significativas (Figura 4; Tabela 3).

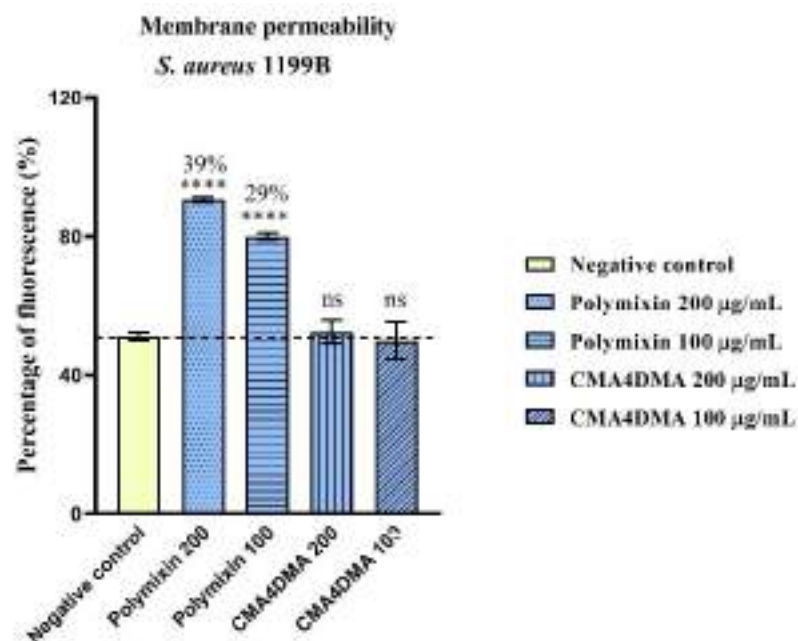


Figura I- 4: Avaliação da ação do CMA4DMA nas concentrações de 200 µg/mL e 100 µg/mL sobre a permeabilidade da membrana bacteriana de *S. aureus* 1199B. $p < 0,0001$ vs. SYTOX Green. Os resultados são expressos como intensidade média de fluorescência.

Tabela I- 3: Percentual médio de fluorescência do SYTOX Green para cada grupo. As abreviações a, b e c indicam diferenças estatísticas entre os grupos.

Grupos	Média e Desvio Padrão
Controle negativo	51.2 ± 4^a
Polimixina 200 µg/mL	90.7 ± 2^b
Polimixina 100 µg/mL	80 ± 3^c
CMA4DMA 200 µg/mL	52.4 ± 9^a
CMA4DMA 100 µg/mL	50 ± 5.4^a

2.2. Análise de Docking Molecular

Como exemplo, as interações ligante–proteína formadas entre a sequência antigênica Fab e os resíduos da bomba de efluxo NorA foram mapeadas (ver Figura 5a). Observou-se que as porções aromáticas do antígeno formaram uma série de interações hidrofóbicas com resíduos de cadeias laterais alquil ou aromáticas (Figura 5). Entre estes, é possível destacar os resíduos Phe140, Ile244 e Phe303 (Figura 5b), que são caracterizados como resíduos de interação de substratos conhecidos da bomba de efluxo NorA, como a norfloxacin (DA SILVA *et al.*, 2020). Estes resíduos são fundamentais para a identificação de novos inibidores da NorA a partir da cepa 1199B (BRAWLEY *et al.*, 2022).

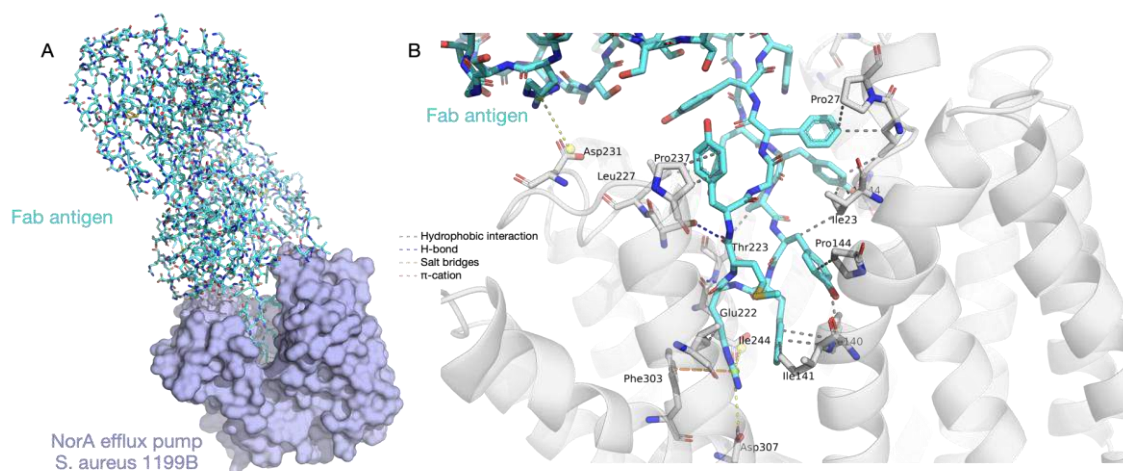


Figura I- 5: (A) Representação tridimensional do *docking* do antígeno Fab (bastão ciano) em relação ao sítio de ligação da bomba de efluxo NorA da cepa *S. aureus* 1199B (superfície roxa), e (B) visualização tridimensional do *docking* do antígeno Fab (bastão ciano) no domínio transmembranar da NorA (desenho cinza) em relação aos resíduos do sítio ativo (bastão cinza)

Ao analisar as poses da simulação de *docking* em relação à bomba de efluxo NorA da cepa *S. aureus* 1199B, observou-se que a chalcona CMA4DMA se ligou dentro do domínio onde o antígeno Fab está complexo, ocupando a mesma cavidade de ligação que os antibióticos Norfloxacin e Ciprofloxacin, designada como domínio de ligação da bomba de efluxo NorA (Figura 6a). A cavidade deste domínio possui uma área de superfície molecular prevista de 1260,43 Å² (Figura 6b), onde pode ser observada uma maior distância espacial em relação ao controle CCCP (carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona), corroborando as análises experimentais, nas quais o CCCP reduziu a concentração inibitória da Norfloxacin e do EtBr. Ao final do ciclo de 20 poses de *docking* independentes, a CMA4DMA complexou-se com a bomba de efluxo NorA com uma afinidade de ligação (BA) de -7,504 kcal/mol, energeticamente mais favorável que a Norfloxacin, que apresentou BA de -7,242 kcal/mol (Tabela 4). Todas as melhores poses selecionadas foram realizadas dentro de um limite estatístico favorável de RMSD <2,0 Å, garantindo a reprodutibilidade do protocolo de *docking* (YUSUF *et al.*, 2008).

A análise das interações ligante–receptor revelou que a CMA4DMA (verde) formou interações hidrofóbicas com as porções alquil dos resíduos Leu218, Ile309, Arg310 e Ile313, enquanto a Norfloxacin (azul) tendia a formar interações hidrofóbicas com resíduos aromáticos, incluindo Phe140 e Phe303, que são resíduos vizinhos dentro da cavidade do domínio de ligação (Figura 6c) (FOKOUÉ *et al.*, 2020). Quando comparada com o EtBr (Figura 6d), observou-se que ocorreram interações distintas, embora próximas da CMA4DMA, formadas entre o controle e resíduos aromáticos (Phe140, Tyr225 e Phe303). É importante notar

que uma interação de ligação de hidrogênio foi formada entre o grupo NH2 da CMA4DMA e a porção polar de Thr211, onde a distância calculada doador–aceptor de 2,28 Å indica interações polares moderadas a fracas ($2,5 < d[\text{Å}] \leq 3,1$), com uma ligação mais forte em comparação à Norfloxacina ($d = 2,80 \text{ Å}$) (IMBERTY *et al.*, 1991).

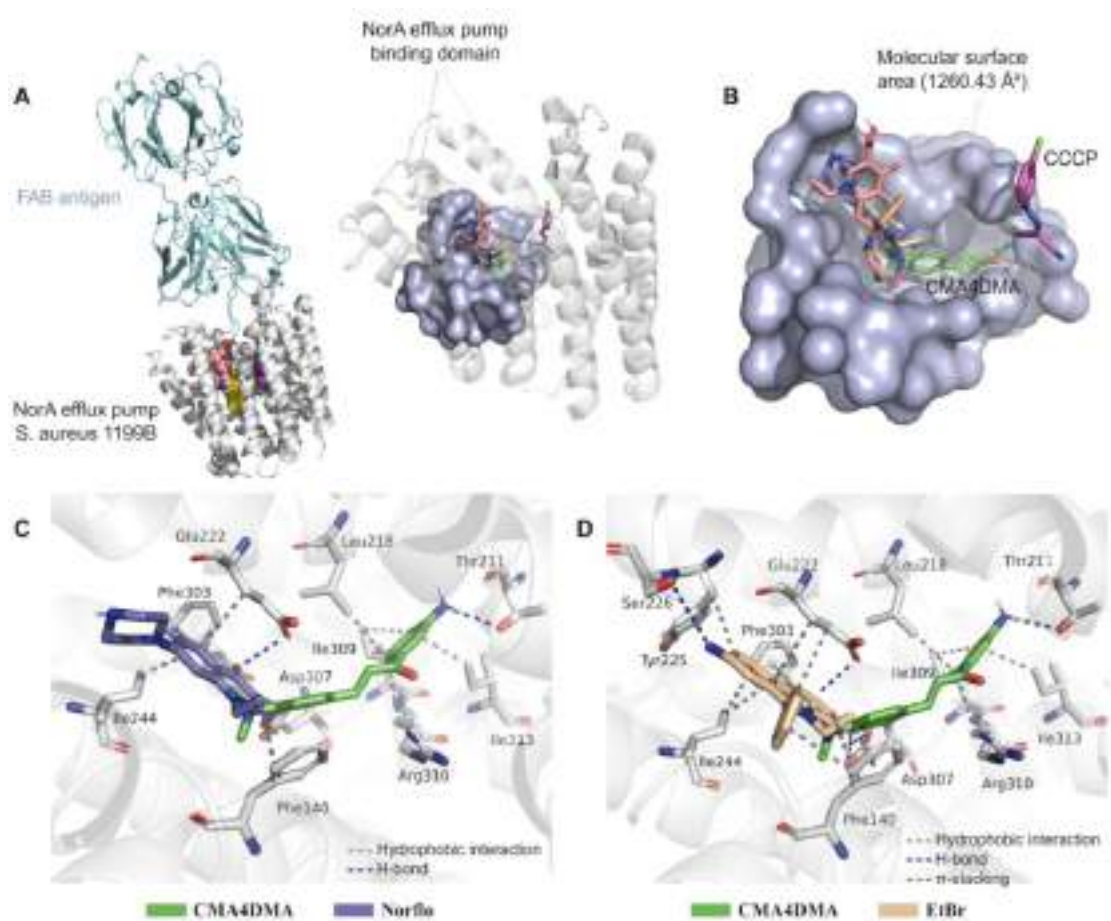


Figura I- 6: (A) Estrutura tridimensional da bomba de efluxo NorA da cepa *S. aureus* 1199B (branca) co-cristalizada com o antígeno Fab (ciano) e complexada com a chalcona CMA4DMA, os antibióticos Norfloxacina e Ciprofloxacina, e os controles EtBr e CCCP, destacando o sítio de ligação (cor azul). (B) Ampliação da área de superfície molecular da cavidade prevista para o domínio de ligação da bomba de efluxo NorA. (C) Visualização tridimensional das interações ligante–receptor formadas entre os ligantes CMA4DMA (verde) e o antibiótico Norfloxacina (azul) e os resíduos do domínio de ligação da bomba de efluxo NorA. (D) Visualização tridimensional das interações ligante–receptor formadas entre os ligantes CMA4DMA (verde) e o controle EtBr (laranja) e os resíduos do domínio de ligação da bomba de efluxo NorA.

Tabela I- 4: Dados das interações ligante–receptor observadas nas simulações de *docking* molecular entre a chalcona CMA4DMA e os ligantes de controle (Norfloxacina, Ciprofloxacina, EtBr e CCCP)* contra as bombas de efluxo NorA.

Ligante	E _A (kcal/mol)	RMSD (Å)	Interações ligante–receptor	
			Tipo	Resíduo (distância em Å)
CMA4DMA	−7.504	0.118	Hidrofóbica	Leu218 (3.50), Ile309 (3.22), Ile309 (3.86), Arg310 (3.43), Ile313 (3.57)
			Ponte de Hidrogênio	Thr211 (2.28)

Norfloxacin*	-7.242	0.497	Hidrofóbica	Phe140 (3.61), Glu222 (3.94), Ile244 (3.60), Phe303 (3.51)
			Ponte de Hidrogênio	Glu222 (2.80), Asp307 (2.60)
Ciprofloxacina*	-6.427	1.748	Hidrofóbica	Glu222 (3.51), Ile240 (3.59), Ile244 (3.69), Ile244 (3.54)
			Ponte de Hidrogênio	Ser226 (2.77), Ser226(2.35), Asp307 (3.04)
EtBr*	-8.363	0.966	Hidrofóbica	Phe140 (3.81), Phe140 (3.59), Glu222 (3.88), Glu222 (3.88), Tyr225 (3.58), Ile244 (3.64), Phe303 (3.69)
			Ponte de Hidrogênio	Ser226 (3.46), Asp307 (2.24)
			Interação π - π	Phe303 (4.74)
CCCP*	-6.879	1.409	Hidrofóbica	Ile19 (3.83), Phe47 (3.97), Phe47 (3.65)
			Ponte de Hidrogênio	Gln51 (2.94), Asn340 (2.33)

Nota: em negrito, destacam-se as interações comuns apresentadas pelos ligantes de controle em relação ao Fab25 co-cristalizado.

2.3. Estudo In Silico ADMET

2.3.1. Predição da Permeabilidade Celular

Na análise preditiva ADMET, a permeabilidade celular efetiva (Papp) em células Caco-2 mostrou forte correlação com os parâmetros físico-químicos calculados de lipofilicidade (logP) e solubilidade aquosa (logS). Para os parâmetros preditos, foi calculada uma correlação estatística de $r = 0,93$, indicando uma relação diretamente proporcional entre Papp em Caco-2 e logP. O composto CMA4DMA ocupou um espaço físico-químico estatisticamente mais próximo dos controles EtBr e CCCP, onde os índices logPapp aumentaram de -5,2 quando o logP excedeu 2,0 (Figura 7a). Isso indica compostos com baixa afinidade por ambientes aquosos ($\log S \leq -3,0$) e alta permeabilidade celular.

No radar do espaço “drug-like” (Figura 7b), o logP calculado de 2,74 posicionou o CMA4DMA dentro da faixa ideal de lipofilicidade segundo o sistema de classificação biofarmacêutica da Pfizer ($-2 < \log P \leq 5$). Além disso, seu peso molecular de 328,4 g/mol situou-se dentro da faixa adequada para compostos “drug-like” (200–500 g/mol) (Tabela 5). O valor de TPSA de 46,33 Å², amplamente influenciado pelo grupo NH₂, esteve dentro do limite ótimo para melhorar as propriedades farmacocinéticas e reduzir o risco de toxicidade *in vivo* (40–90 Å²). O escore QED de 0,525 reforça a viabilidade farmacocinética do composto.

O valor predito de Papp em células Caco-2 foi $1,38 \times 10^{-5}$ cm/s, indicando maior

permeabilidade intestinal em comparação com Norfloxacin e Ciprofloxacina, que apresentaram valores abaixo de $1,0 \times 10^{-5}$ cm/s (Tabela 6). Em células MDCK, valores preditos de permeabilidade acima de $1,5 \times 10^{-5}$ cm/s sugerem que o CMA4DMA, assim como EtBr e CCCP, pode apresentar alta permeabilidade em linhas celulares mais seletivas. A probabilidade predita de interação com o transportador de efluxo P-gp indicou baixa probabilidade de CMA4DMA ser um substrato, característica associada a compostos de baixa polaridade (TPSA ≤ 90 Å²).

Quanto à distribuição, o Vdss predito de 0,37 L/kg sugere que o composto pode se distribuir relativamente de forma equilibrada entre o plasma sanguíneo e os tecidos biológicos. As previsões de ligação a proteínas plasmáticas indicaram PPB >90%, provavelmente devido à baixa polaridade do composto e à natureza hidrofóbica da molécula, favorecendo a ligação dentro das cavidades hidrofóbicas das proteínas séricas.

Tabela I- 5: Propriedades físico-químicas calculadas para CMA4DMA e aplicadas ao critério de estimativa quantitativa de “druglikeness” (QED)¹.

Propriedade	Valor	Faixa ótima
logP	2.74	≤ 5.0
logS	-3.78	> -3.0
MW (g/mol)	266.14	200–500
TPSA (Å ²)	46.33	40–90
nHA	3	≤ 10
nHD	2	≤ 5
nRot	4	≤ 10
AROM	2	≤ 3
QED ¹	0.525	-

Nota: o QED foi estimado a partir da Equação (1)¹.

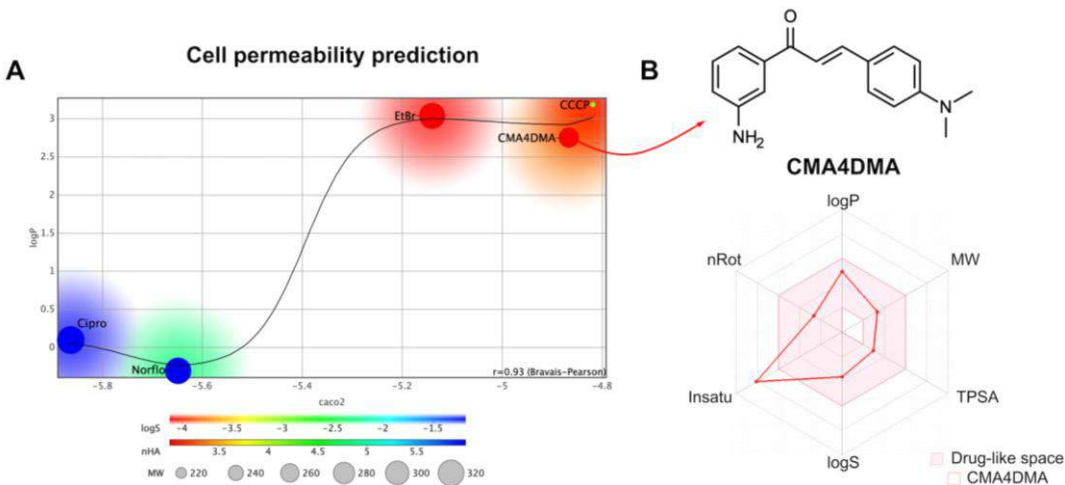


Figura I- 7: (A) Alinhamento entre a permeabilidade aparente (Papp) em células Caco-2 e logP, e correlação com descritores físico-químicos de solubilidade aquosa (logS), peso molecular (MW) e número de aceptores de ponte de hidrogênio (nHA); e (B) radar de propriedades “drug-like” para os valores calculados para CMA4DMA em

relação aos limites de logP entre -2,0 e 5,0, MW entre 200–500 g/mol, TPSA entre 20–120 Å², logS > -3,0, insaturação (Fsp3 > 0,5) e nRot ≤ 10.

2.3.2. Permeação Cerebral e Intestinal e Cardiotoxicidade

No mapa de potencial de lipofilicidade molecular (MLP), foram identificadas as contribuições estruturais que favorecem a absorção intestinal humana (HIA) e a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BBB). A análise de superfície indicou que o grupo NH₂ do CMA4DMA é altamente polar e apresenta uma grande área de superfície acessível ao solvente (espectro vermelho), enquanto os anéis aromáticos substituídos concentram a maior parte da superfície lipofílica do composto (espectro azul), resultando em um logP calculado de 2,74, consistente com afinidade ótima para ambientes lipofílicos (Figura 8a).

Essa propriedade sustenta uma HIA estimada de 88,76% (Figura 8b), já que compostos lipofílicos permeiam membranas celulares mais facilmente e, portanto, apresentam absorção aumentada. A lipofilicidade moderada a alta (logP >2,0–3,0) também favorece a permeabilidade em linhas celulares seletivas, como células MDCK, comumente aplicadas em ensaios de permeabilidade da BBB. Nesse contexto, o logBB predito de 0,87 correlacionou-se com a permeabilidade predita em MDCK (Tabela 6), alinhando-se aos dados observados para pelo menos 87% dos compostos ativos no SNC na base de dados ADMET-LMC (Figura 8c).

Além disso, a natureza lipofílica dos anéis aromáticos substituídos foi associada à possível inibição dos canais hERG (human Ether-à-go-go-Related Gene). A predição *in silico* sugeriu que o sistema aromático α,β -insaturado contribui negativamente para a inibição dependente de K⁺ dos canais hERG, resultando em um IC₅₀ estimado de 6,104 μ M e um pIC₅₀ de 5,21 ± 0,35 (Figura 8d). O teste de similaridade de dados previu ainda uma possível inibição pK_i de 5,43, com 33% de similaridade com inibidores conhecidos de hERG (Figura 8e), e um pIC₅₀ predito de 5,69 com 67% de similaridade com compostos documentados como inibidores de hERG na base ADMET-LMC (Figura 8f).

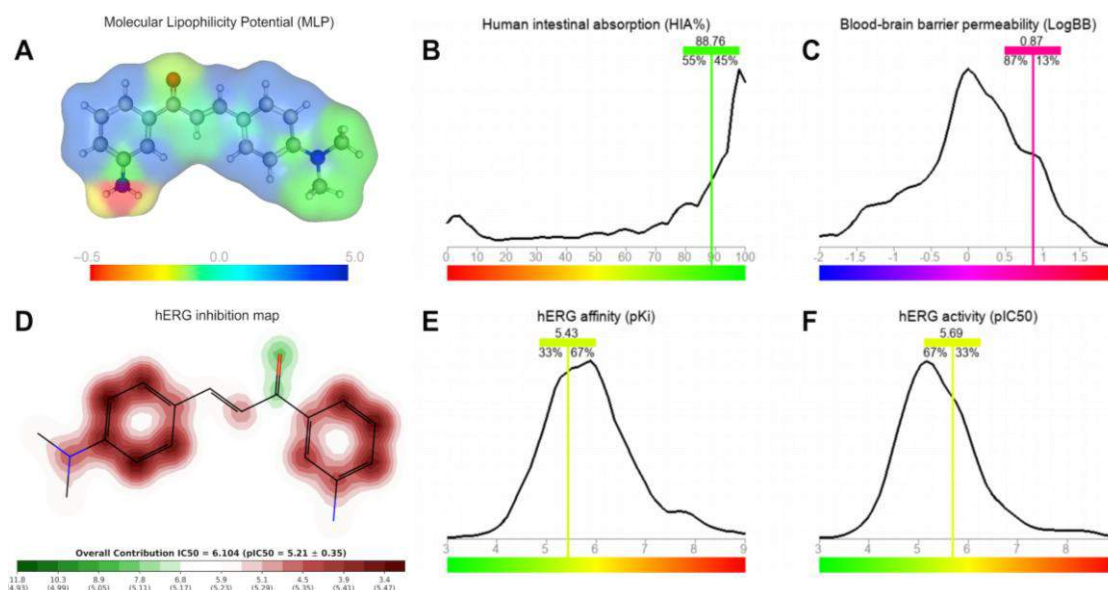


Figura I- 8: (A) Mapa de potencial de lipofilicidade molecular (MLP), (B) predição de absorção intestinal humana (HIA), (C) predição da permeabilidade da barreira hematoencefálica (logBB), (D) mapa 2D de suscetibilidade à inibição dos canais hERG dependentes de K⁺ (human Ether-à-go-go-Related Gene), (E) afinidade com hERG expressa como potencial de inibição (pKi), (F) atividade de inibição de hERG expressa como concentração inibitória (pIC50).

Tabela I- 6: Propriedades farmacocinéticas preditas do CMA4DMA por meio da abordagem multiplataforma de predição ADMET.

Propriedade	CMA4DMA	Norflo	Cipro	EtBr	CCCP
P _{app} Caco-2 (cm/s)	1.38×10^{-5}	2.29×10^{-6}	1.38×10^{-6}	7.41×10^{-6}	1.54×10^{-5}
P _{app} MDCK (cm/s)	1.90×10^{-5}	6.76×10^{-6}	6.02×10^{-6}	1.86×10^{-5}	1.55×10^{-5}
P-gp (probability)	0.04	0.99	0.98	0.99	0.00
CL _{Hepa} (μL/min/10 ⁶ cells)	76.50	12.81	2.90	55.67	64.28
CL _{Micro} (mL/min/kg)	10.58	6.20	3.31	6.55	3.49
V _{dss} (L/kg)	0.37	0.21	0.26	0.74	-0.70
PPB (%)	94.31	20.36	25.51	83.13	97.99

2.3.3. Sítio de Metabolismo e Toxicidade Aguda em Ratos

A predição do sítio metabólico indicou que o CMA4DMA contém um grupo -N(CH₃)₂, que contribui negativamente (espectro de cor vermelha) para o metabolismo de primeira passagem. Esse sítio foi identificado como um sítio de N-desalquilação mediado pelas principais isoformas do CYP450, incluindo CYP2D6, CYP2C9 e CYP3A4 (Figura 9a). Essa biotransformação pode gerar aldeídos instáveis e radicais livres capazes de interagir com macromoléculas como o DNA, potencialmente levando a efeitos hepatotóxicos (DANG *et al.*,

2018). O teste de similaridade de dados confirmou que este é um sítio metabólico estruturalmente específico dentro dos limites aceitáveis de similaridade (Figura 9b) (ZHENG *et al.*, 2009).

A cinética de primeira passagem predita sugeriu uma depuração hepática (CLHepa) de 76,50 $\mu\text{L}/\text{min}/10^6$ células, indicando que o CMA4DMA poderia ser metabolizado mais rapidamente por hepatócitos do que a Norfloxacin e a Ciprofloxacina, que apresentaram valores de CLHepa abaixo de 15 $\mu\text{L}/\text{min}/10^6$ células, consistente com maior estabilidade metabólica e biodisponibilidade oral (Tabela 6) (DI *et al.*, 2012).

Em nível microsomal, os valores de depuração preditos (CLMicro) indicaram que a Norfloxacin e a Ciprofloxacina são metabolicamente mais estáveis ($\leq 8,0$ mL/min/kg) em comparação com o CMA4DMA, que apresentou CLMicro predita de 10,58 mL/min/kg, refletindo instabilidade metabólica relativa e excreção mais rápida da chalcona na primeira passagem (Tabela 6) (PETTERSSON *et al.*, 2016).

As predições de toxicidade em ratos revelaram uma LD50 oral de 1924 mg/kg, ligeiramente abaixo do limite geral de segurança (LD50 >2000 mg/kg), sugerindo possível toxicidade devido à ativação metabólica (Figura 9c) (GONELLA DIAZA *et al.*, 2015). Para vias parenterais, os valores de LD50 preditos foram <500 mg/kg para administração intraperitoneal (IP) e intravenosa (IV), indicando maior toxicidade sistêmica quando o metabolismo de primeira passagem é contornado. Para administração subcutânea, a LD50 predita de aproximadamente 893,7 mg/kg sugeriu que essa via poderia ser viável, particularmente para terapias tópicas ou de infecções localizadas (Figura 9c).

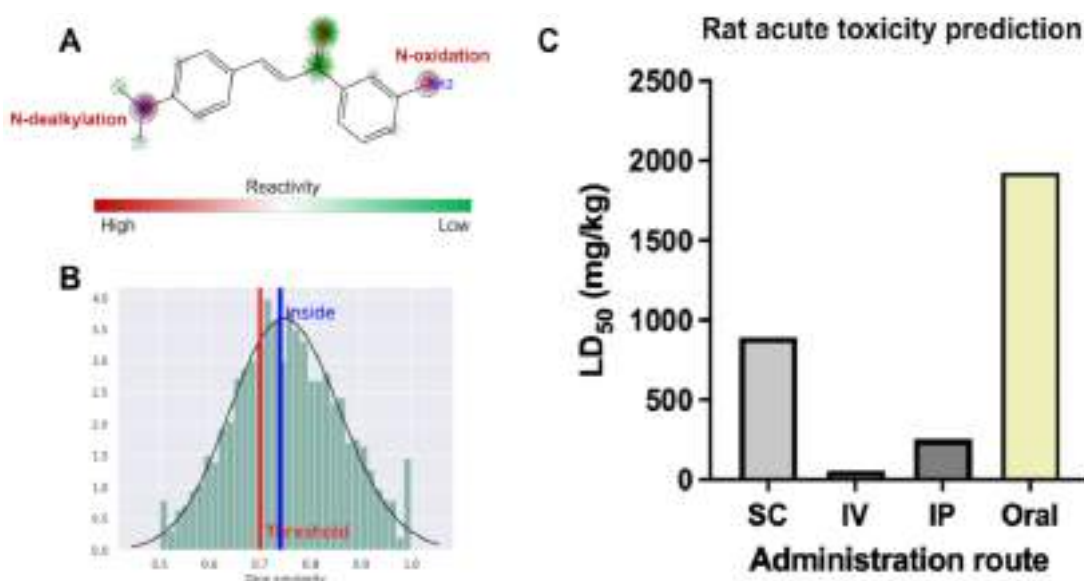


Figura I- 9: (A) Mapa de reatividade 2D e predição do sítio de metabolismo da chalcona CMA4DMA, (B) espectro de similaridade de dados em relação a fragmentos reativos depositados no conjunto de treinamento STopTox, e

(C) predição da dose letal (LD50) em ratos para diferentes vias de administração: oral, IP — intraperitoneal, IV — intravenosa, e SC — subcutânea.

3. Discussão

A ausência de uma MIC relevante não desqualifica completamente uma substância para aplicações potenciais em outros estudos contra microrganismos, especialmente quando se considera seu possível uso como adjuvante antibiótico. No caso dos inibidores de bombas de efluxo, a ausência de atividade direta pode até aumentar sua aplicabilidade, como observado na literatura (WANG; VENTER; MA, 2016).

Restaurar a atividade de antibióticos ou outros agentes antibacterianos por meio de adjuvantes é uma das principais estratégias atualmente empregadas para controlar cepas que apresentam múltiplos mecanismos de resistência a fármacos antibacterianos ou outros agentes bactericidas (GONZÁLEZ-BELLO, 2017). Isso é particularmente relevante, pois a descoberta de novos antibióticos eficazes é cada vez mais rara. Além disso, mesmo quando um novo antibiótico é descoberto, a probabilidade de que seu uso indiscriminado leve à resistência bacteriana é alta (BOUCHER *et al.*, 2013). Vários métodos existem para avaliar a capacidade de substâncias em restaurar a atividade antibiótica e, conseqüentemente, identificar os mecanismos de resistência bacteriana envolvidos. A redução na concentração inibitória mínima (MIC) é uma das primeiras análises realizadas para indicar a restauração da atividade antibiótica, geralmente utilizando concentrações subinibitórias das substâncias testadas em combinação com um antibiótico ou outro agente antibacteriano (DAVIES; SPIEGELMAN; YIM, 2006).

No presente estudo, como mostrado na Figura 1, a CMA4DMA em concentrações subinibitórias foi capaz de restaurar a atividade antibiótica pela redução da MIC, efeito também observado em combinação com brometo de etídio. No caso do brometo de etídio, a redução da MIC indica inibição da bomba de efluxo, reforçada pela ação do controle positivo, o inibidor de bomba de efluxo CCCP. Vale destacar que a cepa SA1199 possui a bomba de efluxo NorA com expressão basal, e a redução da MIC observada nessa cepa pode indicar inibição da expressão basal da bomba NorA (ZIMMERMANN *et al.*, 2019).

A cepa SA1199B é amplamente descrita na literatura por sua alta resistência à norfloxacin e outras quinolonas (KAATZ; SEO, 1995; NEYFAKH; BORSCH; KAATZ, 1993). A resistência a essa classe de antibióticos em *S. aureus* pode ocorrer via bombas de efluxo ou por modificações na topoisomerase, alvo principal das quinolonas (KAATZ; SEO, 1997). A redução da MIC nessa cepa, como observado em SA1199, pode estar associada à

inibição de mecanismos de resistência previamente descritos. A cepa SA1199B superexpressa a bomba NorA, e a diminuição da MIC contra certos antibióticos sugere fortemente a inibição desse transportador, especialmente quando sua expressão é elevada na membrana celular bacteriana. Para descartar interferência de outros mecanismos, é prática comum avaliar a redução da MIC em brometo de etídio, substrato característico de NorA, juntamente com o efeito do CCCP como referência de inibidor de bomba de efluxo. Assim, os resultados apresentados na Figura 2 indicam que a CMA4DMA tem potencial como inibidor da bomba NorA.

Estudos com chalconas naturais isoladas de *Arrabidaea brachypoda* (Rezende-Júnior et al., 2020) e chalconas sintéticas (SIQUEIRA et al., 2021) demonstraram que, semelhantemente à CMA4DMA, as chalconas não apresentam atividade antibacteriana direta, mas reduzem significativamente a MIC da norfloxacin em cepas SA1199B e do brometo de etídio, indicando inibição da bomba NorA. Experimentos de *docking* confirmaram a sobreposição do ligante com o sítio de ligação da norfloxacin na NorA. Esses resultados são especialmente similares aos observados com CMA4DMA, onde o grupo amino no anel fenólico contribuiu positivamente para a redução da MIC em cepas portadoras de NorA (REZENDE-JÚNIOR et al., 2020; SIQUEIRA et al., 2021).

Além disso, a mesma chalcona utilizada no presente trabalho foi investigada contra cepas de *S. aureus* K4100, portadoras de QacC e β -lactamases (DA SILVA et al., 2024) e K2068, portadoras de MepA (DA SILVA et al., 2024). Nenhuma atividade intrínseca (MIC ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$) foi observada em ambos os estudos. Na cepa K4100, a CMA4DMA não inibiu β -lactamase, mas reduziu significativamente a MIC de EtBr de 64 para 32 $\mu\text{g/mL}$. No estudo contra a cepa K2068, foram observadas reduções significativas da MIC para ciprofloxacina e brometo de etídio. Estudos de *docking* confirmaram que a chalcona pode se ligar ao mesmo sítio ocupado pelo inibidor padrão clorpromazina, interagindo com resíduos proteicos chave, corroborando seu potencial como inibidor de MepA (DA SILVA et al., 2024).

Esses estudos complementam e validam os resultados obtidos no presente trabalho, demonstrando que a CMA4DMA reduz consistentemente a resistência mediada por efluxo em diferentes contextos genéticos de *S. aureus* (NorA, MepA e QacC), consolidando-a como uma candidata promissora a adjuvante antibacteriano.

Conforme observado na Figura 3, o aumento da fluorescência devido à maior acumulação intracelular de brometo de etídio corrobora os resultados de redução da MIC, apoiando a inibição da bomba de efluxo. A CMA4DMA promoveu aumento do EtBr intracelular, tornando-o mais disponível para intercalar com o DNA bacteriano, consequência

da inibição da bomba de efluxo, que normalmente expulsa o composto da célula (Paixão et al., 2009).

Estudos de acumulação intracelular de brometo com CMA4DMA em *S. aureus* 1199B são inexistentes, mas estudos com outras chalconas demonstram a inibição da bomba de efluxo com aumento de fluorescência devido à acumulação de EtBr, como no estudo de HOLLER et al., 2012, que avaliou uma biblioteca de 117 chalconas quanto à inibição da bomba NorA mediada por EtBr. Além disso, JESUS et al. (2022), avaliaram derivados de chalcona capazes de aumentar a acumulação de EtBr em *S. aureus* por inibição de bombas de efluxo, corroborando os achados do presente estudo.

De acordo com a Figura 4, a chalcona CMA4DMA não alterou a permeabilidade da membrana, indicando que seu efeito não se deve a inibição indireta da bomba via alterações na fluidez da membrana. Embora a inibição indireta por alteração da membrana seja um modo de ação para alguns compostos que visam bombas de efluxo, a interação direta com a bomba é mais comum (LI; NIKAIDO, 2009; UGHACHUKWU; UNEKWE, 2012). Exceções existem, como no estudo de TINTINO et al., 2020, onde a menadiona atuou tanto diretamente na bomba quanto indiretamente na membrana plasmática. É provável que a CMA4DMA atue em um sítio de ligação na proteína NorA, conforme sugerido pelos estudos de *docking* molecular.

Os resultados de *docking* indicam que a CMA4DMA se liga eficazmente ao mesmo domínio da bomba de efluxo NorA onde antibióticos fluoroquinolônicos, como Norfloxacin e Ciprofloxacin, interagem. A afinidade de ligação mais favorável da CMA4DMA em comparação à Norfloxacin sugere maior estabilidade energética dessa interação, reforçando seu potencial como modulador da atividade de efluxo.

As interações hidrofóbicas de CMA4DMA com resíduos alifáticos (Leu218, Ile309, Arg310 e Ile313), distintas das interações aromáticas predominantes observadas para Norfloxacin e EtBr, indicam que a CMA4DMA ocupa a cavidade de forma diferenciada. Essa divergência pode favorecer efeitos sinérgicos com antibióticos, alterando a dinâmica conformacional do sítio de ligação. Fenômeno semelhante foi observado em estudos de *docking* associados à inibição da cepa 1199B (DA SILVA et al., 2020).

A ligação por ponte de hidrogênio observada entre CMA4DMA e Thr211 reforça ainda mais o perfil de ligação, com distância doadora-aceptora menor indicando interações polares mais estáveis do que aquelas da Norfloxacin. A distância espacial da CMA4DMA em relação ao controle CCCP corrobora os achados experimentais, onde o CCCP potencializou a atividade da Norfloxacin e EtBr, sugerindo sobreposição mecânica na inibição da bomba de efluxo.

Em conjunto, os achados suportam a hipótese de que a CMA4DMA tem efeito inibitório potencial sobre a bomba de efluxo NorA, potencializado na presença de antibióticos, destacando-a como candidata promissora para estudos futuros de modulação de bombas de efluxo e reversão da resistência antibiótica.

Os resultados preditivos de ADMET indicam que a CMA4DMA possui propriedades físico-químicas compatíveis com alta permeabilidade celular, fortemente correlacionada com lipofilicidade (logP). Sua posição no radar de propriedades "*drug-like*" — dentro dos limites de logP, MW e TPSA — reforça o alinhamento com características de compostos orais.

O valor predito de Papp em células Caco-2, superior ao dos antibióticos de referência Norfloxacin e Ciprofloxacina, sugere maior absorção intestinal e melhor biodisponibilidade oral. Além disso, a alta permeabilidade prevista em células MDCK e a baixa probabilidade de ser substrato de P-gp favorecem acúmulo intracelular eficiente, potencializando sua ação antimicrobiana.

O Vdss previsto, dentro da faixa aceitável, indica que o composto pode alcançar equilíbrio adequado entre plasma e tecidos, minimizando risco de acúmulo excessivo. A alta ligação a proteínas plasmáticas (>90%), típica de moléculas lipofílicas de baixa polaridade, pode influenciar a fração livre disponível para ação farmacológica, mas também contribui para estabilidade plasmática e tempo de circulação prolongado.

O mapa MLP e as predições de ADMET sugerem que o balanço estrutural entre regiões polares e lipofílicas na CMA4DMA é determinante para seu perfil farmacocinético. O predomínio de anéis aromáticos lipofílicos, combinado com um único doador polar NH₂, proporciona logP ideal de 2,74, associado a alta absorção intestinal e permeação eficiente. A HIA prevista de quase 89% reforça seu potencial para administração oral.

Valores previstos de logBB e permeabilidade MDCK indicam que a CMA4DMA pode atravessar a barreira hematoencefálica, consistente com distribuição de compostos ativos no SNC. Embora isso favoreça eficácia em tecidos com barreiras seletivas, também sugere risco de efeitos fora do alvo no SNC.

Um aspecto de segurança é a interação prevista com canais hERG. O sistema aromático α,β -insaturado contribui para potencial moderação na inibição hERG, com valores de IC⁵⁰ e pIC⁵⁰ sugerindo bloqueio parcial de canais K⁺. A similaridade de dados com inibidores hERG conhecidos (33–67%) indica risco moderado, importante para exposição crônica, enfatizando necessidade de validação experimental.

A previsão metabólica indica que o grupo –N(CH₃)₂ é um ponto crítico de N-

desalquilação mediada por isoformas CYP450. Embora essa via contribua para depuração, também representa risco de geração de intermediários reativos, como aldeídos e radicais livres, com potencial hepatotóxico. Isso se alinha com o LD50 oral moderado, próximo ao limite de compostos não-tóxicos.

Comparada à Norfloxacin e Ciprofloxacina, a CMA4DMA apresenta menor estabilidade metabólica, refletida em valores mais altos de depuração hepática e microsomal, implicando menor biodisponibilidade oral devido a metabolismo de primeira passagem.

Os valores previstos de LD⁵⁰ via diferentes vias de administração destacam o papel do metabolismo hepático na mitigação da toxicidade sistêmica. Enquanto a via oral pode proteger parcialmente contra efeitos adversos, a administração intravenosa ou intraperitoneal aumenta a toxicidade prevista. A via subcutânea mostrou LD⁵⁰ intermediário, sugerindo viabilidade para aplicações localizadas ou tópicas.

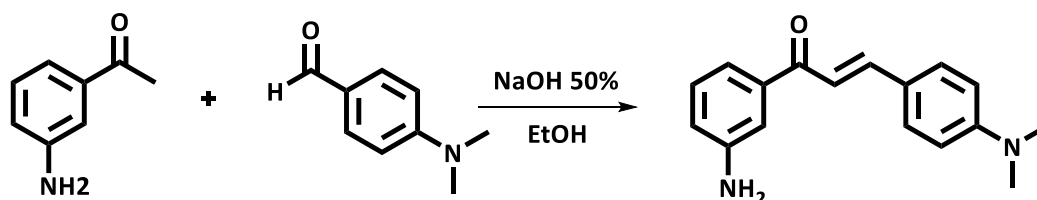
Em resumo, embora a CMA4DMA apresente atributos farmacológicos promissores, sua instabilidade metabólica e riscos de toxicidade exigem avaliação cuidadosa. Otimização estrutural para reduzir N-desalquilação mediada por CYP ou exploração de rotas alternativas de administração pode ser essencial para melhorar seu potencial terapêutico.

4. Materiais e Métodos

4.1. Síntese Química

A chalcona CMA4DMA foi sintetizada por meio de uma reação de condensação de *Claisen-Schmidt* sob condições básicas, utilizando 3-aminoacetofenona e 4-(dimetilamino)benzaldeído como reagentes de partida (DA SILVA et al., 2024).

A rota sintética está ilustrada no Esquema 1, e a estrutura química da CMA4DMA é apresentada na Figura 10.



Esquema I- 1: Síntese da aminochalcona.

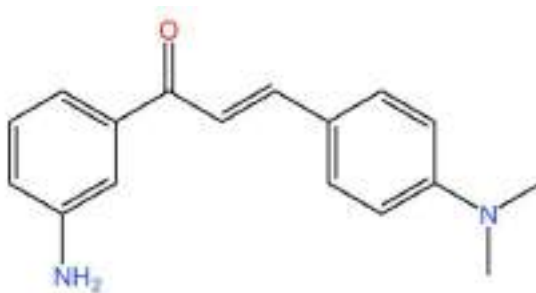


Figura I- 10: Estrutura da chalcona (2E)-1-(3'-aminofenil)-3-(4-dimetilaminofenil) prop-2-en-1-ona (CMA4DMA).

4.2. Docking Molecular de NorA e CMA4DMA

Para a investigação teórica do efeito antimicrobiano contra *S. aureus*, o modelo proteico da bomba de efluxo NorA da cepa 1199B foi obtido do repositório RCSB *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>), depositado sob o ID PDB 7LO7. Essa estrutura é classificada como uma proteína transportadora expressa em *E. coli*, com sua conformação tridimensional resolvida por microscopia eletrônica a uma resolução de 3,74 Å. Para o preparo da proteína antes das simulações de *docking* molecular, utilizou-se o *AutoDockTools*TM versão 1.5.7 (<https://autodocksuite.scripps.edu/adt/>) para adicionar átomos de hidrogênio, calcular as cargas de Gasteiger e ajustar os parâmetros da *grid-box*. A *grid-box* foi configurada para cobrir todo o espaço conformacional da proteína, com dimensões x = 54, y = 58, z = 62, centralizada em x = 137,578; y = 138,065; z = 156,646. Em seguida, o *AutoDock Vina*TM (<https://vina.scripps.edu/>) foi configurado para realizar 50 simulações independentes, com 20 poses cada, para todos os ligantes otimizados pelo método *Merck Molecular Force Field* (MMFF94) no *Avogadro 2* (<https://two.avogadro.cc/>). Os critérios de validação para a pose ótima das simulações de *docking* molecular incluíam baixo desvio quadrático médio (RMSD ≤ 2,0 Å) e baixa energia de afinidade (Rate ≤ -6,0 kcal/mol), utilizando as poses de ligação dos antibióticos caracterizados norfloxacin e ciprofloxacino como controle (MARINHO *et al.*, 2020).

4.3. Estudo In Silico de ADMET

Para a análise das propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), foi aplicado um protocolo preditivo baseado na estimativa quantitativa de similaridade com fármacos (QED — *Quantitative Estimate of Drug-likeness*), conforme apresentado na Equação (1):

$$QED = \exp\left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \ln d_i\right) \quad (1)$$

Onde n é o número de propriedades físico-químicas (i) calculadas, e d é a função de

desejabilidade, que considera os seguintes limites: peso molecular (MW) ≤ 500 g/mol, lipofilicidade (logP) ≤ 5 , doadores de ligação de hidrogênio (HBD) ≤ 5 , aceptadores de ligação de hidrogênio (HBA) ≤ 5 , área superficial polar topológica (TPSA) ≤ 140 Å², ligações rotacionáveis (nRot) ≤ 10 , anéis aromáticos ≤ 3 e alertas estruturais ≤ 1 (n = 8). A soma desses parâmetros resulta em um escore variando de 0,0 (baixa semelhança com fármacos) a 1,0 (alta semelhança com fármacos) (BICKERTON *et al.*, 2012). O alinhamento desses descritores foi analisado segundo as regras de *Lipinski* (LIPINSKI, 2004), a regra da Pfizer (HUGHES *et al.*, 2008), a regra do Triângulo Dourado (JOHNSON; DRESS; EDWARDS, 2009) e a regra da GlaxoSmithKline (GSK).

Para a predição dos descritores farmacocinéticos, foram utilizados os seguintes servidores: *ADMETlab* 3.0 (<https://admetlab3.scbdd.com/>), *ADMET-AI* (<https://admet.ai.greenstonebio.com/>), *ADMET-LMC* (<http://qsar.chem.msu.ru/admet/>), *Pred-hERG* (<https://predherg.labmol.com.br/>), *SwissADME* (<http://www.swissadme.ch/>). As propriedades analisadas incluíram: permeabilidade celular efetiva (Papp), absorção intestinal humana (HIA), permeabilidade da barreira hematoencefálica (BBB), depuração hepática (CLHepa), volume de distribuição (Vdss) e cardiotoxicidade via inibição do canal hERG (*human Ether-à-go-go-Related Gene*).

Para a predição dos sítios de metabolismo, foram empregados os servidores *SMARTCyp* (https://smartcyp.sund.ku.dk/mol_to_som), *FAME 3* (<https://nerdd.univie.ac.at/fame3>) e *StopTox* (<https://stoptox.mml.unc.edu/>). A análise dos fragmentos suscetíveis ao metabolismo dependente do citocromo P450 (CYP450) foi correlacionada com a predição da dose letal (LD50) em ratos, utilizando o servidor *GUSAR Online* (<https://www.way2drug.com/gusar/>).

4.4. Atividade Antibacteriana In Vitro

4.4.1. Cepas Bacterianas

Neste estudo, foram utilizadas as cepas de *S. aureus* SA-1199 (selvagem) e SA-1199B. A cepa SA-1199B superexpressa a proteína de efluxo NorA, associada à resistência a substratos da classe das fluoroquinolonas, como o norfloxacino.

As cepas foram gentilmente cedidas pelos professores S. Gibbons (*University of London*, Reino Unido) e G. W. Kaatz (*Wayne State University School of Medicine*, EUA) e mantidas em ágar sangue (*Difco Laboratories Ltd.*, São Paulo, Brasil). Elas são preservadas por criopreservação a -80 °C em solução de glicerol no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Regional do Cariri (URCA). Para o preparo experimental, as cepas foram cultivadas por 24 h a 37 °C em ágar infusão cérebro-coração (BHI Agar, *Acumedia*

Manufacturers Inc.).

4.4.2. Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios microbiológicos foram: Infusão Cérebro-Coração Agar (BHI Agar, *Acumedia Manufacturers Inc.*), preparado conforme instruções do fabricante; e Infusão Cérebro-Coração (BHI, *Acumedia Manufacturers Inc.*), preparado a 10% de concentração.

4.4.3. Substâncias

Os antibióticos (norfloxacino e ciprofloxacino) e a chalcona CMA4DMA foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e água estéril, mantendo a proporção de DMSO abaixo de 5%. O brometo de etídio (EtBr) foi dissolvido em água destilada estéril, enquanto o carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona (CCCP) foi dissolvido em metanol/água (1:1, v/v). Todas as substâncias foram preparadas a uma concentração padrão de 1024 µg/mL.

4.4.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM da chalcona CMA4DMA foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, conforme descrito por (OLIVEIRA-TINTINO et al., 2023), com modificações. As cepas foram cultivadas 24 h antes do experimento. Após esse período, o inóculo bacteriano foi suspenso em solução salina equivalente ao padrão 0,5 de *McFarland*, correspondendo a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Microtubos foram preenchidos com 900 µL de BHI e 100 µL do inóculo, e as placas receberam 100 µL da solução final. A microdiluição foi realizada com 100 µL de CMA4DMA em diluições seriadas (1:1) até o penúltimo poço, sendo o último usado como controle de crescimento. As concentrações variaram de 512 µg/mL a 8 µg/mL. Após 24 h de incubação, foi adicionado 20 µL de resazurina (7-hidróxi-10-oxidofenoxazina-10-ium-3-ona). A resazurina é oxidada na presença de meio ácido gerado pelo crescimento bacteriano, ocasionando mudança de cor de azul para rosa (ELSHIKH et al., 2016). A CIM foi definida como a menor concentração na qual não houve crescimento visível (ANDREWS, 2001). Todos os ensaios foram realizados em triplicata sob fluxo laminar.

4.4.5. Avaliação da Inibição da Bomba de Efluxo pela Modificação da CIM de Antibióticos e Brometo de Etídio

Para investigar se a chalcona CMA4DMA atua como um inibidor potencial da bomba de efluxo NorA, foi realizado um estudo comparativo com inibidores padrão, avaliando a capacidade de reduzir a CIM de EtBr e antibióticos. O inibidor padrão CCCP foi utilizado para validar a expressão da bomba NorA na cepa testada. A inibição foi testada usando

concentrações subinibitórias (CIM/8) tanto dos inibidores quanto da chalcona. Nos ensaios, 150 µL do inóculo bacteriano (0,5 *McFarland*, $\sim 1.5 \times 10^8$ UFC/mL) foram combinados com os inibidores e a chalcona (CIM/8) e completados com BHI. As misturas foram transferidas para placas de microdiluição de 96 poços, às quais foram adicionados 100 µL de antibiótico ou EtBr em diluições seriadas (1:1) de 512 a 0,5 µg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, e o crescimento bacteriano foi avaliado com resazurina, conforme descrito acima. As CIMs dos controles foram determinadas em placas contendo apenas antibióticos ou EtBr. Todos os testes foram realizados em triplicata sob fluxo laminar.

4.4.6. Atividade Inibitória da Bomba NorA Avaliada pelo Aumento da Emissão de Fluorescência de EtBr

Neste ensaio, foi utilizada a cepa *S. aureus* 1199B, expressando a bomba de efluxo NorA. As cepas foram semeadas em ágar *Mueller Hinton* 24 h antes do experimento e incubadas a 37 °C. O inóculo foi preparado em tampão fosfato salino (PBS) no padrão 0,5 *McFarland* e distribuído em placas pretas de 96 poços. Nos grupos-teste, adicionou-se CMA4DMA nas concentrações finais de 200 e 100 µg/mL. O controle negativo consistiu em PBS nas mesmas condições de diluição, e o controle positivo utilizou CCCP a 200 e 100 µg/mL. Após 1 h de incubação, foi adicionado EtBr (2 µg/mL) a todos os poços. As placas foram novamente incubadas, e a fluorescência foi medida em leitor de microplacas *Cytation 1* (BioTek®, Winooski, VT, EUA) com o software Gen5™ 3.11, usando excitação em 530 nm e emissão em 590 nm (OLIVEIRA-TINTINO et al., 2023).

4.4.7. Avaliação da Permeabilidade da Membrana Bacteriana Usando o Ensaio de Fluorescência SYTOX Green

Neste ensaio, foi utilizado o corante intercalante de DNA SYTOX Green. O inóculo bacteriano de *S. aureus* 1199B foi preparado e distribuído em placas pretas de 96 poços. Adicionou-se CMA4DMA nas concentrações finais de 200 e 100 µg/mL. A polimixina B foi usada como controle positivo (200 e 100 µg/mL), e o PBS como controle negativo. As placas foram incubadas por 1 h, e em seguida adicionou-se 100 µL de SYTOX Green (1 µM). Após mais 1 h de incubação, a fluorescência foi medida no *Cytation 1* (BioTek®, EUA) com o Gen5™ 3.11, com excitação a 485 nm e emissão a 528 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (YUEN et al., 2023).

4.4.8. Análise Estatística

Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Tukey. Os resultados microbiológicos de redução da CIM foram expressos como média

geométrica $\pm$ DP, enquanto os resultados dos ensaios de inibição de bomba de efluxo foram expressos como média aritmética $\pm$ DP. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises foram realizadas no software GraphPad Prism 5.0, em triplicata.

5. Conclusões

Os ensaios *in vitro* demonstraram que a chalcona CMA4DMA, embora desprovida de atividade antibacteriana direta ($MIC \geq 1024 \mu\text{g/mL}$), potencializou significativamente a ação da norfloxacin e do brometo de etídio em cepas de *S. aureus* portadoras da bomba de efluxo NorA. Essa potencialização foi evidenciada pela redução dos valores de MIC e pelo aumento da fluorescência intracelular de EtBr, sem comprometimento da integridade da membrana bacteriana. Esses achados experimentais corroboram as análises *in silico*, que revelaram forte interação da CMA4DMA com o sítio de ligação da NorA, sustentando seu papel como inibidor direto da bomba de efluxo. O composto apresentou ligação mais estável com a NorA de *S. aureus* 1199B ($BA = -7,504 \text{ kcal/mol}$) do que a norfloxacin, ocupando o mesmo sítio de ligação. As interações hidrofóbicas e uma ponte de hidrogênio com o resíduo Thr211 indicam maior afinidade e potencial inibitório frente à NorA. Além disso, a CMA4DMA demonstrou lipofilicidade ótima ($\log P = 2,74$) e permeabilidade adequada ($P_{app} = 1,38 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$), indicando forte absorção intestinal e características favoráveis ao perfil de fármaco. No entanto, sua moderada instabilidade metabólica e o potencial hepatotóxico previsto sugerem cautela quanto à exposição sistêmica e ao metabolismo de primeira passagem. Dessa forma, a combinação de dados computacionais e microbiológicos reforça o potencial da CMA4DMA como adjuvante antimicrobiano, capaz de restaurar a eficácia de antibióticos contra cepas resistentes. Entretanto, estudos adicionais de farmacocinética, toxicidade e modelos pré-clínicos ainda são necessários para confirmar sua viabilidade terapêutica. No futuro, espera-se realizar novos testes *in vivo* e *in vitro* para confirmar o papel da CMA4DMA como inibidor do mecanismo de bomba de efluxo, destacando sua função como adjuvante antibiótico promissor.

Referencias

- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. SUPPL. 1, 2001. Disponível em: https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5
- 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. Volume 10, p. 3237–3252, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S113556>

BHATTACHARYYA, T.; SHARMA, A.; AKHTER, J.; PATHANIA, R. The small molecule IITR08027 restores the antibacterial activity of fluoroquinolones against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* by efflux inhibition. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 2, p. 219–226, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.03.005>

BICKERTON, G. R.; PAOLINI, G. V.; BESNARD, J.; MURESAN, S.; HOPKINS, A. L. Quantifying the chemical beauty of drugs. **Nature Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 90–98, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nchem.1243>

BOUCHER, H. W.; TALBOT, G. H.; BENJAMIN, D. K.; BRADLEY, J.; GUIDOS, R. J.; JONES, R. N.; MURRAY, B. E.; BONOMO, R. A.; GILBERT, D. 10 × '20 progress - Development of new drugs active against gram-negative bacilli: An update from the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 12, p. 1685–1694, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/cit152>

BRAWLEY, D. N. *et al.* Structural basis for inhibition of the drug efflux pump NorA from *Staphylococcus aureus*. **Nature Chemical Biology**, v. 18, n. 7, p. 706–712, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41589-022-00994-9>

CHAN, B. C. L. *et al.* 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. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.06.039>

CHAVAN, H. V.; GANAPURE, S. D.; MALI, N. N.; BHALE, P. S. Synthesis, characterization and biological evaluation of N- substituted indolyl chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. **Materials Today: Proceedings**, v. 73, p. 396–402, 2023. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.09.264>

CHEN, J.; RAM, G.; PENADÉS, J. R.; BROWN, S.; NOVICK, R. P. Pathogenicity Island-Directed Transfer of Unlinked Chromosomal Virulence Genes. **Molecular Cell**, v. 57, n. 1, p. 138–149, 2015. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.011>

CHEUNG, G.; BAE, J.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, p. 547–569, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>

CHINEMEREM NWOBODO, D.; UGWU, M. C.; OLISELOKE ANIE, C.; AL-OUQAILI, M. T. S.; CHINEDU IKEM, J.; VICTOR CHIGOZIE, U.; SAKI, M. Antibiotic resistance: The challenges and some emerging strategies for tackling a global menace. [S. l.]: **John Wiley and Sons Inc**, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcla.24655>

CIRINO, I. C. S.; MENEZES-SILVA, S. M. P.; SILVA, H. T. D.; DE SOUZA, E. L.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. The Essential Oil from *Origanum vulgare* L. and Its Individual Constituents Carvacrol and Thymol Enhance the Effect of Tetracycline against *Staphylococcus aureus*. **Chemotherapy**, v. 60, n. 5–6, p. 290–293, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000381175>

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. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.03.023>

DA SILVA, L. *et al.* Synthesis, spectroscopic characterization, and antibacterial activity of chalcone (2E)-1-(3'-aminophenyl)-3-(4-dimethylaminophenyl)-prop-2-en-1-one against multiresistant *Staphylococcus aureus* carrier of efflux pump mechanisms and β -lactamase. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 38, n. 1, p. 60–71, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/fcp.12938>

DA SILVA, L.; DONATO, I. A.; GONÇALVES, C. A. C.; SCHERF, J. R.; DOS SANTOS, H. S.; MORI, E.; COUTINHO, H. D. M.; DA CUNHA, F. A. B. Antibacterial potential of chalcones and its derivatives against *Staphylococcus aureus*. *3 Biotech*, v. 13, n. 1, p. 1, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03398-7>

DA SILVA, L.; GONÇALVES, C. A. C.; BEZERRA, A. H.; DOS SANTOS BARBOSA, C. R.; ROCHA, J. E.; DE MATOS, Y. M. L. S.; DE OLIVEIRA, L. C. C.; DOS SANTOS, H. S.; COUTINHO, H. D. M.; DA CUNHA, F. A. B. Molecular *docking* and antibacterial and antibiotic-modifying activities of synthetic chalcone (2E)-1-(3'-aminophenyl)-3-(4-dimethylaminophenyl)-prop-2-en-1-one in a MepA efflux pump-expressing *Staphylococcus aureus* strain. **Folia Microbiologica**, 2024 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12223-024-01221-9>

DANG, N. Le; HUGHES, T. B.; MILLER, G. P.; SWAMIDASS, S. J. Computationally Assessing the Bioactivation of Drugs by N-Dealkylation. **Chemical Research in Toxicology**, v. 31, n. 2, p. 68–80, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.7b00191>

DARBY, E. M.; TRAMPARI, E.; SIASAT, P.; GAYA, M. S.; ALAV, I.; WEBBER, M. A.; BLAIR, J. M. A. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 280–295, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>

DAVIES, J.; SPIEGELMAN, G. B.; YIM, G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 445–453, 2006. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.006>

DE BRITO, D. H. A. *et al.* Synthesis, structural and spectroscopic analysis, and antiproliferative activity of chalcone derivate (E)-1-(4-aminophenyl)-3-(benzo[b]thiophen-2-yl)prop-2-en-1-one in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Molecular Structure**, v. 1253, p. 132197, 2022. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.132197>

DE SOUZA, M. A. *et al.* Synthesis, structural, characterization, antibacterial and antibiotic modifying activity, ADMET study, molecular docking and dynamics of chalcone (E)-1-(4-aminophenyl)-3-(4-nitrophenyl)prop-2-en-1-one in strains of *Staphylococcus aureus* carrying NorA and MepA efflux pumps. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 42, n. 4, p. 1670–1691, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2213777>

DI, L.; KEEFER, C.; SCOTT, D. O.; STRELEVITZ, T. J.; CHANG, G.; BI, Y.-A.; LAI, Y.; DUCKWORTH, J.; FENNER, K.; TROUTMAN, M. D.; OBACH, R. S. Mechanistic insights from comparing intrinsic clearance values between human liver microsomes and hepatocytes to guide drug design. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 57, p. 441–448, 2012.

ELSHIKH, M.; AHMED, S.; FUNSTON, S.; DUNLOP, P.; MCGAW, M.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of

minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 6, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2079-2>

ENANY, S.; ALEXANDER, L. C. The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. [S. l.]: **IntechOpen**, 2017.

FOKOUE, H. H.; PINHEIRO, P. S. M.; FRAGA, C. A. M.; SANT'ANNA, C. M. R. Is there anything new about the molecular recognition applied to medicinal chemistry?. [S. l.]: **Sociedade Brasileira de Química**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170474>

GAJDÁCS, M. The Continuing Threat of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**, v. 8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020052>

GONELLA DIAZA, R.; MANGANELLI, S.; ESPOSITO, A.; RONCAGLIONI, A.; MANGANARO, A.; BENFENATI, E. Comparison of silicotoools for evaluating rat oral acute toxicity. **SAR QSAR Environ. Res.**, v. 26, n. 1, p. 1–27, 2015.

GONZÁLEZ-BELLO, C. Antibiotic adjuvants – A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. [S. l.]: **Elsevier Ltd**, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.08.027>

GUEFACK, M.-G. F.; MESSINA, N. D. M.; MBAVENG, A. T.; NAYIM, P.; KUETE, J. R. N.; MATIETA, V. Y.; CHI, G. F.; NGADJUI, B. T.; KUETE, V. Antibacterial and antibiotic-potential activities of the hydro-ethanolic extract and protoberberine alkaloids from the stem bark of *Enantia chlorantha* against multidrug-resistant bacteria expressing active efflux pumps. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 296, p. 115518, 2022. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115518>

HAQ., Q.; SIDDIQUI, M.; SULTAN, I.; JAN, A.; MONDAL, A.; RAHMAN, S. Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02066>

HOLLER, J. G.; SLOTVED, H.-C.; MØLGAARD, P.; OLSEN, C. E.; CHRISTENSEN, S. B. Chalcone inhibitors of the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus* whole cells and enriched everted membrane vesicles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 14, p. 4514–4521, 2012. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.05.025>

HORSWILL, A.; JENUL, C. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. **Microbiology Spectrum**, v. 7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0031-2018>

HORSWILL, A.; KWIECINSKI, J. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. **Current opinion in microbiology**, v. 53, p. 51–60, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.02.005>

HUGHES, J. D. *et al.* Physiochemical drug properties associated with *in vivo* toxicological outcomes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 17, p. 4872–4875, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.07.071>

IMBERTY, A.; HARDMAN, K. D.; CARVER, J. P.; PEREZ, S. Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. *Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A*. **Glycobiology**, v. 1, n. 6, p. 631–642, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/glycob/1.6.631>

J, O. T.; M, K. S.; HONG-SUK, K.; T, N. S.; CHAD, H.; SANJAY, D.; C, W. G.; P, P. N.; HIROSHI, N.; L, B. T. Characterization of a Novel Pyranopyridine Inhibitor of the AcrAB Efflux Pump of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 722–733, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aac.01866-13>

JESUS, A.; DURÃES, F.; SZEMERÉDI, N.; FREITAS-SILVA, J.; DA COSTA, P. M.; PINTO, E.; PINTO, M.; SPENGLER, G.; SOUSA, E.; CIDADE, H. BDDE-Inspired Chalcone Derivatives to Fight Bacterial and Fungal Infections. **Marine Drugs**, v. 20, n. 5, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md20050315>

JOHNSON, T. W.; DRESS, K. R.; EDWARDS, M. Using the Golden Triangle to optimize clearance and oral absorption. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 19, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.08.045>

KAATZ, G. W.; SEO, S. M. Inducible NorA-Mediated Multidrug Resistance in *Staphylococcus aureus* ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. [S. l.: s. n.].

KAATZ, G. W.; SEO, S. M. Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in Genetically Related Strains of *Staphylococcus aureus*. [S. l.: s. n.].

KHAN, N. A Narrative Review on Microbial Response to Antibiotic Stress: Mechanisms of Resistance and Adaptation. **JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH**, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2025/75289.20485>. Acesso em: 9 abr. 2025.

KIRTON, L. K. M.; YOUSEF, N. N.; PARKS, G. D.; PHANSTIEL, O. Synthesis and Bioevaluation of Chalcones as Broad-Spectrum Antiviral Compounds Against Single-Stranded RNA Viruses. **Biomolecules**, v. 15, n. 9, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom15091285>

LAMERS RYAN P. AND CAVALLARI, J. F. A. N. D. B. L. L. The Efflux Inhibitor Phenylalanine-Arginine Beta-Naphthylamide (PAβN) Permeabilizes the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. **PLOS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–7, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060666>

LAZAR, V.; OPREA, E.; DITU, L. M. Resistance, Tolerance, Virulence and Bacterial Pathogen Fitness. **Current State and Envisioned Solutions for the Near Future**. [S. l.]: MDPI, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens12050746>

LI, X. Z.; NIKAIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: An update. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.2165/11317030-000000000-00000>

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>

MACÊDO, N. S. *et al.* Evaluation of the antibacterial and efflux inhibitory activity of trans-cinnamic acid in *Staphylococcus aureus*: Experimental assays and *in silico* modeling. **Phytomedicine Plus**, v. 5, n. 3, p. 100816, 2025. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2025.100816>

MARINHO, E. M.; BATISTA DE ANDRADE NETO, J.; SILVA, J.; ROCHA DA SILVA, C.; CAVALCANTI, B. C.; MARINHO, E. S.; NOBRE JÚNIOR, H. V. Virtual screening based on

molecular *docking* of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104365>

MAURYA, A.; AGRAWAL, A. Recent Advancement in Bioactive Chalcone Hybrids as Potential Antimicrobial Agents in Medicinal Chemistry. **Mini Rev Med Chem**, Netherlands, v. 24, n. 2, p. 176–195, 2024.

MOUWAKEH, A.; KINCSES, A.; NOVÉ, M.; MOSOLYGÓ, T.; MOHÁCSI-FARKAS, C.; KISKÓ, G.; SPENGLER, G. Nigella sativa essential oil and its bioactive compounds as resistance modifiers against *Staphylococcus aureus*. **Phytother Res**, England, v. 33, n. 4, p. 1010–1018, 2019.

MUNITA, J.; ARIAS, C. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>

MUTEEB, G.; REHMAN, M. T.; SHAHWAN, M.; AATIF, M. Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: **A Narrative Review. Pharmaceuticals** 2023, Vol. 16, Page 1615, v. 16, n. 11, p. 1615, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/PH16111615>.

NAWAZ, T.; TAJAMMAL, A.; QURASHI, A. W. Chalcones As Broad-Spectrum Antimicrobial Agents: A Comprehensive Review And Analysis Of Their Antimicrobial Activities. **ChemistrySelect**, v. 8, n. 45, p. e202302798, 2023. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/slct.202302798>

NAWAZ, T.; TAJAMMAL, A.; QURASHI, A. W.; NISA, M.; BINJAWHAR, D. N.; IQBAL, M. Synthesis, antibacterial, antibiofilm, and docking studies of chalcones against multidrug resistance pathogens. **Heliyon**, v. 10, n. 13, p. e30618, 2024. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e30618>

NEYFAKH, A. A.; BIDNENKO, V. E.; CHEN, L. B. Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 11, p. 4781–4785, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.4781>

NEYFAKH, A. A.; BORSCH, C. M.; KAATZ2, G. W. Fluoroquinolone Resistance Protein NorA of *Staphylococcus aureus* Is a Multidrug Efflux Transporter **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**. [S. l.: s. n.].

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. de M. *et al.* Valencene, Nootkatone and Their Liposomal Nanoformulations as Potential Inhibitors of NorA, Tet(K), MsrA, and MepA Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus* Strains. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 10, p. 1–15, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15102400>

PAIXÃO, L.; RODRIGUES, L.; COUTO, I.; MARTINS, M.; FERNANDES, P.; DE CARVALHO, C. C. C. R.; MONTEIRO, G. A.; SANSONETTY, F.; AMARAL, L.; VIVEIROS, M. Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Engineering**, v. 3, p. 1–13, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1754-1611-3-18>

PERSCH, E.; DUMELE, O.; DIEDERICH, F. Molecular recognition in chemical and biological systems. **Angew Chem Int Ed Engl, Germany**, v. 54, n. 11, p. 3290–3327, 2015.

PETTERSSON, M.; HOU, X.; KUHN, M.; WAGER, T. T.; KAUFFMAN, G. W.; VERHOEST, P. R. Quantitative assessment of the impact of fluorine substitution on P-glycoprotein (P-gp) mediated efflux, permeability, lipophilicity, and metabolic stability. **J. Med. Chem.**, v. 59, n. 11, p. 5284–5296, 2016.

PRASCH, S.; BUCAR, F. Plant derived inhibitors of bacterial efflux pumps: an update. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 6, p. 961–974, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9436-y>

QUAN, Y.-S.; LIU, J.-Y.; WANG, Y.-L.; LIU, Z.; QUAN, Z.-S.; WANG, S.-H.; YIN, X.-M. Application of Chalcone in the Structural Modification of Natural Products: An Overview. **Chemistry & Biodiversity**, v. 22, n. 4, p. e202401953, 2025. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cbdv.202401953>

REZENDE-JÚNIOR, L. M. *et al.* Chalcones isolated from Arrabidaea brachypoda flowers as inhibitors of nora and mepa multidrug efflux pumps of *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 1–12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060351>

SANTOS COSTA, S.; VIVEIROS, M.; AMARAL, L.; COUTO, I. Send Orders of Reprints at reprints@benthamscience.net **The Open Microbiology Journal**. [S. l.: s. n.].

SCHINDLER, B. D.; FREMPONG-MANSO, E.; DEMARCO, C. E.; KOSMIDIS, C.; MATTA, V.; SEO, S. M.; KAATZ, G. W. Analyses of Multidrug Efflux Pump-Like Proteins Encoded on the *Staphylococcus aureus* Chromosome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 747–748, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aac.04678-14>

SCHUMACHER, A.; STEINKE, P.; BOHNERT, J. A.; AKOVA, M.; JONAS, D.; KERN, W. V. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of Enterobacteriaceae other than *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 2, p. 344–348, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dki446>

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 of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n. 4, p. 277–290, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.11.002>

SHARMA, A.; GUPTA, V. K.; PATHANIA, R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens. **Indian Journal of Medical Research**, v. 149, n. 2, p. 129–145, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_2079_17

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 in Microbiology**, v. 8, n. OCT, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01868>

SIQUEIRA, M. M. R. *et al.* Aminophenyl chalcones potentiating antibiotic activity and inhibiting bacterial efflux pump. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 158, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105695>

SPENGLER, G.; KINCSES, A.; GAJDÁCS, M.; AMARAL, L. New Roads Leading to Old Destinations: Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria. **Molecules**, v. 22, n. 3, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules22030468>

STRAHL, H.; HAMOEN, L. W. Membrane potential is important for bacterial cell division. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 27, p. 12281–12286, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1005485107>

TAHMASEBI, H.; ARJMAND, N.; MONEMI, M.; BABAEIZAD, A.; ALIBABAEI, F.; ALIBABAEI, N.; BAHAR, A.; OKSENYCH, V.; ESLAMI, M. From Cure to Crisis: Understanding the Evolution of Antibiotic-Resistant Bacteria in Human Microbiota. [S. l.]: **Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)**, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom15010093>

TINTINO, S. R. *et al.* Effect of vitamin K3 inhibiting the function of nora efflux pump and its gene expression on *staphylococcus aureus*. **Membranes**, v. 10, n. 6, p. 1–18, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/membranes10060130>

TRUONG-BOLDUC, Q. C.; DUNMAN, P. M.; STRAHILEVITZ, J.; PROJAN, S. J.; HOOPER, D. C. MgrA Is a Multiple Regulator of Two New Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 7, p. 2395–2405, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.187.7.2395-2405.2005>

UGHACHUKWU, P.; UNEKWE, P. Efflux pump-mediated resistance in chemotherapy. **Annals of Medical and Health Sciences Research**, v. 2, n. 2, p. 191, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/2141-9248.105671>

WANG, D.; XIE, K.; ZOU, D.; MENG, M.; XIE, M. Inhibitory effects of silybin on the efflux pump of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Mol Med Rep**, Greece, v. 18, n. 1, p. 827–833, 2018.

WANG, Y.; VENTER, H.; MA, S. Efflux Pump Inhibitors: A Novel Approach to Combat Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. **Current drug targets**, United Arab Emirates, v. 17, n. 6, p. 702–719, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389450116666151001103948>

YUEN, H. L.; CHAN, S. Y.; DING, Y. E.; LIM, S.; TAN, G. C.; KHO, C. L. Development of a Novel Antibacterial Peptide, PAM-5, via Combination of Phage Display Selection and Computer-Assisted Modification. **Biomolecules**, v. 13, n. 3, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom13030466>

YUSUF, D.; DAVIS, A. M.; KLEYWEGT, G. J.; SCHMITT, S. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, n. 7, p. 1411–1422, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ci800084x>

ZHANG, L.; TIAN, X.; SUN, L.; MI, K.; WANG, R.; GONG, F.; HUANG, L. Bacterial Efflux Pump Inhibitors Reduce Antibiotic Resistance. **Pharmaceutics** 2024, Vol. 16, Page 170, v. 16, n. 2, p. 170, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS16020170>. Acesso em: 20 fev. 2024.

ZHENG, M.; LUO, X.; SHEN, Q.; WANG, Y.; DU, Y.; ZHU, W.; JIANG, H. Site of metabolism prediction for six biotransformations mediated by cytochromes P450.

Bioinformatics, v. 25, n. 10, 2009. Disponível em:
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp140>

ZIMMERMANN, S.; KLINGER-STROBEL, M.; BOHNERT, J. A.; WENDLER, S.; RÖDEL, J.; PLETZ, M. W.; LÖFFLER, B.; TUCHSCHERR, L. Clinically Approved Drugs Inhibit the *Staphylococcus aureus* Multidrug NorA Efflux Pump and Reduce Biofilm Formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019. Disponível em:
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02762>

CAPÍTULO II: Síntese química e avaliação da atividade antibacteriana da chalcona CPA4Cl em cepas portadoras de bomba de efluxo (Submetido)

Autores e afiliação:

Isydório Alves Donato^a, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa^a, Antonio Henrique Bezerra^a, Suieny Rodrigues Bezerra^a, Ray Silva Almeida^b, Cícera Datiane de Marais Oliveira Tintino^b, Isaac Moura Araújo^b, Francisco Rogenio da Silva Mendes^c, Jayza Maria Lima Dias^d, Jesyka Macedo Guedes^d, Hércio Silva dos Santos^d, Henrique Douglas Melo Coutinho^b, Saulo Relison Tintino^a, Francisco Assis Bezerra da Cunha^a

^a Laboratório de Bioprospecção do Semiárido (LABSEMA), Universidade Regional do Cariri (URCA), Crato, CE, Brasil

^b Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Departamento de Biologia Química, Universidade Regional do Cariri, Crato, Brasil

^c Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Fortaleza, CE, Brasil

^d Universidade Estadual Vale do Acaraú, Curso de Química, Sobral, CE, Brasil

Resumo

Diante da capacidade dos microrganismos de desenvolver resistência aos fármacos em um ritmo mais acelerado do que o desenvolvimento de novos medicamentos, torna-se urgente buscar alternativas capazes de restabelecer a eficácia dos antibióticos, especialmente contra patógenos como *Staphylococcus aureus*, conhecido por sua versatilidade na expressão de mecanismos de resistência. Entre esses mecanismos, destacam-se as bombas de efluxo NorA e MepA, responsáveis pela expulsão de antibióticos do interior da célula bacteriana. Nesse contexto, o presente estudo investigou a viabilidade da utilização da chalcona 4Cl ((2E)-1-(3'-aminofenil)-3-(4-clorofenil)-prop-2-en-1-ona) como um potencial inibidor desses sistemas de efluxo. Inicialmente, realizou-se uma triagem por meio de estudos *in silico* (docagem molecular e análises ADMET), seguidos de ensaios *in vitro* (determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e testes de fluorescência com brometo de etídio EtBr e SYTOX Green). Os resultados da docagem molecular revelaram que a chalcona 4Cl interage com resíduos de aminoácidos descritos na literatura como essenciais para a atividade das bombas de efluxo (Glu222 na NorA; Tyr35 e Asn39 na MepA). As distâncias das ligações e as energias obtidas foram consistentes com uma possível atividade inibitória, sugerindo que a 4Cl pode interferir na funcionalidade dessas proteínas. Nos ensaios *in vitro*, observou-se uma redução significativa na concentração inibitória mínima (CIM) de antibióticos como norfloxacin e ciprofloxacina em cepas resistentes, indicando um efeito sinérgico. Além disso, os testes de fluorescência demonstraram um aumento na retenção de brometo de etídio em até 736,3% para NorA e 234,8% para MepA, corroborando a inibição das bombas de efluxo. Verificou-se também um aumento na permeabilidade da membrana bacteriana, evidenciado pela elevação da fluorescência do SYTOX Green em 70-855%. Embora os resultados demonstrem o potencial da 4Cl como adjuvante terapêutico, as análises ADMET apontaram alertas toxicológicos que demandam investigações adicionais. Esses achados sugerem que modificações estruturais

racionais podem ser necessárias para garantir sua segurança e eficácia no combate a infecções bacterianas resistentes.

Palavras-chave:

Staphylococcus aureus, chalcona, resistência bacteriana, bombas de efluxo, *docking* molecular, ADMET.

Introdução

A evolução natural dos microrganismos proporciona a eles a capacidade de desenvolver resistência aos fármacos em um ritmo mais acelerado do que o processo de criação de novos medicamentos. Diante desse cenário, a Organização Mundial da Saúde (OMS) chamou a atenção para a questão e, em 2017, divulgou uma lista de microrganismos resistentes que demandam novos tratamentos.(OMS, 2024)

Entre os organismos destacados pela OMS está o *Staphylococcus aureus*, um patógeno frequentemente encontrado em diversos ambientes e conhecido por sua capacidade de desenvolver resistência a antibióticos. A produção de beta-lactamases, enzimas que inativam antibióticos beta-lactâmicos como a penicilina, e a presença do gene *mecA*, que confere resistência à meticilina, resultam em cepas multirresistentes, conhecidas como MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*), representando um desafio significativo no tratamento de infecções estafilocócicas. Além da presença de mecanismo de resistência como as enzimas betalactamases, outros mecanismos também podem ocorrer em *S. aureus* como a alteração da permeabilidade da membrana celular, modificação do alvo do fármaco, inativação da ação do medicamento e extrusão do antibiótico por meio de bombas de efluxo (DA COSTA et al., 2021; DOS SANTOS et al., 2007, 2023).

As bombas de efluxo são proteínas posicionadas na membrana que realizam a extrusão do antibiótico, diminuindo a sua concentração intracelular e, assim, permitindo que o microrganismo sobreviva, contribuindo para a resistência a múltiplos fármacos (MDR) (CHANDAL et al., 2023). A identificação de uma substância capaz de inibir esse mecanismo de resistência permitiria restaurar a eficácia de medicamentos aos quais os microrganismos desenvolveram resistência, como também diminuir a virulência bacteriana (GAURAV et al., 2023).

As chalconas são uma classe de flavonoides de cadeia aberta, caracterizadas por um sistema carbonila α , β -insaturado que conecta dois anéis aromáticos. Esses compostos estão presentes em diversas partes de frutas e vegetais, e seu processo de síntese é amplamente documentado na literatura. Embora registros indiquem que as primeiras estruturas chalcônicas tenham sido sintetizadas em laboratório no século XIX, foi somente na década de 1970 que os

estudos sobre chalconas e seus derivados sintéticos ganharam maior destaque, impulsionados pela descoberta de suas atividades antitumorais e antiparasitárias. (FERREIRA et al., 2018; ZHUANG et al., 2017). Para este estudo, foi utilizada a 3-aminochalcona-4-clorobenzaldeído ((2E)-1-(3'-aminofenil)-3-(4-clorofenil)-prop-2-en-1-ona), sintetizada pelo método de condensação aldólica de Claisen-Schmidt (PINTO *et al.*, 2020). A estrutura foi confirmada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, e a molécula será referida a partir deste ponto como chalcona 4Cl.

O objetivo deste estudo é apresentar a síntese da chalcona 4Cl e avaliar a capacidade de atuar contra cepas de *Staphylococcus aureus* portadoras das bombas de efluxo NorA e MepA, por meio de ensaios *in silico* e *in vitro*. Os ensaios *in silico* foram realizados visando o acoplamento das chalconas à proteína de efluxo, conforme análises de docagem molecular, como também foram realizadas as avaliações de ADMET foram executadas para verificar os possíveis efeitos dessa chalcona sobre o organismo humano. Além disso, estudos *in vitro* foram realizados visando a diminuição da concentração mínima inibitória (CIM) e alterações na permeabilidade da membrana.

Materiais e Métodos

Síntese química

A síntese foi realizada usando a reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt em meio básico. Uma solução etanólica de 3-aminocetofenona (2 mmol) foi adicionada a uma solução de 4-clorobenzaldeído (2 mmol), seguida pela adição de 1 mL de NaOH aquoso a 50% m/v e agitada por 48 h à temperatura ambiente (32 °C). (MENDES et al., 2023). A chalcona foi então filtrada sob pressão reduzida, lavadas com água fria, seca e recristalizada em etanol, e a pureza (99,9%) foi verificada por análise de HPLC. A estrutura da chalcona foi confirmada pela análise de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H, ¹³C, os espectros foram obtidos usando Bruker DPX-300 operando em frequências de 300 MHz para hidrogênio e 75 MHz para carbono. Além disso, o espectro de absorção no infravermelho foi obtido usando um espectrômetro a vácuo Bruker (VERTEX 70 V) com uma fonte de laser HeNe com comprimento de onda de 633 nm. Finalmente, a avaliação cromatográfica foi realizada por HPLC (Agilent 1260 Infinity, Alemanha) equipado com uma coluna de fase reversa C-18 (Agilent Eclipse Plus: 3,5 µm, 4,6 × 100 mm).

Docking Molecular da NorA e MepA

Recursos computacionais utilizados no processo de *docking* molecular

O *docking* molecular da chalcona 4Cl com as proteínas de efluxo NorA e MepA foi realizado utilizando os softwares *AutoDockTools* (versão 1.5.7) e *AutoDock Vina* (versão 1.2.7) para as simulações, complementados por ferramentas de visualização e modelagem molecular: *BIOVIA Discovery Studio Visualizer* (Dassault Systèmes®, versão 21.1.0.20298), UCSF *Chimera* (versão 1.15) e *ChemAxon MarvinSketch* (versão 22.2, licença acadêmica). As estruturas proteicas foram obtidas nos bancos de dados RCSB *Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/>), *AlphaFold* (DeepMind/EMBL-EBI) (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) e PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Obtenção das estruturas e preparação para docagem

A estrutura da proteína NorA, determinada por criomicroscopia eletrônica (cryo-EM) utilizando a técnica de single-particle analysis em complexo com fragmentos de anticorpos sintéticos (Fabs) (BRAWLEY et al., 2022), foi obtida do RCSB Protein Data Bank (PDB) sob o código de acesso 7LO7. Já a estrutura da proteína MepA foi adquirida a partir do banco de dados AlphaFold (JUMPER et al., 2021; VARADI et al., 2024), correspondente ao identificador AF-Q2G140-F1-v4 (código UniProt: Q2G140), originalmente caracterizada por Kaatz e colaboradores. (KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005)

Na preparação dos receptores para *docking* molecular, procedeu-se inicialmente com o tratamento da proteína NorA, no qual os fragmentos de anticorpos sintéticos (Fabs) foram removidos utilizando o software *BIOVIA Discovery Studio Visualizer*. Posteriormente, no *AutoDockTools*, realizou-se a padronização das estruturas proteicas (NorA e MepA) através da eliminação de moléculas de água, adição de átomos de hidrogênio polares e cálculo de cargas atômicas pelo método Gasteiger. Finalmente, cada receptor foi convertido para o formato PDBQT.

A estrutura bidimensional da chalcona 4Cl foi inicialmente desenhada utilizando o *MarvinSketch*, com posterior conversão para formato tridimensional. A geometria molecular foi então otimizada no UCSF *Chimera*. No *AutoDockTools*, procedeu-se à preparação final do ligante com adição de cargas atômicas, definição de ligações rotáveis e conversão para o formato PDBQT, adequando-a para os experimentos subsequentes de *docking* molecular.

O posicionamento da *grid box* para o *docking* molecular foi estabelecido mediante análise sistemática da literatura científica, com foco em estudos prévios de *docking* realizados com as proteínas NorA (BRAWLEY et al., 2022) e MepA (BENTO et al., 2024; DA SILVA et al., 2021; REZENDE-JÚNIOR et al., 2020; ROCHA et al., 2021), identificando os resíduos críticos para a interação com ligantes e correlação com os valores de Concentração Inibitória

Mínima (CIM) reportados. Esta abordagem permitiu definir regiões de interesse biologicamente relevantes para ambas as proteínas, com os seguintes parâmetros espaciais para as *grid box*: NorA - centro nas coordenadas (x=132,936; y=132,718; z=155,278) com dimensões de 60×60×60 Å; e MepA - centro nas coordenadas (x=-6; y=-1; z=4) com dimensões de 40×40×40 Å.

Após o preparo dos receptores (NorA e MepA) e ligante (Chalcona 4Cl), procedeu-se ao *docking* molecular utilizando o *AutoDock Vina* executado via linha de comando. Para cada sistema proteína-ligante, foi gerado um arquivo de configuração contendo os arquivos de entrada, as coordenadas do centro e dimensões da *grid box* e o arquivo de saída para os resultados. Os complexos proteína-ligante, representados pela pose de maior afinidade, foram então analisados no *BIOVIA Discovery Studio Visualizer* para avaliação das interações moleculares, considerando parâmetros como distâncias de ligação, energia de interação e resíduos de aminoácidos envolvidos.

Estudo de ADMET

A estrutura molecular da Chalcona 4Cl foi inicialmente desenhada utilizando o *MarvinSketch* (disponível em: <https://chemaxon.com/products/marvin>). A representação da molécula foi gerada de forma precisa, garantindo a correta disposição dos átomos e ligações químicas. Em seguida, a sequência de SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*), C1=CC(=CC(=C1)C(=O)C=CC2=CC=C(Cl)C=C2)N, foi obtida diretamente da plataforma *MarvinSketch*. O código SMILES foi utilizado como dado de entrada para a realização dos cálculos de propriedades ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) na plataforma ADMETLab 3.0 (disponível em: <https://admetlab3.scbdd.com>). Os parâmetros ADMET foram calculados utilizando os modelos preditivos integrados na ferramenta, que incluem avaliações de solubilidade, permeabilidade, metabolismo, toxicidade e outros parâmetros relevantes. Os resultados obtidos foram sistematicamente interpretados com base nas diretrizes e valores de referência estabelecidos na literatura científica (FU *et al.*, 2024). As propriedades preditas foram comparadas com os intervalos considerados ideais para candidatos a fármacos, conforme descrito em estudos prévios. Os dados foram registrados e organizados em tabelas e gráficos, permitindo uma análise detalhada do perfil farmacocinético e toxicológico da Chalcona 4Cl. Esses resultados foram posteriormente integrados ao artigo, fornecendo uma base sólida para a discussão das implicações terapêuticas e dos potenciais riscos associados à molécula.

Cepas Bacterianas

Neste estudo, foram utilizadas as cepas de *S. aureus* SA-1199 (tipo selvagem), SA-1199B e SA-K2068. A cepa SA-1199B expressa a proteína de efluxo NorA, associada à resistência a substratos da classe das fluoroquinolonas, como a Norfloxacin. Já a cepa SA-K2068 possui a bomba de efluxo MepA, responsável pelo transporte de múltiplas drogas para fora da célula bacteriana.

As cepas foram gentilmente cedidas pelo Prof. S. Gibbons (*University of London, Malet St, Bloomsbury, London WC1E 7HU*, Reino Unido) e mantidas em ágar-sangue (Laboratórios Difco Ltda., São Paulo-SP, Brasil). As cepas são preservadas por criopreservação a -80°C em solução de glicerol no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Regional do Cariri (URCA). Como processo de preparação para os experimentos, as cepas foram cultivadas por 24 horas a 37 °C em infusão sólida de cérebro e coração em ágar (BHI-Ágar, Acumedia Manufacturers Inc.).

Meios de Cultura

Os meios de cultura foram utilizados para a realização dos testes microbiológicos: Infusão de Cérebro e Coração - Ágar (*Brain Heart Infusion - Agar*, Acumedia Manufacturers Inc.), preparado de acordo com o fabricante, e Infusão de Cérebro e Coração (*Brain Heart Infusion*, Acumedia Manufacturers Inc.) preparado na concentração de 10%.

Substâncias

O antibiótico Norfloxacin e a chalcona 4Cl foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) e em água estéril. A proporção de DMSO utilizada foi inferior a 5%. O Brometo de Etídio (EtBr) foi dissolvido em água destilada estéril, enquanto o Carbonil Cianeto m-Clorofenil Hidrazona (CCCP) foi dissolvido em metanol/água (1:3, v/v). Todas as substâncias foram diluídas a uma concentração padrão de 1024 µg/mL.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Atividade Antibacteriana Direta

A CIM foi determinada para a chalcona 4Cl de acordo com o Método de Microdiluição em Caldo, proposto por (JAVADPOUR et al., 1996), com adaptações. As cepas utilizadas nos testes foram cultivadas 24 horas antes dos experimentos. Após esse período, o inóculo bacteriano foi suspenso em solução salina, correspondente a 0,5 da escala de McFarland, aproximadamente $1,5 \times 10^8$ (UFC)/mL. Em seguida, microtubos foram preenchidos com 900 µL de BHI e 100 µL do inóculo, e as placas foram preenchidas com 100 µL da solução final. A microdiluição foi realizada com 100 µL em diluições seriadas até o penúltimo poço da placa (1:1), sendo o último utilizado como controle de crescimento. As concentrações dos compostos

variaram de 512 µg/mL a 8,0 µg/mL. Após 24 horas de incubação, as leituras foram realizadas com a adição de 20 µL de Resazurina (7-hidroxi-10-oxidofenoxazin-10-ium-3-ona). A Resazurina foi oxidada na presença do meio ácido causado pelo crescimento bacteriano, promovendo a mudança de cor de azul para rosa (ELSHIKH et al., 2016). A CIM foi definida como a menor concentração em que não se observa crescimento (ANDREWS, 2001). Os testes foram realizados em triplicata.

Avaliação da Inibição da Bomba de Efluxo por Modificação da CIM do Antibiótico e do Brometo de Etídio

Para observar se a chalcona 4Cl atua como um inibidor potencial das bombas de efluxo NorA e MepA, foi realizado um estudo comparativo entre os efeitos dos inibidores padrão dessas bombas, avaliando a capacidade de ambos em reduzir a CIM do EtBr e dos antibióticos. O inibidor padrão CCCP foi utilizado para validar a expressão das bombas NorA e MepA pelas cepas testadas. A inibição da bomba de efluxo foi testada utilizando uma concentração sub-inibitória (CIM/8) dos inibidores e da 4Cl. Nos testes, 150 µL de cada inóculo bacteriano suspenso em solução salina, correspondente a 0,5 da escala de McFarland, aproximadamente $1,5 \times 10^8$ (UFC)/mL, foram adicionados juntamente com os inibidores e o 4Cl (CIM/8) e completados com BHI. Em seguida, foram transferidos para placas de microdiluição de 96 poços, às quais foram adicionados 100 µL de antibiótico ou EtBr em diluições seriadas (1:1), variando de 512 a 0,5 µg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e o crescimento bacteriano foi avaliado com Resazurina (7-hidroxi-10-oxidofenoxazin-10-ium-3-ona). A Resazurina foi oxidada na presença do meio ácido causado pelo crescimento bacteriano, promovendo a mudança de cor de azul para rosa (ELSHIKH et al., 2016). A CIM foi definida como a menor concentração em que não se observa crescimento (ANDREWS, 2001). A CIM dos controles foi avaliada utilizando apenas placas com antibióticos e com EtBr, e os testes foram realizados em triplicata.

Controle Negativo

Para o controle negativo, foram utilizadas as últimas fileiras de cavidades das placas de microdiluição, onde apenas o meio de cultura e o inóculo bacteriano foram adicionados, sem a adição das substâncias testadas, visando a máxima formação de colônias bacterianas, além de comprovar que o inóculo foi devidamente adicionado aos microtubos. No entanto, esses números não foram adicionados aos gráficos de resultados devido à impossibilidade de quantificação das colônias formadas no período de 24 horas após os testes microbiológicos. Contudo, após esse período, a presença de bactérias vivas foi confirmada com a adição de 20 µL de Resazurina nos últimos poços da placa de microdiluição.

Ação inibidora de bombas de efluxo NorA e MepA avaliada pelo aumento da emissão de fluorescência de EtBr

Para este ensaio foram utilizadas as cepas de *S. aureus* 1199B e *S. aureus* K2068 que expressam a bomba de efluxo NorA e MepA respectivamente. As cepas foram semeadas em meio de cultura Mueller Hinton agar, 24h antes da realização do experimento. As bactérias foram mantidas em estufa bacteriológica a 37°C. O inóculo foi preparado em Phosphate buffered saline (PBS) até atingir a escala 0,5 de McFarland e distribuído em placas *black* de 96 poços. Nos grupos de teste foi adicionado a Chalcona 4Cl nas concentrações finais de 200 e 100 µg/mL. O controle negativo consistiu em PBS e bactéria. O controle positivo consistiu em CCCP 50 µg/mL. As placas foram incubadas em estufa por 1h e em seguida se adicionou EtBr diluído a 2 µg/mL em todos os poços. As soluções foram novamente incubadas e feita a leitura com leitor de microplaca de fluorescência Cytation 1, BioTek® (Winooski, VT, USA) e Software Gen5™ 3.11. Aplicou-se excitação de 530 nm e emissão comprimento de onda 590 nm (OLIVEIRA-TINTINO et al., 2023).

Avaliação da permeabilidade de membrana bacteriana pelo método de fluorescência com SYTOX Green

Para esse teste foi utilizado o corante SYTOX Green intercalante de DNA. Foram preparados os inóculos bacterianos das cepas *S. aureus* 1199B e *S. aureus* K2068. O inóculo foi distribuído em placa *black* de 96 poços. Foi adicionado a Chalcona 4Cl nas concentrações finais de 200 e 100 µg/mL. A polimixina B foi utilizada com controle positivo na concentração de 100 µg/mL. No grupo controle negativo adicionou-se apenas *Phosphate Buffer Saline* (PBS). As placas foram incubadas por 1h. Em seguida foi adicionado 100 µL de SYTOX Green em concentração final de 1 µM. As placas foram incubadas por 1h e foi realizada a leitura de fluorescência no leitor de placas Cytation 1, BioTek® (Winooski, VT, USA) e Software Gen5™ 3.11. Foi utilizado filtro de excitação 485 nm e emissão de 528 nm. Os testes foram realizados em triplicata (YUEN et al., 2023).

Análise estatística

Os resultados foram analisados através de *One-way* ANOVA, seguida por *Tukey post hoc*. Os resultados microbiológicos de redução de CIM foram expressos em média geométrica $\pm$ SD. Os resultados dos testes de mecanismo da ação inibidora de bomba de efluxo foram

expressos em média aritmética $\pm$ SD. Foram considerados significativos valores $p < 0.05$. Foi utilizado o software *GraphPad Prism* 5.0. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Resultados

Síntese química

A estrutura da chalcona (2E)-1-(3'-aminofenil)-3-(4-clorofenil)-prop-2-en-1-ona, ilustrada na Figura 1, foi confirmada por técnicas espectroscópicas, mostrando os sinais característicos e deslocamentos químicos consistentes com sistemas α,β -insaturados típicos de chalconas (SILVA MENDES *et al.*, 2022). O sinal em 191,0 ppm atribuído ao carbono da carbonila característico de cetonas conjugadas (DA SILVA *et al.*, 2024). Enquanto, os deslocamentos químicos referentes aos carbonos aromáticos C3' (147,1 ppm) e C4 (136,6 ppm), evidenciam os efeitos eletrônicos dos grupos (-NH₂) e (-Cl), respectivamente.

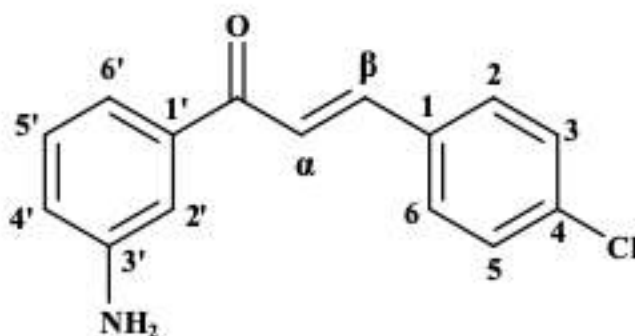


Figura II 1: Fórmula estrutura da (2E)-1-(3'-aminofenil)-3-(4-clorofenil)-prop-2-en-1-ona.

A configuração trans da dupla ligação foi confirmada pelos valores de acoplamentos J 15,7 Hz entre H α (7,48 ppm) e H β (7,77 ppm), característico para chalcona na conformação E (GEORGIOU *et al.*, 2025; XAVIER *et al.*, 2021). A análise dos prótons aromáticos corrobora com as estruturas similares de chalconas reportadas na literatura (DA SILVA *et al.*, 2024; FERREIRA *et al.*, 2021).

Tabela II 1: Dados de RMN de ¹H (500 MHz) e de ¹³C (125 MHz) em (CDCl₃), δ ppm, J/Hz

C	δ_C	δ_H
1'	139,5	-
2'	114,6	-
3'	147,1	-
4'	119,7	6,93 (dd, J = 7,8 e 1,50 Hz)

5'	129,6	7,32 (d, J = 9,30 Hz)
6'	119,0	7,30 (d, J = 7,15 Hz)
C=O	191,0	-
1	133,8	-
2/6	129,6	7,60 (d, J = 8,35 Hz)
3/5	129,4	7,42 (d, J = 8,45 Hz)
4	136,6	-
C _α	122,9	7,48 (d, J = 15,70 Hz)
C _β	143,2	7,77 (d, J = 15,75 Hz)

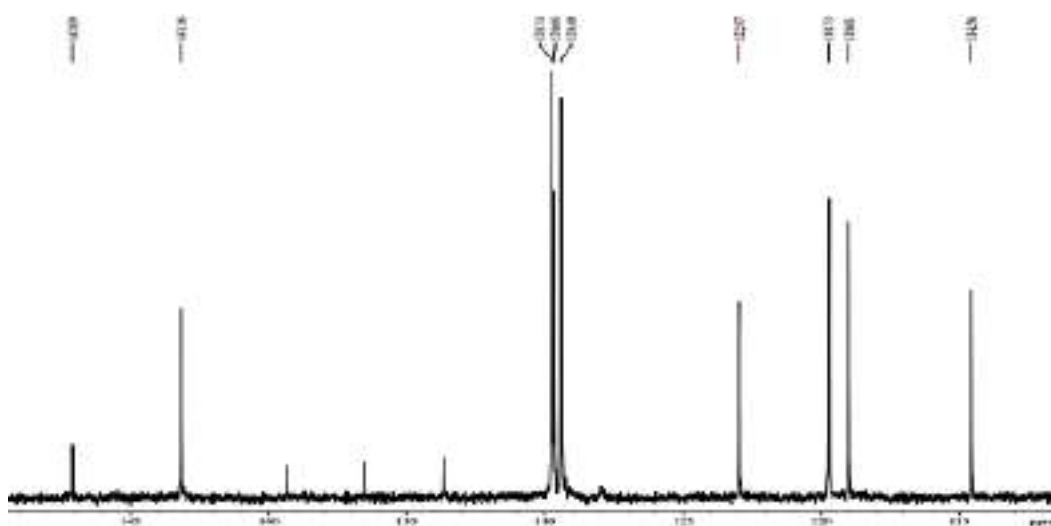


Figura II 2: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de (MAAp-ClB).

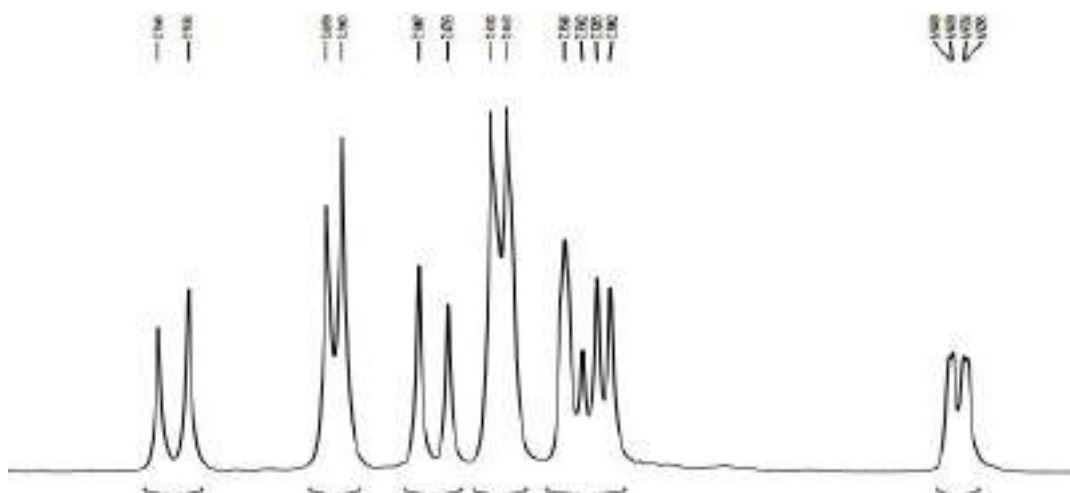


Figura II 3: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz).

Dock molecular NorA

Dentre as conformações geradas pelo AutoDock Vina, selecionou-se para análise a pose com menor energia livre de ligação (-1,848 kcal/mol), correspondendo à interação mais termodinamicamente favorável entre o ligante e o sítio ativo da proteína. Esta conformação, que representa o complexo proteína-ligante de maior estabilidade, está representada na Figura 4.

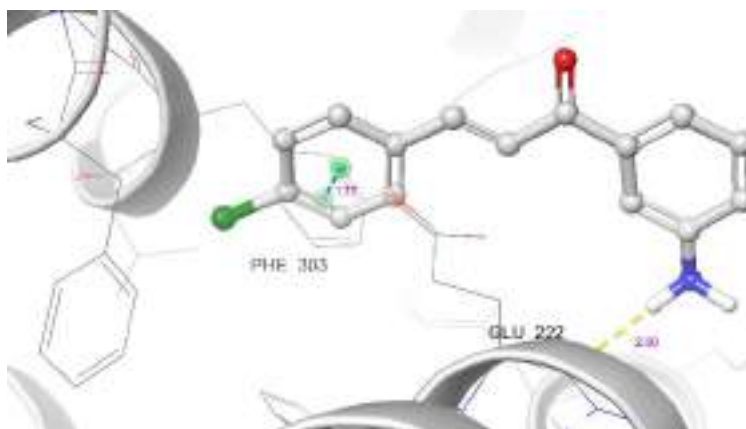


Figura II 4: Docking da chalcona 4Cl com a proteína de efluxo NorA.

Na Figura 5 está ilustrada a uma ponte de hidrogênio, a 2 Å de distância, com a Glu 222 (seta rosa) e ligações do tipo π - π com o anel aromático da Fenilalanina a uma distância de 1,77 Å (linha verde).

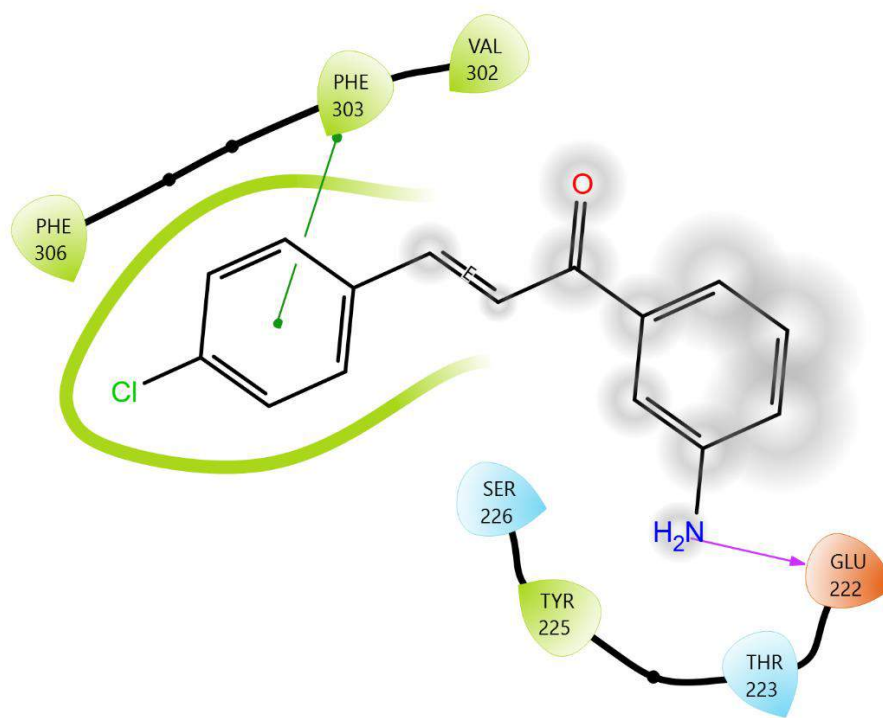


Figura II 5: Representação das interações moleculares entre a chalcona 4Cl e a proteína de efluxo NorA

A Interação da chalcona com o Glu222, considerado pela literatura como um aminoácido chave na mediação da resistência a antibióticos (BRAWLEY et al., 2022) sustenta o potencial da chalcona 4Cl como inibidor competitivo da bomba de efluxo NorA.

Docking molecular da proteína MepA

Para o complexo MepA-chalcona 4Cl, a análise das conformações geradas pelo AutoDock Vina revelou uma pose com energia de -8,007 kcal/mol, que foi selecionada para este estudo por representar a interação mais termodinamicamente favorável. A conformação selecionada está representada na Figura 6.

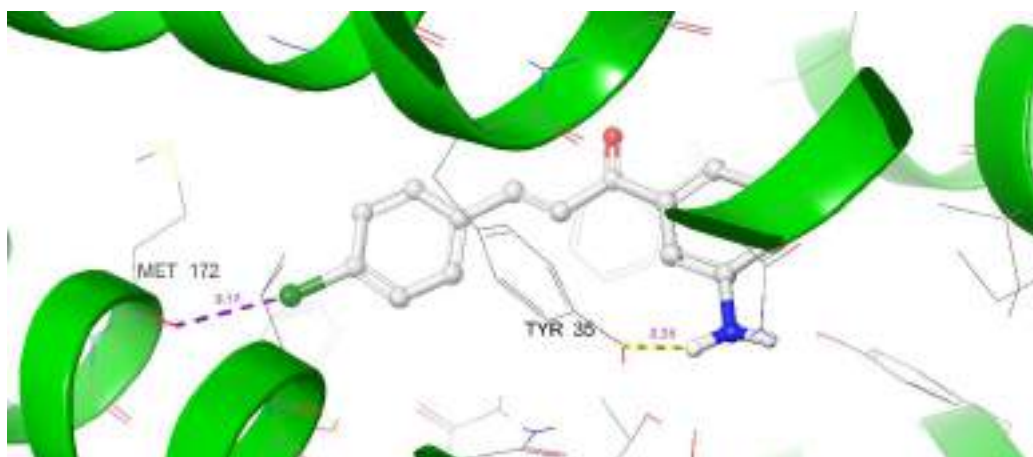


Figura II 6: Docking da chalcona 4Cl com a proteína de efluxo MepA.

O *docking* molecular revelou interações específicas com a proteína MepA, formando uma ligação de hidrogênio com o resíduo Tyr 35 (2,21 Å) e uma interação halogênio entre seu átomo de cloro e a Met 172 (3,17 Å). Conforme ilustrado na Figura 7, a seta rosa destaca a ponte de hidrogênio com a Tirosina 35, enquanto a proximidade entre o cloro e Metionina 172 caracteriza a interação halogênio, reforçando o potencial de ligação da molécula ao sítio ativo.

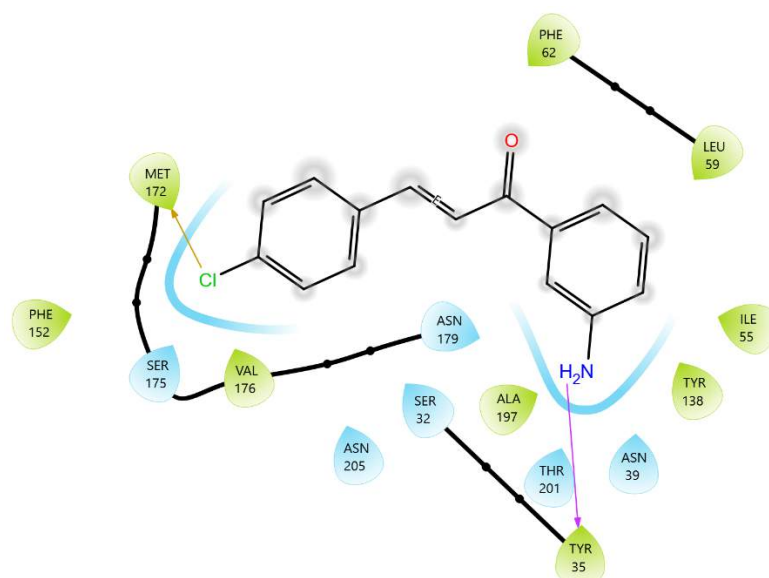


Figura II 7: Representação das interações moleculares entre a chalcona 4Cl e a proteína de efluxo MepA.

Considerando que a chalcona 4Cl se ligou às proteínas de efluxo NorA e MepA, interagindo com aminoácidos previamente descritos na literatura em estudos que relataram a redução da CIM quando associada a moléculas submetidas à docagem, os resultados obtidos sugerem que a chalcona 4Cl é um potencial inibidor dessas proteínas. Dessa forma, reforça-se a necessidade de aprofundamento dos estudos desta substância por meio de ensaios *in vitro*.

Estudo ADMET

O mapa radar do estudo ADMET da Chalcona 4Cl (Figura 8) exibe as principais propriedades físico-químicas e farmacocinéticas essenciais para o desenvolvimento de fármacos, comparando-as com os limites ideais estabelecidos na literatura. Os parâmetros analisados incluem: massa molecular (MW), logP, logS, logD, TPSA, nHD, nHA, nRot, nRing, nHet, nRig e fChar. No mapa, os valores calculados para a Chalcona 4Cl são representados em dourado, os limites superiores aparecem em azul, e os limites inferiores, em verde (FU *et al.*, 2024).

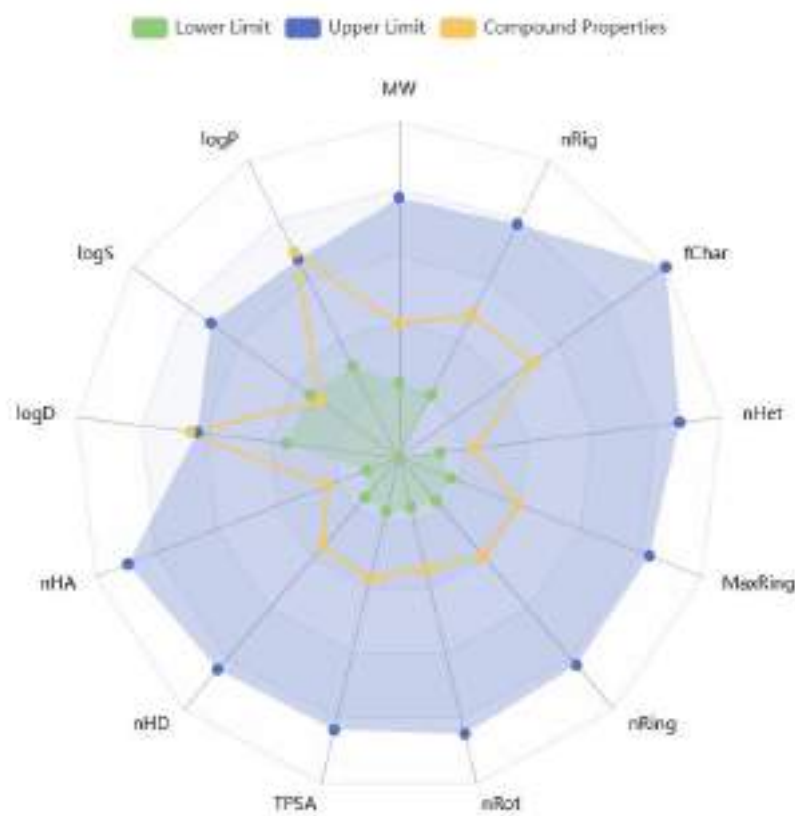


Figura II 8: Mapa radar (propriedades físico-químicas da Chalcona 4Cl).

A análise das propriedades físico-químicas da Chalcona 4Cl revela que a molécula possui um peso molecular de 257.06, dentro da faixa considerada ideal para candidatos a fármacos (100–600). O valor de logP (3.242) indica moderada lipofilicidade, o que pode favorecer a permeabilidade através de membranas biológicas, mas também sugere um potencial risco de toxicidade, uma vez que valores acima de 3 estão associados a maior probabilidade de efeitos adversos (GLEESON; HERSEY; HANNONGBUA, 2011; PALASKA; NEMUTLU, 2024). A solubilidade aquosa (logS = -4.536) é baixa, o que pode limitar a absorção oral e a biodisponibilidade. A área de superfície polar topológica (TPSA = 43.09) está dentro da faixa ideal (0–140), indicando boa permeabilidade celular. A flexibilidade molecular (0.214) é relativamente baixa, o que pode ser favorável para interações específicas com alvos biológicos, mas também pode limitar a adaptabilidade conformacional (GARCÍA JIMÉNEZ *et al.*, 2022; GLEESON; HERSEY; HANNONGBUA, 2011).

Em relação às propriedades de química medicinal, a Chalcona 4Cl apresenta um índice de drug-likeness (QED = 0.516) moderado (LIPINSKI *et al.*, 2001), sugerindo que a molécula possui características farmacocinéticas aceitáveis, mas não ideais. A molécula segue a regra de Lipinski, sem violações, o que é favorável para a absorção oral. No entanto, a regra da Pfizer é violada devido ao logP > 3 e TPSA < 75, indicando um potencial risco de toxicidade. A ausência

de alertas PAINS é um aspecto positivo, mas a presença de dois alertas ALARM NMR sugere que a molécula pode ser reativa com tióis, o que pode levar a toxicidade ou instabilidade metabólica (ERTL; ROHDE; SELZER, 2000; LIPINSKI *et al.*, 2001; PALASKA; NEMUTLU, 2024).

A avaliação da absorção indica que a Chalcona 4Cl possui baixa permeabilidade em modelos de Caco-2 e MDCK, o que pode limitar sua capacidade de atravessar membranas celulares. A molécula não é um substrato da glicoproteína P (Pgp-substrato = 0.011), o que é favorável para a absorção intestinal. No entanto, a probabilidade de absorção intestinal (HIA = 0.0) é baixa, sugerindo que a biodisponibilidade oral pode ser limitada. A alta ligação a proteínas plasmáticas (PPB = 97.933%) pode reduzir a fração livre da molécula disponível para ação terapêutica, enquanto a probabilidade moderada de atravessar a barreira hematoencefálica (BBB = 0.66) pode ser relevante dependendo do alvo terapêutico (ARTURSSON; KARLSSON, 1991).

No que diz respeito ao metabolismo, a Chalcona 4Cl apresenta alta probabilidade de inibir várias isoformas do citocromo P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4, CYP2B6 e CYP2C8), o que pode levar a interações medicamentosas significativas (ZANGER; SCHWAB, 2013). A estabilidade no microsoma hepático humano (HLM = 0.008) é alta, indicando que a molécula não é rapidamente metabolizada no fígado (OBACH, 1999). A depuração plasmática (Cl- plasma = 6.839 ml/min/kg) é moderada, e a meia-vida (T_{1/2} = 0.744 horas) é curta, o que pode exigir doses frequentes para manter a eficácia terapêutica (ZANGER; SCHWAB, 2013).

A avaliação de toxicidade revela que a Chalcona 4Cl possui uma probabilidade moderada de bloquear o canal hERG (0.408 e 0.695), o que pode levar a cardiotoxicidade (SANGUINETTI; TRISTANI-FIROUZI, 2006). A molécula também apresenta alta probabilidade de mutagenicidade (AMES = 0.704), risco moderado de lesão hepática induzida por drogas (DILI = 0.445) e alta probabilidade de neurotoxicidade (0.98) (AMES *et al.*, 1973; CHEN *et al.*, 2011; GERA *et al.*, 2024).

A Chalcona 4Cl apresenta características farmacocinéticas moderadas, com boa permeabilidade celular e estabilidade metabólica. No entanto, a molécula possui riscos significativos de toxicidade, incluindo cardiotoxicidade, neurotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade. Além disso, a baixa solubilidade aquosa e a alta ligação a proteínas plasmáticas podem limitar sua biodisponibilidade. Recomenda-se a realização de estudos adicionais para confirmar os riscos de toxicidade e explorar modificações estruturais que possam melhorar o perfil farmacológico e reduzir os efeitos adversos.

Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM)

Com relação a atividade antibacteriana direta, não foram observados resultados significativos do ponto de vista clínico tendo em vista que a 4Cl apresentou CIM equivalente $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ para cepas K2068 e 1199B de *Staphylococcus aureus*.

Avaliação da inibição de bomba de inibição de bomba de efluxo por redução do CIM do antibiótico e do brometo de etídio.

De acordo com o resultado na Figura 9, a Chalcona 4Cl foi capaz de reduzir a concentração inibitória mínima da cepa 1199 na associação com os antibióticos e com o brometo de etídio que são substratos para bombas. Quando comparado as cepas 1199 e 1199B, foi observado a diferença de comportamento de redução de CIM do antibiótico sendo mais evidente na cepa 1199B que superexpressa NorA.

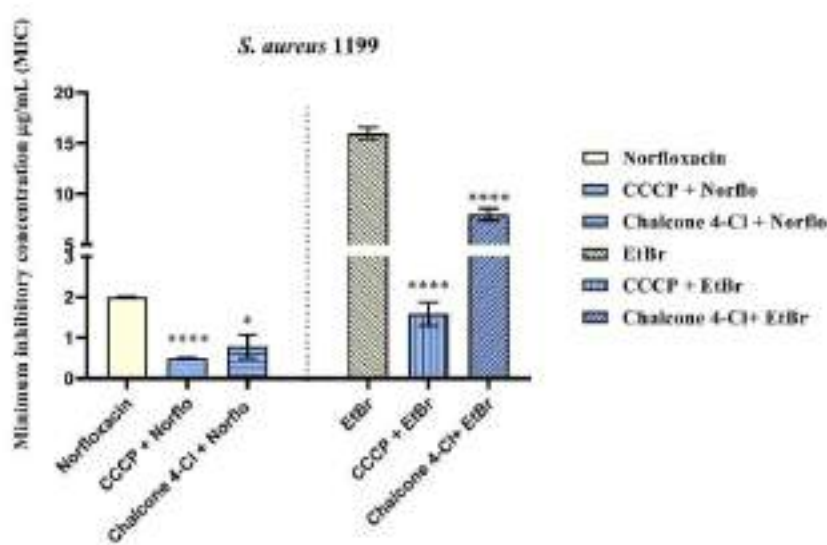


Figura II 9: Avaliação da inibição da bomba de efluxo NorA pela Chalcona 4Cl contra a cepa *S. aureus* 1199. Substância associada ao Norfloxacino (A) e ao EtBr (B). ANOVA unidirecional seguida pelo teste post hoc de Tukey. **** $p < 0,0001$ vs controle de Norfloxacino ou EtBr, na redução da CIM.

Como observado na figura 10 na associação com o brometo de etídio e com antibiótico, a chalcona 4Cl também foi capaz de reduzir a concentração inibitória mínima das cepas 1199B, que superexpressa NorA. No entanto, tanto no brometo de etídio como no antibiótico a CIM foi reduzido apenas uma vez. Nas associações tanto na 1199 como na 1199B apresentaram menor CIM quando associados aos antibióticos.

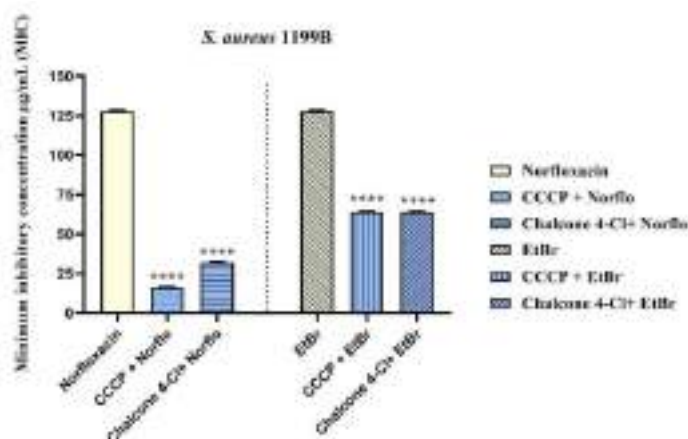


Figura II 10: Avaliação da inibição da bomba de efluxo NorA pela Chalcona 4-Cl contra a cepa *S. aureus* 1199B. Substância associada ao Norfloxacin (A) e ao EtBr (B). ANOVA unidirecional seguida pelo teste post hoc de Tukey. **** $p < 0,0001$ vs controle de Norfloxacin ou EtBr, na redução da CIM.

É importante destacar que, na associação com a cepa K2068, foram observados os melhores resultados de redução da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em comparação com todas as demais cepas testadas, conforme ilustrado na Figura 11. Nesse caso, houve uma redução de três vezes no CIM do antibiótico ciprofloxacina e uma redução de duas vezes no CIM quando associado ao brometo de etídio.

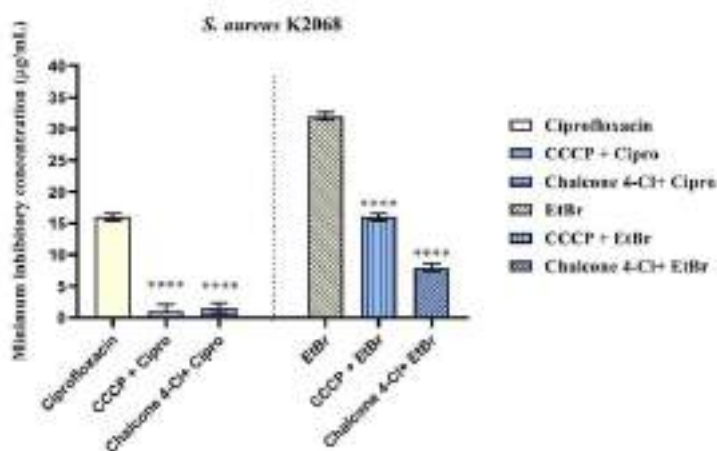


Figura I 11: Avaliação da inibição da bomba de efluxo MepA pela Chalcona 4-Cl contra a cepa *S. aureus* K2068. Substância associada à Ciprofloxacina (A) e ao brometo de etídio (EtBr) (B). ANOVA unidirecional seguida pelo teste post hoc de Tukey. **** $p < 0,0001$ vs controle de Ciprofloxacina ou EtBr, na redução da CIM.

Avaliação da inibição de bombas de efluxo NorA e MepA por medição da fluorescência do EtBr

Foi observado que para a cepa 1199B de *S. aureus* a Chalcona 4Cl avaliada nas concentrações de 200 e 100 µg/mL aumentou significativamente em 736,3% e 137,3%, respectivamente, a fluorescência do EtBr em relação ao controle negativo. Enquanto frente a *S. aureus* K2068 a Chalcona 4Cl nas concentrações de 200 e 100 µg/mL aumentou

respectivamente em 234,8% e 163,6% a fluorescência do EtBr em relação ao controle negativo. Resultado significativo também foi observado pelo inibidor padrão de bombas de efluxo, CCCP, que aumentou a fluorescência em 76,1% e 33,6%, respectivamente, para as cepas 1199B e K2068 (Figura 12A e 12B).

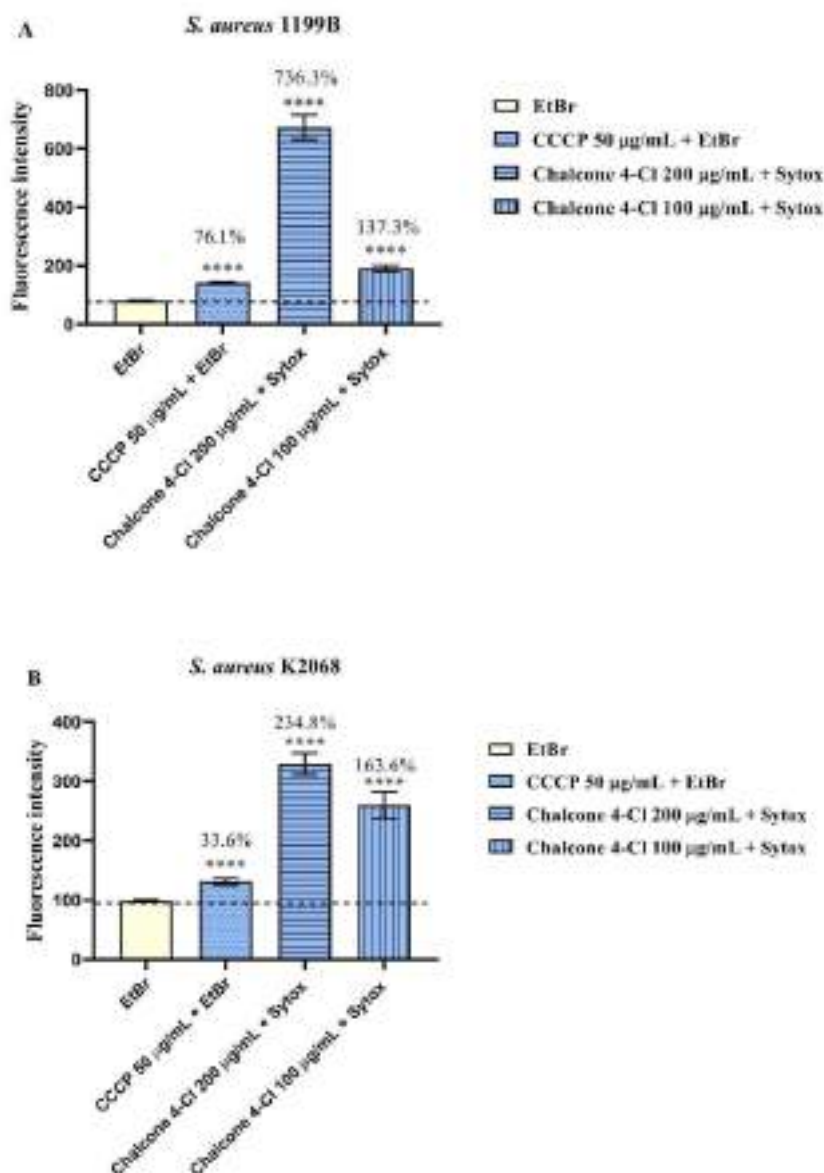


Figura II 12: Avaliação da inibição das bombas de efluxo NorA e MepA pela Chalcona 4-Cl nas concentrações de 200 µg/mL e 100 µg/mL. A avaliação foi realizada medindo a fluorescência de brometo de etídio (EtBr) em *S. aureus* 1199B (A) e *S. aureus* K2068 (B). Os resultados são expressos como intensidade média de fluorescência, **** = $p < 0,0001$ vs EtBr.

Avaliação do aumento da permeabilidade de membrana bacteriana

Observou-se que a Chalcona 4Cl nas concentrações de 200 e 100 µg/mL aumentou significativamente a intensidade de fluorescência do SYTOX Green em 70% e 76% respectivamente em comparação ao controle negativo, na cepa *S. aureus* 1199B. Na cepa *S.*

aureus K2068 esse aumento foi de 855% e 275% para Chalcona 4Cl nas concentrações de 200 e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O controle positivo polimixina B também aumentou significativamente a intensidade de fluorescência em 78,7% na cepa *S. aureus* 1199B e 38,5% em *S. aureus* K2068 (Figura 13A e 13B).

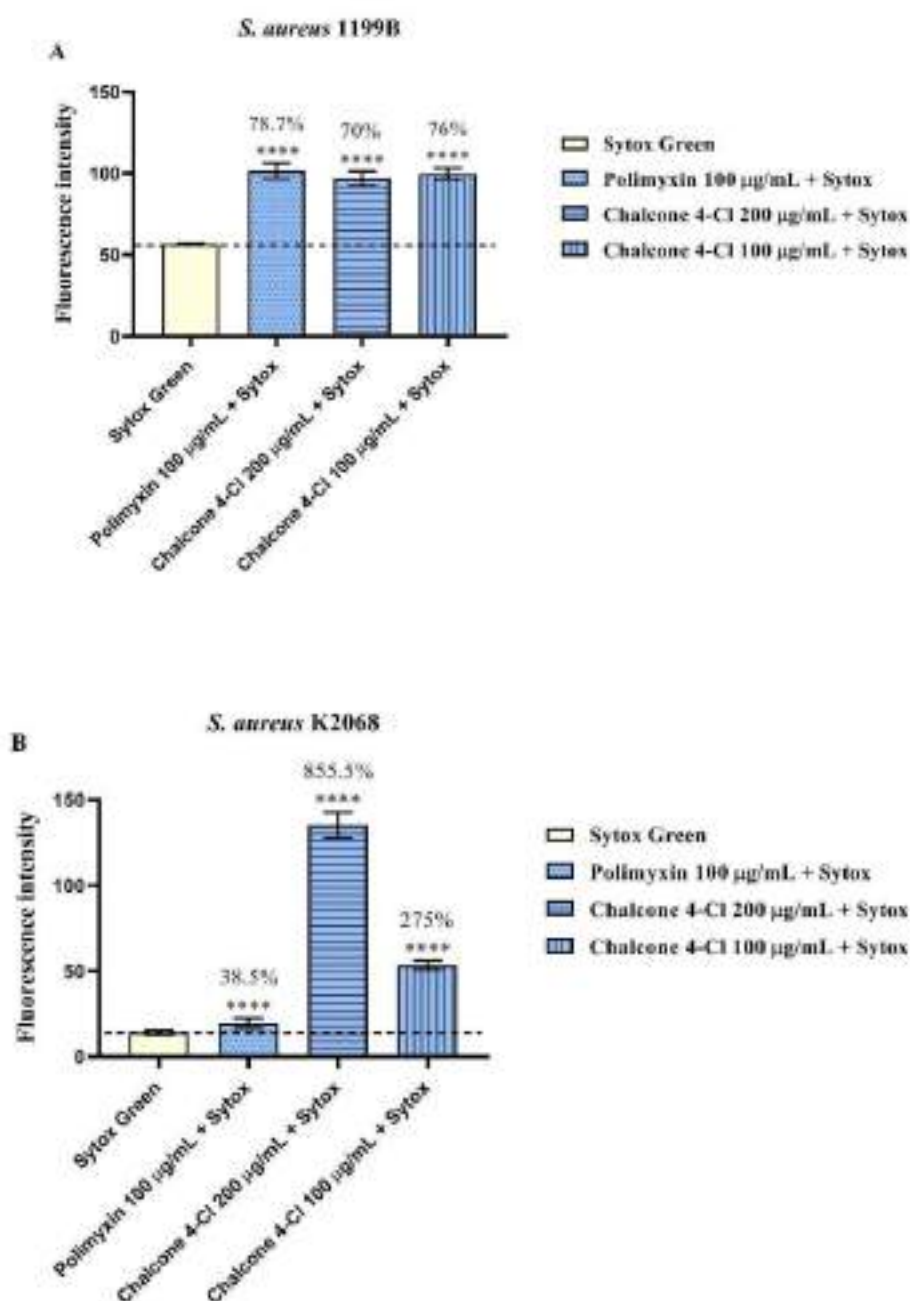


Figura II 13: Avaliação da ação da Chalcona 4-Cl nas concentrações de 200 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ sobre a permeabilidade da membrana bacteriana de *S. aureus* 1199B (A) e *S. aureus* K2068 (B). **** $p < 0,0001$ vs Sytox Green. Os resultados são expressos como intensidade média de fluorescência.

O *SYTOX Green* é um corante fluorescente que não penetra em membranas celulares intactas, mas se intercala ao DNA quando atravessa membranas danificadas, e como consequência emite fluorescência. O aumento da permeabilidade da membrana bacteriana ou danos na membrana pode ser causado por algumas classes de antibióticos como polimixina B, casando altos picos de fluorescência em relação a células não desafiadas com antibiótico (JOHNSON; CRISS, 2013; MCKENZIE *et al.*, 2016). Os dados obtidos no presente estudo indicam que o Chalcona 4Cl atua no aumento da permeabilidade da membrana nas cepas de *S. aureus*, indicando que esse é um dos mecanismos de ação envolvidos na atividade da chalcona.

Discussão

As chalconas constituem uma classe de compostos bioativos pertencentes aos flavonoides, estruturalmente caracterizadas por dois anéis aromáticos unidos por uma cadeia α , β -insaturada de três carbonos com uma ligação dupla conjugada (Ferreira *et al.*, 2018). Esses compostos podem ser obtidos a partir de fontes naturais ou sintetizados por meio de reações de condensação aldólica entre aldeídos e cetonas aromáticas, sendo posteriormente caracterizados por técnicas espectroscópicas como ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN), espectrometria de massas (MS) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (FREITAS *et al.*, 2021; TEMPONE *et al.*, 2022). A versatilidade estrutural das chalconas permite a introdução de diferentes grupos substituintes nos anéis aromáticos, o que amplia sua diversidade química e favorece uma gama expressiva de atividades biológicas (ALVES BORGES LEAL *et al.*, 2021; KUTTITHODI *et al.*, 2022; ROCHA *et al.*, 2021), incluindo propriedades antibacterianas e potencial de modular a ação de antibióticos (DOS SANTOS *et al.*, 2023; FERRAZ *et al.*, 2020).

Com relação a chalcona 4Cl do presente estudo, como mencionado anteriormente não apresentou atividade direta com cepas de *S. aureus* 1199, 1999B e K2068, mas mostraram capacidade de inibir a bomba de efluxo. Portanto, essa primeira característica a qualifica como substância dotada com uma das características essenciais para os inibidores ideais de bomba de efluxo, tendo em vista que a ausência de atividade direta é necessária para um bom inibidor de bomba de efluxo, de modo que tal ação resulta em prevenir o possível desenvolvimento de resistência a um novo inibidor (WANG; VENTER; MA, 2016).

A capacidade de inibir a bomba de efluxo em cepas bacterianas pode ser avaliada por diversos meios, desde as preliminares aos mais conclusivos e detalhados (TINTINO *et al.*, 2020). No presente estudo estes diferentes métodos foram aplicados, obtendo-se resultados que corroboram entre si.

Durante a triagem por *docking* molecular, identificou-se afinidade da chalcona 4Cl com sítios funcionais de proteínas de efluxo. No complexo com a NorA, a energia de ligação calculada foi de $-7,926$ kcal/mol, mediada por interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio e forças hidrofóbicas. Destacou-se a interação com o resíduo Glu222, a distância inferior a $4 \text{ \AA}$, crítico para o mecanismo de efluxo (BRAWLEY et al., 2022). A Interação com a proteína MepA também sugeriu viabilidade no uso da chalcona 4Cl, aminoácidos citados em outros estudos, como a Tyr35 e Asn39 (ALVES BORGES LEAL et al., 2021; BENTO et al., 2024; FREITAS et al., 2021; REZENDE-JÚNIOR et al., 2020), também se ligaram a 4Cl com distâncias de $2,21 \text{ \AA}$.

No ensaio de associação com antibióticos, considerado um método preliminar, a redução da concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos em cepas que expressam bombas de efluxo com substrato conhecido é um dos primeiros indicativos da atividade inibitória sobre essas bombas. No presente estudo, a chalcona 4Cl demonstrou essa capacidade, promovendo a redução da CIM de diferentes antibióticos, conforme observado nos resultados. Destaca-se, especialmente, a maior expressividade desse efeito na cepa que superexpressa a bomba NorA. Além disso, o controle positivo (CCCP), um inibidor clássico de bomba de efluxo, também foi capaz de reduzir a CIM em todas as cepas testadas (FERRAZ et al., 2020; ROCHA et al., 2021, 2023).

É importante destacar que a redução do brometo de etídio é outro indício ainda mais conclusivo de inibição de bomba de efluxo, tendo em vista que sabe-se que o brometo de etídio é substrato das bombas de efluxo, para vários tipos de bombas de efluxo, devido a uma adaptação a toxicidade do brometo de etídio (EtBr) pelas células bacterianas (PAIXÃO et al., 2009; STAVRI; PIDDOCK; GIBBONS, 2007; TINTINO et al., 2016). Neste estudo foi observado a redução do CIM brometo nas duas cepas portadoras de NorA (1199 e 1199B), assim como na cepa K2068, portadora de MepA. É importante ressaltar que a acumulação final do brometo de etídio no interior celular e consequente da inibição da bomba de efluxo pode ser verificada pelo ensaio de emissão de fluorescência do EtBr (MARTINS et al., 2013; PAL et al., 2020).

De modo que o EtBr é conhecido por ser um corante intercalante de DNA, que emite fluorescência, tendo uma relação direta dessa fluorescência a quantidade de moléculas ligadas ao DNA (MARTINS *et al.*, 2013). Portanto, ao não realizar a extrusão do EtBr, ele se acumula na célula e se intercala com o DNA, por ter uma alta afinidade com ele. Tal situação ocorre quando uma bomba de efluxo é inibida por qualquer substância, aumentando a concentração de EtBr intracelular passível de intercalação ao DNA. Como consequência, maior fluorescência é

emitida nos grupos de bactérias submetidos a substâncias inibidoras de bombas de efluxo, como o próprio CCCP controle (BLAIR; PIDDOCK, 2016; GIBBONS; OLUWATUYI; KAATZ, 2003; MARKHAM et al., 1999). Os resultados obtidos no presente estudo mostram aumento expressivo e significativo da fluorescência causado pela Chalcona 4Cl indicando que essa substância pode ter inibido as bombas de efluxo NorA e MepA.

Como nas proteínas transmembranares presentes nas células eucarióticas, as proteínas de transmembranas de células bacterianas também são funcionalmente dependentes da estabilidade, integridade e fluidez de membrana, e quando há qualquer alteração nas membranas essas proteínas podem ter seu funcionamento alternado (LEE; MICHELANGELI; EAST, 1989). Conforme vimos anteriormente a presença a chalcona 4Cl provoca alterações na permeabilidade da membrana, e sabe-se que alteração na permeabilidade pode resultar em desregulação do funcionamento de proteínas integradas a membrana, já que estas precisam de membranas estáveis e fluidas para o seu bom funcionamento (KRISHNAMURTHY; PRASAD, 1999). Portanto a chalcona 4Cl poderia, está alterando o funcionamento das bombas de efluxo NorA e MepA também de modo indireto.

Há indícios na literatura que as chalconas e seus derivados podem apresentar ação sobre os mecanismos de resistência bacteriana, com a possibilidade de atuarem envolvendo permeabilidade de membrana, fluorescência e inibição de bombas de efluxo. No artigo de Tempone *et al.* (2022), a chalcona derivada r4MB foi avaliada quanto à sua capacidade de alterar a permeabilidade da membrana de *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina. Utilizando o corante fluorescente *SYTOX Green*, os autores observaram um aumento significativo na fluorescência após 6 minutos de incubação com o composto, indicando rápida permeabilização da membrana bacteriana. Além disso, análises de microscopia de fluorescência confirmaram a penetração do corante nas células tratadas, corroborando os resultados espectrofluorimétricos.

Em outro estudo, Freitas *et al.* (2021) investigaram a inibição das bombas de efluxo NorA e MepA em *Staphylococcus aureus* utilizando ensaios de acúmulo de brometo de etídio (EtBr) com quatro chalconas distintas. Assim como a chalcona 4Cl, as chalconas avaliadas no estudo apresentavam halogênios (flúor ou cloro) no anel aromático B, não exibiram atividade antibacteriana direta contra cepas resistentes e demonstraram resultados *in silico* semelhantes. Os autores observaram que essas chalconas aumentaram significativamente a retenção de EtBr nas células bacterianas, indicando inibição das bombas de efluxo. Esse efeito foi corroborado por ensaios de redução das concentrações inibitórias mínimas (CIMS) de ciprofloxacina e EtBr.

No entanto, a chalcona 4Cl demonstrou maior eficácia em comparação com os compostos estudados por Freitas e colaboradores (2021).

Em um estudo complementar, Siqueira *et al.* (2021) avaliaram chalconas estruturalmente análogas, incluindo uma molécula muito semelhante à chalcona 4Cl, contra as mesmas cepas do presente estudo. A principal diferença entre elas reside na posição do grupo amina: enquanto na chalcona de Siqueira *et al.* (2021) esse grupo está ligado ao carbono 4' do anel A, na chalcona 4Cl, ele está posicionado no carbono 3' do mesmo anel, mas essas diferenças não afetaram muito a atividade das chalconas aqui comparadas. Como no presente estudo, esta também não apresentou atividade direta. E também mostrou atividade antibacteriana indireta por reduzir a CIM das mesmas cepas, tanto associando ao antibiótico como ao brometo de etídeo (SIQUEIRA *et al.*, 2021), todavia pode-se deduzir que contribuíram para a inibição das bombas NorA e MepA como a 4Cl.

Portanto, os achados reforçam o potencial das chalconas como agentes adjuvantes de antibióticos, capazes de interferir em mecanismos de resistência bacteriana por meio da inibição direta das bombas de efluxo ou, indiretamente, pela modulação da permeabilidade da membrana.

Conclusão

Este estudo comprovou o potencial da chalcona 4Cl como inibidora das bombas de efluxo NorA e MepA em *Staphylococcus aureus*, com confirmação *in silico* e *in vitro*. A síntese do composto foi validada por RMN, e o *docking* molecular evidenciou afinidade por resíduos-chave (ex.: Glu222 na NorA; Tyr35/Asn39 na MepA), concordando com literatura prévia.

Embora a 4Cl não apresente atividade antibacteriana direta, ela demonstrou sinergia com antibióticos, reduzindo a CIM em cepas resistentes (SA 1199B e SA K2068). Os ensaios de fluorescência confirmaram seu efeito inibitório, com aumento significativo da retenção de EtBr, superando o inibidor padrão CCCP. O incremento na fluorescência do SYTOX Green sugere ação adicional na membrana bacteriana.

Apesar do potencial, análises ADMET alertam para toxicidade, sugerindo estudos futuros: avaliação *in vivo* de eficácia, farmacocinética e toxicidade; modificações estruturais para reduzir efeitos adversos sem perder atividade. Essas estratégias podem viabilizar a 4Cl como adjuvante seguro contra resistência mediada por efluxo em *S. aureus*.

Referencias

- ALVES BORGES LEAL, A. L.; TEIXEIRA DA SILVA, P.; NUNES DA ROCHA, M.; MARINHO, E. M.; MARINHO, E. S.; MARINHO, M. M.; BANDEIRA, P. N.; SAMPAIO NOGUEIRA, C. E.; BARRETO, H. M.; RODRIGUES TEIXEIRA, A. M.; SILVA DOS SANTOS, H. Potentiating activity of Norfloxacin by synthetic chalcones against NorA overproducing *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 155, n. February, 2021.
- AMES, B. N.; DURSTON, W. E.; YAMASAKI, E.; LEE, F. D. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 8, p. 2281–2285, ago. 1973.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. SUPPL. 1, 2001.
- ARTURSSON, P.; KARLSSON, J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 175, n. 3, p. 880–885, mar. 1991.
- BENTO, A. J. D. M.; ALMEIDA-NETO, F. W. DE Q.; MARINHO, E. S.; SILVA, L. DA; MARINHO, M. M.; COUTINHO, H. D. M.; ROCHA, J. E.; GUEDES, J. M.; TEIXEIRA, A. M. R.; SANTOS, H. S. DOS. Quantum-chemical calculation, antibiotic potentiating activity, evaluation of efflux pump inhibition against *S. aureus* multi-resistant strains and molecular docking of the drugs isoniazid and hydralazine. **Journal of Molecular Structure**, v. 1312, n. April, 2024.
- BLAIR, J. M. A.; PIDDOCK, L. J. V. How to Measure Export via Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps. **mBio**, v. 7, n. 4, p. 1–6, 7 set. 2016.
- BRAWLEY, D. N. *et al.* Structural basis for inhibition of the drug efflux pump NorA from *Staphylococcus aureus*. **Nature Chemical Biology**, v. 18, n. 7, p. 706–712, 2022.
- CHANDAL, N. *et al.* arsenal against norA over-expressing *Staphylococcus aureus*. v. 11, n. 5, 2023.
- CHEN, M.; VIJAY, V.; SHI, Q.; LIU, Z.; FANG, H.; TONG, W. FDA-approved drug labeling for the study of drug-induced liver injury. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 15, p. 697–703, 2011.
- COSTA, R. H. S. DA; ROCHA, J. E.; FREITAS, T. S. DE; PEREIRA, R. L. S.; JUNIOR, F. N. P.; OLIVEIRA, M. R. C. DE; BATISTA, F. L. A.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A. DE. Evaluation of antibacterial activity and reversal of the NorA and MepA efflux pump of estragole against *Staphylococcus aureus* bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 6, 2021.
- ELSHIKH, M.; AHMED, S.; FUNSTON, S.; DUNLOP, P.; MCGAW, M.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 6, 2016.
- ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. **Journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 20, p. 3714–3717, out. 2000.

FERRAZ, C. A. N. *et al.* Potentiation of antibiotic activity by chalcone (E)-1-(4'-aminophenyl)-3-(furan-2-yl)-prop-2-en-1-one against gram-positive and gram-negative MDR strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, 1 nov. 2020.

FERREIRA, M. K. A. *et al.* Chalcones reverse the anxiety and convulsive behavior of adult zebrafish. **Epilepsy and Behavior**, v. 117, 2021.

FERREIRA, M. K. A.; FONTENELLE, R. O. S.; MAGALHÃES, F. E. A.; BANDEIRA, P. N.; MENEZES, J. S. E. A. DE; SANTOS, H. S. DOS. Chalcones pharmacological potential: A brief review. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 5, p. 1455–1473, 2018.

FREITAS, T. S. *et al.* In vitro and in silico studies of chalcones derived from natural acetophenone inhibitors of NorA and MepA multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 161, 2021.

FU, L. *et al.* ADMETlab 3.0: an updated comprehensive online ADMET prediction platform enhanced with broader coverage, improved performance, API functionality and decision support. **Nucleic acids research**, v. 52, n. W1, p. W422–W431, jul. 2024.

GARCÍA JIMÉNEZ, D.; ROSSI SEBASTIANO, M.; VALLARO, M.; MILEO, V.; PIZZIRANI, D.; MORETTI, E.; ERMONDI, G.; CARON, G. Designing Soluble PROTACs: Strategies and Preliminary Guidelines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, n. 19, p. 12639–12649, 2022.

GAURAV, A.; BAKHT, P.; SAINI, M.; PANDEY, S.; PATHANIA, R. Role of bacterial efflux pumps in antibiotic resistance, virulence, and strategies to discover novel efflux pump inhibitors. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 169, n. 5, p. 1–13, 2023.

GERA, B.; GAUTAM, H.; RAZA, S.; MOHAPATRA, S.; SOOD, S.; DHAWAN, B.; KAPIL, A.; DAS, B. K. Detection of Aminoglycoside Modifying Enzyme (AME) genes in *Acinetobacter baumannii* isolates and the inhibitory effect of efflux pump activity on drug susceptibility pattern. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 47, p. 100493, 1 jan. 2024.

GIBBONS, S.; OLUWATUYI, M.; KAATZ, G. W. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 1, 2003.

GLEESON, M. P.; HERSEY, A.; HANNONGBUA, S. In-silico ADME models: a general assessment of their utility in drug discovery applications. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 11, n. 4, p. 358–381, 2011.

JOHNSON, M. B.; CRISS, A. K. Fluorescence Microscopy Methods for Determining the Viability of Bacteria in Association with Mammalian Cells. **JoVE**, n. 79, p. e50729, 2013.

JUMPER, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021.

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.

KRISHNAMURTHY, S. S.; PRASAD, R. Membrane fluidity affects functions of Cdr1p, a multidrug ABC transporter of *Candida albicans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 173, n. 2, p. 475–481, 1999.

KUTTITHODI, A. M.; NIKHITHA, D.; JACOB, J.; NARAYANANKUTTY, A.; MATHEWS, M.; OLATUNJI, O. J.; RAJAGOPAL, R.; ALFARHAN, A.; BARCELO, D. Antioxidant, Antimicrobial, Cytotoxicity, and Larvicidal Activities of Selected Synthetic Bis-Chalcones. **Molecules**, v. 27, n. 23, p. 1–11, 2022.

LEE, A. G.; MICHELANGELO, F.; EAST, J. M. Tests for the importance of fluidity for the function of membrane proteins. **Biochemical Society Transactions**, v. 17, n. 6, p. 962–964, 1 dez. 1989.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings¹PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1, p. 3–26, 2001.

MARKHAM, P. N.; WESTHAUS, E.; KLYACHKO, K.; JOHNSON, M. E.; NEYFAKH, A. A. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 10, p. 2404–2408, 1999.

MARTINS, M.; MCCUSKER, M. P.; VIVEIROS, M.; COUTO, I.; FANNING, S.; PAGÈS, J.-M.; AMARAL, L. A Simple Method for Assessment of MDR Bacteria for Over-Expressed Efflux Pumps. **The Open Microbiology Journal**, v. 7, n. 1, p. 72–82, 2013.

MCKENZIE, K.; MACLEAN, M.; GRANT, M. H.; RAMAKRISHNAN, P.; MACGREGOR, S. J.; ANDERSON, J. G. The effects of 405 nm light on bacterial membrane integrity determined by salt and bile tolerance assays, leakage of UV-absorbing material and SYTOX green labelling. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 162, n. 9, p. 1680–1688, 2016.

MENDES, F. R. S. *et al.* GABAA and serotonergic receptors participation in anxiolytic effect of chalcones in adult zebrafish. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 41, n. 21, p. 12426–12444, 2023.

OBACH, R. S. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 27, n. 11, p. 1350–1359, nov. 1999.

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. DE M. *et al.* Valencene, Nootkatone and Their Liposomal Nanoformulations as Potential Inhibitors of NorA, Tet(K), MsrA, and MepA Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus* Strains. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 10, p. 1–15, 2023.

OMS. WHO bacterial priority pathogens list, 2024. [s.l: s.n.].

PAIXÃO, L.; RODRIGUES, L.; COUTO, I.; MARTINS, M.; FERNANDES, P.; CARVALHO, C. C. C. R. DE; MONTEIRO, G. A.; SANSONETTY, F.; AMARAL, L.; VIVEIROS, M. Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Engineering**, v. 3, p. 1–13, 2009.

PAL, S.; MISRA, A.; BANERJEE, S.; DAM, B. Adaptation of ethidium bromide fluorescence assay to monitor activity of efflux pumps in bacterial pure cultures or mixed population from environmental samples. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 1, p. 939–945, 2020.

PALASKA, E.; NEMUTLU, E. Determination of Acidity Constant (pKa), Lipophilic Partition (LogP) and Distribution Coefficients (LogD) Values of Some 3- (2-Phenylethyl) - Tetrahydro-2H-. v. 45, n. 4, p. 673–682, 2024.

PINTO, L. M. A.; ADEOYE, O.; THOMASI, S. S.; FRANCISCO, A. P.; CARVALHEIRO, M. C.; CABRAL-MARQUES, H. Preparation and characterization of a synthetic curcumin analog inclusion complex and preliminary evaluation of in vitro antileishmanial activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 589, n. April, p. 119764, 2020.

REZENDE-JÚNIOR, L. M. *et al.* Chalcones isolated from Arrabidaea brachypoda flowers as inhibitors of nora and mepa multidrug efflux pumps of *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 1–12, 2020.

ROCHA, J. E. *et al.* Antibacterial and antibiotic modifying activity, ADMET study and molecular docking of synthetic chalcone (E)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-(2,4-dimethoxy-3-methylphenyl)prop-2-en-1-one in strains of *Staphylococcus aureus* carrying NorA and MepA efflux pumps. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 140, n. May, 2021.

ROCHA, J. E. *et al.* ADMET study, spectroscopic characterization and effect of synthetic nitro chalcone in combination with norfloxacin, ciprofloxacin, and ethidium bromide against *Staphylococcus aureus* efflux pumps. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 163–173, 1 fev. 2023.

SANTOS, A. L. DOS; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C. DE; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: Visiting a strain of clinical importance. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413–423, 2007.

SANTOS, A. T. L. DOS *et al.* Synthesis of chalcones and their antimicrobial and drug potentiating activities. **Microbial Pathogenesis**, v. 180, n. April, 2023.

SILVA MENDES, F. R. *et al.* GABAA receptor participation in anxiolytic and anticonvulsant effects of (E)-3-(furan-2-yl)-1-(2hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one in adult zebrafish. **Neurochemistry International**, v. 155, n. February, 2022.

SILVA, P. T. DA *et al.* Synthesis, spectroscopic characterization and antibacterial evaluation by chalcones derived of acetophenone isolated from Croton anisodontus Müll.Arg. **Journal of Molecular Structure**, v. 1226, 2021.

SILVA, P. T. DA *et al.* Structural characterization, DFT calculations, ADMET studies, antibiotic potentiating activity, evaluation of efflux pump inhibition and molecular docking of heterocyclic chalcone (E)-1-(4-aminophenyl)-3-(thiophen-2-yl)prop-2-en-1-one. **Journal of Molecular Structure**, v. 1312, n. January, 2024.

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

STAVRI, M.; PIDDOCK, L. J. V; GIBBONS, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 1247–1260, 1 jun. 2007.

TEMPONE, A. G. *et al.* A new reduced chalcone-derivative affects the membrane permeability and electric potential of multidrug-resistant *Enterococcus faecalis*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 365, n. July, p. 110086, 2022.

TINTINO, S. R. *et al.* Effect of vitamin K3 inhibiting the function of nora efflux pump and its gene expression on *staphylococcus aureus*. **Membranes**, v. 10, n. 6, p. 1–18, 2020.

TINTINO, S. R.; OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M.; CAMPINA, F. F.; SILVA, R. L. P.; COSTA, M. DO S.; MENEZES, I. R. A.; CALIXTO-JÚNIOR, J. T.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; COUTINHO, H. D. M.; 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.

VARADI, M. *et al.* AlphaF old Prot ein Structure D atabase in 2024: **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. November 2023, p. D368–D375, 2024.

WANG, Y.; VENTER, H.; MA, S. Efflux Pump Inhibitors: A Novel Approach to Combat Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. **Current drug targets**, v. 17, n. 6, p. 702–719, 2016.

YUEN, H. L.; CHAN, S. Y.; DING, Y. E.; LIM, S.; TAN, G. C.; KHO, C. L. Development of a Novel Antibacterial Peptide, PAM-5, via Combination of Phage Display Selection and Computer-Assisted Modification. **Biomolecules**, v. 13, n. 3, 2023.

ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 138, n. 1, p. 103–141, 2013.

ZHUANG, C.; ZHANG, WEN; SHENG, C.; ZHANG, WANNIAN; XING, C.; MIAO, Z. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. 2017.

...

5.1 ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Durante o Doutorado em Química Biológica na Universidade Regional do Cariri (URCA), a aplicação sistemática de técnicas experimentais avançadas e a consolidação de conceitos científicos permitiram desenvolver a pesquisa, estruturada em dois capítulos experimentais, uniu abordagens *in silico* e *in vitro* para avaliar o desempenho de dois análogos estruturais, a chalcona 4Cl (CPA4Cl) e a aminochalcona CMA4DMA, frente a cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*.

O Capítulo I abordou a síntese, caracterização e avaliação da chalcona 4Cl, enquanto o Capítulo II ampliou a investigação com a CMA4DMA, uma molécula modificada estruturalmente pela introdução de um grupo dimetilamino, com o objetivo de otimizar propriedades eletrônicas e farmacocinéticas.

Ambos os compostos foram obtidos com alto grau de pureza e confirmados por RMN, FTIR e HPLC. Ensaios de docagem molecular demonstraram que tanto a 4Cl quanto a CMA4DMA interagem com resíduos críticos das bombas de efluxo NorA e MepA, como Glu222, Tyr35 e Asn39, sugerindo afinidade e potencial inibitório comparável ao inibidor padrão CCCP. No entanto, diferenças relevantes foram observadas nas propriedades farmacocinéticas e na resposta microbiológica dos compostos.

Enquanto a 4Cl apresentou melhor estabilidade metabólica e perfil farmacocinético favorável, a CMA4DMA revelou maior afinidade molecular com NorA, mas também maior susceptibilidade à depuração hepática e possível toxicidade, segundo as predições ADMET. Essas diferenças evidenciam o impacto das modificações químicas sobre a biodisponibilidade e segurança dos compostos.

5.2 CONCLUSÕES GERAIS

A descrição detalhada do processo de síntese da 3-aminochalcona-4-clorobenzaldeído (chalcona 4Cl) evidenciou a eficiência da rota de condensação aldólica de *Claisen-Schmidt* em meio básico, resultando em produto de alta pureza (99,9%), confirmada por análises espectroscópicas e cromatográficas. Essa etapa consolidou a reprodutibilidade da metodologia sintética e forneceu base sólida para os ensaios subsequentes.

Os estudos de *docking* molecular realizados com as bombas NorA e MepA permitiram compreender os modos de interação das chalconas com resíduos críticos de cada proteína, revelando afinidades favoráveis e interações estáveis com resíduos cataliticamente relevantes, como Glu222 (NorA) e Tyr35/Asn39 (MepA). Esses achados sustentam a hipótese de que as chalconas atuam como potenciais inibidoras de efluxo.

As análises *in silico* de propriedades físico-químicas e farmacocinéticas (ADMET) confirmaram que os compostos apresentam características compatíveis com moléculas bioativas, destacando boa absorção intestinal e adequada permeabilidade de membrana, ainda que alertas de cardiotoxicidade e mutagenicidade apontem a necessidade de otimizações estruturais antes de aplicações terapêuticas mais amplas.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) confirmou a ausência de atividade antibacteriana direta das chalconas frente às cepas testadas ($CIM \geq 1024 \mu\text{g/mL}$), mas os ensaios de modulação da resistência demonstraram expressiva redução das CIMs de antibióticos (como norfloxacin e ciprofloxacina) na presença dos compostos, sinalizando ação sinérgica e possível inibição das bombas de efluxo.

Os experimentos de modificação da CIM do brometo de etídio (EtBr) e os ensaios de fluorescência confirmaram o aumento do acúmulo intracelular do corante, corroborando a interferência direta das chalconas no transporte ativo de substratos pelas proteínas NorA e MepA. Da mesma forma, a análise da permeabilidade de membrana com o corante *SYTOX Green* revelou alterações significativas na integridade celular, o que pode contribuir adicionalmente para a retenção intracelular de antimicrobianos.

Comparando os resultados das chalconas verifica-se que: A chalcona 4Cl mostrou maior estabilidade química e farmacocinética, além de inibir simultaneamente as bombas NorA e MepA, com incremento de fluorescência de EtBr e *SYTOX Green* indicando ação combinada sobre efluxo e permeabilidade de membrana; A aminochalcona CMA4DMA, por sua vez, demonstrou afinidade molecular superior com NorA e redução expressiva da CIM de antibióticos em cepas superexpressoras dessa bomba, confirmando ação específica, embora com risco toxicológico mais elevado.

Em conjunto, os resultados corroboram a hipótese de que modificações eletrônicas no anel aromático influenciam diretamente o desempenho inibitório das chalconas, modulando tanto a interação com proteínas de transporte quanto o perfil farmacocinético. Assim, a CMA4DMA representa um avanço racional em relação à 4Cl em termos de afinidade molecular, mas a 4Cl mantém vantagem quanto à estabilidade e segurança preditas.

Em síntese, os resultados obtidos ao longo deste trabalho consolidam o papel das chalconas CMA4DMA e 4Cl como moléculas promissoras no desenvolvimento de adjuvantes terapêuticos voltados à restauração da eficácia de antibióticos frente a cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. Ao mesmo tempo, a convergência entre as abordagens *in silico* e *in vitro* reforça a validade metodológica do estudo e fornece subsídios para futuras investigações *in vivo* voltadas à otimização estrutural e avaliação de segurança dos compostos sintetizados. Tais resultados permitem concluir que ambas as chalconas são promissoras como adjuvantes antimicrobianos, capazes de modular a resistência bacteriana mediada por efluxo.

5.3 PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS

As perspectivas para investigações futuras incluem a realização de ensaios *in vivo* em modelos animais de infecção por *Staphylococcus aureus*, com o objetivo de validar a eficácia antimicrobiana e a capacidade moduladora das chalconas sobre as bombas de efluxo NorA e MepA. Adicionalmente, recomenda-se a avaliação do perfil farmacocinético e toxicológico desses compostos por meio de estudos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção, bem como a aplicação de testes de citotoxicidade e genotoxicidade em linhagens celulares humanas para assegurar sua segurança biológica.

A otimização estrutural das chalconas também se mostra necessária, visando à obtenção de derivados com melhor solubilidade aquosa, menor lipofilicidade e manutenção da afinidade por alvos bacterianos, o que pode ser conduzido com base em abordagens de modelagem molecular, QSAR e dinâmica molecular. Ensaios complementares devem explorar o potencial sinérgico das chalconas em associação com diferentes classes de antibióticos, incluindo macrolídeos, tetraciclínas e β -lactâmicos, além da análise de seus efeitos sobre a formação e a integridade de biofilmes bacterianos.

Estudos de expressão gênica por RT-qPCR e simulações estruturais de alta resolução, como criomicroscopia eletrônica (cryo-EM), poderão elucidar com maior precisão os mecanismos moleculares envolvidos na inibição das bombas de efluxo. Propõe-se ainda expandir o espectro de investigação para outras espécies patogênicas portadoras de bombas homólogas, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecium*, bem como testar o desempenho das chalconas frente a cepas clínicas multirresistentes isoladas de ambientes hospitalares.

Por fim, estudos voltados ao desenvolvimento de nanoformulações e sistemas de liberação controlada poderão contribuir para aprimorar a estabilidade, a biodisponibilidade e o

potencial terapêutico dessas moléculas, abrindo caminho para futuras aplicações translacionais e a possibilidade de registro de propriedade intelectual.

- ALABDALI, Y. A. J.; AZEEZ, D. A.; MUNAHI, M. G.; KUWAIT, Z. I. Molecular Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates with Mutant *gyrA* Gene and Development of a New Ciprofloxacin Derivative for Antimicrobial Therapy. **Molecular Biotechnology**, p. 1–12, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S12033-024-01076-Y/METRICS>
- ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 73, n. 8, p. 2003–2020, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/JAC/DKY042>
- ALMATAR, M.; ALBARRI, O.; MAKKY, E. A.; KÖKSAL, F. Efflux pump inhibitors: new updates. **Pharmacological reports**: PR, v. 73, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S43440-020-00160-9>
- ALÓS, J.-I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, n. 10, p. 692–699, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- ARDAKANI, Z.; ARAGRANDE, M.; CANALI, M. Global antimicrobial use in livestock farming: an estimate for cattle, chickens, and pigs. **Animal**, v. 18, n. 2, p. 101060, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ANIMAL.2023.101060>
- ARGUDÍN, M. A. *et al.* Heavy metal and disinfectant resistance genes among livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 191, p. 88–95, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.06.004>
- ASMARE, Z.; AWOKE, T.; GENET, C.; ADMAS, A.; MELESE, A.; MULU, W. Incidence of catheter-associated urinary tract infections by Gram-negative bacilli and their ESBL and carbapenemase production in specialized hospitals of Bahir Dar, northwest Ethiopia. **Antimicrobial resistance and infection control**, v. 13, n. 1, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/S13756-024-01368-7>
- BARBOSA, C. R. dos S. *et al.* Evaluation of the antibacterial and inhibitory activity of the MepA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by riparins I, II, III, and IV. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 748, p. 109782, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2023.109782>
- BELANGER, C. R.; HANCOCK, R. E. W. Testing physiologically relevant conditions in minimal inhibitory concentration assays. **Nature Protocols** 2021 16:8, v. 16, n. 8, p. 3761–3774, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00572-8>
- BENTO, A. J. D. M.; ALMEIDA-NETO, F. W. de Q.; MARINHO, E. S.; DA SILVA, L.; MARINHO, M. M.; COUTINHO, H. D. M.; ROCHA, J. E.; GUEDES, J. M.; TEIXEIRA, A. M. R.; DOS SANTOS, H. S. Quantum-chemical calculation, antibiotic potentiating activity, evaluation of efflux pump inhibition against *S. aureus* multi-resistant strains and molecular docking of the drugs isoniazid and hydralazine. **Journal of Molecular Structure**, v. 1312, n. April, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.138474>

BEZERRA, A. H. *et al.* Effect of estragole over the RN4220 *Staphylococcus aureus* strain and its toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Life Sciences**, v. 264, n. September, p. 118675, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118675>

BHARDWAJ, A. K.; MOHANTY, P. Bacterial Efflux Pumps Involved in Multidrug Resistance and their Inhibitors: Rejuvenating the Antimicrobial Chemotherapy. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 7, n. 1, p. 73–89, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/157489112799829710>

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. Volume 10, p. 3237–3252, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S113556>

BLAIR, J. M. A.; PIDDOCK, L. J. V. How to measure export via bacterial multidrug resistance efflux pumps. **mBio**, v. 7, n. 4, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.00840-16>

BLANCO, P.; SANZ-GARCÍA, F.; HERNANDO-AMADO, S.; MARTÍNEZ, J. L.; ALCALDE-RICO, M. The development of efflux pump inhibitors to treat Gram-negative infections. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 13, n. 10, p. 919–931, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1514386>

BRAWLEY, D. N. *et al.* Structural basis for inhibition of the drug efflux pump NorA from *Staphylococcus aureus*. **Nature Chemical Biology**, v. 18, n. 7, p. 706–712, 2022 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41589-022-00994-9>

BUNDUKI, G. K.; MASOAMPHAMBE, E.; FOX, T.; MUSAYA, J.; MUSICHA, P.; FEASEY, N. Prevalence, risk factors, and antimicrobial resistance of endemic healthcare-associated infections in Africa: a systematic review and meta-analysis. **BMC infectious diseases**, v. 24, n. 1, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/S12879-024-09038-0>

BUSSETI, M. I. I.; MARGARA, L. M.; CASTELL, S. D.; FERNÁNDEZ, M. M.; MALCHIODI, E. L.; MONTICH, G. G.; MIGUEL, V.; ARGARAÑA, C. E.; MONTI, M. R. MutS recognition of mismatches within primed DNA replication intermediates. **DNA repair**, v. 119, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2022.103392>

BYRD, B. A.; ZENICK, B.; ROCHA-GRANADOS, M. C.; ENGLANDER, H. E.; HARE, P. J.; LAGREE, T. J.; DEMARCO, A. M.; MOK, W. W. K. The AcrAB-TolC Efflux Pump Impacts Persistence and Resistance Development in Stationary-Phase *Escherichia coli* following Delafloxacin Treatment. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 65, n. 8, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.00281-21>

CHAUDHARY, M.; TYAGI, K. a Review on Molecular *Docking* and Its Application. **International Journal of Advanced Research**, v. 12, n. 03, p. 1141–1153, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.21474/ijar01/18505>

CHE TRI, S. The culmination of multidrug-resistant efflux pumps vs. meager antibiotic arsenal era: Urgent need for an improved new generation of EPIs. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1149418, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1149418>

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution** 2019 88:1, v. 88, n. 1, p. 26–40, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00239-019-09914-3>

COELHO, M. L.; FERREIRA, J. H. L.; DE SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; KAATZ, G. W.; BARRETO, H. M.; DE CARVALHO MELO CAVALCANTE, A. A. Inhibition of the NorA multi-drug transporter by oxygenated monoterpenes. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 173–177, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.026>

COSTA, L. M. *et al.* Inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by synthetic riparins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 5, p. 1312–1322, 2016 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.13258>

COSTA, S. S.; SOBKOWIAK, B.; PARREIRA, R.; EDGEWORTH, J. D.; VIVEIROS, M.; CLARK, T. G.; COUTO, I. Genetic Diversity of norA, Coding for a Main Efflux Pump of *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. JAN, p. 1–11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00710>

DA SILVA, L.; GONÇALVES, C. A. C.; BEZERRA, A. H.; DOS SANTOS BARBOSA, C. R.; ROCHA, J. E.; DE MATOS, Y. M. L. S.; DE OLIVEIRA, L. C. C.; DOS SANTOS, H. S.; COUTINHO, H. D. M.; DA CUNHA, F. A. B. Molecular *docking* and antibacterial and antibiotic-modifying activities of synthetic chalcone (2E)-1-(3'-aminophenyl)-3-(4-dimethylaminophenyl)-prop-2-en-1-one in a MepA efflux pump-expressing *Staphylococcus aureus* strain. **Folia Microbiologica**, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12223-024-01221-9>

DA SILVA, P. T. *et al.* Synthesis, spectroscopic characterization and antibacterial evaluation by chalcones derived of acetophenone isolated from Croton anisodontus Müll.Arg. **Journal of Molecular Structure**, v. 1226, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129403>

DANTAS, N.; DE AQUINO, T. M.; DE ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; DA SILVA-JÚNIOR, E.; GOMES, E. A.; GOMES, A. A. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B. Aminoguanidine hydrazones (AGH's) as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that overexpress NorA efflux pump. **Chemico-Biological Interactions**, v. 280, n. September 2017, p. 8–14, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.009>

DASHTBANI-ROOZBEHANI, A.; BROWN, M. H. Efflux Pump Mediated Antimicrobial Resistance by *Staphylococci* in Health-Related Environments: Challenges and the Quest for Inhibition. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, p. 1502, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121502>

DE LAGARDE, M.; FAIRBROTHER, J. M.; ARCHAMBAULT, M.; DUFOUR, S.; FRANCOZ, D.; MASSÉ, J.; LARDÉ, H.; AENISHAENSLIN, C.; PARADIS, M. È.; ROY, J. P. Impact of a Regulation Restricting Critical Antimicrobial Usage on Prevalence of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates From Fecal and Manure Pit Samples on Dairy Farms in Québec, Canada. **Frontiers in veterinary science**, v. 9, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FVETS.2022.838498>

DE LIMA SILVA, M. G. *et al.* Antibacterial effect and evaluation of the inhibitory effect against efflux pump in *Staphylococcus aureus* by abietic acid: *in vitro* and *in silico* assays. **Process Biochemistry**, v. 122, n. P2, p. 363–372, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.10.010>

DE SOUSA JÚNIOR, D. L. *et al.* Evaluation of isoeugenol in inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps and their toxicity using *Drosophila melanogaster* model. **Life Sciences**, v. 285, n. August, 2021 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119940>

DEMARCO, C. E.; CUSHING, L. A.; FREMPONG-MANSO, E.; SEO, S. M.; JARAVAZA, T. A. A.; KAATZ, G. W. Efflux-Related Resistance to Norfloxacin, Dyes, and Biocides in Bloodstream Isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3235–3239, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.00430-07>

DENG, X.; SUN, F.; JI, Q.; LIANG, H.; MISSIAKAS, D.; LAN, L.; HE, C. Expression of Multidrug Resistance Efflux Pump Gene *norA* Is Iron Responsive in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 7, p. 1753–1762, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.06582-11>

DHANDA, G.; ACHARYA, Y.; HALDAR, J. Antibiotic Adjuvants: A Versatile Approach to Combat Antibiotic Resistance. **ACS Omega**, v. 8, n. 12, p. 10757–10783, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.3C00312/ASSET/IMAGES/LARGE/AO3C00312_0012.JPEG

DOS SANTOS, A. T. L. *et al.* Synthesis of chalcones and their antimicrobial and drug potentiating activities. **Microbial Pathogenesis**, v. 180, n. April, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106129>

DOS SANTOS BARBOSA, C. R. *et al.* Effect of Carvacrol and Thymol on NorA efflux pump inhibition in multidrug-resistant (MDR) *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, p. 1–10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10863-021-09906-3>

DU, D.; WANG-KAN, X.; NEUBERGER, A.; VAN VEEN, H. W.; POS, K. M.; PIDDOCK, L. J. V.; LUISI, B. F. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 523–539, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0048-6>

EL MEOUCHE, I.; DUNLOP, M. J. Heterogeneity in efflux pump expression predisposes antibiotic-resistant cells to mutation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 362, n. 6415, p. 686–690, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAR7981>

ERNST, R.; KUEPPERS, P.; STINDT, J.; KUCHLER, K.; SCHMITT, L. Multidrug efflux pumps: substrate selection in ATP-binding cassette multidrug efflux pumps--first come, first served? **The FEBS journal**, v. 277, n. 3, p. 540–549, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2009.07485.X>

FERREIRA, M. K. A.; FONTENELLE, R. O. S.; MAGALHÃES, F. E. A.; BANDEIRA, P. N.; DE MENEZES, J. S. E. A.; DOS SANTOS, H. S. Chalcones pharmacological potential: A brief review. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 5, p. 1455–1473, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180099>

FERREIRA, M.; LIMA, P.; AZEVEDO BORGES, M.; PARENTE, R. S.; CALDEIRA, R.; JÚNIOR, V.; EMÍLIA DE OLIVEIRA, M. *Staphylococcus aureus* E AS INFECÇÕES HOSPITALARES-REVISÃO DE LITERATURA *Staphylococcus aureus* AND NOSOCOMIAL INFECTIONS-LITERATURE REVIEW. **Uningá Review**, v. 21, n. 1, p. 32–39, 2015.

FIGUEREDO, F. G. *et al.* Inhibition of *Staphylococcus aureus* TetK and MsrA efflux pumps by hydroxyamines derived from lapachol and norlachel. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 53, n. 2, p. 149–156, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S10863-021-09885-5>

FREITAS, T. S. *et al.* *in vitro* and *in silico* studies of chalcones derived from natural acetophenone inhibitors of NorA and MepA multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 161, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105286>

FUTAMATA, R.; OGASAWARA, F.; ICHIKAWA, T.; KODAN, A.; KIMURA, Y.; KIOKA, N.; UEDA, K. How ATP is used by P-glycoprotein to export multiple hydrophobic compounds. **bioRxiv**, p. 641225, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/641225>

GERA, B.; GAUTAM, H.; RAZA, S.; MOHAPATRA, S.; SOOD, S.; DHAWAN, B.; KAPIL, A.; DAS, B. K. Detection of Aminoglycoside Modifying Enzyme (AME) genes in *Acinetobacter baumannii* isolates and the inhibitory effect of efflux pump activity on drug susceptibility pattern. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 47, p. 100493, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IJMMB.2023.100493>

GERRY, M.; KIRBY, D.; ALEXANDROV, B. S.; SEGAL, D.; ZILMAN, A. Specificity and tunability of efflux pumps: A new role for the proton gradient? **PLoS computational biology**, v. 21, n. 1, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1012772>

GULUMBE, B. H. *et al.* Antibiotic resistance and the COVID-19 pandemic: A dual crisis with complex challenges in LMICs. **Health science reports**, v. 6, n. 9, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/HSR2.1566>

HASSAN, K. A. *et al.* Pacing across the membrane: the novel PACE family of efflux pumps is widespread in Gram-negative pathogens. **Research in Microbiology**, v. 169, n. 7–8, p. 450–454, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.01.001>

HENDERSON, P. J. F.; MAHER, C.; ELBOURNE, L. D. H.; EIJKELKAMP, B. A.; PAULSEN, I. T.; HASSAN, K. A. Physiological Functions of Bacterial “multidrug” Efflux Pumps. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 9, p. 5417–5478, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.0C01226/SUPPL_FILE/CRO0C01226_SI_002.PDF

HO, C. S. *et al.* Antimicrobial resistance: a concise update. **The Lancet. Microbe**, v. 6, n. 1, p. 100947, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.LANMIC.2024.07.010/ATTACHMENT/8E466D11-C7F8-4242-966E-400B405A324B/MMC1.PDF>

HUET, A. A.; RAYGADA, J. L.; MENDIRATTA, K.; SEO, S. M.; KAATZ, G. W. Multidrug efflux pump overexpression in *Staphylococcus aureus* after single and multiple *in vitro* exposures to biocides and dyes. **Microbiology**, v. 154, n. 10, p. 3144–3153, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/021188-0>

JAVADPOUR, M. M.; JUBAN, M. M.; LO, W. C. J.; BISHOP, S. M.; ALBERTY, J. B.; COWELL, S. M.; BECKER, C. L.; MCLAUGHLIN, M. L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107–3113, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/JM9509410>

Ji, Y. *et al.* Potential of phage EF-N13 as an alternative treatment strategy for mastitis infections caused by multidrug-resistant *Enterococcus faecalis*. **Journal of dairy science**, v. 106, n. 12, p. 9174–9185, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/JDS.2022-22892>

JUMPER, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1276-1281.2006>

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 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1857-1864.2005>

KAATZ, G. W.; MOUDGAL, V. V.; SEO, S. M.; KRISTIANSEN, J. E. Phenothiazines and Thioxanthenes Inhibit Multidrug Efflux Pump Activity in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 719–726, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.719-726.2003>

KARNWAL, A.; JASSIM, A. Y.; MOHAMMED, A. A.; AL-TAWAHA, A. R. M. S.; SELVARAJ, M.; MALIK, T. Addressing the global challenge of bacterial drug resistance: insights, strategies, and future directions. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, p. 1517772, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FMICB.2025.1517772/PDF>

KHAN, N. A Narrative Review on Microbial Response to Antibiotic Stress: Mechanisms of Resistance and Adaptation. **Journal Of Clinical and Diagnostic Research**, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2025/75289.20485>

KOWALSKA-KROCHMAL, B.; DUDEK-WICHER, R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. **Pathogens** 2021, Vol. 10, Page 165, v. 10, n. 2, p. 165, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10020165>

KUMAR, S.; LEKSHMI, M.; PARVATHI, A.; OJHA, M.; WENZEL, N.; VARELA, M. F. Functional and Structural Roles of the Major Facilitator Superfamily Bacterial Multidrug Efflux Pumps. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 266, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020266>

KUMAR, V.; YASMEEN, N.; PANDEY, A.; AHMAD CHAUDHARY, A.; ALAWAM, A. S.; AHMAD RUDAYNI, H.; ISLAM, A.; LAKHAWAT, S. S.; SHARMA, P. K.; SHAHID, M. Antibiotic adjuvants: synergistic tool to combat multi-drug resistant pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1293633, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2023.1293633>

KUMAR VASAN, A.; HALOI, N.; ULRICH, R. J.; ELIZABETH, M. Investigation of gating in outer membrane porins provides new perspectives on antibiotic resistance mechanisms. **bioRxiv**, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2021.09.09.459668>

- KURODA, T.; TSUCHIYA, T. Multidrug efflux transporters in the MATE family. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 5, p. 763–768, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.012>
- LAMUT, A.; PETERLIN MAŠIČ, L.; KIKELJ, D.; TOMAŠIČ, T. Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, n. 6, p. 2460–2504, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/med.21591>
- LAWS, M.; SHAABAN, A.; RAHMAN, K. M. Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 5, p. 490–516, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUZ014>
- LI, J.; LI, Y.; KOIDE, A.; KUANG, H.; TORRES, V. J.; KOIDE, S.; WANG, D. N.; TRAASETH, N. J. Proton-coupled transport mechanism of the efflux pump NorA. **Nature communications**, v. 15, n. 1, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/S41467-024-48759-3>
- MACEDO, N. S. *et al.* Phytochemical prospection, evaluation of antibacterial activity and toxicity of extracts of *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 2, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103632>
- MARQUEZ, B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. **Biochimie**, v. 87, n. 12, p. 1137–1147, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.04.012>
- MCALEESE, F.; PETERSEN, P.; RUZIN, A.; DUNMAN, P. M.; MURPHY, E.; PROJAN, S. J.; BRADFORD, P. A. A Novel MATE Family Efflux Pump Contributes to the Reduced Susceptibility of Laboratory-Derived *Staphylococcus aureus* Mutants to Tigecycline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1865–1871, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1865-1871.2005>
- MELCHIORRI, D.; ROCKE, T.; ALM, R. A.; CAMERON, A. M.; GIGANTE, V. Addressing urgent priorities in antibiotic development: insights from WHO 2023 antibacterial clinical pipeline analyses. **The Lancet. Microbe**, v. 6, n. 3, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.LANMIC.2024.100992>
- MENDES, F. R. S. *et al.* GABAA and serotonergic receptors participation in anxiolytic effect of chalcones in adult zebrafish. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 41, n. 21, p. 12426–12444, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2167116>
- MENEZES DANTAS, D. de *et al.* Naringenin as potentiator of norfloxacin efficacy through inhibition of the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 203, p. 107504, 2025 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2025.107504>
- MONTVILLE, T. J.; BRUNO, M. E. C. Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. **International journal of food microbiology**, v. 24, n. 1–2, p. 53–74, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90106-6](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90106-6)
- MORITA, Y.; KODAMA, K.; SHIOTA, S.; MINE, T.; KATAOKA, A.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. NorM, a Putative Multidrug Efflux Protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and Its Homolog in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 7, p. 1778–1782, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.42.7.1778>

MUTEEB, G.; REHMAN, M. T.; SHAHWAN, M.; AATIF, M. Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review. **Pharmaceutics** 2023, Vol. 16, Page 1615, v. 16, n. 11, p. 1615, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/PH16111615>

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.05.004>

NISHINO, K.; YAMASAKI, S.; NAKASHIMA, R.; ZWAMA, M.; HAYASHI-NISHINO, M. Function and Inhibitory Mechanisms of Multidrug Efflux Pumps. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 737288, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.737288/BIBTEX>

NOLIVOS, S.; CAYRON, J.; DEDIEU, A.; PAGE, A.; DELOLME, F.; LESTERLIN, C. Role of AcrAB-TolC multidrug efflux pump in drug-resistance acquisition by plasmid transfer. **Science** (New York, N.Y.), v. 364, n. 6442, p. 778–782, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAV6390>

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. de M. *et al.* Valencene, Nootkatone and Their Liposomal Nanoformulations as Potential Inhibitors of NorA, Tet(K), MsrA, and MepA Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus* Strains. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 10, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15102400>

OMOTE, H.; HIASA, M.; MATSUMOTO, T.; OTSUKA, M.; MORIYAMA, Y. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 11, p. 587–593, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.09.001>

OMS. WHO bacterial priority pathogens list, 2024. [S. l.: s. n.].

PAL, M.; KERORSA, G. B.; MARAMI, L. M.; KANDI, V. Epidemiología, patogenicidad, infecciones animales, resistencia a los antibióticos, importancia para la salud pública y Impacto económico de *Staphylococcus aureus*: Una revisión completa. **American Journal of Public Health Research**, v. 8, n. 1, p. 14–21, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.12691/ajphr-8-1-3>

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17735-y>

PATIL, M. *et al.* Unlocking the Gates: A Novel Diagnostic Molecule for Quantifying Efflux Levels in Gram-Positive Bacteria. **Advanced Healthcare Materials**, p. 2404145, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ADHM.202404145>

PINHEIRO, P. G. *et al.* Ferulic acid derivatives inhibiting *Staphylococcus aureus* tetK and MsrA efflux pumps. **Biotechnology reports** (Amsterdam, Netherlands), v. 34, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2022.E00717>

POVOLO, V. R.; ACKERMANN, M. Disseminating antibiotic resistance during treatment. **Science** (New York, N.Y.), v. 364, n. 6442, p. 737–738, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAX6620>

RAHMAN, S.; ALI, T.; ALI, I.; KHAN, N. A.; HAN, B.; GAO, J. The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–14, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/9519718>

RAJPUT, P.; NAHAR, K. S.; RAHMAN, K. M. Evaluation of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram-Positive Bacteria. **Antibiotics** 2024, Vol. 13, Page 1197, v. 13, n. 12, p. 1197, 2024 b. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS13121197>

RAMPACCI, E.; FELICETTI, T.; CERNICCHI, G.; STEFANETTI, V.; SABATINI, S.; PASSAMONTI, F. Inhibition of *Staphylococcus pseudintermedius* Efflux Pumps by Using *Staphylococcus aureus* NorA Efflux Pump Inhibitors. **Antibiotics**, v. 12, n. 5, p. 806–806, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12050806>

RAMPIONI, G.; PILLAI, C. R.; LONGO, F.; BONDÌ, R.; BALDELLI, V.; MESSINA, M.; IMPERI, F.; VISCA, P.; LEONI, L. Effect of efflux pump inhibition on *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome and virulence. **Scientific Reports** 2017 7:1, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11892-9>

REZENDE-JÚNIOR, L. M. *et al.* Chalcones isolated from Arrabidaea brachypoda flowers as inhibitors of nora and mepa multidrug efflux pumps of *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 1–12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060351>

ROCHA, J. E. *et al.* Antibacterial and antibiotic modifying activity, ADMET study and molecular *docking* of synthetic chalcone (E)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-(2,4-dimethoxy-3-methylphenyl)prop-2-en-1-one in strains of *Staphylococcus aureus* carrying NorA and MepA efflux pumps. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 140, n. May, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111768>

ROCHA, J. E. *et al.* ADMET study, spectroscopic characterization and effect of synthetic nitro chalcone in combination with norfloxacin, ciprofloxacin, and ethidium bromide against *Staphylococcus aureus* efflux pumps. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 163–173, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/FCP.12830>

RODRIGUES DOS SANTOS BARBOSA, C. *et al.* Evaluation of the antibacterial and inhibitory activity of the MepA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by riparins I, II, III, and IV. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 748, p. 109782, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2023.109782>

RODRÍGUEZ-NORIEGA, E.; LEÓN-GARNICA, G.; PETERSEN-MORFÍN, S.; PÉREZ-GÓMEZ, H. R.; GONZÁLEZ-DÍAZ, E.; MORFÍN-OTERO, R. La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. **Biomédica**, v. 34, p. 181, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.2142>

SANGWAN, P. L.; KOUL, J. L.; KOUL, S.; REDDY, M. V.; THOTA, N.; KHAN, I. A.; KUMAR, A.; KALIA, N. P.; QAZI, G. N. Piperine analogs as potent *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 22, p. 9847–9857, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.09.042>

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, n. August, p. 104528, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104528>

SCHINDLER, B. D.; JACINTO, P.; KAATZ, G. W. Inhibition of Drug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: Current Status of Potentiating Existing Antibiotics. **Future Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 491–507, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb.13.16>

SCHINDLER, B. D.; SEO, S. M.; JACINTO, P. L.; KUMARASWAMI, M.; BIRUKOU, I.; BRENNAN, R. G.; KAATZ, G. W. Functional Consequences of Substitution Mutations in MepR, a Repressor of the *Staphylococcus aureus* mepA Multidrug Efflux Pump Gene. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 16, p. 3651–3662, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.00565-13>

SHARMA, A.; GUPTA, V. K.; PATHANIA, R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens. **Indian Journal of Medical Research**, v. 149, n. 2, p. 129–145, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_2079_17

SINHA, S.; AGGARWAL, S.; SINGH, D. V. Efflux pumps: gatekeepers of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* biofilms. **Microbial Cell**, v. 11, n. 1, p. 368–377, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.15698/mic2024.11.839>

SMITH, B. L.; FERNANDO, S.; KING, M. D. *Escherichia coli* resistance mechanism AcrAB-TolC efflux pump interactions with commonly used antibiotics: a molecular dynamics study. **Scientific Reports** 2024 14:1, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52536-z>

SPENGLER, G.; KINCSES, A.; GAJDÁCS, M.; 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. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules22030468>

SZABÓ, K.; WELKER, E.; BAKOS, É.; MÜLLER, M.; RONINSON, I.; VÁRADI, A.; SARKADI, B. Drug-stimulated Nucleotide Trapping in the Human Multidrug Transporter MDR1: COOPERATION OF THE NUCLEOTIDE BINDING DOMAINS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 17, p. 10132–10138, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/JBC.273.17.10132>

TEMPONE, A. G. *et al.* A new reduced chalcone-derivative affects the membrane permeability and electric potential of multidrug-resistant *Enterococcus faecalis*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 365, n. July, p. 110086, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110086>

THEURETZBACHER, U. The global resistance problem and the clinical antibacterial pipeline. **Nature Reviews Microbiology** 2025, p. 1–18, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-025-01169-8>

TINTINO, S. R. *et al.* Action of cholecalciferol and alpha-tocopherol on *staphylococcus aureus* efflux pumps. **EXCLI Journal**, v. 15, p. 315–322, 2016 a. Disponível em: <https://doi.org/10.17179/excli2016-277>

TINTINO, S. R. Avaliação da Inibição de Bombas de Efluxos em Linhagens de *Staphylococcus aureus* por Substâncias Sintéticas de Origem Natural. 2018. - **Universidade Federal do Pernambuco**, [s. l.], 2018.

TINTINO, S. R.; OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M.; CAMPINA, F. F.; SILVA, R. L. P.; COSTA, M. do S.; MENEZES, I. R. A.; CALIXTO-JÚNIOR, J. T.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; COUTINHO, H. D. M.; 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 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.04.003>

TOMBLINE, G.; BARTHOLOMEW, L. A.; URBATSCH, I. L.; SENIOR, A. E. Combined Mutation of Catalytic Glutamate Residues in the Two Nucleotide Binding Domains of P-glycoprotein Generates a Conformation That Binds ATP and ADP Tightly. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 30, p. 31212–31220, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/JBC.M404689200>

UBUKATA, K.; ITOH-YAMASHITA, N.; KONNO, M. Cloning and expression of the norA gene for fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, n. 9, p. 1535–1539, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.33.9.1535>

URBATSCH, I. L.; SANKARAN, B.; WEBER, J.; SENIOR, A. E. P-glycoprotein is stably inhibited by vanadate-induced trapping of nucleotide at a single catalytic site. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 33, p. 19383–19390, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/JBC.270.33.19383>

VARADI, M. *et al.* AlphaFold Protein Structure Database in 2024: **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. November 2023, p. D368–D375, 2024.

VEIKO, A. G.; OLCHOWIK-GRABAREK, E.; SEKOWSKI, S.; ROSZKOWSKA, A.; LAPSHINA, E. A.; DOBRZYNSKA, I.; ZAMARAEVA, M.; ZAVODNIK, I. B. Antimicrobial Activity of Quercetin, Naringenin and Catechin: Flavonoids Inhibit *Staphylococcus aureus*-Induced Hemolysis and Modify Membranes of Bacteria and Erythrocytes. **Molecules** 2023, Vol. 28, Page 1252, v. 28, n. 3, p. 1252, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28031252>

WAN, Y.; ZHENG, J.; CHAN, E. W. C.; CHEN, S. Proton motive force and antibiotic tolerance in bacteria. **Microbial biotechnology**, v. 17, n. 11, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.70042>

YANG, B.; TONG, Z.; SHI, J.; WANG, Z.; LIU, Y. Bacterial proton motive force as an unprecedented target to control antimicrobial resistance. **Medicinal Research Reviews**, v. 43, n. 4, p. 1068–1090, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/MED.21946>

YUEN, H. L.; CHAN, S. Y.; DING, Y. E.; LIM, S.; TAN, G. C.; KHO, C. L. Development of a Novel Antibacterial Peptide, PAM-5, via Combination of Phage Display Selection and Computer-Assisted Modification. **Biomolecules**, v. 13, n. 3, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/BIOM13030466>

ZACK, K. M.; SORENSON, T.; JOSHI, S. G. Types and Mechanisms of Efflux Pump Systems and the Potential of Efflux Pump Inhibitors in the Restoration of Antimicrobial Susceptibility,

with a Special Reference to *Acinetobacter baumannii*. **Pathogens**, v. 13, n. 3, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens13030197>

ZHANG, L.; TIAN, X.; SUN, L.; MI, K.; WANG, R.; GONG, F.; HUANG, L. Bacterial Efflux Pump Inhibitors Reduce Antibiotic Resistance. **Pharmaceutics** 2024, Vol. 16, Page 170, v. 16, n. 2, p. 170, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS16020170>

ZHANG, R. min *et al.* Dynamic human exposure to airborne bacteria-associated antibiotic resistomes revealed by longitudinal personal monitoring data. **The Science of the total environment**, v. 904, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.166799>

ZHANG, S.; WANG, J.; AHN, J. Advances in the Discovery of Efflux Pump Inhibitors as Novel Potentiators to Control Antimicrobial-Resistant Pathogens. **Antibiotics** 2023, Vol. 12, Page 1417, v. 12, n. 9, p. 1417, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12091417>

ZIMMERMANN, S.; KLINGER-STROBEL, M.; BOHNERT, J. A.; WENDLER, S.; RÖDEL, J.; PLETZ, M. W.; LÖFFLER, B.; TUCHSCHERR, L. Clinically Approved Drugs Inhibit the *Staphylococcus aureus* Multidrug NorA Efflux Pump and Reduce Biofilm Formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 492781, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02762/BIBTEX>

ZOAITER, M.; ZEAITER, Z.; MEDIANNIKOV, O.; SOKHNA, C.; FOURNIER, P. E. Carbonyl Cyanide 3-Chloro Phenyl Hydrazone (CCCP) Restores the Colistin Sensitivity in *Brucella intermedia*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2106, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/IJMS24032106/S1>

APÊNDICE A: Relatório completo da análise ADMET


Nc1cccc(C(=O)/C=C/c2ccc(Cl)cc2)c1

1. Physicochemical Property

Property	Value	Comment
Molecular Weight	257.06	Contain hydrogen atoms. Optimal:100~600
Volume	264.79	Van der Waals volume
Density	0.971	Density = MW / Volume
nHA	2.0	Number of hydrogen bond acceptors. Optimal:0~12
nHD	2.0	Number of hydrogen bond donors. Optimal:0~7
nRot	3.0	Number of rotatable bonds. Optimal:0~11
nRing	2.0	Number of rings. Optimal:0~6
MaxRing	6.0	Number of atoms in the biggest ring. Optimal:0~18
nHet	3.0	Number of heteroatoms. Optimal:1~15
fChar	0.0	Formal charge. Optimal:-4 ~4
nRig	14.0	Number of rigid bonds. Optimal:0~30
Flexibility	0.214	Flexibility = nRot /nRig
Stereo Centers	0.0	Stereo Centers. Optimal: ≤ 2
TPSA	43.09	Topological Polar Surface Area. Optimal:0~140
logS	-4.454	The logarithm of aqueous solubility value.
logP	3.199	The logarithm of the n-octanol/water distribution coefficients at pH=7.4.
logD	3.16	The logarithm of the n-octanol/water distribution coefficient.
pka (Acid)	9.758	Acid-base dissociation constant (pKa) value represents the strength of a drug molecule's acidity or basicity.
pka (Base)	3.568	Acid-base dissociation constant (pKa) value represents the strength of a drug molecule's acidity or basicity.
Melting point	124.286	The predicted melting point of a compound is expressed in degrees Celsius (°C). Melting points below 25°C are classified as liquids, while melting points above 25°C are classified as solids.
Boiling point	336.04	The predicted melting point of a compound is expressed in degrees Celsius (°C). A normal boiling point below 25°C is categorized as a gas.

2. Medicinal Chemistry

Property	Value	Decision	Comment
QED	0.516	●	■ A measure of drug-likeness based on the concept of desirability; ■ Attractive: > 0.67; ■ unattractive: 0.49–0.67; ■ too complex: < 0.34
GASA	0.0	●	■ ES: Easy to synthesize; HS: Hard to synthesize; ■ The output value represents the probability of being difficult to synthesize, ranging from 0 to 1.
Synth	1.0	●	■ Synthetic accessibility score is designed to estimate ease of synthesis of drug-like molecules. ■ SAScore ≥ 6, difficult to synthesize; SAScore < 6, easy to synthesize
Fsp3	0.0	●	■ The number of sp³ hybridized carbons / total carbon count, correlating with melting point and solubility. ■ Fsp³ ≥ 0.42 is considered a suitable value.
MCE-18	11.0	●	■ MCE-18 stands for medicinal chemistry evolution. ■ MCE-18 ≥ 45 is considered a suitable value.
NPscore	-0.575	-	■ Natural product-likeness score. ■ This score is typically in the range from -5 to 5. ■ The higher the score is, the higher the probability is that the molecule is a NP.
Lipinski Rule	0.0	●	■ MW ≤ 500; logP ≤ 5; Hacc ≤ 10; Hdon ≤ 5 ■ If two properties are out of range, a poor absorption or permeability is possible, one is acceptable.
Pfizer Rule	1.0	●	■ logP > 3; TPSA < 75 ■ Compounds with a high log P (>3) and low TPSA (<75) are likely to be toxic.
GSK Rule	0.0	●	■ MW ≤ 400; logP ≤ 4 ■ Compounds satisfying the GSK rule may have a more favorable ADMET profile
Golden Triangle	0.0	●	■ 200 ≤ MW ≤ 500; -2 ≤ logD ≤ 5 ■ Compounds satisfying the Golden Triangle rule may have a more favorable ADMET profile.
PAINS	0 alerts	-	frequent hitters, Alpha-screen artifacts and reactive compound 480 substructures (J Med Chem 201053:2719-40)
ALARM NMR	2 alerts	-	Thiol reactive compounds.
BMS	0 alerts	-	undesirable, reactive compounds 176 substructures (J Chem Inf Model 200646:1060-8)
Chelator Rule	0 alerts	-	Chelating compounds.

Colloidal aggregators	1.0	-	- Category 0: non-colloidal aggregators; - Category 1: colloidal aggregators. - The output value is the probability of being colloidal aggregators, within the range of 0 to 1.
FLuc inhibitors	1.0	●	- Category 0: non-fLuc inhibitors; - Category 1: fLuc inhibitors. - The output value is the probability of being fLuc inhibitors, within the range of 0 to 1.
Blue fluorescence	0.312	●	- Category 0: non-blue fluorescence; - Category 1: blue fluorescence. - The output value is the probability of being blue fluorescence, within the range of 0 to 1.
Green fluorescence	0.868	●	- Category 0: non-green fluorescence; - Category 1: green fluorescence. - The output value is the probability of being green fluorescence, within the range of 0 to 1.
Reactive compounds	0.902	●	- Category 0: non-reactive compound; - Category 1: reactive compound. - The output value is the probability of being reactive compound, within the range of 0 to 1.
Promiscuous compounds	0.302	●	- Category 0: non-promiscuous compound; - Category 1: promiscuous compound. - The output value is the probability of being promiscuous compound, within the range of 0 to 1.

3. Absorption

Property	Value	Decision	Comment
Caco-2 Permeability	-4.642	●	Optimal: higher than -5.15 Log unit
MDCK Permeability	-4.763	●	- low permeability: $< 2 \times 10^{-6}$ cm/s - medium permeability: $2-20 \times 10^{-6}$ cm/s - high passive permeability: $> 20 \times 10^{-6}$ cm/s
PAMPA	0.067	●	- The experimental data for Peff was logarithmically transformed (logPeff). - Molecules with log Peff values below 2.0 were classified as low-permeability (Category 0), while those with log Peff values exceeding 2.5 were classified as high-permeability (Category 1).
Pgp-inhibitor	0.978	●	- Category 1: Inhibitor; - Category 0: Non-inhibitor; - The output value is the probability of being Pgp-inhibitor
Pgp-substrate	0.004	●	- Category 1: substrate; - Category 0: Non-substrate; - The output value is the probability of being Pgp-substrate

HIA	0.0	●	■ Human Intestinal Absorption ■ Category 1: HIA+(HIA < 30%); ■ Category 0: HIA-(HIA >= 30%); ■ The output value is the probability of being HIA+
F _{20%}	0.014	●	■ 20% Bioavailability ■ Category 1: F 20% + (bioavailability < 20%); ■ Category 0: F 20% - (bioavailability ≥ 20%); ■ The output value is the probability of being F 20% +
F _{30%}	0.074	●	■ 30% Bioavailability ■ Category 1: F 30% + (bioavailability < 30%); ■ Category 0: F 30% - (bioavailability ≥ 30%); ■ The output value is the probability of being F 30% +
F _{50%}	0.132	●	■ 50% Bioavailability ■ Category 1: F 50% + (bioavailability < 50%); ■ Category 0: F 50% - (bioavailability ≥ 50%); ■ The output value is the probability of being F 50% +

4. Distribution

Property	Value	Decision	Comment
PPB	98.287	●	■ Plasma Protein Binding - Optimal: < 90%. ■ Drugs with high protein-bound may have a low therapeutic index.
VDss	-0.101	●	■ Volume Distribution - Optimal: 0.04-20L/kg
BBB	0.563	●	■ Blood-Brain Barrier Penetration ■ Category 1: BBB+; Category 0: BBB-; ■ The output value is the probability of being BBB+
Fu	1.317	●	■ The fraction unbound in plasms ■ Low: <5%; Middle: 5~20%; High: > 20%
OATP1B1 inhibitor	0.978	●	■ Category 0: Non-inhibitor; Category 1: inhibitor. ■ The output value is the probability of being inhibitor, within the range of 0 to 1.
OATP1B3 inhibitor	0.999	●	■ Category 0: Non-inhibitor; Category 1: inhibitor. ■ The output value is the probability of being inhibitor, within the range of 0 to 1.
BCRP inhibitor	0.048	●	■ Category 0: Non-inhibitor; Category 1: inhibitor. ■ The output value is the probability of being inhibitor, within the range of 0 to 1.
MRP1 inhibitor	0.005	●	■ Category 0: Non-inhibitor; Category 1: inhibitor. ■ The output value is the probability of being inhibitor, within the range of 0 to 1.

5. Metabolism

Property	Value	Decision	Comment
CYP1A2 inhibitor	1.0	●	- Category 1: Inhibitor; Category 0: Non-inhibitor; - The output value is the probability of being inhibitor.
CYP1A2 substrate	0.0	●	- Category 1: Substrate; Category 0: Non-substrate; - The output value is the probability of being substrate.
CYP2C19 inhibitor	1.0	●	- Category 1: Inhibitor; Category 0: Non-inhibitor; - The output value is the probability of being inhibitor.
CYP2C19 substrate	0.0	●	- Category 1: Substrate; Category 0: Non-substrate; - The output value is the probability of being substrate.
CYP2C9 inhibitor	1.0	●	- Category 1: Inhibitor; Category 0: Non-inhibitor; - The output value is the probability of being inhibitor.
CYP2C9 substrate	0.002	●	- Category 1: Substrate; Category 0: Non-substrate; - The output value is the probability of being substrate.
CYP2D6 inhibitor	0.96	●	- Category 1: Inhibitor; Category 0: Non-inhibitor; - The output value is the probability of being inhibitor.
CYP2D6 substrate	0.047	●	- Category 1: Substrate; Category 0: Non-substrate; - The output value is the probability of being substrate.
CYP3A4 inhibitor	0.141	●	- Category 1: Inhibitor; Category 0: Non-inhibitor; - The output value is the probability of being inhibitor.
CYP3A4 substrate	0.0	●	- Category 1: Substrate; Category 0: Non-substrate; - The output value is the probability of being substrate.
CYP2B6 inhibitor	1.0	●	- Category 1: Inhibitor; Category 0: Non-inhibitor; - The output value is the probability of being inhibitor.
CYP2B6 substrate	0.0	●	- Category 1: Substrate; Category 0: Non-substrate; - The output value is the probability of being substrate.
CYP2C8 inhibitor	1.0	●	- Category 1: Inhibitor; Category 0: Non-inhibitor; - The output value is the probability of being inhibitor.
HLM Stability	0.005	●	- human liver microsomal (HLM) stability - Category 0: stable+ (HLM > 30 min); Category 1: unstable- (HLM ≤ 30 min). The output value is the probability of human liver microsomal instability, where a value closer to 1 indicates a higher likelihood of instability. The range is between 0 and 1.

6. Excretion

Property	Value	Decision	Comment
CL _{plasma}	9.66	●	■ The unit of predicted CL_{plasma} penetration is ml/min/kg. >15 ml/min/kg: high clearance; 5-15 ml/min/kg: moderate clearance; < 5 ml/min/kg: low clearance.
T _{1/2}	0.649	●	■ The unit of predicted T_{1/2} is hours. ■ ultra-short half-life drugs: 1/2 < 1 hour; short half-life drugs: T_{1/2} between 1-4 hours; intermediate short half-life drugs: T_{1/2} between 4-8 hours; long half-life drugs: T_{1/2} > 8 hours.

7. Toxicity

Property	Value	Decision	Comment
hERG Blockers	0.372	●	■ Molecules with IC₅₀ ≤10μM or ≥50% inhibition at 10 μM were classified as hERG+ (Category 1), ■ while molecules with IC₅₀ >10μM or < 50% inhibition at 10μM were classified as hERG - (Category 0). ■ The output value is the probability of being hERG+, within the range of 0 to 1.
hERG Blockers (10um)	0.625	●	■ Molecules with IC₅₀ ≤10 μM are classified as hERG+ (Category 1), ■ and molecules with IC₅₀ > 10μM are classified as hERG- (Category 0). ■ The output value is the probability of being hERG+, within the range of 0 to 1.
DILI	0.742	●	■ Drug Induced Liver Injury. ■ Category 1: drugs with a high risk of DILI; ■ Category 0: drugs with no risk of DILI. ■ The output value is the probability of being toxic.
AMES Muta genicity	0.544	●	■ AMES Toxicity ■ Category 1: Ames positive(+); ■ Category 0: Ames negative(-); ■ The output value is the probability of being toxic.
Rat Oral Acute Toxicity	0.218	●	■ Rat Oral Acute Toxicity. ■ Category 0: low-toxicity, > 500 mg/kg; ■ Category 1: high-toxicity; < 500 mg/kg. ■ The output value is the probability of being toxic, within the range of 0 to 1.
FDAMDD	0.343	●	■ FDA Maximum (Recommended) Daily Dose. ■ Category 1: FDAMDD (+); ■ Category 0: FDAMDD (-); - The output value is the probability of being positive.
Skin Sensitization	0.88	●	■ Category 1: Sensitizer; ■ Category 0: Non-sensitizer. ■ The output value is the probability of being toxic, within the range of 0 to 1.

Carcinogenicity	0.33		- Category 1: carcinogens; - Category 0: non-carcinogens; - The output value is the probability of being toxic.
Eye Corrosion	0.109		- Eye Corrosion - Category 1: corrosives; - Category 0: noncorrosives; - The output value is the probability of being corrosives.
Eye Irritation	0.984		- Eye Irritation - Category 1: irritants; - Category 0: nonirritants; - The output value is the probability of being irritants.
Respiratory	0.689		- Category 1: respiratory toxicants; - Category 0: non-respiratory toxicants. - The output value is the probability of being toxic, within the range of 0 to 1.
Human Hepatotoxicity	0.514		- Human Hepatotoxicity - Category 1: H-HT positive(+); - Category 0: H-HT negative(-); - The output value is the probability of being toxic.
Drug-induced Nephrotoxicity	0.567		- Category 0: non-nephrotoxic (-); - Category 1: nephrotoxic (+). - The output value is the probability of being nephrotoxic (+), within the range of 0 to 1.
Ototoxicity	0.256		- Category 0: non-ototoxicity (-); - Category 1: ototoxicity (+). - The output value is the probability of being ototoxicity (+), within the range of 0 to 1.
Hematotoxicity	0.384		- Category 0: non-hematotoxicity (-); - Category 1: hematotoxicity (+). - The output value is the probability of being hematotoxicity (+), within the range of 0 to 1.
Genotoxicity	0.86		- Category 0: non-Genotoxicity (-); - Category 1: Genotoxicity (+). - The output value is the probability of being ototoxicity (+), within the range of 0 to 1.
RPMI-8226 Immunotoxicity	0.049		- Category 0: non-cytotoxicity (-); - Category 1: cytotoxicity (+). - The output value is the probability of being ototoxicity (+), within the range of 0 to 1.
A549 Cytotoxicity	0.168		- Category 0: non-cytotoxicity (-); - Category 1: cytotoxicity (+). - The output value is the probability of being ototoxicity (+), within the range of 0 to 1.
Hek293 Cytotoxicity	0.603		- Category 0: non-cytotoxicity (-); - Category 1: cytotoxicity (+). - The output value is the probability of being ototoxicity (+), within the range of 0 to 1.

Drug-induced Neurotoxicity	0.977		■ Category 0: non-neurotoxic (-); ■ Category 1: neurotoxic (+). ■ The output value is the probability of being neurotoxic (+), within the range of 0 to 1.
----------------------------	-------	---	--

8. Environmental toxicity

Property	Value	Comment
Bioconcentration Factors	1.465	■ Bioconcentration factors are used for considering secondary poisoning potential and assessing risks to human health via the food chain. ■ The unit is $-\log_{10}[(\text{mg/L})/(1000 \cdot \text{MW})]$
IGC ₅₀	4.281	■ Tetrahymena pyriformis 50 percent growth inhibition concentration. ■ The unit is $-\log_{10}[(\text{mg/L})/(1000 \cdot \text{MW})]$
LC ₅₀ FM	5.17	■ 96-hour fathead minnow 50 percent lethal concentration. ■ The unit is $-\log_{10}[(\text{mg/L})/(1000 \cdot \text{MW})]$
LC ₅₀ DM	5.686	■ 48-hour daphnia magna 50 percent lethal concentration. ■ The unit is $-\log_{10}[(\text{mg/L})/(1000 \cdot \text{MW})]$

9. Tox21 pathway

Property	Value	Decision	Comment
NR-AhR	0.25	●	■ Aryl hydrocarbon receptor ■ Category 1: actives ; ■ Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.
NR-AR	0.0	●	■ Androgen receptor ■ Category 1: actives ; ■ Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.
NR-AR-LBD	0.238	●	■ Androgen receptor ligand-binding domain ■ Category 1: actives ; ■ Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.
NR-Aromatase	0.041	●	■ Category 1: actives ; ■ Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.
NR-ER	0.958	●	■ Estrogen receptor ■ Category 1: actives ; ■ Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.
NR-ER-LBD	0.081	●	■ Estrogen receptor ligand-binding domain ■ Category 1: actives ; ■ Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.
NR-PPAR-gamma	0.029	●	■ Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ■ Category 1: actives ; ■ Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.
SR-ARE	0.969	●	■ Antioxidant response element ■ Category 1: actives ; ■ Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.

SR-ATAD5	0.56		■ ATPase family AAA domain-containing protein 5 ■ Category 1: actives ; ■ Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.
SR-HSE	0.667		■ Heat shock factor response element ■ Category 1: actives ; ■ Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.
SR-MMP	0.967		■ Mitochondrial membrane potential ■ Category 1: actives ; ■ Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.
SR-p53	0.933		■ p53, a tumor suppressor protein ■ Category 1: actives ; ■ Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.

10. Toxicophore Rules

Property	Value	Comment
Acute Toxicity Rule	0	■ 20 substructures; ■ acute toxicity during oral administration
Genotoxic Carcinogenicity Rule	6 alerts	■ 117 substructures; ■ carcinogenicity or mutagenicity
NonGenotoxic Carcinogenicity Rule	2 alerts	■ 23 substructures; ■ carcinogenicity through nongenotoxic mechanisms
Skin Sensitization Rule	4 alerts	■ 155 substructures; ■ skin irritation
Aquatic Toxicity Rule	3 alerts	■ 99 substructures; ■ toxicity to liquid(water)
NonBiodegradable Rule	1 alerts	■ 19 substructures; ■ non-biodegradable
SureChEMBL Rule	0	■ 164 substructures; ■ MedChem unfriendly status
FAF-Drugs4 Rule	2 alerts	154 toxic substructures from FAF-Drug4

ANEXO 1: Produções Científicas

Article

Evaluation of the Activity of Amino Chalcone Against *Staphylococcus* Strains Harboring Efflux Pumps

Isydório Alves Donato ¹, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa ¹, Antonio Henrique Bezerra ¹,
Sueleny Rodrigues Bezerra ¹, Ray Silva Almeida ², Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino ²,
Isaac Moura Araújo ³, Ewerton Yago de Sousa Rodrigues ¹, Maria Yasmin Cândido de Oliveira ¹,
Francisco Ferdinando Cajazeiras ³, Jayza Maria Lima Dias ³, Jesyka Macedo Guedes ³, Jéssica Hiade Silva Cristino ³,
Emmanuel Silva Marinho ⁴, Márcia Machado Marinho ⁴, Hélcio Silva dos Santos ³,
Henrique Douglas Melo Coutinho ², Saulo Relison Tintino ¹, Irwin Rose Alencar de Menezes ^{3,*}
and Francisco Assis Bezerra da Cunha ^{1,*}

- ¹ Laboratory of Semi- and Bioprospecting (LABSEMA), Regional University of Cariri (URCA), Crato 63105-000, CE, Brazil; isydorio.donato@urca.br (I.A.D.), cristina798@gmail.com (C.R.d.S.B.), henriquebezerra@urca.br (A.H.B.), sueleny@urca.br (S.R.B.), ewerton.sousa@urca.br (E.Y.d.S.R.), yasmin.oliveira@urca.br (M.Y.C.d.O.), saulo.tintino@urca.br (S.R.T.)
- ² Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Department of Chemical Biology, Regional University of Cariri (URCA), Crato 63105-000, CE, Brazil; ray.almeida@urca.br (R.S.A.), ciberemoris@hotmail.com (C.D.d.M.O.-T.), isaacmoura@urca.br (I.M.A.), hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M.C.)
- ³ Chemistry Program, Vale do Acaraú State University (UVA), Sobral 62090-370, CE, Brazil; ferdinandocajazeiras@gmail.com (P.F.C.), jayzadiaz48@gmail.com (J.M.L.D.), jesyka.mg@gmail.com (J.M.G.), jessica.hiade@urca.br (J.H.S.C.), helciodossantos@gmail.com (H.S.d.S.)
- ⁴ Graduate Program in Natural Sciences, State University of Ceará (UECE), Fortaleza 60714-905, CE, Brazil; emmanuel.marinho@uece.br (E.S.M.), marinho.marcia@gmail.com (M.M.M.)
- ⁵ Brazil National Institute of Science and Technology of the Health Economic-Industrial Complex (ICES), Laboratory of Pharmacology and Chemical Molecular, Department of Chemical Biology, Regional University of Cariri (URCA), Crato 63105-000, CE, Brazil
- * Correspondence: irwin.alencar@urca.br (I.R.A.d.M.), cunha.assis@gmail.com (F.A.B.d.C.); Tel.: +55-88-96829724 (I.R.A.d.M.)



Academic Editors: Michael Dostert, Maria Huerta-Reyes, Gil Alfredo Magno-Guerrero and Oscar Romero-Vázquez

Received: 22 September 2025

Revised: 19 October 2025

Accepted: 23 October 2025

Published: 28 October 2025

Citation: Donato, I.A.; Barbosa, C.R.d.S.; Bezerra, A.H.; Bezerra, S.R.; Almeida, R.S.; Oliveira-Tintino, C.D.d.M.; Araújo, I.M.; Rodrigues, E.Y.d.S.; Oliveira, M.Y.C.d.; Cajazeiras, F.F.; et al. Evaluation of the Activity of Amino Chalcone Against *Staphylococcus* Strains Harboring Efflux Pumps. *Pharmaceuticals* **2025**, *18*, 1629. <https://doi.org/10.3390/ph18111629>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract

Background/Objectives: The increasing prevalence of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* represents a major clinical challenge, primarily driven by the acquisition of multiple resistance mechanisms. Among these, efflux pumps such as NorA play a pivotal role in quinolone resistance by promoting active drug extrusion and reducing intracellular antibiotic levels. This study evaluated the synthetic chalcone CMA4DMA as a potential NorA efflux pump inhibitor and modulator of bacterial resistance. **Methods:** Antimicrobial susceptibility assays were conducted against *S. aureus* SA1199 (wild-type) and SA1199B (NorA-overexpressing) strains. The minimum inhibitory concentration (MIC) of CMA4DMA and its modulatory effects on norfloxacin and ethidium bromide were determined. Efflux inhibition was assessed by ethidium bromide accumulation and SYTOX Green assays. Molecular docking and in silico ADMET analyses were performed to predict binding affinity and pharmacokinetic parameters. **Results:** CMA4DMA exhibited no intrinsic antibacterial activity (MIC ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$) but reduced the MIC of norfloxacin from 32 to 8 $\mu\text{g/mL}$ and that of ethidium bromide from 32 to 8 $\mu\text{g/mL}$ in SA1199. In SA1199B, reductions from 64 to 16 $\mu\text{g/mL}$ and from 64 to 32 $\mu\text{g/mL}$ were observed, respectively. Fluorescence increased by 15% without affecting membrane integrity. Docking revealed a binding affinity of -7.504 kcal/mol, stronger than norfloxacin (-7.242 kcal/mol), involving key residues Leu218, Ile309, Arg310, and Ile313. ADMET data indicated high

intestinal absorption (88.76%) and permeability ($P_{app} = 1.38 \times 10^{-5}$ cm/s). **Conclusions:** CMADMA effectively restored norfloxacin susceptibility in resistant *S. aureus* strains, highlighting its potential as a promising scaffold for developing novel efflux pump inhibitors and antibiotic adjuvants.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; chalcone; bacterial resistance; efflux pump; docking; ADMET

1. Introduction

Antibiotic resistance constitutes one of the greatest contemporary challenges to public health, impacting infection-related mortality, prolonging the course of diseases, increasing treatment costs, and reducing social productivity. In addition, it compromises the effectiveness of medical interventions that rely on antimicrobials, such as prophylactic surgeries and chemotherapy [1–4]. The emergence of resistance largely results from the adaptive capacity of bacterial populations, intensified by the indiscriminate use of antibiotics, which favors the acquisition and dissemination of resistance mechanisms.

Among multidrug-resistant pathogens, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) stands out due to its high virulence, ability to evade immune responses, and increasing resistance to antimicrobials [5–8]. This versatile microorganism can cause anything from mild skin lesions to severe diseases such as sepsis, pneumonia, and toxic shock syndrome through the production of multiple virulence factors, including toxins, adhesion proteins, and immune evasion systems such as protein A, superantigenic toxins, and the agr quorum-sensing system [9].

Resistance in *S. aureus* arises both from spontaneous genetic mutations and from the acquisition of resistance genes via horizontal transfer. Mobile genetic elements such as plasmids, transposons, pathogenic islands (SaPIs), and staphylococcal chromosomal cassettes (SCCs) enable the rapid dissemination of resistance determinants [10]. Among the most important mechanisms are enzymatic inactivation of antibiotics, modification of molecular targets, reduced membrane permeability, and activation of efflux pumps [11–13]. Processes such as conjugation, natural transformation, and phage-mediated transduction contribute to the emergence of highly virulent and resistant strains.

Among these mechanisms, efflux pumps stand out as central resistance systems, promoting the active extrusion of antibiotics and other toxic compounds [14]. Studies indicate that the *S. aureus* genome encodes at least 31 multidrug efflux pumps distributed among the major transporter families [15]. The Major Facilitator Superfamily (MFS) has received particular attention, especially the NorA pump, responsible for the extrusion of fluoroquinolones and other drugs. Its function operates through a proton/drug antiport mechanism, which may be constitutively expressed or induced by exposure to antimicrobials [16–18].

Given the scarcity of new antimicrobials, alternative strategies have been explored, including the use of efflux pump inhibitors (EPIs) [19]. These compounds block drug extrusion, potentially reversing efflux-mediated resistance, reducing required doses, minimizing adverse effects, and restoring the efficacy of previously ineffective antibiotics [19–22]. EPIs can be natural or synthetic, and compounds derived from medicinal plants, such as chalcones, have shown promise due to their structural diversity and broad spectrum of biological activities [21,23].

The literature reports various efflux pump inhibitors (EPIs), both synthetic and natural, capable of restoring antibiotic effectiveness against resistant strains. Among the synthetic inhibitors, PAβN (phenylalanyl-arginyl-β-naphthylamide) is notable, functioning through competitive inhibition and gene regulation [24,25]. CCCP (carbonyl cyanide-m-

chlorophenylhydrazones), which disrupts ATP synthesis [26]; NMP (1-(1-naphthylmethyl)-piperazine), which hinders the proper assembly of pumps [27]; and MBX2319, a pyrazolopyridine derivative with proven activity against *E. coli* [28]. In the natural inhibitors group, silybin stands out for reducing the expression of *NorA* and *qacA/B* genes in *S. aureus* [29]; boeravinone B, which enhances ciprofloxacin's action [30]; curcumin, an inhibitor of the TetK pump [31]; berberine and columbamine, which interfere with ATP synthesis [32]; and reserpine, which binds directly to transport proteins [33]. Additionally, essential oils from *Origanum vulgare* and *Nigella sativa* have shown potential in modulating efflux gene expression and altering bacterial membrane permeability [34,35].

Although numerous natural and synthetic compounds have been described as efflux pump inhibitors, the search for effective, safe, and structurally versatile molecules still represents a significant challenge in combating bacterial resistance [22]. In this context, chalcones stand out for their broad spectrum of biological activities and their ability to modulate resistance mechanisms [36]. These molecules, widely distributed in flowers, leaves, fruits, and roots, can be obtained by chemical or semi-synthetic synthesis [37], exhibit low toxicity, a characteristic yellow coloration, and act as precursors of various bioactive compounds [38,39]. Studies indicate that chalcones display antioxidant, anti-inflammatory [40], antimicrobial [39], anticancer [38], and antiviral activities [41], in addition to enhancing antibiotic action and reducing virulence factors such as biofilm formation and toxin production [42–44].

However, investigations involving specific synthetic derivatives, such as the chalcone CMA4DMA, remain scarce. Thus, the present study aimed to evaluate the potential of the synthetic chalcone CMA4DMA as an inhibitor of the *NorA* efflux pump in *S. aureus* through an integrated in vitro and in silico approach, aiming to contribute to the development of new therapeutic strategies against resistant bacterial infections.

2. Results

2.1. In Vitro Antibacterial Activity

2.1.1. Evaluation of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Upon analyzing direct antibacterial activity, it was observed that the chalcone exhibited no direct activity in the in vitro minimum inhibitory concentration (MIC) assay, with values equal to or greater than 1024 µg/mL for all strains, which is considered irrelevant for advancing to clinical studies. Regarding the standard efflux pump inhibitor Carbonyl Cyanide M-Chlorophenyl Hydrazone (CCCP), MIC values of 8 µg/mL for strain 1199 and 16 µg/mL for strain 1199B were identified.

2.1.2. Efflux Pump Inhibition by Modulation of Antibiotic and Ethidium Bromide MIC

In the analysis of potential MIC changes in antibiotics and ethidium bromide in the wild-type 1199 strain, it was observed that the chalcone was able to reduce the MIC of both the antibiotic and ethidium bromide. The antibiotic MIC decreased from 32 µg/mL to 8 µg/mL, and when the activity of ethidium bromide was evaluated in combination with the adjuvant, a similar reduction from 32 µg/mL to 8 µg/mL was observed. The positive control also reduced the MIC from 32 µg/mL to 0.5 µg/mL in both associations, as shown in Figure 1 and Table 1.

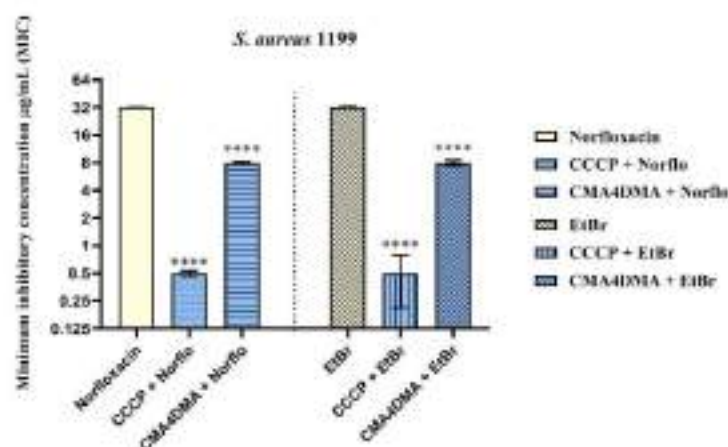


Figure 1. Evaluation of the ability to inhibit the NorA efflux pump by CMA4DMA against the *S. aureus* 1199 strain, in association with Norfloxacin and EtBr. Values represent the geometric mean $\pm$ SD (standard deviation). Analysis was performed using One-way ANOVA, followed by Tukey's test. **** = $p < 0.0001$ vs. control.

Regarding the MIC changes in the NorA-overexpressing 1199B strain, it was observed that the chalcone, as an adjuvant, was able to reduce the MIC of both the antibiotic and ethidium bromide: from 64 $\mu\text{g/mL}$ to 16 $\mu\text{g/mL}$ for the antibiotic and from 64 $\mu\text{g/mL}$ to 32 $\mu\text{g/mL}$ for ethidium bromide. The positive control CCCP reduced the MIC from 64 $\mu\text{g/mL}$ to 16 $\mu\text{g/mL}$ for both the antibiotic and ethidium bromide, as shown in Figure 2 and Table 1.

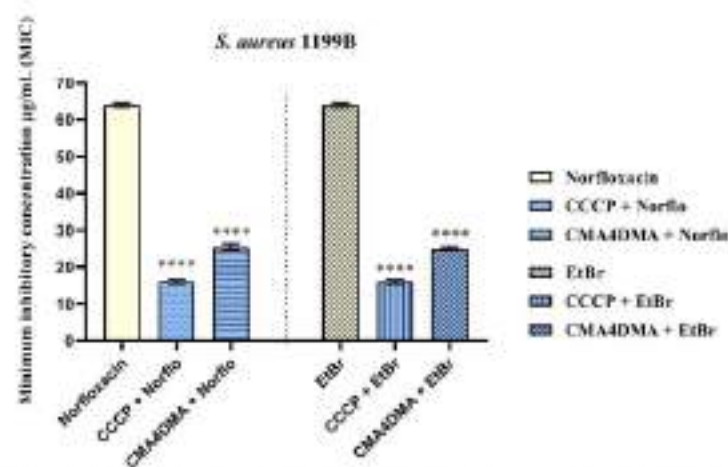


Figure 2. Evaluation of the ability to inhibit the NorA efflux pump by CMA4DMA against the *S. aureus* 1199B strain, in association with Norfloxacin and EtBr. Values represent the geometric mean $\pm$ SD (standard deviation). Analysis was performed using One-way ANOVA, followed by Tukey's test. **** = $p < 0.0001$ vs. control.

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) of Norfloxacin and EtBr alone and in combination with CMA4DMA and CCCP, against the *S. aureus* 1199 and 1199B strains. Values represent the geometric mean in µg/mL.

	<i>S. aureus</i> 1199	<i>S. aureus</i> 1199B
Norfloxacin	32 µg/mL ± 1	64 µg/mL ± 1
Norfloxacin + CCCP	0.5 µg/mL ± 1	16 µg/mL ± 1
Norfloxacin + CMA4DMA	8 µg/mL ± 1	25 µg/mL ± 1.5
EtBr	32 µg/mL ± 1	64 µg/mL ± 1
EtBr + CCCP	0.5 µg/mL ± 1	16 µg/mL ± 1
EtBr + CMA4DMA	8 µg/mL ± 1	25 µg/mL ± 1.5

2.1.3. Evaluation of NorA Efflux Pump Inhibition by Ethidium Bromide Fluorescence Measurement

In the assessment of ethidium bromide (EtBr) accumulation in *S. aureus* 1199B, CMA4DMA at 200 µg/mL caused a significant 15% increase in EtBr fluorescence compared to the negative control. A similar significant result was observed with the standard efflux pump inhibitor CCCP, which increased fluorescence by 21% in the 1199B strain (Figure 3; Table 2).

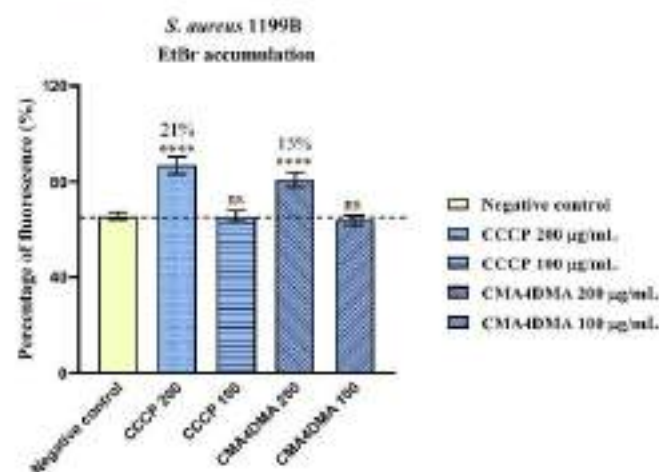


Figure 3. Evaluation of NorA efflux pump inhibition by CMA4DMA at 200 µg/mL and 100 µg/mL. Assessed by measuring EtBr fluorescence in *S. aureus* 1199B. Results are expressed as percentage of fluorescence. **** = $p < 0.0001$ vs. negative control; ns = not significant.

Table 2. Mean percentage of EtBr fluorescence for each group. The abbreviations a, b, and c indicate statistical differences between groups with $p < 0.05$.

Groups	Mean ± SD
Negative control	65.9 ± 1.5 ^a
CCCP 200 µg/mL	86.8 ± 3.6 ^b
CCCP 100 µg/mL	65.7 ± 2.3 ^a
CMA4DMA 200 µg/mL	80.8 ± 3 ^c
CMA4DMA 100 µg/mL	64 ± 2 ^a

2.1.4. Assessment of Increased Bacterial Membrane Permeability

It was observed that CMA4DMA at 200 µg/mL and 100 µg/mL did not increase SYTOX Green fluorescence intensity compared to the negative control in the tested strains, showing no statistically significant difference from the negative control. This indicates that the compound does not affect membrane permeability. The positive control, polymyxin B at 200 µg/mL and 100 µg/mL, significantly increased fluorescence intensity by 39% and 29% in *S. aureus* 1199B. Fluorescence measurements of SYTOX Green showed no statistically significant changes (Figure 4; Table 3).

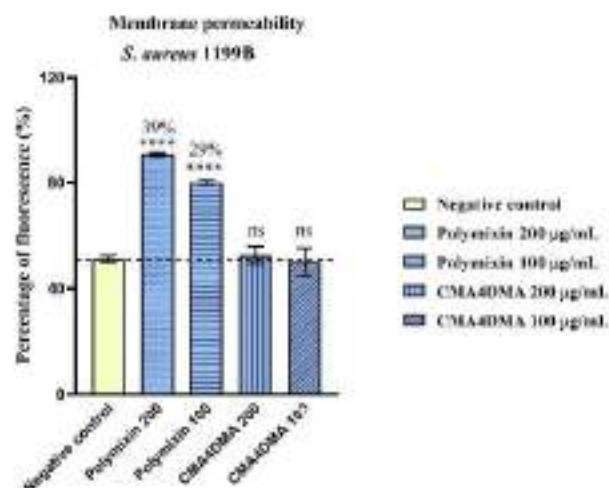


Figure 4. Evaluation of the action of CMA4DMA at 200 µg/mL and 100 µg/mL on the permeability of the bacterial membrane of *S. aureus* 1199B $p < 0.0001$ Vs. SYTOX Green. Results are expressed as mean fluorescence intensity. **** = $p < 0.0001$ vs. negative control; ns = not significant.

Table 3. Mean percentage of SYTOX Green fluorescence for each group. The abbreviations a, b, and c indicate statistical differences between groups.

Groups	Mean ± SD
Negative control	51.2 ± 4 ^a
Polymyxin 200 µg/mL	90.7 ± 2 ^b
Polymyxin 100 µg/mL	80.7 ± 3 ^c
CMA4DMA 200 µg/mL	52.4 ± 9 ^a
CMA4DMA 100 µg/mL	50.7 ± 5 ^a

2.2. Molecular Docking Analysis

As a case in point, the ligand–protein interactions formed between the Fab antigenic sequence and the NorA efflux pump residues were plotted (see Figure 5A). It was observed that the aromatic portions of the antigen formed a series of hydrophobic interactions with alkyl or aromatic side chain residues (Figure 5). Among these, it is possible to highlight the residues of Phe140, Ile244, Phe303 (Figure 5B), which are characterised as interaction residues of known substrates of the NorA efflux pump, such as norfloxacin [45]. These are fundamental residues in the identification of new inhibitors of NorA from strain 1199B [46].

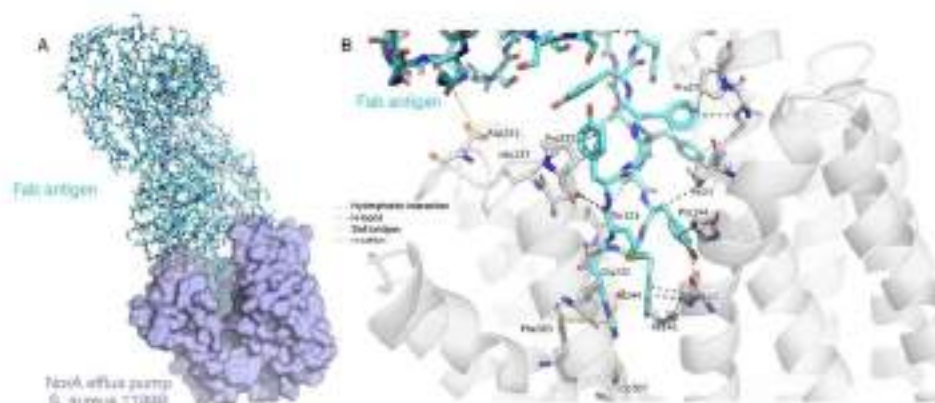


Figure 5. (A) Three-dimensional representation of the Fab antigen docking (cyan stick) in relation to the binding site of the NorA efflux pump *S. aureus* 1199B strain (purple surface), and (B) three-dimensional visualization of the Fab antigen docking (cyan stick) in the NorA transmembrane domain (gray cartoon) in relation to the active site residues (gray stick).

When analyzing the docking simulation poses relative to the NorA efflux pump of *S. aureus* 1199B, it was observed that the chalcone CMA4DMA bound within the domain where the FAB antigen is complexed, occupying the same binding cavity as the antibiotics Norfloxacin and Ciprofloxacin, designated as the NorA efflux pump binding domain (Figure 6A). The cavity of this domain has a predicted molecular surface area of 1260.43 Å² (Figure 6B), where a greater spatial distance from the CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone) control can be noted, corroborating the experimental analyses, in which CCCP reduced the inhibitory concentration of Norfloxacin and EtBr. At the end of the cycle of 20 independent docking poses, CMA4DMA complexed with the NorA efflux pump with a binding affinity (BA) of −7.504 kcal/mol, which was energetically more favorable than Norfloxacin, which exhibited a BA of −7.242 kcal/mol (Table 4). All selected best-poses performed within a favorable statistical threshold of RMSD <2.0 Å, ensuring reproducibility of the docking simulation protocol [47].

Table 4. Data from ligand–receptor interactions observed in molecular docking simulations between chalcone CMA4DMA and control ligands (Norfloxacin, Ciprofloxacin, EtBr, and CCCP) * against NorA efflux pumps.

Ligand	E _A (kcal/mol)	RMSD (Å)	Ligand–Receptor Interactions	
			Type	Residue (Distance in Å)
CMA4DMA	−7.504	0.118	Hydrophobic	Leu218 (3.50), Ile309 (3.22), Ile309 (3.86), Arg310 (3.43), Ile313 (3.57)
			H-bond	Thr211 (2.28)
Norfloxacin *	−7.242	0.497	Hydrophobic	Phe140 (3.61), Glu222 (3.94), Ile244 (3.60), Phe303 (3.51)
			H-bond	Glu222 (2.80), Asp307 (2.60)

Table 4. Cont.

Ligand	E_A (kcal/mol)	RMSD (Å)	Ligand–Receptor Interactions	
			Type	Residue (Distance in Å)
Ciprofloxacin *	−6.427	1.748	Hydrophobic	Glu222 (3.51), Ile240 (3.59), Ile244 (3.69), Ile244 (3.54)
			H-bond	Ser226 (2.77), Ser226 (2.35), Asp307 (3.04)
EtBr *	−8.363	0.966	Hydrophobic	Phe140 (3.81), Phe140 (3.59), Glu222 (3.88), Glu222 (3.88), Tyr225 (3.58), Ile244 (3.64), Phe303 (3.69)
			H-bond	Ser226 (3.46), Asp307 (2.24)
			π -stacking	Phe303 (4.74)
CCCP *	−6.879	1.409	Hydrophobic	Ile19 (3.83), Phe47 (3.97), Phe47 (3.65)
			H-bond	Gln51 (2.94), Asn340 (2.33)

Note: in bold, the common interactions that the control ligands showed in relation to the co-crystallized Pab25 are highlighted.

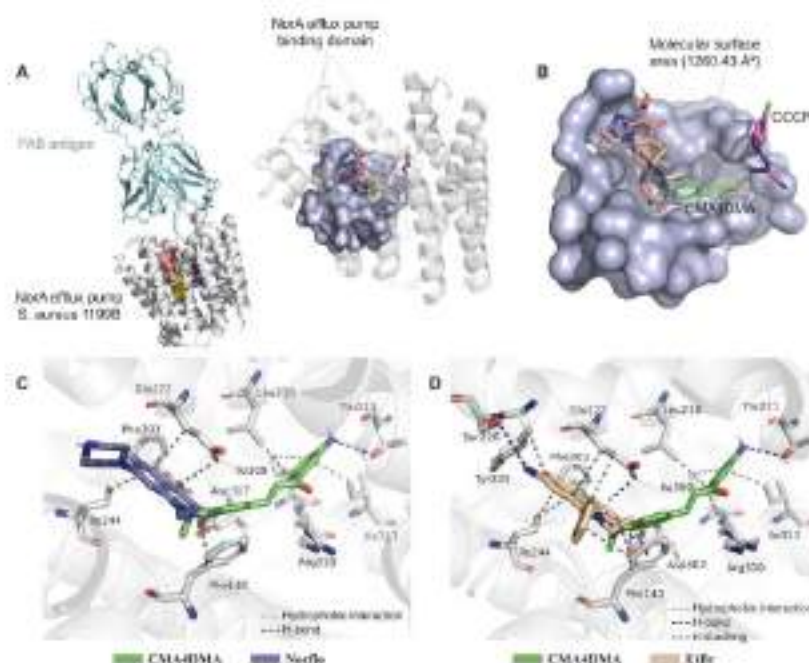


Figure 6. (A) Three-dimensional structure of the NorA efflux pump *S. aureus* 1199B (white) co-crystallized with the Fab antigen (cyan) and complexed with CMA4DMA chalcone, the antibiotics Norfloxacin and Ciprofloxacin, and EtBr and CCCP controls, highlighting the binding site (blue color). (B) Enlargement of the molecular surface area of the cavity predicted for the binding domain of the NorA efflux pump. (C) Three-dimensional visualization of the ligand–receptor interactions formed between the CMA4DMA ligands (green) and the antibiotic Norfloxacin (blue) and the residues of the binding domain of the NorA efflux pump. (D) Three-dimensional visualization of ligand–receptor interactions formed between CMA4DMA ligands (green) and EtBr control (orange) and residues of the NorA efflux pump binding domain.

Analysis of ligand–receptor interactions revealed that CMA4DMA (green) formed hydrophobic interactions with the alkyl portions of residues Leu218, Ile309, Arg310, and Ile313, whereas Norfloxacin (blue) tended to form hydrophobic interactions with aromatic residues, including Phe140 and Phe303, which are neighboring residues within the binding domain cavity (Figure 6C) [48]. When compared with EtBr (Figure 6D), distinct interactions were observed, although near CMA4DMA, formed between the control and aromatic residues (Phe140, Tyr225, and Phe303). It is noteworthy that a hydrogen bond interaction was formed between the NH_2 group of CMA4DMA and the polar portion of Thr211, where the calculated donor–acceptor distance of 2.28 Å indicates moderate-to-weak polar interactions ($2.5 < d[\text{Å}] \leq 3.1$), with a stronger binding compared to Norfloxacin ($d = 2.80 \text{ Å}$) [49].

2.3. In Silico ADMET Study

2.3.1. Cell Permeability Prediction

In the predictive ADMET analysis, effective cellular permeability (P_{app}) in Caco-2 cells showed a strong correlation with the calculated physicochemical parameters of lipophilicity ($\log P$) and aqueous solubility ($\log S$). For the predicted parameters, a statistical correlation of $r = 0.93$ was calculated, indicating a directly proportional relationship between Caco-2 P_{app} and $\log P$. The compound CMA4DMA occupied a physicochemical space statistically closer to the controls EtBr and CCCE, where $\log P_{app}$ indices increased from -5.2 when $\log P$ exceeded 2.0 (Figure 7A). This indicates compounds with low affinity for aqueous environments ($\log S \leq -3.0$) and high cellular permeability.

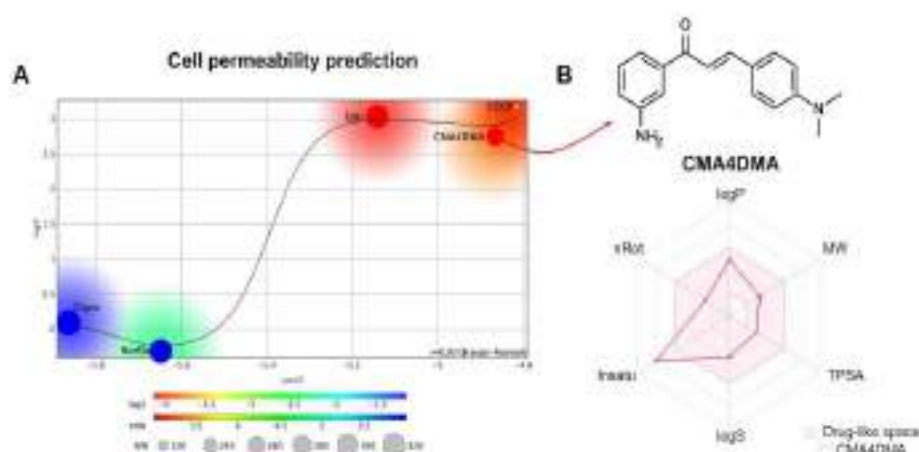


Figure 7. (A) Alignment between apparent permeability (P_{app}) in Caco-2 cells and $\log P$ and correlation with physicochemical descriptions of aqueous solubility ($\log S$), molecular weight (MW), and number of H-bond acceptors ($nHBA$), and (B) drug-like radar-like properties radar for the values calculated for CMA4DMA in relation to the thresholds of $\log P$ between -2.0 – 5.0 , MW between 200 – 500 g/mol , TPSA between 20 – 120 Å^2 , $\log S > -3.0$, unsaturation ($\text{Esp3} > 0.5$) and $nRot \leq 10$.

In the *drug-like space radar* (Figure 7B), the calculated $\log P$ of 2.74 positioned CMA4DMA within the ideal lipophilicity range according to Pfizer's biopharmaceutical classification system ($-2 < \log P \leq 5$). Moreover, its molecular weight of 328.4 g/mol fell within the appropriate drug-like range (200 – 500 g/mol) (Table 5). The TPSA value of 46.33 Å^2 , largely influenced by the NH_2 group, was within the optimal threshold for

improving pharmacokinetic properties and reducing in vivo toxicity risk (40–90 Å²). The QED score of 0.525 further supports the pharmacokinetic viability of the compound.

Table 5. Physical–chemical properties calculated for CMA4DMA and applied to the quantitative estimation of drug-likeness (QED) criterion ¹.

Property	Value	Optimal Range
logP	2.74	≤5.0
logS	−3.78	>−3.0
MW (g/mol)	266.14	200–500
TPSA (Å ²)	46.33	40–90
nHA	3	≤10
nHD	2	≤5
nRot	4	≤10
AROM	2	≤3
QED ²	0.525	-

Note: ¹ QED was estimated from Equation (1).

The predicted Papp value in Caco-2 cells was 1.38×10^{-5} cm/s, indicating higher intestinal permeability compared with Norfloxacin and Ciprofloxacin, which showed values below 1.0×10^{-5} cm/s (Table 6). In MDCK cells, predicted permeability values above 1.5×10^{-5} cm/s suggested that CMA4DMA, similarly to EtBr and CCCP, may present high permeability in more selective cell lines. The predicted probability of interaction with the efflux transporter P-gp indicated a low likelihood of CMA4DMA being a substrate, a characteristic associated with compounds of low polarity (TPSA ≤ 90 Å²). Regarding distribution, the predicted V_{dis} of 0.37 L/kg suggested that the compound may distribute relatively evenly between blood plasma and biological tissues. Plasma protein binding predictions indicated PPB >90%, likely due to the compound's low polarity and the hydrophobic nature of the molecule, favoring binding within the hydrophobic cavities of serum proteins.

Table 6. Predicted pharmacokinetic properties of CMA4DMA through the multiplatform ADMET prediction approach.

Property	CMA4DMA	Norfloxacin	Ciprofloxacin	EtBr	CCCP
P _{app} Caco-2 (cm/s)	1.38×10^{-5}	2.29×10^{-6}	1.38×10^{-6}	7.41×10^{-6}	1.54×10^{-5}
P _{app} MDCK (cm/s)	1.90×10^{-5}	6.76×10^{-6}	6.02×10^{-6}	1.86×10^{-5}	1.55×10^{-5}
P-gp (probability)	0.04	0.99	0.98	0.99	0.00
CL _{hepa} (μL/min/10 ⁶ cells)	76.50	12.81	2.90	55.67	64.28
CL _{micro} (mL/min/kg)	10.58	6.20	3.31	6.55	3.49
V _{dis} (L/kg)	0.37	0.21	0.26	0.74	−0.70
PPB (%)	94.31	20.36	25.51	83.13	97.99

2.3.2. Brain and Intestinal Permeation and Cardiotoxicity

In the molecular lipophilicity potential (MLP) map, the structural contributions that favor human intestinal absorption (HIA) and blood–brain barrier (BBB) permeability were identified. Surface analysis indicated that the NH₂ group of CMA4DMA is highly polar and exhibits a large solvent-accessible surface area (red spectrum), whereas the substituted aromatic rings concentrate most of the compound's lipophilic surface (blue spectrum), resulting in a calculated logP of 2.74, consistent with optimal affinity for lipophilic environments (Figure 8A).

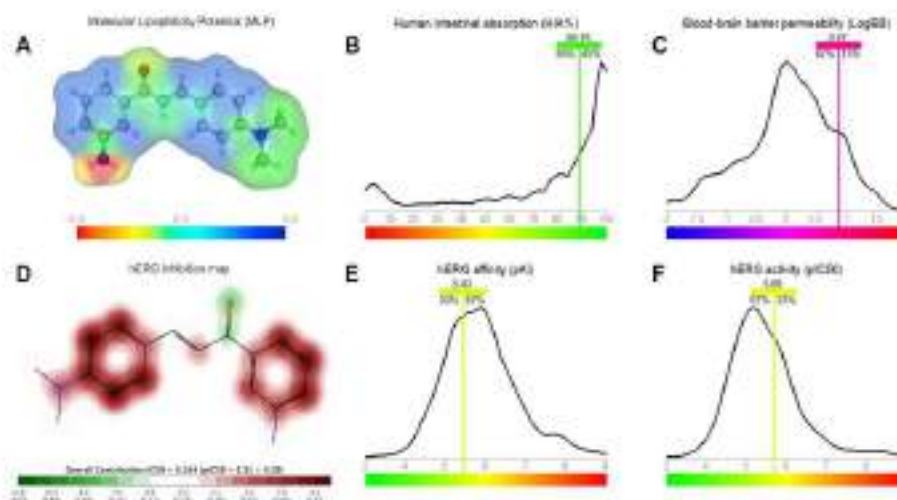


Figure 8. (A) Molecular lipophilicity potential (MLP) map, (B) human intestinal absorption (HIA) prediction, (C) Blood–brain barrier permeability (logBB) prediction, (D) 2D susceptibility map of inhibition of human Ether-a-go-go-Related Gene (hERG) K^+ -dependent channels, (E) hERG affinity expressed as inhibition potential (pKi), (F) hERG inhibition activity expressed as inhibitory concentration (pIC₅₀).

This property supports an estimated HIA of 88.76% (Figure 8B), as lipophilic compounds more readily permeate cell membranes and thus display enhanced absorption. The moderate-to-high lipophilicity ($\log P > 2.0$ – 3.0) also favors permeability in selective cell lines, such as MDCK cells, commonly applied in BBB permeability assays. In this context, the predicted logBB of 0.87 correlated with the predicted MDCK permeability (Table 6), aligning with data observed for at least 87% of CNS-active compounds in the ADMET-LMC database (Figure 8C).

Additionally, the lipophilic nature of the substituted aromatic rings was associated with potential inhibition of hERG (human Ether-a-go-go-Related Gene) channels. In silico prediction suggested that the α,β -unsaturated aromatic system contributes negatively to K^+ -dependent hERG channel inhibition, yielding an estimated IC₅₀ of 6.104 μ M and a pIC₅₀ of 5.21 ± 0.35 (Figure 8D). The data similarity test further predicted a potential inhibition pKi of 5.43 with 33% similarity to known hERG inhibitors (Figure 8E) and a predicted pIC₅₀ of 5.69 with 67% similarity to compounds documented as hERG inhibitors in the ADMET-LMC database (Figure 8F).

2.3.3. Site of Metabolism and Rat Acute Toxicity

Prediction of the metabolic site indicated that CMA4DMA contains an $-N(CH_2)_2$ group, which contributes negatively (red color spectrum) to first-pass metabolism. This site was identified as an N-dealkylation site mediated by major CYP450 isoforms, including CYP2D6, CYP2C9, and CYP3A4 (Figure 9A). Such biotransformation may generate unstable aldehydes and free radicals capable of interacting with macromolecules such as DNA, potentially leading to hepatotoxic effects [50]. The data similarity test confirmed that this is a structurally specific metabolic site within acceptable similarity thresholds (Figure 9B) [51]. Predicted first-pass kinetics suggested a hepatic clearance (CL_{Hepa}) of 76.50 μ L/min/ 10^6 cells, indicating that CMA4DMA could be more rapidly metabolized by hepatocytes than Norfloxacin and Ciprofloxacin, which exhibited CL_{Hepa} values below

15 $\mu\text{L}/\text{min}/10^6$ cells, consistent with greater metabolic stability and oral bioavailability (Table 6) [52].

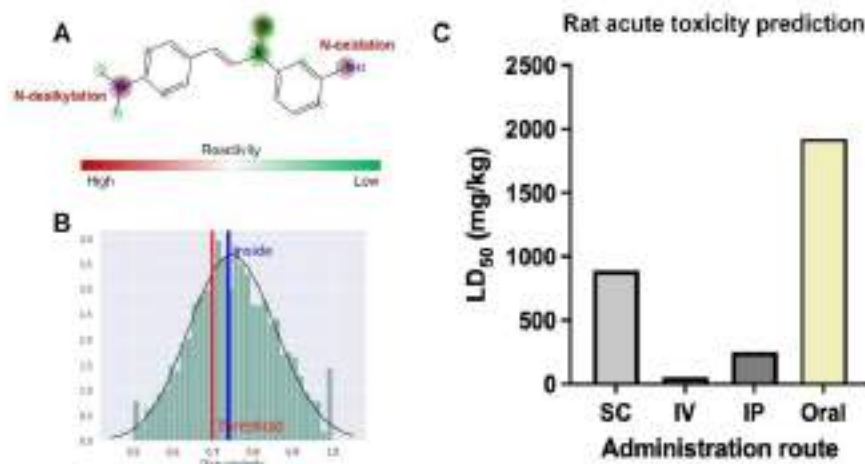


Figure 9. (A) 2D reactivity map and prediction of the metabolism site of the chalcone CMA4DMA, (B) similarity spectrum of data in relation to reactive fragments deposited in the 5topTox training set, and (C) prediction of lethal dose (LD₅₀) in rats for different administration routes: oral, IP—intraperitoneal, IV—intravenous, and SC—subcutaneous.

At the microsomal level, predicted clearance values (CL_{Micro}) indicated that Norfloxacin and Ciprofloxacin are metabolically more stable (≤ 8.0 mL/min/kg) compared with CMA4DMA, which showed a predicted CL_{Micro} of 10.98 mL/min/kg, reflecting relative metabolic instability and faster first-pass excretion of the chalcone (Table 6) [53]. Toxicity predictions in rats revealed an oral LD₅₀ of 1924 mg/kg, slightly below the general safety threshold (LD₅₀ > 2000 mg/kg), suggesting possible toxicity due to metabolic activation (Figure 9C) [54]. For parenteral routes, the predicted LD₅₀ values were <500 mg/kg for intraperitoneal (IP) and intravenous (IV) administration, indicating greater systemic toxicity when first-pass metabolism is bypassed. For subcutaneous administration, the predicted LD₅₀ of approximately 893.7 mg/kg suggested that this route could be feasible, particularly for topical or localized infection therapies (Figure 9C).

3. Discussion

The lack of a relevant MIC does not entirely disqualify a substance for potential application in other studies against microorganisms, particularly when considering its possible use as an antibiotic adjuvant. In the case of efflux pump inhibitors, the absence of direct activity may even enhance their applicability, as previously noted in the literature [55].

Restoring the activity of antibiotics or other antibacterial agents through adjuvants is one of the main strategies currently employed to control strains harboring multiple mechanisms of resistance to antibacterial drugs or other bactericidal agents [56]. This is particularly relevant because the discovery of new effective antibiotics is increasingly rare. Furthermore, even when a new antibiotic is discovered, the likelihood that its indiscriminate use will lead to bacterial resistance is high [57]. Various methods exist to assess the ability of substances to restore antibiotic activity and, consequently, to identify the bacterial resistance mechanisms involved. Reduction in the minimum inhibitory concentration is one of the first analyses performed to indicate the restoration of antibiotic activity, typically using

sub-inhibitory concentrations of the test substances in combination with an antibiotic or another antibacterial agent [58].

In the present study, as shown in Figure 1, CMA4DMA at sub-inhibitory concentrations was able to restore antibiotic activity by reducing the MIC, and the same effect was observed in combination with ethidium bromide. In the case of ethidium bromide, the MIC reduction is indicative of efflux pump inhibition, which is reinforced by the action of the positive control, the efflux pump inhibitor CCCP. It is also noteworthy that the SA1199 strain is a NorA efflux pump carrier with basal expression, and the observed MIC reduction in this strain may indicate inhibition of basal NorA pump expression, as illustrated in Figure 1 [59].

The SA1199B strain is widely described in the literature for its high resistance to norfloxacin and other quinolones [16,60]. Resistance to this class of antibiotics in *S. aureus* can occur via efflux pumps or by modifications in topoisomerase, the primary target of quinolones [61]. MIC reduction in this strain, as observed in SA1199, may be associated with inhibition of previously described resistance mechanisms. The SA1199B strain over-expresses the NorA pump, and the decrease in MIC against certain antibiotics strongly suggests inhibition of this transporter, particularly when its expression is high in the bacterial cell membrane. To rule out interference from other mechanisms, it is common practice to evaluate MIC reduction in ethidium bromide, a characteristic substrate of NorA, alongside the effect of CCCP as a reference efflux pump inhibitor. Thus, the results presented in Figure 2 suggest that CMA4DMA has potential as a NorA pump inhibitor.

Studies with natural chalcones isolated from *Arrabidaea brachypoda* [62] and synthetic chalcones [63] have shown that, similarly to CMA4DMA, chalcones exhibit no direct antibacterial activity but significantly reduce the MIC of norfloxacin in SA1199B strains and of ethidium bromide, indicating NorA pump inhibition. Docking experiments confirmed ligand overlap with the norfloxacin binding site in NorA. These results are particularly similar to those observed with CMA4DMA, where the amino group on the phenolic ring contributed positively to MIC reduction in NorA-harboring strains [62,63].

In addition to the studies mentioned, the same chalcone used in the present work was investigated against *S. aureus* strains K4100, carrying QacC and β -lactamases [64], carrying MepA [65]. No intrinsic activity (MIC ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$) was observed in either study. In the K4100 strain, CMA4DMA did not inhibit β -lactamase but significantly reduced the MIC of EtBr from 64 to 32 $\mu\text{g/mL}$. In the previously mentioned study against strain K2068, significant MIC reductions for ciprofloxacin and ethidium bromide were observed. Docking studies confirmed that the chalcone can bind to the same site occupied by the standard chlorpromazine inhibitor, interacting with key protein residues, which supports its potential as a MepA inhibitor, as it may in [65].

These studies complement and validate the results obtained in the present work, demonstrating that CMA4DMA consistently reduces efflux-mediated resistance in different *S. aureus* genetic backgrounds (NorA, MepA, and QacC), consolidating it as a promising antibacterial adjuvant candidate.

According to Figure 3, the increase in fluorescence due to greater intracellular ethidium bromide accumulation corroborates the MIC reduction results, supporting efflux pump inhibition. CMA4DMA was able to promote increased intracellular EtBr, making it more available to intercalate with bacterial DNA as a consequence of efflux pump inhibition, which normally extrudes the compound from the cell [66].

Studies of intracellular bromide accumulation using CMA4DMA in *S. aureus* 1199B are nonexistent, but there are studies with other chalcones that show inhibition of the efflux pump with increased fluorescence due to ethidium bromide accumulation, as in the study by [67], which evaluated a library of 117 chalcones for inhibitory activity of the NorA pump mediated by EtBr efflux. Furthermore, the study by [68] evaluated the action

of chalcone derivatives capable of increasing EtBr accumulation in *S. aureus* by inhibiting efflux pumps. Therefore, these two studies corroborate the present study by demonstrating the ability of chalcones to increase the amount of intracellular bromide, related to efflux protein inhibition.

Therefore, according to Figure 4, the chalcone CMA4DMA did not alter membrane permeability, and thus its effect cannot be attributed to indirect efflux pump inhibition via changes in membrane fluidity. Although indirect inhibition through membrane alteration is one mode of action for compounds targeting efflux pumps, direct interaction with the pump is more common [69,70]. Exceptions exist, such as in the study by [71], where menadiione was shown to act both directly on the efflux pump and indirectly on the plasma membrane, the latter also potentially disabling the pump. It is likely that CMA4DMA acts at a binding site on the NorA protein, as suggested by molecular docking studies.

The docking results indicate that CMA4DMA can effectively bind to the same NorA efflux pump domain where fluoroquinolone antibiotics such as Norfloxacin and Ciprofloxacin interact. The more favorable binding affinity of CMA4DMA compared to Norfloxacin suggests a higher energetic stability of this interaction, reinforcing its potential as a modulator of efflux activity. The affinity energy of CMA4DMA is higher (i.e., has a more negative value) when compared to natural compounds that bind to NorA and have the potential to inhibit strain 1199B. These potential increases as values decrease from <-5.0 kcal/mol [45,72].

The hydrophobic interactions of CMA4DMA with aliphatic residues (Leu218, Ile309, Arg310, and Ile313), distinct from the predominantly aromatic interactions observed for Norfloxacin and EtBr, reveal that CMA4DMA occupies the cavity in a differentiated binding mode. This divergence may favor synergistic effects with antibiotics, as the compound could alter the conformational dynamics of the binding pocket. This phenomenon has also been observed in molecular docking studies associated with strain 1199B inhibition [45], where NorA ligand candidates can act synergistically with other known substrates, such as Norfloxacin.

Molecular recognition was applied in the analysis of molecular docking simulations, where it was possible to observe that the hydrophobic nature of chalcone would affect the van der Waals dispersive forces in hydrophobic interactions with the protein. The results demonstrate the significant contribution of the aromatic rings of the ligand in establishing hydrophobic interactions with the alkyl portion of the residues Leu218, Ile309, and Ile313, thereby establishing a privileged scaffold that facilitates the selection of lead compounds that inhibit the NorA efflux pump [48,73].

The hydrogen bonding observed between CMA4DMA and Thr211 further strengthens the binding profile, as the shorter donor-acceptor distance indicates more stable polar interactions compared to those of Norfloxacin. Importantly, the spatial distance of CMA4DMA relative to the CCCP control corroborates experimental findings, where CCCP potentiated the activity of Norfloxacin and EtBr, suggesting a mechanistic overlap in efflux pump inhibition. The residue has been found to be associated with the binding of known NorA substrates, such as levofloxacin, within the hydrophobic cavity of the efflux pump [74].

Taken together, these findings support the hypothesis that CMA4DMA has a potential inhibitory effect on the NorA efflux pump, which may be potentiated in the presence of antibiotics. This interaction pattern highlights CMA4DMA as a promising candidate for further studies aimed at efflux pump modulation and antibiotic resistance reversal.

The predictive ADMET results indicate that CMA4DMA possesses physicochemical properties compatible with high cellular permeability, an attribute strongly correlated with lipophilicity (logP). Its placement in the drug-like space *namely*—within the thresholds of logP, MW, and TPSA—reinforces the compound's alignment with drug-like oral properties.

The predicted Papp value in Caco-2 cells, superior to that of the reference antibiotics Norfloxacin and Ciprofloxacin, suggests that CMA4DMA may exhibit higher intestinal absorption and, consequently, improved oral bioavailability. Additionally, the prediction of high permeability in MDCK cells and the low probability of being a P-gp substrate strengthen the perspective of efficient intracellular accumulation, favoring its antimicrobial potential.

The predicted Vdss, within the acceptable range, indicates that the compound may achieve a suitable balance between plasma and tissue distribution, minimizing the risk of excessive accumulation in specific compartments. The high level of plasma protein binding (>90%), although typical of low-polarity lipophilic molecules, may influence the free fraction available to exert pharmacological activity. Nonetheless, this feature may also contribute to plasma stability and prolonged circulation time. Overall, the ADMET analysis suggests that CMA4DMA combines favorable permeability, distribution, and pharmacokinetic viability, presenting advantages over comparative antibiotics in terms of absorption and cellular transport.

The MLP map and ADMET predictions suggest that the structural balance between polar and lipophilic regions in CMA4DMA is a key determinant of its pharmacokinetic profile. The predominance of lipophilic aromatic rings combined with a single polar NH₂ donor provides the compound with an optimal logP value of 2.74, which is associated with both high intestinal absorption and efficient membrane permeation. The predicted HIA of nearly 89% strongly supports the potential of CMA4DMA for oral administration, as lipophilicity is a critical determinant of absorption efficiency.

The predicted logBB and MDCK permeability values indicate that CMA4DMA may cross the BBB, displaying distribution patterns consistent with a large proportion of CNS-active compounds. While this property could support antimicrobial efficacy in tissues with selective barriers, it also raises concerns regarding potential off-target CNS effects.

A key safety consideration is the compound's predicted interaction with hERG channels. The α,β -unsaturated aromatic system contributes to moderate hERG inhibition potential, with IC₅₀ and pIC₅₀ values suggesting partial blockade of K⁺ channels. The data similarity to known hERG inhibitors (33–67%) highlights a moderate but significant risk for cardiotoxicity, particularly in scenarios of chronic exposure. These predictions emphasize the need for further experimental validation, as inhibition of hERG channels is strongly associated with arrhythmias and other cardiac disorders. Together, these findings indicate that CMA4DMA displays a favorable absorption and distribution profile, but its potential to interact with cardiac ion channels warrants caution and targeted safety evaluation.

The metabolic prediction highlights the $-N(CH_3)_2$ group of CMA4DMA as a major liability, acting as a specific site for N-dealkylation mediated by CYP450 isoforms. While this pathway contributes to clearance, it also poses a potential safety risk due to the possible generation of reactive intermediates such as aldehydes and free radicals, which could contribute to hepatotoxicity. This aligns with the observed moderate oral LD₅₀, which falls just below the threshold of non-toxic compounds, suggesting a risk of toxicity linked to metabolic activation.

Compared with Norfloxacin and Ciprofloxacin, CMA4DMA appears to be less metabolically stable, as reflected by its higher predicted hepatic and microsomal clearance values. This reduced metabolic stability implies lower oral bioavailability, as the compound would be more extensively metabolized during first-pass hepatic processing.

The predicted LD₅₀ values across different administration routes emphasize the role of first-pass metabolism in mitigating systemic toxicity. While oral administration may partially protect against systemic adverse effects, bypassing hepatic metabolism through intravenous or intraperitoneal administration results in greater predicted toxicity. Interest-

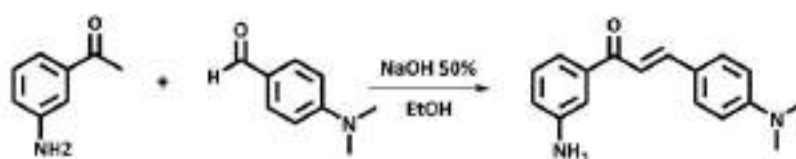
ingly, the subcutaneous route showed an intermediate LD₅₀, suggesting potential viability for localized or topical applications, where systemic exposure could be minimized.

Taken together, these predictions suggest that although CMA4DMA has promising pharmacological attributes, its metabolic liability and associated toxicity risks require careful consideration. Optimization of structural features to reduce CYP-mediated N-dealkylation, or the exploration of alternative administration routes, may be essential for improving its therapeutic potential.

4. Materials and Methods

4.1. Chemical Synthesis

The chalcone CMA4DMA was synthesized through a Claisen-Schmidt condensation reaction under basic conditions, using 3-aminoacetophenone and 4-(dimethylamino)benzaldehyde [64]. The synthetic pathway is illustrated in Scheme 1, while the chemical structure of CMA4DMA is presented in Figure 10.



Scheme 1. Synthesis of the amino chalcone.

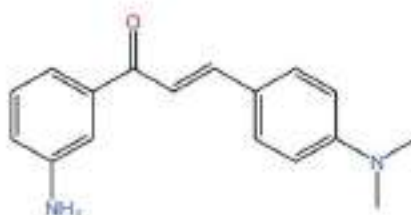


Figure 10. Structure of chalcone (2E)-1-(3'-aminophenyl)-3-(4-dimethylaminophenyl)-prop-2-en-1-one (CMA4DMA).

4.2. Molecular Docking of NorA and CMA4DMA

For the theoretical investigation of the antimicrobial effect against *S. aureus*, the protein model of the NorA efflux pump from the 1199B strain was obtained from the RCSB Protein Data Bank repository (<https://www.rcsb.org/>), deposited under PDB ID 7LO7. This structure is classified as a transporter protein expressed in *E. coli*, with its three-dimensional conformation resolved by electron microscopy at a 3.74 Å resolution. For protein preparation prior to molecular docking simulations, AutoDockTools™ version 1.5.7 (<https://autodocktools.scripps.edu/ad1/>) was used to add hydrogen atoms, compute Gasteiger charges, and adjust the grid-box parameters. The grid-box was configured to cover the entire conformational space of the protein, with dimensions $x = 54$, $y = 58$, and $z = 62$, centered at $x = 137.578$, $y = 138.065$, and $z = 156.646$. Subsequently, AutoDock Vina™ (<https://vina.scripps.edu/>) was set to perform 50 independent simulations of 20 poses each, for all ligands optimized using the Merck Molecular Force Field method (MMFF94s) in Avogadro 2 (<https://two.avogadro.cc/>). The validation criteria for the optimal pose of molecular docking simulations include low Root Mean Square Deviation (RMSD ≤ 2.0 Å) and low affinity energy (Rate ≤ -6.0 kcal/mol), with the binding pose of the characterised antibiotics norfloxacin and ciprofloxacin serving as a control [75].

4.3. *In Silico* ADMET Study

For the analysis of absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADMET) properties, a predictive protocol based on the quantitative estimate of drug-likeness (QED) was applied, as shown in Equation (1):

$$QED = \exp\left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \ln d_i\right) \quad (1)$$

where n is the number of physicochemical properties (i) calculated, and d is the desirability function, which considers the thresholds defined as follows: molecular weight (MW) ≤ 500 g/mol, lipophilicity ($\log P$) ≤ 5 , hydrogen bond donors (HBD) ≤ 5 , hydrogen bond acceptors (HBA) ≤ 5 , topological polar surface area (TPSA) ≤ 140 Å², rotatable bonds (nRot) ≤ 10 , aromatic rings ≤ 3 , and structural alerts ≤ 1 ($n = 8$). The summation yields a score ranging from 0.0 (poor drug-likeness) to 1.0 (optimal drug-likeness) [76]. The alignment of these descriptors was analyzed according to Lipinski's rules [77], the Pfizer rule [78], the Golden Triangle rule [79], and the GlaxoSmithKline (GSK) rule.

For the prediction of pharmacokinetic descriptors, the following servers were used: ADMETlab 3.0 (<https://admetlab3.acbddd.com/>), ADMET-AI (<https://admet.ai/greystonebio.com/>), ADMET-LMC (<http://qsar.chem.msu.ru/admet/>), Pred-HERG (<https://predherg.lalimol.com.br/>), and SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>). The properties analyzed included effective cellular permeability (Papp), human intestinal absorption (HIA), blood–brain barrier (BBB) permeability, hepatic clearance (CL_{Hepa}), volume of distribution (V_{dis}), and cardiotoxicity via human Ether-à-go-go-Related Gene (hERG) inhibition.

For the prediction of metabolic sites, the servers SMARTCyp (https://smartcyp.sund.ku.dk/mol_to_scm), FAME 3 (<https://nersd.univie.ac.at/fame3>), and StopTox (<https://stoptox.mml.unc.edu/>) were employed. The analysis of fragments susceptible to cytochrome P450 (CYP450)-dependent metabolism was correlated with the prediction of lethal dose (LD50) in rats using the GUSAR Online server (<https://www.way2drug.com/gusar/>).

4.4. *In Vitro* Antibacterial Activity

4.4.1. Bacterial Strains

In this study, the *S. aureus* strains SA-1199 (wild-type) and SA-1199B were used. The SA-1199B strain overexpresses the NorA efflux protein, which is associated with resistance to fluoroquinolone-class substrates, such as norfloxacin.

The strains were kindly provided by Prof. S. Gibbons (University of London, Malet St, Bloomsbury, London WC1E 7HU, UK) and Prof. G. W. Kaatz (Wayne State University School of Medicine, Detroit, MI, USA) and maintained on blood agar (Difco Laboratories Ltd., São Paulo, Brazil). The strains are preserved by cryopreservation at -80 °C in glycerol solution at the Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Regional University of Cariri (URCA). For experimental preparation, the strains were cultured for 24 h at 37 °C in brain-heart infusion agar (BHI Agar, Acumedia Manufacturers Inc., Lansing, Michigan).

4.4.2. Culture Media

The culture media used for the microbiological assays were as follows: Brain Heart Infusion Agar (BHI Agar, Acumedia Manufacturers Inc.), prepared according to the manufacturer's instructions, and Brain Heart Infusion (BHI, Acumedia Manufacturers Inc.) prepared at a 10% concentration.

4.4.3. Substances

The antibiotics (norfloxacin and ciprofloxacin) and the chalcone CMA4DMA were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and sterile water, with the DMSO proportion kept below 5%. Ethidium bromide (EtBr) was dissolved in sterile distilled water, while carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) was dissolved in methanol/water (1:1, v/v). All substances were prepared at a standard concentration of 1024 µg/mL.

4.4.4. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The MIC of the chalcone CMA4DMA was determined according to the broth microdilution method described by [80], with modifications. The strains used in the assays were cultured 24 h prior to the experiments. After this period, the bacterial inoculum was suspended in saline solution corresponding to 0.5 McFarland standard, approximately 1.5×10^8 CFU/mL. Subsequently, microtubes were filled with 900 µL of BHI and 100 µL of the inoculum, and the plates were loaded with 100 µL of the final solution. Microdilution was performed with 100 µL of CMA4DMA in serial dilutions up to the penultimate well of the plate (1:1), with the last well used as a growth control. Compound concentrations ranged from 512 µg/mL to 8.0 µg/mL. After 24 h of incubation, readings were performed by adding 20 µL of resazurin (7-hydroxy-10-oxido-phenoxazin-10-ium-3-one). Resazurin is oxidized in the presence of acidic medium caused by bacterial growth, inducing a color change from blue to pink [81]. The MIC was defined as the lowest concentration at which no visible growth was observed [82]. All assays were performed in triplicate in a laminar flow hood.

4.4.5. Evaluation of Efflux Pump Inhibition by Modification of the Antibiotic and Ethidium Bromide MIC

To investigate whether the chalcone CMA4DMA acts as a potential NorA efflux pump inhibitor, a comparative study was conducted between the effects of standard pump inhibitors, evaluating their ability to reduce the MIC of EtBr and antibiotics. The standard inhibitor CCCP was used to validate NorA pump expression in the tested strain. Efflux pump inhibition was tested using sub-inhibitory concentrations (MIC/8) of both the inhibitors and the chalcone. In the assays, 150 µL of each bacterial inoculum, suspended in saline solution corresponding to 0.5 McFarland standard (approximately 1.5×10^8 CFU/mL), was added together with the inhibitors and the chalcone (MIC/8) and completed with BHI. Subsequently, the mixtures were transferred to 96-well microdilution plates, to which 100 µL of antibiotic or EtBr in serial dilutions (1:1) ranging from 512 to 0.5 µg/mL were added. Plates were incubated at 37 °C for 24 h, and bacterial growth was assessed using resazurin (7-hydroxy-10-oxido-phenoxazin-10-ium-3-one). Resazurin is oxidized in the presence of acidic medium resulting from bacterial growth, inducing a color change from blue to pink [81]. The MIC was defined as the lowest concentration at which no visible growth was observed [82]. MICs of the controls were determined using plates containing only antibiotics or EtBr. All tests were performed in triplicate in a laminar flow hood.

4.4.6. NorA Efflux Pump Inhibitory Activity Assessed by Increased EtBr Fluorescence Emission

For this assay, the *S. aureus* 1199B strain expressing the NorA efflux pump was used. Strains were streaked on Mueller Hinton agar 24 h prior to the experiment and maintained in a bacteriological incubator at 37 °C. The inoculum was prepared in phosphate-buffered saline (PBS) to a 0.5 McFarland standard and distributed into black 96-well plates. In the test groups, CMA4DMA was added at final concentrations of 200 and 100 µg/mL. The negative control consisted of PBS prepared under the same dilution conditions as the test substance, followed by the addition of bacteria. The positive control consisted

of CCCP at 200 µg/mL and 100 µg/mL. Plates were incubated for 1 h, after which EtBr (2 µg/mL) was added to all wells. The plates were then incubated again and fluorescence was measured using a Cytation 1 microplate reader (BioTek®, Winooski, VT, USA) with Gen5™ 3.11 software. Excitation was set at 530 nm and emission at 590 nm [80].

4.4.7. Assessment of Bacterial Membrane Permeability Using SYTOX Green Fluorescence Assay

For this assay, the DNA-intercalating dye SYTOX Green was used. The bacterial inoculum of *S. aureus* 1199B was prepared and distributed into black 96-well plates. CMA4DMA was added at final concentrations of 200 and 100 µg/mL. Polymyxin B was used as positive control at 200 and 100 µg/mL, while phosphate-buffered saline (PBS) served as the negative control. Plates were incubated for 1 h. Subsequently, 100 µL of SYTOX Green at a final concentration of 1 µM was added. Plates were incubated for an additional hour, and fluorescence was measured using a Cytation 1 microplate reader (BioTek®, Winooski, VT, USA) with Gen5™ 3.11 software. Excitation and emission wavelengths were set at 485 nm and 528 nm, respectively. All assays were performed in triplicate [83].

4.4.8. Statistical Analysis

The results were analyzed using one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test. Microbiological results for MIC reduction were expressed as geometric mean ± SD, while results from efflux pump inhibition mechanism assays were expressed as arithmetic mean ± SD. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. GraphPad Prism 5.0 software was used for all analyses. All assays were performed in triplicate.

5. Conclusions

This research demonstrated, *in vitro* assays, that the chalcone CMA4DMA, although devoid of direct antibacterial activity (MIC ≥ 1024 µg/mL), significantly enhanced the action of norfloxacin and ethidium bromide in *S. aureus* strains carrying the NorA efflux pump. This potentiation was evidenced by reduced MIC values and increased intracellular EtBr fluorescence, without compromising bacterial membrane integrity. These experimental findings corroborate the *in silico* analyses, which revealed a strong interaction of CMA4DMA with the NorA binding site, supporting its role as a direct efflux pump inhibitor. Supported by the fact that the compound CMA4DMA showed a more stable binding to the NorA efflux pump of *S. aureus* 1199B (BA = −7.504 kcal/mol) than Norfloxacin, occupying the same binding site. Hydrophobic interactions and a hydrogen bond with Thr211 indicate higher affinity and inhibitory potential toward NorA. Additionally, CMA4DMA demonstrated optimal lipophilicity (logP = 2.74) and permeability (Papp = 1.38×10^{-5} cm/s), indicating strong intestinal absorption and drug-like properties. However, its moderate metabolic instability and predicted hepatotoxic potential suggest caution regarding systemic exposure and first-pass metabolism. Thus, the combination of computational and microbiological data reinforces the potential of CMA4DMA as an antimicrobial adjuvant to restore antibiotic efficacy against resistant strains, although additional studies on pharmacokinetics, toxicity, and preclinical models are required to confirm its therapeutic feasibility. In the future, we expect to carry out new *in vivo* and *in vitro* tests to corroborate the role of CMA4DMA as an inhibitor of the efflux pump mechanism, highlighting its role as an antibiotic adjuvant.

Author Contributions: Conceptualization, all authors; methodology, all authors; formal analysis, I.A.D. and S.R.T.; investigation, I.A.D., C.R.d.S.B., A.H.B., E.S.M., E.Y.d.S.R., M.Y.C.d.O., R.S.A., I.M.A., E.F.C., J.M.C. and M.M.M.; resources, H.S.d.S., H.D.M.C., S.R.B. and F.A.B.d.C.; data curation, I.A.D., C.D.d.M.O.-T., A.H.B., S.R.B., J.H.S.C. and J.M.L.D.; writing—original draft preparation, I.A.D.,

C.D.d.M.O.-T., H.S.d.S. and E.S.M.; writing—review and editing, I.A.D. and S.R.T.; visualization, I.A.D. and S.R.T.; supervision, I.R.A.d.M., S.R.T. and F.A.B.d.C.; project administration, I.R.A.d.M., I.A.D., S.R.T. and F.A.B.d.C.; funding acquisition, H.S.d.S., H.D.M.C., S.R.T. and F.A.B.d.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was financed in part by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—Brasil-CNPq (to F.A.B.d.C.: process: 306008/2022-0, 303164/2022-0 and 405394/2023-3; I.R.A.d.M.: process 303940/2022-0, 441128/2023-8, 404780/2021-0 and 303438/2021-5), Fundação Coariense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico—FUNCAP UNIVERSAL (process: UNI-0210-00337.01.00/23), FUNCAP-INTERNACIONALIZAÇÃO (process: ITR-0214-00060.01.00/23), PDCTR (CNPq/FUNCAP) (process: DCT-0162-00048.02.00/21 and 04879791/2022) and FUNCAP (process: BPS-0197-00174.01.00/22 and FPD-0213-00369.01.00/23).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data is available from the authors upon reasonable request.

Acknowledgments: The authors thank Fundação Coariense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Funcap), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support and scholarship. The authors thank Northeastern Center for the Application and Use of Nuclear Magnetic Resonance (CENAUREMN), National Institute of Science and Technology of the Health Economic-Industrial Complex (ICEIS) for their financial support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

ADMET	Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity
CCCP	Carbonyl Cyanide M-Chlorophenyl Hydrazone
CMA4DMA	chalcone (2E)-1-(3'-aminophenyl)-3-(4-dimethylaminophenyl)-prop-2-en-1-one
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EA	Affinity Energy
EtBr	Ethidium Bromide
HBD	Hydrogen Bond Donor
HLA	Human Intestinal Absorption
MFS	Major Facilitator Superfamily
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MLP	Molecular Lipophilicity Potential
MW	Molecular Weight
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PPB	High Plasma Protein Binding
RMSD	Root Mean Square Deviation
TPSA	Topological Polar Surface Area

References

1. Chinemerem Nwobodo, D.; Ugwu, M.C.; Olibeloke Anie, C.; Al-Osagili, M.T.S.; Chinedu Ikem, J.; Victor Chigozie, U.; Saki, M. Antibiotic Resistance: The Challenges and Some Emerging Strategies for Tackling a Global Menace. *J. Clin. Lab. Anal.* **2022**, *36*, e24655. [\[CrossRef\]](#)
2. Lazar, V.; Oprea, E.; Ditu, L.M. Resistance, Tolerance, Virulence and Bacterial Pathogen Fitness—Current State and Envisioned Solutions for the Near Future. *Pathogens* **2023**, *12*, 746. [\[CrossRef\]](#)
3. Tahmasebi, H.; Arjmand, N.; Monemi, M.; Baharizad, A.; Alibabaei, F.; Alibabaei, N.; Babar, A.; Olesnych, V.; Edami, M. From Cure to Crisis: Understanding the Evolution of Antibiotic-Resistant Bacteria in Human Microbiota. *Biomolecules* **2023**, *15*, 93. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

4. Muteeb, G.; Rehman, M.T.; Shahwan, M.; Aatif, M. Origins of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 1615. [\[CrossRef\]](#)
5. Chisung, G.; Bai, J.; Otto, M. Pathogenicity and Virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence* **2021**, *12*, 547–569. [\[CrossRef\]](#)
6. Gajdics, M. The Continuing Threat of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics* **2019**, *8*, 52. [\[CrossRef\]](#)
7. Horswill, A.; Jenu, C. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiol. Spectr.* **2019**, *7*, 10–1128. [\[CrossRef\]](#)
8. Horswill, A.; Kwiecinski, J. *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections: Pathogenesis and Regulatory Mechanisms. *Curr. Opin. Microbiol.* **2020**, *53*, 51–60. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Enany, S.; Alexander, L.C. *The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus*; IntechOpen: London, UK, 2017.
10. Chen, J.; Ram, G.; Penadés, J.R.; Berner, S.; Novick, R.P. Pathogenicity Island-Directed Transfer of Unlinked Chromosomal Virulence Genes. *Mol. Cell* **2015**, *57*, 138–149. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Darby, E.M.; Trampari, E.; Siasat, P.; Gaya, M.S.; Alay, I.; Webber, M.A.; Blair, J.M.A. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance Revisited. *Nat. Rev. Microbiol.* **2023**, *21*, 280–295. [\[CrossRef\]](#)
12. Haq, Q.; Siddiqui, M.; Sultan, I.; Jan, A.; Mondal, A.; Rahman, S. Antibiotics, Resistance and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2066. [\[CrossRef\]](#)
13. Munta, J.; Arias, C. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4*, 464–473. [\[CrossRef\]](#)
14. Khan, N. A Narrative Review on Microbial Response to Antibiotic Stress: Mechanisms of Resistance and Adaptation. *J. Clin. Diagn. Res.* **2025**, *19*, DE01–DE05. [\[CrossRef\]](#)
15. Schindler, B.D.; Frempong-Manso, E.; DeMarco, C.E.; Kosmidis, C.; Matta, V.; Seo, S.M.; Kaatz, G.W. Analyses of Multidrug Efflux Pump-Like Proteins Encoded on the *Staphylococcus aureus* Chromosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 747–748. [\[CrossRef\]](#)
16. Neytsch, A.A.; Boesch, C.M.; Kaatz, G.W. Fluoroquinolone Resistance Protein NorA of *Staphylococcus aureus* Is a Multidrug Efflux Transporter. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 128–129. [\[CrossRef\]](#)
17. Santos Costa, S.; Viveiros, M.; Amaral, L.; Couto, I. Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: An Update. *Open Microbiol. J.* **2013**, *7*, 59–71. [\[CrossRef\]](#)
18. Truong-Bolduc, Q.C.; Durman, J.M.; Strahilevitz, J.; Projan, S.J.; Hooper, D.C. MgrA Is a Multiple Regulator of Two New Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 2395–2405. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Zhang, L.; Tian, X.; Sun, L.; Mi, K.; Wang, R.; Gong, F.; Huang, L. Bacterial Efflux Pump Inhibitors Reduce Antibiotic Resistance. *Pharmaceutics* **2024**, *16*, 170. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Frasch, S.; Bacar, E. Plant Derived Inhibitors of Bacterial Efflux Pumps: An Update. *Phytochem. Rev.* **2015**, *14*, 961–974. [\[CrossRef\]](#)
21. Seukop, A.J.; Kurte, V.; Nahat, L.; Sarker, S.D.; Guo, M. Plant-Derived Secondary Metabolites as the Main Source of Efflux Pump Inhibitors and Methods for Identification. *J. Pharm. Anal.* **2020**, *10*, 277–290. [\[CrossRef\]](#)
22. Spengler, G.; Kincses, A.; Gajdics, M.; Amaral, L. New Roads Leading to Old Destinations: Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria. *Molecules* **2017**, *22*, 468. [\[CrossRef\]](#)
23. Sharma, A.; Gupta, V.K.; Pathania, R. Efflux Pump Inhibitors for Bacterial Pathogens. *Indian J. Med. Res.* **2019**, *149*, 129–145. [\[CrossRef\]](#)
24. Bhattacharyya, T.; Sharma, A.; Akhter, J.; Pathania, R. The Small Molecule HTR06027 Restores the Antibacterial Activity of Fluoroquinolones against Multidrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii* by Efflux Inhibition. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2017**, *50*, 219–226. [\[CrossRef\]](#)
25. Lamers, R.P.; Cavallari, J.F.; Barnows, L.L. The Efflux Inhibitor Phenylalanine-Arginine Beta-Naphthylamide (PAβN) Permeabilizes the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e60666. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Strahl, H.; Hamoen, L.W. Membrane Potential Is Important for Bacterial Cell Division. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 12281–12286. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Schumacher, A.; Stehrke, P.; Bohnert, J.A.; Akova, M.; Jonas, D.; Keen, W.V. Effect of 1-(1-Naphthylmethyl)-Piperazine, a Novel Putative Efflux Pump Inhibitor, on Antimicrobial Drug Susceptibility in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae Other than *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *57*, 344–348. [\[CrossRef\]](#)
28. Opperman, T.J.; Kwany, S.M.; Kim, H.-S.; Nguyen, S.T.; Houseweart, C.; D'Souza, S.; Walker, G.C.; Peet, N.P.; Nikaide, H.; Bowlin, T.L. Characterization of a Novel Pyranopyridine Inhibitor of the AcrAB Efflux Pump of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 722–733. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Wang, D.; Xie, K.; Zou, D.; Meng, M.; Xie, M. Inhibitory Effects of Silybin on the Efflux Pump of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *18*, 827–833.
30. Singh, S.; Kalia, N.P.; Joshi, P.; Kumar, A.; Sharma, P.R.; Kumar, A.; Bharate, S.B.; Khan, I.A.; Boeravinnone, 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. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1868. [\[CrossRef\]](#)

31. Chan, B.C.L.; Ip, M.; Lau, C.B.S.; Lui, S.L.; Joliva, C.; Gwem-Ebbaz, C.; Litaudon, M.; Reinert, N.E.; Görg, H.; See, R.H.; et al. Synergistic Effects of Bacitracin with Ciprofloxacin against *NorA* Over-Expressed Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Inhibition of MRSA Pyruvate Kinase. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *137*, 767–773. [\[CrossRef\]](#)
32. Guefack, M.-G.F.; Messina, N.D.M.; Mbayeng, A.T.; Nayim, P.; Kuete, J.R.N.; Mateta, V.Y.; Chi, G.F.; Ngadjui, B.T.; Kuete, V. Antibacterial and Antibiotic-Potential Activities of the Hydro-Ethanollic Extract and Protoberberine Alkaloids from the Stem Bark of *Eranthis Chlorantha* against Multidrug-Resistant Bacteria Expressing Active Efflux Pumps. *J. Ethnopharmacol.* **2022**, *296*, 115518. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Neyfakh, A.A.; Bidnenko, Y.E.; Chen, L.B. Efflux-Mediated Multidrug Resistance in *Bacillus Subtilis*: Similarities and Dissimilarities with the Mammalian System. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 4781–4785. [\[CrossRef\]](#)
34. Cirino, L.C.S.; Mones-Silva, S.M.P.; Silva, H.T.D.; de Souza, E.L.; Siqueira-Júnior, J.P. The Essential Oil from *Origanum Vulgare* L. and Its Individual Constituents Carvacrol and Thymol Enhance the Effect of Tetracycline against *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy* **2015**, *60*, 290–293. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Monawakeh, A.; Kircses, A.; Novák, M.; Mosolygó, T.; Mohácsi-Farkas, C.; Kiskó, G.; Sprenger, G. *Nigella Sativa* Essential Oil and Its Bioactive Compounds as Resistance Modifiers against *Staphylococcus aureus*. *Phytother. Res.* **2019**, *33*, 1010–1018. [\[CrossRef\]](#)
36. da Silva, L.; Donato, L.A.; Gonçalves, C.A.C.; Scherf, J.R.; dos Santos, H.S.; Mori, E.; Coutinho, H.D.M.; da Cunha, E.A.B. Antibacterial Potential of Chalcones and Its Derivatives against *Staphylococcus aureus*. *3 Biotech* **2022**, *13*, 1. [\[CrossRef\]](#)
37. de Brito, D.H.A.; Almeida-Neto, F.W.Q.; Ribeiro, L.R.; Magalhães, E.P.; de Menezes, R.R.P.B.; Sampaio, T.L.; Martins, A.M.C.; Bandeira, P.N.; Marinho, M.M.; Marinho, E.S.; et al. Synthesis, Structural and Spectroscopic Analysis, and Antiproliferative Activity of Chalcone Derivative (E)-1-(4-Aminophenyl)-3-(Benzof[Thiophen-2-Yl]Prop-2-En-1-One in *Trypanosoma Cruzi*. *J. Mol. Struct.* **2022**, *1253*, 132197. [\[CrossRef\]](#)
38. Quan, Y.-S.; Liu, J.-Y.; Wang, Y.-L.; Liu, Z.; Quan, Z.-S.; Wang, S.-H.; Yin, X.-M. Application of Chalcone in the Structural Modification of Natural Products: An Overview. *Chem. Bioactive* **2023**, *22*, e202401950. [\[CrossRef\]](#)
39. de Souza, M.A.; Rodrigues, L.G.; Rocha, J.E.; de Freitas, T.S.; Bandeira, P.N.; Marinho, M.M.; da Rocha, M.N.; Marinho, E.S.; Barreto, A.C.H.; Coutinho, H.D.M.; et al. Synthesis, Structural, Characterization, Antibacterial and Antibiotic Modifying Activity, ADMET Study, Molecular Docking and Dynamics of Chalcone (E)-1-(4-Aminophenyl)-3-(4-Nitrophenyl)Prop-2-En-1-One in Strains of *Staphylococcus aureus* Carrying *NorA* and *MepA* Efflux Pumps. *J. Biomed. Struct. Dyn.* **2024**, *42*, 1670–1691. [\[CrossRef\]](#)
40. Chavan, H.V.; Ganapure, S.D.; Mali, N.N.; Bhale, P.S. Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of N-Substituted Indolyl Chalcones as Anticancer, Anti-Inflammatory and Antioxidant Agents. *Mater. Today Proc.* **2023**, *73*, 396–402. [\[CrossRef\]](#)
41. Kirton, L.K.M.; Yousef, N.N.; Parks, G.D.; Phanstiel, O. Synthesis and Bioevaluation of Chalcones as Broad-Spectrum Antiviral Compounds Against Single-Stranded RNA Viruses. *Biomolecules* **2023**, *13*, 1285. [\[CrossRef\]](#)
42. Maurya, A.; Agrawal, A. Recent Advancement in Bioactive Chalcone Hybrids as Potential Agents in Medicinal Chemistry. *Mini Rev. Med. Chem.* **2024**, *24*, 176–195. [\[CrossRef\]](#)
43. Nawaz, T.; Tajammal, A.; Qureshi, A.W. Chalcones As Broad-Spectrum Antimicrobial Agents: A Comprehensive Review And Analysis Of Their Antimicrobial Activities. *ChemistrySelect* **2023**, *8*, e202302798. [\[CrossRef\]](#)
44. Nawaz, T.; Tajammal, A.; Qureshi, A.W.; Nisa, M.; Binjawhar, D.N.; Iqbal, M. Synthesis, Antibacterial, Antifungal, and Docking Studies of Chalcones Against Multidrug Resistance Pathogens. *Heliyon* **2024**, *10*, e30618. [\[CrossRef\]](#)
45. 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.; et al. Structural Characterization, Antibacterial Activity and *NorA* Efflux Pump Inhibition of Flavonoid Roetindol. *S. Afr. J. Bot.* **2020**, *732*, 140–145. [\[CrossRef\]](#)
46. Brawley, D.N.; Sauer, D.B.; Li, J.; Zheng, X.; Koide, A.; Jedhe, G.S.; Suwathee, T.; Song, J.; Liu, Z.; Asara, P.S.; et al. Structural Basis for Inhibition of the Drug Efflux Pump *NorA* from *Staphylococcus aureus*. *Nat. Chem. Biol.* **2022**, *18*, 706–712. [\[CrossRef\]](#)
47. Yousef, D.; Davis, A.M.; Kleywegt, G.J.; Schmitt, S. An Alternative Method for the Evaluation of Docking Performance: RSR vs RMSD. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48*, 1411–1422. [\[CrossRef\]](#)
48. Fokoue, H.H.; Pinheiro, P.S.M.; Fraga, C.A.M.; Sant'Anna, C.M.R. Is There Anything New About the Molecular Recognition Applied to Medicinal Chemistry? *Quim. Nova* **2020**, *43*, 78–89.
49. Imberty, A.; Hardman, K.D.; Carver, J.P.; Perez, S. Molecular Modelling of Protein-Carbohydrate Interactions: Docking of Monosaccharides in the Binding Site of Concanavalin A. *Glycobiology* **1991**, *1*, 631–642. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Le Dang, N.; Hughes, T.B.; Miller, G.P.; Swamidass, S.J. Computationally Assessing the Bioactivation of Drugs by N-Dealkylation. *Chem. Res. Toxicol.* **2018**, *31*, 68–80. [\[CrossRef\]](#)
51. Zheng, M.; Luo, X.; Shui, Q.; Wang, Y.; Du, Y.; Zhu, W.; Jiang, H. Site of Metabolism Prediction for Six Biotransformations Mediated by Cytochromes P450. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1251–1258. [\[CrossRef\]](#)
52. Di, L.; Keefer, C.; Scott, D.O.; Strelevitz, T.J.; Chang, G.; Bi, Y.-A.; Lai, Y.; Duckworth, J.; Fenner, K.; Troutman, M.D.; et al. Mechanistic Insights from Comparing Intrinsic Clearance Values between Human Liver Microsomes and Hepatocytes to Guide Drug. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *57*, 441–448. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

53. Petersson, M.; Hoxa, X.; Kulm, M.; Wager, T.E.; Kauffman, G.W.; Verhoest, P.R. Quantitative Assessment of the Impact of Fluoxetine substitution on P-Glycoprotein (P-Gp) Mediated Efflux, Permeability, Lipophilicity, and Metabolic Stability. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 5284–5296. [\[CrossRef\]](#)
54. Gonella-Díaz, R.; Mangano, S.; Esposito, A.; Roncaglioni, A.; Mangano, A.; Benferati, E. Comparison of in Silico tools for Evaluating Rat Oral Acute SAR QSAR. *Environ. Res.* **2018**, *166*, 1–27. [\[CrossRef\]](#)
55. Wang, Y.; Venier, H.; Ma, S. Efflux Pump Inhibitors: A Novel Approach to Combat Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. *Curr. Drug Targets* **2016**, *17*, 702–719. [\[CrossRef\]](#)
56. González-Bello, C. Antibiotic Adjuvants—A Strategy to Unlock Bacterial Resistance to Antibiotics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 4221–4228. [\[CrossRef\]](#)
57. Boucher, H.W.; Talbot, G.H.; Benjamin, D.K.; Bradley, J.; Gaidos, R.J.; Jones, R.N.; Muenay, R.E.; Bonomo, R.A.; Gilbert, D. 10 × '20 Progress—Development of New Drugs Active against Gram-Negative Bacilli: An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **2013**, *56*, 1685–1694. [\[CrossRef\]](#)
58. Davies, J.; Spiegelman, G.B.; Yin, G. The World of Subinhibitory Antibiotic Concentrations. *Curr. Opin. Microbiol.* **2006**, *9*, 445–453. [\[CrossRef\]](#)
59. Zimmermann, S.; Klinger-Strobel, M.; Bohner, J.A.; Wendler, S.; Rödel, J.; Plett, M.W.; Löffler, B.; Tuchscher, L. Clinically Approved Drugs Inhibit the *Staphylococcus aureus* Multidrug NorA Efflux Pump and Reduce Biofilm Formation. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2762. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Kaatz, G.W.; Seo, S.M. Inducible NorA-Mediated Multidrug Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *39*, 2650–2655. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
61. Kaatz, G.W.; Seo, S.M. Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in Genetically Related Strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 2735–2737. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Rezende-Júnior, L.M.; Andrade, L.M.d.S.; Leal, A.L.A.B.; Mesquita, A.B.d.S.; Santos, A.L.F.d.A.; Neto, J.d.S.L.; Siqueira-Júnior, J.P.; Nogueira, C.E.S.; Kaatz, G.W.; Coutinho, H.D.M.; et al. Chalcones Isolated from *Arrabidaea* Brachypoda Flowers as Inhibitors of NorA and MepA Multidrug Efflux Pumps of *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics* **2020**, *9*, 351. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Siqueira, M.M.R.; Freire, P.d.T.C.; Cruz, B.G.; de Freitas, T.S.; Bandeira, P.N.; dos Santos, H.S.; Nogueira, C.E.S.; Teixeira, A.M.R.; Pereira, R.L.S.; Xavier, J.d.C.; et al. Aminophenyl Chalcones Potentiating Antibiotic Activity and Inhibiting Bacterial Efflux Pump. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2021**, *158*, 105695. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. da Silva, L.; Donato, I.A.; Bezerra, S.R.; dos Santos, H.S.; Bandeira, P.N.; do Nascimento, M.T.R.; Guedes, J.M.; Freitas, P.R.; de Araújo, A.C.J.; de Freitas, T.S.; et al. Synthesis, Spectroscopic Characterization, and Antibacterial Activity of Chalcone (2E)-1-(3'-Aminophenyl)-3-(4-Dimethylaminophenyl)-Prop-2-En-1-One against Multiresistant *Staphylococcus aureus* Carrier of Efflux Pump Mechanisms and β -Lactamase. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2024**, *38*, 60–71. [\[CrossRef\]](#)
65. da Silva, L.; Gonçalves, C.A.C.; Bezerra, A.H.; dos Santos Barbosa, C.R.; Rocha, J.E.; de Matos, Y.M.L.S.; de Oliveira, L.C.C.; dos Santos, H.S.; Coutinho, H.D.M.; da Cunha, F.A.B. Molecular Docking and Antibacterial and Antibiotic-Modifying Activities of Synthetic Chalcone (2E)-1-(3'-Aminophenyl)-3-(4-Dimethylaminophenyl)-Prop-2-En-1-One in a MepA Efflux Pump-Expressing *Staphylococcus aureus* Strain. *Folia Microbiol.* **2024**, *70*, 841–849. [\[CrossRef\]](#)
66. Paixão, L.; Rodrigues, L.; Couto, I.; Martins, M.; Fernandes, P.; de Carvalho, C.C.C.R.; Monteiro, G.A.; Sansonetti, F.; Amaral, L.; Viveiros, M. Fluorometric Determination of Ethidium Bromide Efflux Kinetics in *Escherichia coli*. *J. Biol. Eng.* **2009**, *3*, 18. [\[CrossRef\]](#)
67. Holter, J.G.; Skotved, H.-C.; Mølgaard, P.; Olsen, C.E.; Christensen, S.B. Chalcone Inhibitors of the NorA Efflux Pump in *Staphylococcus aureus* Whole Cells and Enriched Everet Membrane Vesicles. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4514–4521. [\[CrossRef\]](#)
68. Jesus, A.; Durão, F.; Saemmerli, N.; Freitas-Silva, J.; da Costa, P.M.; Pinto, E.; Pinto, M.; Spengler, G.; Sousa, E.; Cidade, H. BDDE-Inspired Chalcone Derivatives to Fight Bacterial and Fungal Infections. *Mar. Drugs* **2022**, *20*, 315. [\[CrossRef\]](#)
69. Li, X.Z.; Nkaido, H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: An Update. *Drugs* **2009**, *69*, 1555–1623. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
70. Ughachukwu, P.; Uneke, P. Efflux Pump-Mediated Resistance in Chemotherapy. *Aust. Med. Health Sci. Res.* **2012**, *2*, 191. [\[CrossRef\]](#)
71. Tintino, S.R.; de Souza, V.C.A.; da Silva, J.M.A.; Oliveira-Tintino, C.D.d.M.; Pereira, P.S.; Leal-Balbino, T.C.; Pereira-Neves, A.; Siqueira-Júnior, J.P.; da Costa, J.G.M.; Rodrigues, F.F.G.; et al. Effect of Vitamin K3 Inhibiting the Function of NorA Efflux Pump and Its Gene Expression on *Staphylococcus aureus*. *Membr.* **2020**, *10*, 130. [\[CrossRef\]](#)
72. Macedo, N.S.; de Sousa-Silveira, Z.; Dantas, D.M.; dos Santos Barbosa, C.R.; de Moraes Oliveira-Tintino, C.D.; Tintino, S.R.; Alencar, C.G.; Siqueira, G.M.; da Silva, T.F.; Marinho, M.M.; et al. Evaluation of the Antibacterial and Efflux Inhibitory Activity of Trans-Cinnamic Acid in *Staphylococcus aureus*: Experimental Assays and in Silico Modeling. *Phytomedicine Plus* **2023**, *5*, 100816. [\[CrossRef\]](#)
73. Pisch, E.; Danelle, O.; Diederich, F. Molecular Recognition in Chemical and Biological Systems. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 3290–3327. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

74. 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 Des. Dev. Ther.* **2016**, *10*, 3237–3252. [\[CrossRef\]](#)
75. Marinho, E.M.; Batista de Andrade Neto, J.; Silva, J.; Rocha da Silva, C.; Cavalcanti, B.C.; Marinho, E.S.; Nobre Júnior, H.V. Virtual Screening Based on Molecular Docking of Possible Inhibitors of COVID-19 Main Protease. *Microb. Pathog.* **2020**, *148*. [\[CrossRef\]](#)
76. Bickerton, G.R.; Poole, G.V.; Bernard, J.; Muresan, S.; Hopkins, A.L. Quantifying the Chemical Beauty of Drugs. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 90–98. [\[CrossRef\]](#)
77. Lipinski, C.A. Lead- and Drug-like Compounds: The Rule-of-Five Revolution. *Drug Discov. Today Technol.* **2004**, *1*, 337–341. [\[CrossRef\]](#)
78. Hughes, J.D.; Blagg, J.; Price, D.A.; Bailey, S.; DeCrescenzo, G.A.; Devraj, R.V.; Ellsworth, E.; Fobian, Y.M.; Gibbs, M.E.; Gillen, R.W.; et al. Physicochemical Drug Properties Associated with In Vivo Toxicological Outcomes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4872–4875. [\[CrossRef\]](#)
79. Johnson, T.W.; Dress, K.R.; Edwards, M. Using the Golden Triangle to Optimize Clearance and Oral Absorption. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5560–5564. [\[CrossRef\]](#)
80. Oliveira-Tatino, C.D.d.M.; Santana, J.E.G.; Alencar, G.G.; Siqueira, G.M.; Gonçalves, S.A.; Tatino, S.R.; de Menezes, I.R.A.; Rodrigues, J.P.V.; Gonçalves, V.B.P.; Nicoletti, R.; et al. Valencene, Nootkatone and Their Liposomal Nanoformulations as Potential Inhibitors of NorA, Tet(K), MefA, and MepA Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus* Strains. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 2400. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
81. Elshidi, M.; Ahmed, S.; Farston, S.; Dunlop, P.; McGaw, M.; Marchant, R.; Borat, I.M. Resazurin-Based 96-Well Plate Microdilution Method for the Determination of Minimum Inhibitory Concentration of Biosurfactants. *Biotecol. Lett.* **2016**, *38*, 1015–1019. [\[CrossRef\]](#)
82. Andrews, J.M. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *48*, 5–16. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Yuen, H.L.; Chan, S.Y.; Ding, Y.E.; Lim, S.; Tan, G.C.; Kho, C.L. Development of a Novel Antibacterial Peptide, BMM-5, via Combination of Phage Display Selection and Computer-Assisted Modification. *Biomolecules* **2023**, *13*, 466. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.