



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**  
**REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA**

**CÍCERA DATIANE DE MORAIS OLIVEIRA TINTINO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E INIBIDORA DE BOMBAS  
DE EFLUXO EM CEPAS DE *Staphylococcus aureus* POR 1,8-NAFTIRIDINAS  
SULFONAMÍDICAS: ABORDAGEM *IN VITRO* E *IN SILICO***

**Recife**

**2021**

CÍCERA DATIANE DE MORAIS OLIVEIRA TINTINO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E INIBIDORA DE BOMBAS  
DE EFLUXO EM CEPAS DE *Staphylococcus aureus* POR 1,8-NAFTIRIDINAS  
SULFONAMÍDICAS: ABORDAGEM *IN VITRO* E *IN SILICO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pernambuco (UFPE), fazendo parte da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Teresinha Gonçalves da Silva

**Coorientador:** Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

**Recife**

**2021**

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Tintino, Cícera Datiane de Morais Oliveira

Avaliação da atividade antibacteriana e inibidora de bombas de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus* por 1,8-Naftiridinas sulfonamídicas: abordagem em *Vitro* e *in Silico* / Cícera Datiane de Morais Oliveira Tintino. - 2021.

242 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Recife, 2021.

Inclui referências e apêndices.

1. Bactérias. 2. Drogas – Resistência em microrganismos 3. Farmacologia.  
I. Silva, Teresinha Gonçalves da (orientadora). II. Menezes, Irwin Rose Alencar de (coorientador). III. Título.

579.353

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-156

CÍCERA DATIANE DE MORAIS OLIVEIRA TINTINO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E INIBIDORA DE BOMBAS  
DE EFLUXO EM CEPAS DE *Staphylococcus aureus* POR 1,8-NAFTIRIDINAS  
SULFONAMÍDICAS: ABORDAGEM *IN VITRO* E *IN SILICO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pernambuco (UFPE), fazendo parte da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Aprovada em: 11/02/2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Teresinha Gonçalves da Silva (Orientadora)

Universidade Federal do Pernambuco

---

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes (Coorientador)

Universidade Regional do Cariri

---

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira (Examinador Interno)

Universidade Regional do Cariri

---

Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha (Examinador Externo)

Universidade Regional do Cariri

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jacqueline Cosmo Andrade Pinheiro (Examinadora Externa)

Universidade Regional do Cariri

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga (Examinadora Externa)

Universidade Regional do Cariri

Dedico à minha família, em especial aos meus pais e meu esposo.  
Ao povo sertanejo que representa minhas raízes e minha história e a todos os pós-graduandos,  
pois, algo em comum nos une: a perseverança.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da Vida, por todas as bênçãos e graças, sem ele eu não teria chegado onde cheguei. Agradecer principalmente por mim e por meus familiares estarmos bem e com saúde nesse momento histórico que é a pandemia.

À minha família, meu pai Dionízio Correia e minha mãe Alzeneide Morais por me ensinarem o valor da honestidade, do trabalho, da humildade e do amor.

Ao meu esposo Saulo pelo companheirismo, amor, respeito, apoio e por inspirar a ser sempre uma pessoa melhor.

À minha professora e Orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Teresinha Gonçalves da Silva pelos ensinamentos, disponibilidade, pela confiança, calma e por ser uma grande inspiração como profissional e mulher, ensinando primeiramente com seu exemplo.

Ao Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes, por todos os ensinamentos, me acompanhando desde a graduação até o doutorado e por me ajudar a desenvolver o senso crítico científico.

Ao professor Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho que também me auxiliou com suas orientações e sabedoria, mostrando sempre o caminho sensato a seguir, e por disponibilizar o espaço do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM), para a realização dos experimentos.

Ao professor Luiz Everson da Silva da UFPR pela parceria e solicitude, contribuindo na realização do trabalho. Aos professores e pesquisadores da FURB cuja parceria também foi imprescindível e tem rendido bons frutos.

Aos professores da banca examinadora por me auxiliarem na melhoria do meu trabalho e por estarem presentes desde minha graduação, a destacar os professores Dr.<sup>a</sup> Maria Flaviana, Dr.<sup>a</sup> Jacqueline Andrade, Dr. Francisco Cunha, Dr. Erlânio Oliveira e Dr. Alexandre Teixeira.

À Coordenação do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, RENORBIO da UFPE, pelo apoio e disponibilidade. E aos professores que integram o corpo docente deste programa de pós-graduação, fornecendo seus valiosos ensinamentos.

Aos colegas que me auxiliaram nos testes e dividiram comigo muitos momentos no laboratório Débora Muniz, Cristina Rodrigues, Raimundo Luiz, José Neto, Maria Milena e a todos os meus colegas do LMBM.

À UFPE essa grande instituição que me acolheu e onde me sinto em casa, onde aprendi muitas coisas e conheci muitas pessoas, que agregaram muito tanto na minha caminhada profissional como pessoal.

À URCA que literalmente foi minha segunda casa, durante a graduação, quando morei na Residência Universitária, em seguida onde fiz o mestrado e agora parte do doutorado.

À FACEPE pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento da pesquisa.

### **A estrada**

No relógio do Céu, o Sol ponteiro  
Sangra a Cabra no estranho céu chumboso.  
A Pedra lasca o Mundo impiedoso,  
A chama da Espingarda fere o Aceiro.

No carrascal do sol, azul braseiro,  
Refulge o Girassol rubro e feroso.  
Como morrer na sombra do meu Pouso?  
Como enfrentar as flechas desse Arqueiro?

Lá fora, o incêndio: o roxo lampadário  
das Macambiras rubras e auri-pardos  
Anjos-diabos e Tronos-vai queimando.

Sopra o vento – o Sertão incendiário!  
Andam monstros sombrios pela Estrada  
e, pela Estrada, entre esses Monstros, ando!

Ariano Suassuna, “Poemas”. Recife: Editora  
Universitária da UFPE, 1999.



## RESUMO

A ocorrência crescente de resistência bacteriana vem estimulando buscas por novos agentes não apenas antibacterianos, mas eficazes, frente mecanismos de resistência expressos pela bactéria, como bombas de efluxo. Compostos como 1,8-naftiridinas e sulfonamidas atraem o interesse de pesquisadores apresentando diversas atividades biológicas comprovadas, tornando promissora a síntese de novos derivados naftiridínicos com ações bioativas. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana e inibidora de bombas de efluxo por 1,8-naftiridinas sulfonamídicas sintetizadas, sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. A síntese ocorreu pela termólise do aduto do ácido de Meldrum, e os derivados sulfonamídicos finais, obtidos pela sulfonilação da 2-amino-5-cloro-1,8-naftiridina com diferentes cloretos de benzenossulfonila. Experimentos de docagem molecular foram realizados para avaliar a interação com proteínas de efluxo, utilizando o servidor CASTp para obter a estrutura topográfica dos bolsos de ligação. Foram avaliadas as propriedades farmacocinéticas, previsões de bioatividade e propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção). A atividade antibacteriana foi avaliada pelo teste de microdiluição em caldo. A capacidade inibitória da bomba de efluxo foi avaliada pelos efeitos sinérgicos sobre o antibiótico e brometo de etídio (EtBr); e ensaios de fluorimetria. Foram sintetizados e testados os compostos: *N*-(5-oxo-5,8-diidro-1,8-naftiridin-2-il)-acetamida; 4-metil-*N*-(5-cloro-1,8-naftiridin-2-il)-benzenossulfonamida; 2,5-dicloro-*N*-(5-cloro-1,8-naftiridin-2-il)-benzenossulfonamida; 2,3,4-trifluoro-*N*-(5-cloro-1,8-naftiridin-2-il)-benzenossulfonamida e 3-trifluormetil-*N*-(5-cloro-1,8-naftiridin-2-il)-benzenossulfonamida, ou compostos 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente. Obteve-se um rendimento médio de 61,4%, para os compostos. A docagem molecular com NorA, revelou que derivados com melhor energia de ligação estavam na faixa de -8,2 a -9,1 kcal/mol. No acoplamento com MepA, as energias de ligação mais favoráveis estavam entre -7,1 a -8,8 kcal/mol. Os estudos de farmacocinética dos compostos revelaram um perfil favorável, podem sofrer absorção gastrointestinal, não cruzam a barreira hemato-encefálica, não são substratos da P-gp e o composto 4 foi o que menos inibiu as isoenzimas do citocromo P450. Não houve violação da regra dos cinco de Lipinski pelos compostos, indicando serem seguros e candidatos propícios a medicamento oral. Os compostos não apresentaram atividade antibacteriana intrínseca significativa, obtendo-se uma concentração inibitória mínima (CIM)  $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ , frente as cepas SA-1199, SA-1199B, SA IS-58, SA RN4220 e SA K-2068. Porém, todos os compostos (1-5), induziram uma redução da CIM em duas vezes ou mais, ao se associarem aos antibióticos e EtBr, atuando como inibidores

putativos de NorA, Tet(K), MsrA e MepA. Dente todos, o composto 4 destacou-se por induzir uma redução da concentração dos antibióticos norfloxacin, eritromicina, ciprofloxacina e tetraciclina em 16, 32, 8 e 6,3 vezes respectivamente. Na associação com o EtBr, o composto 4 reduziu a CIM em 4, 2,6, 16 e 8 vezes respectivamente, contra as cepas SA-1199B, SA IS-58, SA RN4220 e SA K-2068. Nos ensaios de fluorescência, o composto 4 foi capaz de aumentar a intensidade de emissão quando associado ao EtBr, nas cepas SA-1199B e SA-K2068, indicando uma ação inibidora das proteínas NorA e MepA. Em conclusão, as 1,8-naftiridinas sulfonamídicas sintetizadas apresentaram resultados inéditos para as atividades biológicas testadas, apresentando um perfil farmacocinético e energia de interação favorável, atuando como inibidores putativos das bombas de efluxo NorA, Tet(K), MsrA e MepA, em cepas de *S. aureus*.

**Palavras-chave:** Brometo de etídio; Fluorimetria; Modelagem molecular; Núcleo naftiridínico; Resistência bacteriana.

## ABSTRACT

The increasing occurrence of bacterial resistance has stimulated searches for new agents that are not only antibacterial but effective against resistance mechanisms expressed by the bacteria, such as efflux pumps. Compounds such as 1,8-naphthyridines and sulfonamides attract the interest of researchers with several proven biological activities, making the synthesis of new naphthyridine derivatives with bioactive actions promising. This study aimed to evaluate the antibacterial and inhibitory activity of efflux pumps by synthesized sulfonamide 1,8-naphthyridines, on strains of *Staphylococcus aureus*. The synthesis occurred by the thermolysis of the Meldrum acid adduct, and the final sulfonamide derivatives, obtained by the sulfonylation of 2-amino-5-chloro-1,8-naphthyridine with different benzenesulfonyl chlorides. Molecular docking experiments were carried out to evaluate the interaction with efflux proteins, using the CASTp server to obtain the topographic structure of the connection pockets. Pharmacokinetic properties, bioactivity predictions, and ADME properties (absorption, distribution, metabolism, and excretion) were evaluated. The antibacterial activity was evaluated by the broth microdilution test. The inhibitory capacity of the efflux pump was evaluated by the synergistic effects on the antibiotic and ethidium bromide (EtBr); and fluorimetry tests. The compounds were synthesized and tested: *N*-(5-oxo-5,8-dihydro-1,8-naphthyridin-2-yl)-acetamide; 4-methyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; 2,5-dichloro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; 2,3,4-trifluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; 3-trifluoromethyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide, or compounds 1, 2, 3, 4 and 5, respectively. An average yield of 61.4% was obtained for the compounds. Molecular docking with NorA revealed that derivatives with better binding energy were in the range of  $-8.2$  to  $-9.1$  kcal/mol. In MepA coupling, the most favorable binding energies were between  $-7.1$  to  $-8.8$  kcal/mol. The pharmacokinetic studies of the compounds showed a favorable profile, they can undergo gastrointestinal absorption, they do not cross the blood-brain barrier, they are not substrates of P-gp and compound 4 was the one that least inhibited the cytochrome P450 isoenzymes. There was no violation of the Lipinski rule of five by the compounds, indicating that they are safe and suitable candidates for oral medication. The compounds did not show significant intrinsic antibacterial activity, obtaining a minimum inhibitory concentration (MIC)  $\geq 1024$   $\mu\text{g/mL}$ , against strains SA-1199, SA-1199B, SA IS-58, SA RN4220, and SA K-2068. However, all compounds (1–5) induced a reduction in MIC by two or more times, when

associated with antibiotics and EtBr, acting as putative inhibitors of NorA, Tet(K), MsrA, and MepA. All of them, compound 4 stood out for inducing a reduction in the concentration of the antibiotics norfloxacin, erythromycin, ciprofloxacin, and tetracycline by 16, 32, 8, and 6.3 times respectively. In association with EtBr, compound 4 reduced MIC by 4, 2.6, 16, and 8 times respectively, against strains SA-1199B, SA IS-58, SA RN4220, and SA K-2068. In fluorescence assays, compound 4 was able to increase the emission intensity when associated with EtBr, in strains SA-1199B and SA-K2068, indicating an inhibitory action of NorA and MepA proteins. In conclusion, the synthesized sulfonamide 1,8-naphthyridines showed unprecedented results for the biological activities tested, presenting a favorable pharmacokinetic profile and interaction energy, acting as putative inhibitors of the NorA, Tet(K), MsrA, and MepA efflux pumps, in strains of *S. aureus*.

**Keywords:** Bacterial resistance; Ethidium bromide; Fluorimetry; Molecular modeling; Naphthyridine nucleus.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> –	Representação estrutural dos isômeros naftiridínicos.....	26
<b>Figura 2</b> –	Representação estrutural das sulfonamidas.....	30
<b>Figura 3</b> –	Parede celular de bactéria Gram-positiva.....	32
<b>Figura 4</b> –	Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos.....	40
<b>Figura 5</b> –	Estrutura dos representantes de cada superfamília de bombas de efluxo. .....	48
<b>Figura 6</b> –	Estruturas do sistema tripartido de proteínas da família ABC e MFS em bactérias Gram-negativas. ....	49
<b>Figura 7</b> –	Estrutura de Sav1866 de <i>S. aureus</i> e glicoproteína-P em células eucarióticas.....	52
<b>Figura 8</b> –	Previsão estrutural de transportadores MFS: MFSD13A, SPNS3 e CLN3.....	55
<b>Figura 9</b> –	Estrutura da proteína EmrE e sua via de translocação putativa. ....	58
<b>Figura 11</b> –	Estrutura da bomba de efluxo AcrAB-TolC. ....	60
<b>Figura 12</b> –	Estrutura e diagrama da topologia do monômero AcrB de <i>E. coli</i> . ....	61
<b>Figura 13</b> –	Representação em fitas da estrutura de NorA. ....	62
<b>Figura 14</b> –	Estrutura da proteína MepA. ....	66
<b>Figura 15</b> –	Mecanismos gerais de inibição de bomba de efluxo.....	70
<b>Figura 16</b> –	Método de microdiluição em caldo, utilizado na verificação da atividade antibacteriana e inibidora de bomba de efluxo. ....	87
<b>Figura 17</b> –	Método de determinação da inibição do efluxo por medição da emissão da fluorescência de EtBr. ....	88
<b>Figura 18</b> –	Diagrama da organização dos testes.....	90

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Bombas de efluxo encontradas em células procarióticas e seus principais substratos.....	76
<b>Tabela 2</b> – 1,8-naftiridinas testadas <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> .....	83
<b>Tabela 3</b> – Organização dos Resultados.....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABC</b>	<i>ATP-binding cassette</i>
<b>ACS</b>	<i>Anion/cation symporter</i>
<b>ADME</b>	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
<b>AME</b>	<i>Aminoglycoside modifying enzymes</i>
<b>CCCP</b>	<i>Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone</i>
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>DHA</b>	<i>Drug/H<sup>+</sup> antiporter</i>
<b>DHPP</b>	<i>Dihydropteridine pyrophosphate</i>
<b>DHPS</b>	Dihidropteroato sintase
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DS</b>	<i>Discovery studio</i>
<b>EE</b>	Eenterotoxina estafilocócica
<b>EL</b>	Eficiência do ligante
<b>Erm</b>	Enzima eritromicina ribossomo metilase
<b>EPI</b>	<i>Efflux pump inhibitor</i>
<b>ESBL</b>	<i>Extended-spectrum beta-lactamase</i>
<b>ET</b>	<i>Exfoliative toxin</i>
<b>QRSA</b>	<i>Quinolone resistant Staphylococcus aureus</i>
<b>HGT</b>	<i>Horizontal gene transfer</i>
<b>IMP</b>	<i>Inner membrane protein</i>
<b>MATE</b>	<i>Multidrug and toxic compound extrusion</i>
<b>MDR</b>	<i>Multidrug resistance</i>
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MES</b>	<i>Multidrug efflux systems</i>
<b>MFP</b>	<i>Membrane fusion proteins</i>
<b>MFS</b>	<i>Major facilitator superfamily</i>
<b>MGE</b>	<i>Mobile genetic elements</i>
<b>MRSA</b>	<i>Methicillin resistant Staphylococcus aureus</i>
<b>NBD</b>	<i>Nucleotide-binding domain</i>
<b>OHS</b>	<i>Oligosaccharide/H<sup>+</sup> symporter</i>
<b>OMP</b>	<i>Outer membrane protein</i>

<b>PABA</b>	Ácido <i>p</i> -aminobenzóico
<b>PACE</b>	<i>Proteobacterial antimicrobial compound efflux</i>
<b>PAN-BR</b>	Plano de ação nacional para a prevenção e controle da resistência antimicrobiana no Brasil
<b>PAβN</b>	<i>Phenylalanine-arginyl β-naphthylamide</i>
<b>PBP</b>	<i>Penicillin binding protein</i>
<b>P-gp</b>	Glicoproteína-P
<b>PRP</b>	Proteínas de repetição de pentapeptídeo
<b>QAC</b>	<i>Quaternary ammonium compounds</i>
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Ressonância magnética nuclear de Carbono-13
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância magnética nuclear de Hidrogênio-1
<b>RND</b>	<i>Resistance-nodulation-cell division</i>
<b>SCCmec</b>	<i>Staphylococcal chromosomal cassettes mec</i>
<b>SDS</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
<b>SMR</b>	<i>Small multidrug resistance</i>
<b>SP</b>	<i>Sugar porter</i>
<b>SSSS</b>	<i>Staphylococcal scalded skin syndrome</i>
<b>THF</b>	Tetraidrofurano
<b>TSST-1</b>	<i>TSS toxin-1</i>
<b>TMD</b>	<i>Transmembrane domains</i>
<b>TMS</b>	<i>Transmembrane segment</i>
<b>TPP</b>	<i>Tetraphenylphosphonium</i>



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
1.1	OBJETIVOS.....	25
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>25</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>25</b>
<b>2.</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>26</b>
2.1	1,8-NAFTIRIDINAS SULFONAMÍDICAS .....	26
2.2	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	31
<b>2.2.1</b>	<b>Características gerais.....</b>	<b>31</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Crescimento e identificação.....</b>	<b>33</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Infectividade.....</b>	<b>34</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Patogenicidade.....</b>	<b>34</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Virulência.....</b>	<b>35</b>
2.2.5.1	Fatores de adesão .....	35
2.2.5.2	Fatores de evasão do sistema imune .....	36
2.2.5.3	Fatores relacionados com a invasão na célula do hospedeiro .....	37
2.3	RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	38
<b>2.3.1</b>	<b>Mecanismos de modificação, desvio e proteção do alvo .....</b>	<b>39</b>
2.3.1.1	Alterações no alvo por mutação .....	39
2.3.1.2	Modificação e proteção do alvo .....	41
<b>2.3.2</b>	<b>Modificação ou degradação de antibióticos .....</b>	<b>42</b>
2.3.2.1	Inativação do antibiótico por hidrólise.....	42
2.3.2.2	Inativação de antibiótico por transferência de um grupo químico .....	42
<b>2.3.3</b>	<b>Prevenção de acesso ao alvo .....</b>	<b>43</b>
2.3.3.1	Efluxo de drogas.....	43
2.4	BOMBAS DE EFLUXO .....	44
<b>2.4.1</b>	<b>Superfamília de cassetes de ligação ao ATP ou família ABC (<i>ATP-binding cassette</i>) .....</b>	<b>51</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Família de extrusão de múltiplas drogas e compostos tóxicos ou MATE (<i>Multidrug and toxic compound extrusion</i>) .....</b>	<b>54</b>

2.4.3	<b>Superfamília de facilitadores principais ou MFS (<i>Major facilitator superfamily</i>)</b> .....	54
2.4.4	<b>Família pequena de resistência a múltiplas drogas ou SMR (<i>Small multidrug resistance</i>)</b> .....	57
2.4.5	<b>Superfamília resistência-nodulação-divisão celular ou RND (<i>Resistance-nodulation-cell division</i>)</b> .....	58
2.5	<b>BOMBAS DE EFLUXO ESPECÍFICAS</b> .....	61
2.5.1	<b>Bomba de Efluxo NorA</b> .....	61
2.5.2	<b>Bomba de Efluxo Tet(K)</b> .....	65
2.5.3	<b>Bomba de Efluxo MepA</b> .....	66
2.5.3	<b>Bomba de Efluxo MsrA</b> .....	67
2.6	<b>INIBIDORES DE BOMBA DE EFLUXO</b> .....	69
2.6.1	<b>Identificação da ocorrência de inibição de bomba de efluxo</b> .....	79
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	82
3.1	<b>OBTENÇÃO DOS DERIVADOS DE 1,8-NAFTIRIDINAS SULFONAMÍDICAS</b> .....	82
3.2	<b>MODELAGEM MOLECULAR E ESTUDOS DE DOCAGEM</b> .....	82
3.3	<b>ESTUDOS <i>IN SILICO</i> DE FARMACOCINÉTICA E PREVISÕES DE BIOATIVIDADE</b> .....	84
3.3.1	<b>Verificação da propriedade de semelhança a drogas, análise da regra de Lipinski e previsões das propriedades ADME</b> .....	84
3.3.2	<b>Previsões de bioatividade usando <i>Molinspiration Cheminformatics</i></b> .....	84
3.4	<b>SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS</b> .....	85
3.5	<b>CEPAS BACTERIANAS</b> .....	85
3.6	<b>AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E INIBIDORA DE BOMBA DE EFLUXO</b> .....	86
3.6.1	<b>Verificação da atividade antibacteriana pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM)</b> .....	86
3.6.2	<b>Avaliação da inibição de bomba de efluxo por redução da CIM dos antibióticos e do brometo de etídio (EtBr)</b> .....	86
3.6.3	<b>Avaliação da inibição de bomba de efluxo pelo ensaio de emissão da fluorescência de EtBr</b> .....	87
3.7	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	89

3.8	SÚMULA METODOLÓGICA.....	90
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>91</b>
4.1	ARTIGO 1: CHEMICAL SYNTHESIS, MOLECULAR DOCKING AND MepA EFFLUX PUMP INHIBITORY EFFECT BY 1,8-NAPHTHYRIDINES SULFONAMIDES .....	92
4.2	ARTIGO 2: THE 1,8-NAPHTHYRIDINES SULFONAMIDES ARE NorA EFFLUX PUMP INHIBITORS .....	136
4.3	ARTIGO 3: DO 1,8-NAPHTHYRIDINE SULFONAMIDES POSSESS AN INHIBITORY ACTION AGAINST Tet(K) AND MsrA EFFLUX PUMPS IN MULTIRESISTANT <i>Staphylococcus aureus</i> STRAINS? .....	164
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>181</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	
	<b>APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA MICROBIAL PATHOGENESIS</b>	
	<b>APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA JOURNAL OF GLOBAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE (JAGAR)</b>	
	<b>APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES</b>	
	<b>APÊNDICE D – PRODUÇÃO CIENTÍFICA OBTIDA DURANTE O PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO DA TESE</b>	

## 1 INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas têm um grande impacto na saúde pública. A transmissão bacteriana aos humanos pode ocorrer através do ar, água, alimentos ou vetores, como insetos. Os meios de transmissão dessas infecções incluem principalmente o contato direto com outro organismo contaminado, vias aéreas, por gotículas ou veicular. Durante a disseminação, uma quantidade suficiente desses micro-organismos deve sobreviver até chegar ao hospedeiro suscetível. Nesse processo, as bactérias dispõem de diversos mecanismos de adaptação para sobreviverem na água, no solo e nos alimentos (FERNSTROM; GOLDBLATT, 2013; KNOX; UHLEMANN; LOWY, 2015; RASIGADE; VANDENESCH, 2014).

Três fatores são cruciais no desenvolvimento de infecções e doenças bacterianas: a infectividade, a patogenicidade e a virulência bacteriana. A infectividade consiste na capacidade de um agente infeccioso de invadir e se multiplicar no hospedeiro. A patogenicidade está relacionada com a capacidade de um organismo infeccioso em causar doenças no hospedeiro infectado. Por fim, a presença de fatores de virulência determina a propensão de um micro-organismo de causar doenças graves ou fatais, produzindo endotoxinas e evadindo dos mecanismos de proteção do hospedeiro (ANDRAS et al., 2020; CROSS, 2008; MARTÍNEZ; BAQUERO, 2002).

Além disso, alguns fatores do hospedeiro são determinantes para o desenvolvimento da doença após a infecção. Esses fatores incluem a idade, genética, estado nutricional e duração da exposição ao organismo. De fato, alguns pacientes tendem a uma suscetibilidade maior, tendo em vista a prevalência de indivíduos imunossuprimidos, seja pelo uso de quimioterápicos, ou pela presença de doenças coexistentes como a AIDS, ou ainda em casos de pacientes transplantados. Nesse caso, o ambiente também influencia nessa suscetibilidade, seja através da presença de poluentes no ar, ou através de contaminantes despejados no meio ambiente e que acabam indo parar na alimentação humana (ALWARAWRAH; KIERNAN; MACIVER, 2018; CASADEVALL; PIROFSKI, 2018; RELMAN; LIPSITCH, 2018; SANCHEZ; DORON, 2016).

Os patógenos bacterianos usam estratégias comuns para estabelecerem infecções no hospedeiro. Essas estratégias são atualmente bem descritas e incluem adesão, invasão, patogenicidade aprimorada e evasão do sistema de defesa do organismo (MASCARETTI, 2014; MORENS; FOLKERS; FAUCI, 2004; WILSON et al., 2002). Após estabelecidas, as infecções bacterianas podem persistir no hospedeiro por longos períodos. Nessas infecções

denominadas persistentes, vários fatores contribuem para o seu estabelecimento e manutenção, podendo estimular o desenvolvimento de resistência aos antibióticos, tendo em vista que a persistência e resistência são adaptações evolutivas ao estresse, agindo de forma complementar (FISHER; GOLLAN; HELAINE, 2017; VOGWILL et al., 2016).

Dentre as células bacterianas persistentes com grande importância nessas infecções destacam-se *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (HARMS; MAISONNEUVE; GERDES, 2016; HELAINE; KUGELBERG, 2014; MICHIELS et al., 2016).

A bactéria Gram-positiva *S. aureus* ocorre majoritariamente como um comensal humano, presente principalmente nas fossas nasais, onde a partir desse sítio anatômico pode se disseminar facilmente no ambiente (POLLITT et al., 2018; VON EIFF et al., 2001). Estima-se que em torno de 30 a 40% das pessoas saudáveis são colonizadas por essa bactéria, mas não apresentam sintomas (CHAMBERS, 2001; RASMUSSEN et al., 2014; VON EIFF et al., 2001; ZAKAI, 2015).

*S. aureus* também é considerada um patógeno oportunista que causa infecções fatais quando presente na corrente sanguínea, com notável capacidade de colonizar superfícies como próteses e cateteres e, a partir destes se espalhar para outros sistemas do corpo, através do sistema circulatório (LOWY, 1998a). A incidência estimada de infecção na corrente sanguínea causada por esse patógeno é em média de 80 a 190 casos a cada 100.000 habitantes por ano, em países desenvolvidos (ARIAS et al., 2017; LAUPLAND, 2013; TALAN et al., 2011).

No ambiente hospitalar as infecções oportunistas por *S. aureus* são recorrentes e extremamente graves, sendo relatado que cerca de 20% das infecções que ocorrem no centro cirúrgico, são causadas por essa bactéria (BANBURY, 2003; LIMA et al., 2015). Por esse motivo, enquadra-se no grupo de patógenos ESKAPE, acrônimo representado as bactérias *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* e espécies do gênero *Enterobacter*, bactérias resistentes aos antibióticos, responsáveis por causar graves infecções nosocomiais no mundo (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016).

O sucesso nas infecções sistêmicas por *S. aureus* é garantido primordialmente pelos mecanismos de virulência consistindo na evasão do sistema imunológico humano, liberação de proteínas de superfície, secreção de enzimas e toxinas que danificam as membranas do hospedeiro (BUCHAN; FOSTER; RENSHAW, 2019; FOSTER et al., 2014; NAKAKIDO et

al., 2014; WANG; MUIR, 2016). Como consequência instalam-se as infecções que podem variar de lesões cutâneas superficiais, abscessos profundos, até sepse (CONLON, 2014; GORDON; LOWY, 2008; LOWY, 1998a).

Essa bactéria adquiriu grande importância médica, devido sua capacidade de adquirir resistência a múltiplos antibióticos, por diferentes vias moleculares (GE et al., 2017). Um exemplo clássico foi o surgimento de cepa de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), que suscita grande preocupação mundial, com ocorrência heterogênea na América Latina, variando de 6% na América Central a 80% em alguns países da América do Sul, incluindo Brasil (ARIAS et al., 2017; GUZMÁN-BLANCO et al., 2009; SEAS et al., 2018). MRSA tornou-se comum em hospitais, causando infecções nosocomiais graves e associadas à comunidade em todo o mundo, conferindo resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2009; MONECKE et al., 2011). Outro fator que a torna extensivamente citada é o fato de causar uma taxa de mortalidade três vezes maior do que a cepa sensível à meticilina (LIMA et al., 2015; ZHOU et al., 2018).

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista de patógenos prioritários, contendo as 12 famílias de bactérias mais ameaçadoras para humanos, com fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR), e *S. aureus* está incluída nessa lista (WHO, 2017).

Tendo em vista o surgimento dessa e de outras cepas resistentes, desenvolveu-se no Brasil alguns sistemas de vigilância epidemiológica (OLIVEIRA et al., 2019; PEREIRA-FRANCHI et al., 2019). Destacando-se o Plano de ação nacional para a prevenção e controle da resistência antimicrobiana no Brasil (PAN-BR), desenvolvido em 2018, elaborado com base nas medidas pré-estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde, visando monitorar, controlar e prevenir infecções por cepas resistentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Estima-se que as infecções causadas por bactérias MDR causem cerca de 700.000 mortes por ano (O'NEILL, 2014). A disseminação de patógenos resistentes iniciou-se por um número pequeno de linhagens que obtiveram êxito na adaptação, com uma sobrevivência bem sucedida no ambiente e no hospedeiro (DAI et al., 2019; KLEMM; WONG; DOUGAN, 2018; LOGAN; WEINSTEIN, 2017; PITOUT; DEVINNEY, 2017). O surgimento desse fenótipo pode ser explicado através da aquisição de genes de resistência aos antibióticos por ocorrência de mutação ou transferência horizontal de genes (*horizontal gene transfer*, HGT) (BAKER et al., 2018; GYLES; BOERLIN, 2014). Alguns fatores auxiliam para que as bactérias sejam mais

propensas a esse fenômeno, como apresentarem uma taxa elevada de mutações, ou possuírem genes potenciais que favorecem a evolução (BLOUNT et al., 2012; GIFFORD et al., 2018).

A resistência bacteriana pode ser intrínseca ou adquirida: intrínseca quando envolve características funcionais inerentes da bactéria, e quando esses mecanismos são codificados pelos próprios cromossomos bacterianos. A resistência adquirida, como o próprio termo indica, ocorre quando os mecanismos de resistência são adquiridos de outro micro-organismo ou do próprio meio, por transferência horizontal de genes, através da transformação, transdução e conjugação, em elementos genéticos móveis como plasmídeos (MUNITA; ARIAS, 2016; PONTES et al., 2018; VAN HOEK et al., 2011).

Existem vários tipos de mecanismos de resistência como: modificação, desvio e proteção do alvo, que pode ocorrer por mutações ou alterações pós-transcricionais (BLAIR et al., 2015; KUMAR et al., 2014; LIU et al., 2016); modificação ou degradação do antibiótico que pode ocorrer pela adição de grupos químicos e por enzimas, respectivamente (JACOBY, 2009; RAMIREZ; TOLMASKY, 2010); e prevenção de acesso ao alvo, que inclui a redução da permeabilidade da membrana e efluxo de drogas através de bombas de efluxo (KAATZ; SEO, 1995; LAVIGNE et al., 2013).

As bombas de efluxo são proteínas transmembranares que podem contribuir para esses dois tipos de resistência, a depender da proteína em questão. Na resistência intrínseca as bombas de efluxo geralmente são expressas constitutivamente. Já nos mecanismos adquiridos, as bombas de efluxo podem ser expressas a partir de genes transferidos através de elementos genéticos móveis, (MGEs, do inglês *mobile genetic elements*), como plasmídeos, pelo processo de transferência HGT (BLAIR et al., 2015; POOLE, 2014). As bombas de efluxo extrudem o antibiótico concentrado no citoplasma, reduzindo sua concentração no compartimento intracelular, realizando a extrusão de uma classe específica ou antibióticos quimicamente diferentes (ALEKSHUN; LEVY, 2007; COSTA et al., 2013).

Foi relatada a relação entre a presença de bombas de efluxo e o surgimento de persistentes bacterianos (PU et al., 2016; PU; KE; BAI, 2017). Tendo em vista a importância dessas proteínas para a manutenção da resistência e outras funções metabólicas bacterianas, esse mecanismo vem sendo um forte alvo de estudos no intuito de identificar inibidores de bombas de efluxo ou EPIs (*efflux pump inhibitor*) (KAPP et al., 2018; POOLE; LOMOVSKAYA, 2006). Essas moléculas são administradas com o antibiótico, com o intuito de impedir sua extrusão e elevar a sua concentração intracelular (MAHAMOUD et al., 2007; POOLE; LOMOVSKAYA, 2006).

Portanto, além de restaurar a suscetibilidade ao antibiótico e potencializar a ação deste, o EPI pode reduzir a ocorrência de persistentes, auxiliando no tratamento de infecções crônicas (LOMOVSKAYA; BOSTIAN, 2006; MONTEIRO; DE AQUINO; MENDONÇA JUNIOR, 2020; WRIGHT, 2000).

Paralelamente, para solucionar a crise causada pelo surgimento contínuo de patógenos resistentes, o desenvolvimento de novos antimicrobianos também se faz necessário, utilizando-se de novas abordagens para prever e prevenir a propagação do fenótipo MDR. Um verdadeiro desafio como relatado por Bell e MacLean (2018): a busca por antibióticos capazes de driblar os mecanismos de resistência, ao longo do processo evolutivo das bactérias (BAYM; STONE; KISHONY, 2016; SOMMER et al., 2017).

Nas últimas décadas, apenas algumas classes novas de antibióticos entraram na prática clínica. Esse fato decorre da diminuição nas pesquisas realizadas por empresas farmacêuticas, buscando por antibióticos com mecanismo de ação diferente, devido aos obstáculos enfrentados que desencorajam esses estudos, incluindo: a falta de retorno financeiro ao investimento inicial, devido a não comercialização dos antibióticos recém-aprovados, sendo mantidos em reserva até que os medicamentos vigentes não sejam mais eficazes devido ao desenvolvimento de resistência; efeitos adversos e colaterais detectados pelos requisitos regulamentares; o tempo de tratamento com antibióticos ser bem menor do que medicamentos prescritos para doenças crônicas como hipertensão, tornando esse investimento, menos lucrativo (FERNANDES; MARTENS, 2017).

As naftiridinas atraem um crescente interesse de estudos por apresentarem diversas atividades biológicas comprovadas, ou por fazerem parte da composição de substâncias já utilizadas, na prática clínica. As naftiridinas são compostos heterocíclicos formados por anéis aromáticos condensados, onde cada anel aromático apresentará um átomo de nitrogênio. Apresentam-se em seis isômeros, nomeados com base na posição do nitrogênio no sistema bicíclico (LITVINOV, 2006; LITVINOV; ROMAN; DYACHENKO, 2001).

Dentre todos os isômeros a 1,8-naftiridina e seus derivados, são os compostos que mais atraem o interesse dos pesquisadores, especificamente sobre suas propriedades biológicas e químicas. Fato esse, refletido na quantidade significativa de publicações de artigos de pesquisa, patentes e trabalhos de revisão, sobre esses compostos, que apresentam um amplo espectro de atividades biológicas e aplicações em várias áreas terapêuticas (CZUBA, 1979; LITVINOV; ROMAN; DYACHENKO, 2001; NORAVYAN; PARONIKYAN; VARTANYAN, 1985; SRIVASTAVA et al., 2007a).



Os estudos sobre 1,8-naftiridinas iniciaram-se através da síntese do ácido nalidíxico e sua atividade antibacteriana contra Gram-negativas causadoras de infecções do trato urinário (LESHER et al., 1962; THOMPSON; RAE, 1964). Dentre as atividades biológicas comprovadas pode-se citar antibacteriana (MADAAN et al., 2015), antiviral (HUANG et al., 2014; WANG et al., 2015), anticancerígena (AHMED; ALFOOTY; KHALIFAH, 2014), anti-inflamatória e analgésica (BLUM et al., 2010; DI BRACCIO et al., 2014; KURODA et al., 1992; MADAAN et al., 2013; ROMA et al., 2008) e antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* (SILVA et al., 2007).

Além das naftiridinas, deve-se ressaltar a importância de outras classes de substâncias como as sulfonamidas, conhecidas como sulfas. São uma classe de antibióticos que também apresentam uma ampla ação antibacteriana e são utilizadas na prática clínica contra diversas infecções causadas por Gram-positivas e Gram-negativas. Representam a classe mais antiga de antibióticos sintéticos, estando em uso clínico a mais 85 anos (BERMINGHAM; DERRICK, 2002; DOMAGK, 1935; HOLMES; LINDSAY GRAYSON, 2017; NASR; BONDOCK; EID, 2016).

Tendo em vista a eficácia apresentada pelas sulfonamidas, a gama de atividades biológicas comprovadas pelas 1,8-naftiridinas e sua composição em substâncias já utilizadas na prática clínica, seria relevante e inédita a união desses compostos e avaliação de sua ação como adjuvantes de antibióticos, especificamente na inibição de mecanismos de resistência como bombas de efluxo. Dessa forma, torna-se promissora a síntese de novos derivados 1,8-naftiridínicos com ação bioativa, bem como sua união com as sulfonamidas, que possivelmente conduz a potencialização de sua atividade biológica. Assim, o presente trabalho apresenta as possíveis atividades antibacteriana e inibidora de bombas de efluxo por 1,8-naftiridinas sulfonamídicas frente as cepas de *S. aureus*.

Após esse apanhado, a presente Tese está organizada em Introdução, Referencial teórico e Capítulos I, II e III. Os capítulos são referentes aos artigos publicados e aceitos, contendo os resultados obtidos no presente trabalho. Por fim apresenta as Referências e Anexos, este contendo a lista dos artigos publicados, aceitos e submetidos referentes à Tese; e a produção científica obtida durante o período de desenvolvimento da mesma.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana e inibidora de bombas de efluxo, *in vitro* e *in silico*, por 1,8-naftiridinas sulfonamídicas sintetizadas, sobre cepas de *S. aureus*.

### 1.1.2 Objetivos específicos

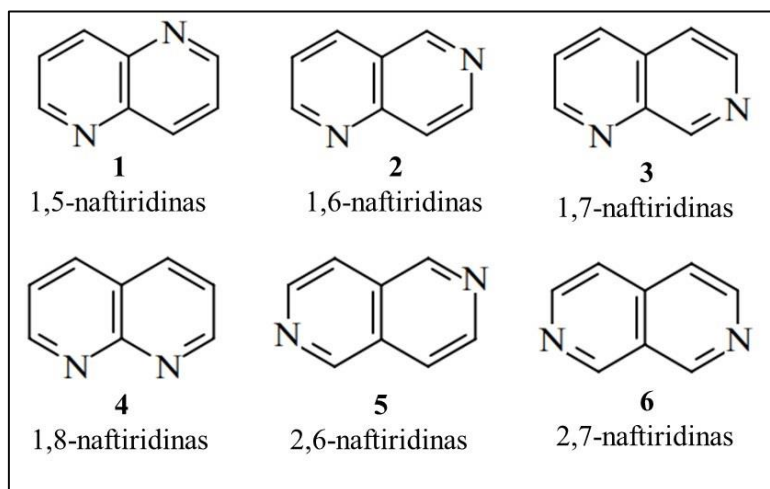
- Sintetizar 1,8-naftiridinas sulfonamídicas;
- Verificar a atividade antibacteriana desses compostos heterocíclicos, contra cepas de *S. aureus* resistentes;
- Investigar a ação inibidora das bombas de efluxo NorA, Tet(K), MsrA e MepA, pelas 1,8-naftiridinas sulfonamídicas;
- Determinar através de ensaios *in silico*, o perfil farmacocinético, previsões da bioatividade e avaliar o acoplamento desses compostos com as bombas de efluxo, para verificar a interação com essas proteínas e influência das naftiridinas no efeito inibitório de bomba de efluxo;
- Verificar a possível ocorrência de inibição dos sistemas de efluxo NorA e MepA pela medição da emissão de fluorescência do brometo de etídio.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 1,8-NAFTIRIDINAS SULFONAMÍDICAS

As naftiridinas consistem em um sistema heterocíclico de anéis aromáticos condensados, resultante da fusão de dois anéis de piridina, onde cada anel apresentará um átomo de nitrogênio. As naftiridinas também são denominadas de piridopiridinas, diazanaftalenos, porém, naftiridinas é o termo mais usual na literatura, para esses compostos sintéticos. Apresentam-se em seis subclasses de isômeros, nomeados com base na posição do nitrogênio no sistema bicíclico: 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,6- e 2,7-naftiridinas (**1–6**) (Figura 1). Esses seis sistemas isoméricos são divididos em dois grupos: 1,A-naftiridinas (sendo A = 5, 6, 7 ou 8) e 2,B-naftiridinas (sendo B = 6 ou 7) (LITVINOV, 2006; LITVINOV; ROMAN; DYACHENKO, 2001).

**Figura 1** – Representação estrutural dos isômeros naftiridínicos.



Fonte: o autor.

O primeiro derivado de naftiridina foi sintetizado em 1893 por Reissert, que também sugeriu essa denominação, e em seu estudo foi identificado como naftaleno, análogo da piridina (REISSERT, 1893). As primeiras naftiridinas não-substituídas 1,5-naftiridina e 1,8-naftiridina, foram preparadas em 1927 (BOBRAŃSKI; SUCHARDA, 1927; KOLLER, 1927a, 1927b, 1927c).

Dentre os seis isômeros apresentados, os derivados de 1,8-naftiridina são os que mais atraem o interesse dos pesquisadores em avaliar suas propriedades biológicas e químicas,

refletindo na quantidade significativa de publicações e patentes, sobre esse derivado de compostos heterocíclicos (BACHAND, 2002; DOMAGALA; MICH; NICHOLS, 1994). Também há diversas revisões de literatura, agrupando os estudos sobre síntese, propriedades físico-químicas, relação estrutura-atividade e ação farmacológica de derivados naftiridínicos (MADAAN et al., 2015; LITVINOV, 2001; 2004; 2006; LITVINOV; ROMAN; DYACHENKO, 2000). O empenho significativo de estudos concentrados na 1,8-naftiridina deve-se ao amplo espectro de atividades biológicas e suas aplicações em várias áreas terapêuticas, sendo o cerne do interesse em seu esqueleto, por estar presente em muitos isolados de substâncias naturais (CZUBA, 1979; LITVINOV; ROMAN; DYACHENKO, 2001; NORAVYAN; PARONIKYAN; VARTANYAN, 1985; SRIVASTAVA et al., 2007a).

As pesquisas sobre a atividade biológica das 1,8-naftiridinas iniciaram-se através da síntese do ácido nalidíxico (ácido 1-etil-7-metil-4-oxo-1,8-naftiridina-3-carboxílico de acordo com a IUPAC) e estudo de suas propriedades antibacterianas contra Gram-negativas causadoras de infecções do trato urinário (LESHER et al., 1962; THOMPSON; RAE, 1964). O ácido nalidíxico é uma quinolona sintética, que foi descoberto por Leshner e colaboradores como um subproduto destilado, durante a síntese do antimalárico cloroquina (LESHER et al., 1962). Essa descoberta abriu caminho para pesquisas mais extensas de outras atividades biológicas e no desenvolvimento de outros derivados possuindo a porção 1,8-naftiridina, sendo sintetizadas outras 1,8-naftiridinas substituídas, apresentando relevância terapêutica, tornando-se o núcleo mais amplamente investigado na química medicinal e que serão abordadas a seguir.

O potencial antibacteriano de 1,8-naftiridinas, é dentre todas, a ação biológica mais explorada e relatada na literatura até o momento. Por isso, por sua literatura ser extensa, ela pode ser categorizada em quatro grupos de acordo com a composição química dos derivados 1,8-naftiridínicos em: azetidínil quinolonas, ácidos piridona-carboxílicos, ácidos carboxílicos e derivados de tiazol (MADAAN et al., 2015). Dentre as azetidínil quinolonas destaca-se a E-4695, uma naftiridina fluorada com uma fração de azetidina, exibindo propriedades antibacterianas contra cocos Gram-positivos, dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, sendo sua resposta considerada mais eficiente do que a ciprofloxacina e ofloxacina. Também foi demonstrada sua ação frente Gram-negativos, como cepas da família Enterobacteriaceae e cepas de *Clostridium perfringens* e *Bacteroides fragilis*, além de apresentar significância em um modelo *in vivo* contra *S. pneumoniae* 29206 (GUINEA et al., 1995).

Dentre os ácidos piridonocarboxílicos destaca-se uma enoxacina, ou ácido AT-2266, uma fluoroquinolona com ação antimicrobiana com amplo espectro, frente Gram-positivos e Gram-negativos, mostrando-se ainda mais potente do que o ácido nalidíxico, mas com atividade semelhante à norfloxacin. O AT-2266 não mostrou resistência cruzada aos antibióticos além de inibir o crescimento da maioria das bactérias já resistentes ao ácido nalidíxico (MATSUMOTO et al., 1984; NAKAMURA et al., 1983a, 1983b).

Os ácidos carboxílicos apresentam um espectro de ação variado, como o DW286, um agente antibacteriano à base de fluoronaftiridona. DW286 demonstrou atividades contra bactérias *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. epidermidis* e *Enterococcus faecalis*, apresentando uma ação mais potente do que outras fluoroquinolonas como ciprofloxacina e gemifloxacina. Também se mostrou significativo frente a infecção sistêmica por *S. aureus* resistente à meticilina e *S. aureus* resistente à quinolona (QRSA, *Quinolone resistant Staphylococcus aureus*) em modelo *in vivo* (KIM; SHIN, 2004; YUN et al., 2002). Outros ácidos carboxílicos também foram eficientes, frente *Streptococcus pneumoniae* e *S. pneumoniae* resistentes a múltiplas drogas (HUANG et al., 2009, 2010).

O quarto grupo a ser categorizado na ação antibacteriana consiste em derivados de tiazol, cujo mecanismo de ação envolve a inibição da DNA-girase de uma cepa de *E. coli*, apresentando vantagens clínicas por apresentar baixa citotoxicidade, comparável nesse quesito, à ciprofloxacina (KONDO et al., 1990; OZAKI et al., 1996). Outros estudos abordaram a mesma temática (HAYAKAWA et al., 1984; SUZUKI, 1980; SUZUKI; TANAKA; DOHMORI, 1980; TANI; MUSHIKA; YAMAGUCHI, 1982).

A propriedade anticâncer também foi notavelmente comprovada para as 1,8-naftiridinas, sendo o derivado mais importante representando essa atividade a voreloxina, ou SNS-595, um estimulador da apoptose e inibidor do ciclo celular, que já está em fase clínica de experimentação, frente leucemia mieloide aguda e câncer de ovário (ABBAS; STUART, 2012; FREEMAN et al., 2013; MILLS; FEKRAZAD; VERSCHRAEGEN, 2008). Também apresentou efeitos citotóxicos nas linhagens de células cancerígenas: HL-60 da leucemia promielocítica aguda, CCRF-CEM da leucemia linfoblástica aguda e MV4-11, linhagem pertencente à leucemia mielocítica aguda (HAWTIN et al., 2010) e em 11 linhagens de células cancerígenas em modelos de tumor *in vitro* (HOCH et al., 2009).

Outras 1,8-naftiridinas substituídas em diferentes posições, apresentam atividades citotóxicas como: ação *in vitro* contra a linhagem celular P388 da leucemia, do tipo selvagem e resistente a amsacrina (ARGIROPOULOS et al., 1992); contra leucemia P388 *in vivo*, em

murinos; contra linhagens de células tumorais em modelos experimentais *in vitro* de tumores murinos e humano (TSUZUKI et al., 2004); contra linhagem de células MIA PaCa-2, do câncer de pâncreas (BANTI et al., 2009); contra a linhagem HCT116, do câncer de cólon humano (HWANG et al., 2012); contra a linhagem HeLa, do câncer cervical humano, HL-60 da leucemia e PC-3 do câncer de próstata (HWANG et al., 2013); inibição do crescimento em células de câncer de fígado, representada pela linhagem HepG2 (AHMED; ALFOOTY; KHALIFAH, 2014); linhagem MCF7 do câncer de mama (ELANSARY et al., 2014); contra células cancerosas SMMC-7721 do hepatoma humano e L1210 e HL60 da leucemia, além de mostrar a capacidade de inibição de crescimento das bactérias *S. aureus* MRSA e *E. coli* multirresistente, pelo derivado naftiridínico (GAO et al., 2015). Além de muitos outros renomados estudos da ação anticâncer (FU et al., 2015; KUMAR et al., 2009; SRIVASTAVA et al., 2007b).

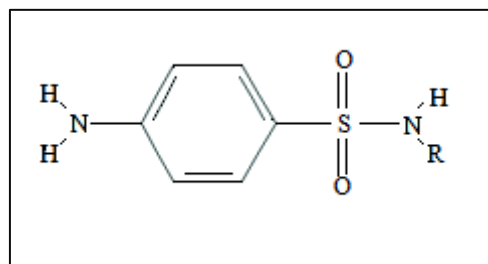
A atividade antiviral também foi comprovada para derivados de 1,8-naftiridina, com potencial anti-HIV, possuindo inclusive em alguns casos, atividade melhor do que atevirdina (OH; CHO, 1998); inibidores da ribonuclease H do HIV-1 (WILLIAMS et al., 2010) e agentes com ação anti-HCV (HUANG et al., 2014; WANG et al., 2015).

Outras atividades também foram relatadas como ação antialérgica (KREUTNER et al., 1988; KUO et al., 1988; SHERLOCK et al., 1988); anti-inflamatória e analgésica (BLUM et al., 2010; DI BRACCIO et al., 2014; KURODA et al., 1992; MADAAN et al., 2013; ROMA et al., 2008); anti-osteoporótico, em modelos *in vivo* de remodelação óssea (COLEMAN et al., 2004; HUTCHINSON et al., 2003; RABOISSON et al., 2007); broncodilatadora (SUZUKI et al., 1992); gastroprotetora, por ação antissecretória gástrica (DEDIEU-CHAUFOR et al., 1991; SANTILLI et al., 1987); antiparasitária, contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* (SILVA et al., 2007); propriedades antimaláricas (ADAMS et al., 1946; BARLIN; TAN, 1984); inibidora da acetilcolinesterase (BARREIRO et al., 2003); antidepressiva (DHAR et al., 2014; GAUTAM et al., 2013; MAHESH et al., 2014); anticonvulsivante (LEONARD et al., 2002); anti-hipertensiva (BADAWNEH et al., 2001; FERRARINI et al., 1998) e inibidora da agregação plaquetária (FERRARINI et al., 1997, 2000, 2001).

Além das 1,8-naftiridinas, deve-se mencionar uma classe importante de substâncias que são as sulfonamidas, compostos altamente eficientes na ação antibacteriana, mas com estrutura química e mecanismos de ação distintos da classe anterior. As sulfonamidas constituem a classe mais antiga de antibióticos sintéticos, estando em uso clínico a mais 85 anos, com eficácia comprovada contra muitas infecções microbianas, sendo amplamente empregadas na prática

clínica (BERMINGHAM; DERRICK, 2002; DOMAGK, 1935; NASR; BONDOCK; EID, 2016). Destacam-se por sua ação antibacteriana de amplo espectro, estendendo-se desde o tratamento de infecções agudas e crônicas, contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas, além de não interferir nos mecanismos de defesa do hospedeiro (Figura 2) (ANAND, 1975; HOLMES; LINDSAY GRAYSON, 2017). Apresentam uma ação bacteriostática, onde a parte ativa da molécula é a sulfanilamida (FOUTS; KAMM; BRODIE, 1957; TREFOUEL; NITTI; BOVET, 1935).

**Figura 2** – Representação estrutural das sulfonamidas.



Fonte: o autor.

Atuam como inibidores competitivos do ácido *p*-aminobenzóico (PABA) devido à sua semelhança estrutural e molecular, inibindo a ligação do PABA à enzima dihidropteroato sintase (DHPS). Essa enzima catalisa a biossíntese do ácido fólico de micro-organismos, a partir do PABA e pirofosfato de dihidropteridina ou *dihydropteridine pyrophosphate* (DHPP), portanto, as sulfonamidas interferem na síntese do ácido fólico. Termo geralmente empregado para se referir ao tetrahidrofolato, o ácido fólico é um componente essencial necessário para a síntese de DNA e RNA nas bactérias, e a interrupção de sua biossíntese pelas sulfonamidas, compromete diretamente a capacidade de crescimento dos micro-organismos (ARGYROPOULOU et al., 2009; GOULIAN et al., 1986; ROLAND et al., 1979; SEYDEL, 1968). Em contrapartida, os eucariotos superiores obtêm o ácido fólico a partir da dieta, de modo que as sulfonamidas não interferem no metabolismo humano e sua toxicidade é seletiva para os micro-organismos (BERMINGHAM; DERRICK, 2002; WOODS, 1940).

Essa classe de medicamentos, possui diversas ações biológicas além de antibacteriana, como anticonvulsivante (THIRY et al., 2008), anticâncer (CASINI et al., 2005; SCOZZAFAVA et al., 2003; SUPURAN, 2017), antiviral (FORSTER, 1940; HAMRE; RAKE, 1947; HIRSCHFELDER, 1939; SCOZZAFAVA et al., 2003), antiprotozoária (COGGESHALL, 1940; GOLDBERGER, 1942; RODANICHE; KIRSNER, 1942; SABIN;

WARREN, 1942; SENEKJI, 1940), diurética (PRANDOTA, 2002), hipoglicêmica (BOYD, 1988) e anti-inflamatória (SHOAIB AHMAD SHAH; RIVERA; ASHFAQ, 2012).

Dessa forma, as 1,8-naftiridinas e as sulfonamidas atraem um crescente interesse de pesquisadores por apresentarem diversas atividades biológicas comprovadas, ou por fazerem parte da composição de substâncias já utilizadas na prática clínica. Com isso, torna-se promissora a síntese de novos derivados naftiridínicos com ações bioativas, ao unir essas duas classes de compostos através da substituição de radicais, conduzindo a uma possível potencialização desses compostos.

## 2.2 *Staphylococcus aureus*

### 2.2.1 Características gerais

O gênero *Staphylococcus* é pertencente à família Staphylococcaceae (HOLT et al., 1994; SCHLEIFER et al., 2009; ONDUSKO; NOLT, 2018). Existem 33 espécies e oito subespécies no gênero, sendo que 17 delas fazem parte da microbiota natural da pele humana e de outras regiões anatômicas. Dentre essas espécies, destaca-se *Staphylococcus aureus* por ser a espécie de maior interesse médico, em particular devido às infecções nosocomiais, que estão relacionadas com diversos subtipos de infecções (PARLET; BROWN; HORSWILL, 2019; MEDEIROS, 2005; ONDUSKO; NOLT, 2018).

A bactéria *S. aureus* foi descrita pela primeira vez em 1880, pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston, em abscessos cirúrgicos. As características fenotípicas mais importantes de *S. aureus* incluem: um micro-organismo anaeróbico facultativo, crescendo por fermentação ou respiração aeróbica; imóvel e não esporulado; considerado Gram-positivo, em formato de cocos formadores de colônias; a fermentação da glicose produz principalmente ácido lático; fermenta manitol; é coagulase e catalase positivo; colônia de coloração amarela ou dourada em ágar (KLOOS; MUSSELWHITE, 1975; WILKINSON, 1997). Além disso, estafilococos apresentam resistência ao calor e toleram altas concentrações de sal (DOS SANTOS et al., 2007; KLOOS; LAMBE 1991; ONDUSKO; NOLT, 2018).

Medindo de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, os cocos individuais de *S. aureus* se dividem em mais de um plano, se apresentando de diversas formas como aos pares, isolados, em cadeias curtas, ou em agrupados, formando um aspecto de cacho de uvas (CASSETTARI;



STRABELLI; MEDEIROS, 2005; TRABULSI; ALTHERTHUM, 2005). O seu genoma possui um tamanho médio de 2,8 Mb (KURODA et al., 2001).

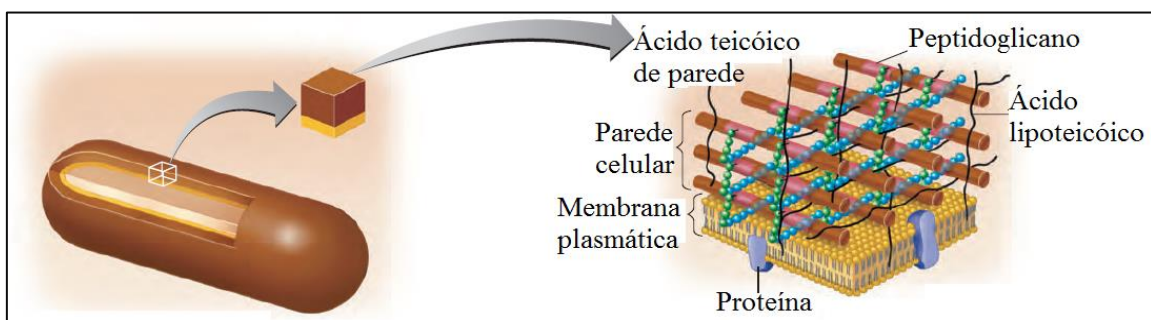
O nome da espécie é assim denominado, pois, suas colônias apresentam uma cor dourada quando cultivadas em meio sólido, variando até o acinzentado, diferenciando-se das espécies coagulase negativas como *S. epidermidis*, que formam colônias brancas, translúcidas ou pálidas (HOWARD; KLOOS, 1987).

Os nutrientes requisitados para seu crescimento, consiste em uma fonte orgânica de nitrogênio, fornecida por 5 a 12 aminoácidos essenciais como valina, arginina e vitaminas do complexo B, como a nicotinamida e tiamina (KLOOS; SCHLEIFER, 1986; WILKINSON, 1997).

Na sua parede celular, *S. aureus* apresenta diversas moléculas que são antigênicas, induzindo a resposta do sistema imune, destacando-se ácido teicóico e lipoteicóico, proteína A, adesinas e a cápsula, apesar de geralmente não apresentarem este último componente (KNOX; WICKEN, 1973; LUTZ et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2001). A parede celular de *S. aureus* é uma camada resistente, amorfa, com cerca de 20 a 40 nm de espessura, protegendo a membrana celular e o citoplasma, suportando a alta pressão osmótica interna dos estafilococos (PASQUINA-LEMONCHE et al., 2020; SHOCKMAN; BARREN, 1983; WILKINSON, 1997).

O componente básico da parede celular é o peptidoglicano, que compõe 50% da sua massa (WALDVOGEL, 1990). Outro constituinte da parede celular é o ácido teicóico, um grupo de polímeros contendo fosfato, apresentando-se de duas formas: o ácido teicóico da parede celular, que é covalentemente ligado ao peptidoglicano, fazendo ligação apenas entre as cadeias polissacarídicas da parede; e ácido lipoteicóico, ancorado na membrana lipídica, fazendo a ligação entre a membrana plasmática e a parede celular (Figura 3) (KNOX; WICKEN, 1973).

**Figura 3** – Parede celular de bactéria Gram-positiva.



Fonte: adaptado de Tortora, Funke e Case (2012).

O peptidoglicano e o ácido teicóico juntos representam cerca de 90% do peso da parede celular, o restante é composto por proteínas de superfície e hidrolases de peptidoglicano, também denominadas autolisinas. Os ácidos teicóicos são responsáveis por fornecer uma carga negativa na superfície celular, desempenhando um papel importante na localização de íons metálicos, especificamente cátions bivalentes, regular a atividades de enzimas autolíticas, promover a adesão das bactérias ao hospedeiro e são determinantes da virulência (O'RIORDAN; LEE, 2004; THAKKER et al., 1998).

### 2.2.2 Crescimento e identificação

As cepas de *S. aureus* podem crescer em meios como caldo ou ágar simples, em uma temperatura ótima de 37 °C, ou em um intervalo de temperaturas entre 18 °C e 40 °C e um pH = 7. As colônias formadas em placa com meio sólido, após 18–24 horas de incubação, apresentam-se arredondadas, de superfície lisa e brilhante. A pigmentação amarelada vai aumentando com o passar do tempo de incubação, porém, não apresenta pigmentação na cultura em caldo ou em condições anaeróbicas (KONEMAN et al., 2001; TRABULSI; ALTHERTHUM, 2005).

Uma das formas de identificação dessa bactéria ocorre através do crescimento em meio de cultura, como o ágar manitol-sal, seletivo para essa espécie, onde ela fermenta o manitol, sendo produzido o ácido láctico, distinguindo-a de *S. epidermidis*. Também é possível identificá-la em ágar sangue, onde se desenvolve um halo de hemólise em torno das colônias formadas (KONEMAN et al., 2001; TRABULSI; ALTHERTHUM, 2005).

Os testes típicos de identificação bioquímica incluem coagulase positiva, para distingui-la de outras espécies do gênero *Staphylococcus*; catalase positiva, para distingui-la das espécies patogênicas desse gênero; e sensibilidade à novobiocina, para distinguir de *S. saprophyticus* (CASSETTARI; STRABELLI; MEDEIROS, 2005; LOWY, 1998b; RASIGADE; VANDENESCH, 2014).

O crescimento e a sobrevivência das bactérias dependem da sua capacidade de adaptação às mudanças ambientais. *S. aureus* desenvolveu muitos mecanismos para se adaptar, favorecendo seu crescimento em uma infecção. Essa espécie pode permanecer viável por períodos prolongados em partículas de poeira, mesmo após exposta ao frio e dessecação. É encontrada no ambiente e na flora normal do ser humano, este sendo seu principal reservatório, localizando-se na pele e mucosas como nasofaringe, garganta, uretra, vagina e trato

gastrointestinal (LOWY, 1998; KAHL; BECKER; LÖFFLER, 2016). As fossas nasais são os sítios anatômicos onde está mais presente, com prevalência média de 40% em adultos, sendo esses sítios a fonte mais importante de disseminação (CARVALHO et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2005; IARIA; FURLANETTO; CAMPOS, 1980; VON EIFF et al., 2001).

### 2.2.3 Infectividade

Essa bactéria normalmente não causa infecção no organismo saudável, e as infecções locais são pequenas e sem risco de vida. No entanto, se as barreiras naturais forem rompidas, como em cirurgias ou traumas, sua entrada é facilitada na corrente sanguínea ou nos tecidos internos, alcançando outras partes da mucosa e da pele, causando uma variedade de infecções graves (LOWY, 1998b; ROBERTS; CHAMBERS, 2005; VELÁZQUEZ-MEZA, 2005).

A reprodução de *S. aureus* na mucosa nasal é assintomática, porém, representa um risco de importância clínica quando um hospedeiro assintomático contamina outros indivíduos, transmitindo por contato direto ou através de disseminação aérea (CARVALHO et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2005; RASIGADE; VANDENESCH, 2014; REAGAN et al., 1991).

Em hospitais, principalmente em berçários e unidade de terapia intensiva (UTI) são necessários diversos protocolos para evitar contaminação em pacientes de risco. Há certas condições ou comportamentos subjacentes que predisõem indivíduos a infecções estafilocócicas, incluindo pacientes com queimaduras ou em diálise, diabéticos, uso de drogas e cateteres intravenosos e pacientes HIV-positivos (CLUFF; REYNOLDS, 1965; MALANOSKI et al., 1995; MATHEW et al., 1995).

Dessa forma, deve-se destacar o uso de cateteres endovenosos como um grande fator de risco para o desenvolvimento de infecção por *S. aureus*. Através do cateter, a bactéria pode migrar pelos vasos sanguíneos, podendo gerar quadros de bacteremia com complicações, caso a infecção ocorra por *S. aureus* resistente à metilina, dificultando o tratamento (GOSBELL, 2005; JACOBSON; GELLERMANN; CHAMBERS, 1988). Essa bactéria também pode formar estruturas altamente organizadas como biofilmes, em superfícies de próteses e cateteres, ou seja, locais onde o antibiótico não alcança (DAVIS, 2005).

### 2.2.4 Patogenicidade

Em relação ao seu grau de patogenicidade, ou seja, a capacidade desse agente biológico em causar doenças, *S. aureus* é responsável pelas infecções mais comuns, incluindo: bacteremia, abscessos cutâneos, síndrome da pele escaldada, síndrome do choque tóxico, intoxicação alimentar, infecções pulmonares como pneumonia e empiema, artrite séptica, infecções de próteses ósseas, meningite, gastroenterite, infecções do trato urinário e peritonite decorrente da diálise peritoneal contínua (TONG et al., 2015).

Em *S. aureus* as infecções ocorrem especificamente em tecidos moles e na pele, atingindo desde regiões superficiais até a circulação. A bacteremia pode desencadear outras infecções em diferentes órgãos e sistemas do corpo, como osteomielites, endocardites, piodartrites, peritonite e formação de abscessos metastáticos em tecidos dos pulmões, rins, fígado e cérebro (CARVALHO et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2005; MCGUIRE; BOYD; WOODS, 2020). De acordo com o sítio anatômico infectado, a infecção pode ter diferentes denominações como carbúnculo e furúnculo, quando localizada na região cervical posterior; foliculite, no folículo piloso; hidradenite, nas glândulas sudoríparas e hordéolo ou terçol, no olho (ANDRIOLO, 2005; CARVALHO et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2005).

A patogênese da infecção por *S. aureus* envolve cinco estágios diferentes, que são: (1) colonização, (2) infecção local, (3) disseminação sistêmica e/ou sepse, (4) infecção metastática e (5) toxiose (ARCHER, 1998; GNANAMANI; HARIHARAN; PAUL-SATYASEELA, 2017).

## **2.2.5 Virulência**

O potencial de patogenicidade e de colonizar o hospedeiro por *S. aureus* é determinado por fatores de virulência que são classificados por sua função e etapa de ação. São três os principais fatores de virulência: fatores de adesão, fatores relacionados com a inibição do sistema imune e os que favorecem a invasão nas células (JENUL; HORSWILL, 2019).

### **2.2.5.1 Fatores de adesão**

O processo de invasão de *S. aureus* inicia-se através de sua adesão na pele e mucosa, e rompimento das ligações intercelulares, como junções de aderência e desmossomos (IWATSUKI et al., 2006). Dentre os fatores de adesão, destaca-se o ácido teicóico da parede celular e proteínas de superfície, como adesinas específicas (WEIDENMAIER et al., 2004;

WINSTEL et al., 2015). Essas adesinas são expressas exclusivamente na parede celular de *S. aureus*, interagindo com as proteínas da matriz extracelular (MEC) do hospedeiro.

Várias adesinas foram caracterizadas bioquimicamente e descritas como a proteína de ligação ao fibrinogênio, proteína de ligação à fibronectina e proteína de ligação ao colágeno, vitronectina e laminina (FOSTER et al., 2014; FOSTER; MCDEVITT, 1994; FRANÇOIS et al., 1996).

As adesinas são designadas como MSCRAMMs (componentes microbianos de superfície que reconhecem moléculas da matriz adesiva) do inglês *microbial surface components recognising adhesive matrix molecules* (MAZMANIAN et al., 1999; NAVARRE; SCHNEEWIND, 1994; PATTI et al., 1994).

A implantação de biomaterial no corpo humano aumenta a suscetibilidade à infecção. Após o implante do biomaterial no organismo, ocorre o revestimento de sua superfície, através da migração e fixação de proteínas da matriz extracelular, células hospedeiras e bactérias como *S. aureus*. Esse processo é conceituado como “corrida para a superfície”, travada entre as células do hospedeiro e as bactérias (ARCIOLA; CAMPOCCIA; MONTANARO, 2018; BUSSCHER et al., 2012).

Nesta corrida, se as células como fibroblastos chegarem à superfície do biomaterial, encontrarão uma área desimpedida, estabelecendo ligações seguras. As bactérias que vierem a seguir, encontrarão uma superfície celular integrada e viva, que através de mecanismos funcionais de defesa, poderá resistir a fixação bacteriana (BAIER et al., 1984; BUSSCHER et al., 2012; GRISTINA, 1994).

No entanto, através de mecanismos de adesão por MSCRAMMs, *S. aureus* poderá aderir às proteínas da MEC depositadas na superfície do biomaterial (HERRMANN et al., 1993). Uma vez que *S. aureus* estabelece-se como colonizadora em uma superfície, as células do hospedeiro são incapazes de deslocá-la, levando à formação de um biofilme e à infecção. Dentre as etapas de formação do biofilme destaca-se a adesão bacteriana, síntese de polissacarídeos extracelulares pelas bactérias agregadas em microcolônias, evoluindo em seguida para uma matriz tridimensional, com canais internos (MAIKRANZ et al., 2020; TRAMPUZ et al., 2003).

#### 2.2.5.2 Fatores de evasão do sistema imune

Uma vez que ocorre a invasão do epitélio humano, esses micro-organismos utilizam-se de diversas estratégias que lhes permitem sobreviver, proliferar e persistir no hospedeiro. *S.*

*aureus* libera toxinas que agem como superantígenos, onde sua expressão no hospedeiro infectado impedirá o desenvolvimento de uma resposta imune normal (LLEWELYN; COHEN, 2002). Nesse caso, são fatores de virulência que evitam a opsonização pelo sistema complemento (DE HAAS et al., 2004), inibem da quimiotaxia de neutrófilos (CHAVAKIS et al., 2002), neutralizam a fagocitose (GRESHAM et al., 2000) e a resposta imune humoral e celular (FOSTER, 2005; FOSTER; MCDEVITT, 1994; LEE et al., 2002). Enquadram-se nesse grupo as exoproteínas, como lipases, proteína A e polissacarídeos capsulares (FEDTKE; GÖTZ; PESCHEL, 2004; FLANNAGAN; HEIT; HEINRICHS, 2015; FOSTER, 2005; GRUMANN; NÜBEL; BRÖKER, 2014).

As exotoxinas e enzimas liberadas por *S. aureus*, podem causar diversas doenças cutâneas e infecções sistêmicas específicas, incluindo as enterotoxinas estafilocócicas (EE) A–E, G–J, K, L, M, O e P, cuja ingestão em alimentos contaminados é responsável pela intoxicação alimentar (CARVALHO et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2005; TAM; TORRES, 2019).

Outra exotoxina consiste na toxina 1 da síndrome do choque tóxico, do inglês *TSS toxin-1* (TSST-1). Como o nome indica, é um superantígeno responsável pela síndrome do choque tóxico, do inglês *toxic shock syndrome* (TSS). É muitas vezes confundida com o choque séptico, porém, a TSS manifesta-se de formas específicas, através de descamações nos pés e mãos, hiperemia conjuntival e faríngea, exantema, comprometimento muscular, insuficiência renal e sintomas gastrointestinais (DEVRIES et al., 2011; DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; LAPPIN; FERGUSON, 2009). Enquanto isso, as toxinas esfoliativas A e B, *exfoliative toxin* (ET), estão associadas à síndrome da pele escaldada estafilocócica, do inglês *staphylococcal scalded skin syndrome* (SSSS), que, manifesta-se através do eritema escarlatiniforme, necrólise epidérmica tóxica e impetigo bolhoso, os quais danificam a camada epidérmica da pele (HOWARD; KLOOS, 1987; LADHANI et al., 1999; PROJAN; NOVICK, 1997).

#### 2.2.5.3 Fatores relacionados com a invasão na célula do hospedeiro

Por fim, os fatores de virulência que favorecem a invasão nas células, penetração nos tecidos e aderência em superfícies de prótese e cateteres por *S. aureus*, incluem as toxinas como hemolisinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  (VELÁZQUEZ-MEZA, 2005). Há também as citotoxinas e enzimas que realizam a conversão dos tecidos dos hospedeiros em nutrientes necessários ao crescimento bacteriano, como nucleases, lipases, toxinas hemolíticas, proteases, colagenases e

hialuronidases (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000). E outras toxinas com potencial patogênico, incluindo  $\beta$ -lactamases e catalases (ANDRIOLO, 2005; BUSH; JACOBY, 2010).

Quem coordena a expressão dos genes codificadores de exotoxinas e todos os determinantes de virulência, são os reguladores. *S. aureus* possui três reguladores bem caracterizados: o *agr* (RECSEI et al., 1986), *sar* (CHEUNG et al., 1992) e *sae* (GIRAUDO et al., 1994; GIRAUDO; CHEUNG; NAGEL, 1997). O *agr* ou regulador de genes acessórios, do inglês *accessory gene regulator*, regula a produção de TSST-1, enterotoxina B, C e protease V8 (*sspA*); e regula negativamente a síntese de proteínas de ligação à fibronectina e proteínas de ligação ao fibrinogênio, durante a fase de crescimento pós-exponencial e estacionária (FOSTER et al., 1990; LINDBERG et al., 1990; SCHWARZ-LINEK; HÖÖK; POTTS, 2006).

Dessa forma, observa-se que *S. aureus* é um patógeno de importância crescente, não apenas por causar uma variedade de infecções e manifestações clínicas, mas também devido ao aumento da sua resistência aos antibióticos (CHANG; LEE; LEE, 2020; TONG et al., 2015). O tratamento contra essas infecções, continua sendo um desafio, devido ao surgimento de cepas resistentes a vários medicamentos, como a cepa de *S. aureus* MRSA (LEE et al., 2018; STRYJEWSKI; COREY, 2014; TURNER et al., 2019). Dessa forma, muitos estudos têm como foco o desenvolvimento e caracterização de diversos agentes que, além de possuírem ação antibacteriana, possam driblar a resistência de *S. aureus*.

### 2.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência aos antibióticos pode ser denominada, em termos bioquímicos, como a incapacidade de um antibiótico de atingir seu alvo bacteriano, em uma concentração que anteriormente seria adequada para inibir a atividade desse alvo. O surgimento da resistência aos antibióticos é promovido pela liberação de antibióticos no meio ambiente; seu uso excessivo e inadequado por automedicação, uso em infecções não bacterianas, como resfriados e outras infecções virais; aplicação de antibióticos em animais, propagando bactérias resistentes, através de múltiplas rotas de transferência como a água, alimentos e aplicação de adubo no solo (MARSHALL; LEVY, 2011; WRIGHT, 2010a). Esses fatores fornecem condições ideais para cepas bacterianas menos suscetíveis sobreviverem, serem selecionadas, adaptarem-se, desenvolverem resistência e serem propagadas através da cadeia alimentar (ALCOCK et al., 2020; AMINOV; MACKIE, 2007; D’COSTA; GRIFFITHS; WRIGHT, 2007; SILBERGELD; GRAHAM; PRICE, 2008).

A resistência dos micro-organismos a diferentes agentes pode ser de duas naturezas distintas: resistência intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca deve-se às características funcionais ou estruturais que já são inerentes da própria bactéria. Mecanismos intrínsecos são codificados por cromossomos e incluem as enzimas inativadoras de antibióticos, bombas de efluxo inespecíficas e barreira da permeabilidade, envolvendo composição da membrana de Gram-positivas e Gram-negativas. Os mecanismos intrínsecos conferem uma resistência mais baixa, todavia em hospedeiros imunocomprometidos, as bactérias podem facilmente tornarem-se patógenos oportunistas (COX; WRIGHT, 2013; FAJARDO et al., 2008; PONTES et al., 2018; WRIGHT, 2007).

Por outro lado, os mecanismos de resistência adquiridos, são obtidos por transferência horizontal de genes, em elementos genéticos móveis como plasmídeos. Incluem outra categoria de bombas de efluxo com substratos mais específicos e que são codificadas por plasmídeo. Neste grupo, também estão inclusos os mecanismos de inativação por enzimas, que modificam o antibiótico ou seu alvo (VAN HOEK et al., 2011). Como os elementos de transferência de genes podem ser facilmente disseminados entre os micro-organismos, estes mecanismos representam um grande risco no avanço rápido e descontrolado da resistência bacteriana (DANTAS; SOMMER, 2012; MARTÍNEZ, 2018).

Dentro desse escopo, existem duas maneiras principais de resistência, que são diminuir a afinidade do alvo pelo antibiótico, por mutação dos genes que codificam o alvo ou modificação pós-traducional; e diminuir a concentração ativa do antibiótico no interior da célula, por hidrólise, modificação ou efluxo. Por essa razão, os mecanismos de resistência podem se agrupar nas seguintes categorias gerais: mecanismos de modificação, desvio e proteção do alvo; modificação ou degradação de antibióticos; e prevenção de acesso ao alvo, por efluxo do antibiótico ou por diminuição da permeabilidade da parede celular (BLAIR et al., 2015; PETERSON; KAUR, 2018; WRIGHT, 2011) (Figura 4).

### **2.3.1 Mecanismos de modificação, desvio e proteção do alvo**

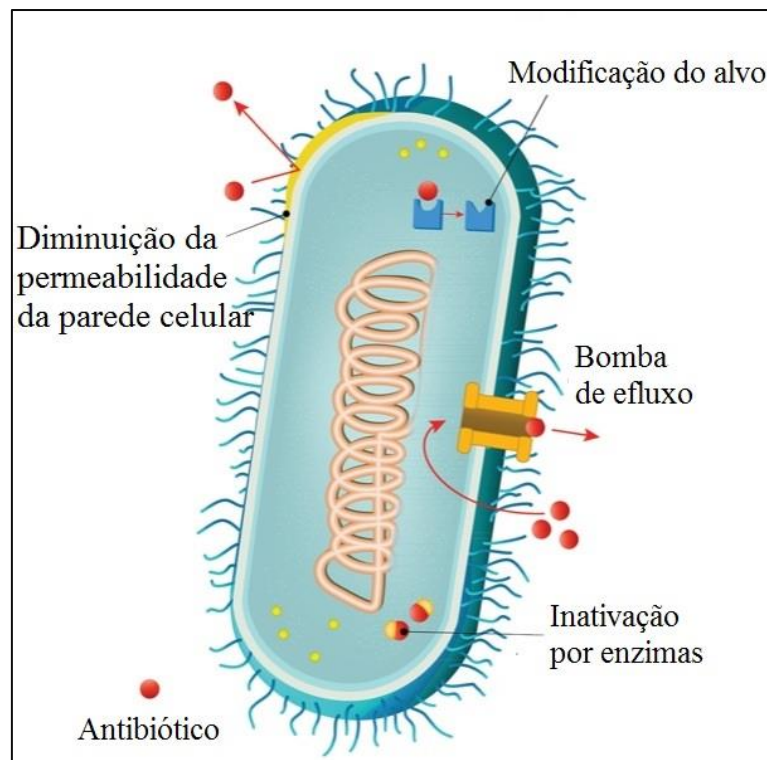
#### **2.3.1.1 Alterações no alvo por mutação**

Nessa categoria se enquadram dois subtipos de mecanismos de resistência: alterações no alvo por mutação e a modificação ou proteção do alvo. As alterações na estrutura do alvo do antibiótico, impedem a ligação eficiente de antibióticos e sua ação, mas não alteram a



funcionalidade do alvo. A transformação é uma das formas de obtenção desse mecanismo de resistência, ou seja, a captação de DNA do meio ambiente leva à formação de mosaicos genéticos e modificação da proteína alvo original. É o que acontece no exemplo clássico de resistência à penicilina em *S. pneumoniae*, onde o mosaicismo leva a codificação da proteína de ligação à penicilina (*penicillin binding protein*, PBP), insensível à penicilina (BLAIR et al., 2015).

**Figura 4** – Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos.



Fonte: adaptado de Nicolsen e Stang (2019).

Outro exemplo clássico envolvendo as PBPs pode ser visto nas cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina. Os  $\beta$ -lactâmicos ligam-se às PBPs, proteínas que sintetizam o peptidoglicano da parede celular, e ao se ligarem a essas proteínas, impedem a biossíntese da parede, levando à lise bacteriana. A resistência ocorre pela aquisição do gene *mecA* que está inserido em um elemento genético móvel, o cassete cromossômico estafilocócico *mec* ou *staphylococcal chromosomal cassettes mec* (SCC*mec*). O *mecA* codifica a PBP2a, uma PBP adicional que é funcional e, ao mesmo tempo, insensível aos  $\beta$ -lactâmicos. Como a PBP2a, não contém atividade transglicosilase, a PBP2 nativa ainda permanecerá atuando na reticulação necessária para a formação da parede celular, agindo ambas em conjunto. Por esse motivo, a

presença do gene *mecA* é considerada a característica definidora de MRSA (FISHOVITZ et al., 2014; KATAYAMA; ITO; HIRAMATSU, 2000; LIU et al., 2016).

### 2.3.1.2 Modificação e proteção do alvo

O segundo mecanismo de resistência consiste na modificação e proteção do alvo, um mecanismo eficiente de resistência que não requer mutações nos genes codificadores das moléculas alvo, mas ocorre através de alterações pós-transcricionais e, em alguns casos, acompanha a ação de enzimas. Como exemplo dessa estratégia de resistência, destaca-se a enzima eritromicina ribossomo metilase (Erm), que metila a subunidade 23S do rRNA, na posição A2058, o alvo da eritromicina. Essa modificação reduz a afinidade da eritromicina por seu alvo, impedindo também a ligação de outros antibióticos como macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B, devido à resistência cruzada, conferindo o fenótipo MLS<sub>B</sub> (KUMAR et al., 2014; VESTER; DOUTHWAITE, 2001; WEISBLUM, 1995). Enquanto isso, a enzima metiltransferase Cfr, metila sítios do 23S no rRNA, conferindo resistência ao cloranfenicol, florfenicol, lincosamidas e estreptograminas (KEHRENBERG et al., 2005; LONG et al., 2006; ROBERTS et al., 1999).

No caso dos glicopeptídeos que agem através da associação com precursores de peptidoglicanos inibindo assim a transpeptidação e a transglicosilação da parede celular, a resistência ocorre por alterações do precursor, no resíduo de aminoácido do peptidoglicano, levando a uma redução da afinidade e inibindo a ligação dos glicopeptídeos (BILLOT-KLEIN et al., 1994; BINDA; MARINELLI; MARCONE, 2014; BUGG et al., 1991).

Esse mecanismo também ocorre como resistência frente quinolonas. Essa classe de antibióticos tem como alvo a topoisomerase necessária para desenovelamento e replicação do DNA, formando o complexo topoisomerase-quinolona. Porém, a família de genes bacterianos *qnr* codificam as proteínas de repetição de pentapeptídeo (PRPs), que protegem a topoisomerase através da interação da PRP com o complexo topoisomerase-quinolona, onde essa interação promove a liberação da quinolona e resgate da topoisomerase para que esta complete sua atividade normalmente (VETTING et al., 2011).

A resistência aos aminoglicosídeos ocorre pela 16S rRNA metiltransferase, que metila resíduos dessa subunidade do ribossomo, inibindo a ligação dos aminoglicosídeos ao ribossomo e permitindo que a síntese proteica ocorra normalmente (SHAKIL et al., 2008). Os genes que codificam a enzima metiltransferase como é o caso do gene *armA*, foram evidenciados em

isolados clínicos de Enterobacteriaceae (FRITSCHÉ et al., 2008; HIDALGO et al., 2013; SAVIC et al., 2009). Outros mecanismos envolvem a produção de novos alvos que possuem baixa afinidade com o antibiótico, impedindo a ação deste sobre o alvo já existente. Isso envolve síntese alternativa de RNA polimerase, ácido graxo e subunidades de DNA-girase adicional, todos insensíveis à ação do antibiótico (BLANCO; HARDISSON; SALAS, 1984).

### **2.3.2 Modificação ou degradação de antibióticos**

#### **2.3.2.1 Inativação do antibiótico por hidrólise**

Uma forma eficiente em driblar a ação antibiótica, consiste na modificação direta e inativação do antibiótico, que pode ocorrer de duas maneiras: por hidrólise, ou por transferência de um grupo químico. São diversas as enzimas que catalisam modificações no antibiótico e que o hidrolisam, como as  $\beta$ -lactamases (ABRAHAM; CHAIN, 1940). A diversificação de antibióticos e utilização de derivados com ação melhorada, estimulou o surgimento de enzimas hidrolíticas com espectro de ação estendido. Com efeito, enquanto os  $\beta$ -lactâmicos de primeira geração eram hidrolisados por  $\beta$ -lactamases iniciais, foram surgindo  $\beta$ -lactamases de espectro estendido, do inglês *extended-spectrum beta-lactamase* (ESBLs), causando resistência a todos os antibióticos dessa classe (JOHNSON; WOODFORD, 2013; LYNCH; CLARK; ZHANEL, 2013).

Os genes de  $\beta$ -lactamases são obtidos principalmente por elementos genéticos móveis, resultando em alta expressão da proteína e altos níveis de resistência pela bactéria, mas também esses genes podem ser encontrados nos cromossomos dos membros da família Enterobacteriaceae, funcionando apenas como genes silenciosos (DANTAS; SOMMER, 2012; JACOBY, 2009). Esses genes podem desempenhar funções duplas além da resistência, incluindo reciclagem de peptidoglicanos (MARTÍNEZ, 2018; WIEDEMANN et al., 1998).

#### **2.3.2.2 Inativação de antibiótico por transferência de um grupo químico**

A transferência de um grupo químico é uma forma adicional de inativação do antibiótico, impedindo sua ligação à proteína alvo, destacando-se a transferência de acila, fosforilação, glicosilação, nucleotidilação, ribosilação e transferência de tiol (WRIGHT, 2005). Os aminoglicosídeos possuem grupos amida e hidroxil expostos, por isso são bastante

suscetíveis a essa adição pelas enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AME, do inglês *aminoglycoside modifying enzymes*), destacando-se: fosfotransferases, acetiltransferases e nucleotidiltransferases (NORRIS; SERPERSU, 2013; RAMIREZ; TOLMASKY, 2010).

### 2.3.3 Prevenção de acesso ao alvo

Essa estratégia inclui dois mecanismos: redução da permeabilidade da membrana e efluxo de drogas. As bactérias Gram-negativas possuem intrinsecamente uma membrana menos permeável aos antibióticos, tendo em vista que possuem uma membrana externa que fornece essa barreira de permeabilidade contra antibióticos hidrofílicos, como vancomicina e penicilinas (CHOI et al., 2012; KOJIMA; NIKAIDO, 2013; NIKAIDO, 2003). Como os antibióticos hidrofílicos só atravessam a membrana externa através das porinas, uma redução da permeabilidade dessa membrana ocorre por regulação negativa das porinas, mutações nos genes dessas proteínas, ou sua substituição por canais mais seletivos (LI et al., 2012; TAMBER; HANCOCK, 2003). Esse mecanismo é visto, por exemplo, em *E. coli* e outras espécies *Enterobacter* spp. Em cepas resistentes a carbapenêmicos observaram-se mutações nos genes das porinas após a imposição de pressão seletiva (LAVIGNE et al., 2013; NOVAIS et al., 2012; TÄNGDÉN et al., 2013).

#### 2.3.3.1 Efluxo de drogas

As bombas de efluxo são proteínas que expõem moléculas do interior celular para o meio externo. Nas bactérias desempenham papéis específicos, dentre eles a resistência aos antibióticos. Os genes que codificam as bombas de efluxo podem ter origem tanto intrínseca quanto adquirida. Como exemplo de bombas de efluxo do sistema intrínseco estão AcrAB-TolC em *E. coli*, e NorA em *S. aureus*, com afinidade ampla de substratos (NIKAIDO; TAKATSUKA, 2009).

Os determinantes de efluxo, adquiridos através de elementos genéticos móveis, podem ser representados pelos genes *Tet* que codificam proteínas como Tet(K) e Tet(L) em *S. aureus*, esses genes, são transferidos entre as bactérias, tornando esse mecanismo de resistência rapidamente disseminado entre os patógenos (BISMUTH et al., 1990; ROBERTS, 2005). No entanto, as proteínas advindas da expressão de genes adquiridos, podem agir juntamente aos mecanismos intrínsecos, como ocorre na exportação da tetraciclina pela proteína Tet. Nesse

caso, a extrusão ocorre do citoplasma para o periplasma, seguida da exportação do meio periplasmático para o meio exterior por uma bomba de efluxo de sistema tripartido. Assim as proteínas atuam de forma sinérgica, resultando no aumento na concentração inibitória mínima da tetraciclina de forma significativa (LEE et al., 2000; NIKAIDO; TAKATSUKA, 2009).

O alto nível de expressão de genes de efluxo ocorre por mutações nos seus reguladores. Com efeito, as mutações podem afetar um fator de transcrição global, um repressor local, ou locais intergênicos (KAATZ; THYAGARAJAN; SEO, 2005; OLLIVER et al., 2004; WARNER; SHAFER; JERSE, 2008; WEBBER; PIDDOCK, 2001). É o que ocorre na inibição da proteína repressora transcricional, deixando o DNA livre da ação do repressor, como observado em *Mycobacterium tuberculosis* (KUMAR et al., 2014; WANG et al., 2013; YAMASAKI et al., 2013). Mutações podem ainda alterar a atividade do promotor, como demonstrado em *Neisseria gonorrhoeae*, levando à superexpressão constitutiva de proteínas de efluxo (ZALUCKI; DHULIPALA; SHAFER, 2012).

Sinais ambientais também podem induzir a expressão de genes das bombas de efluxo, em condições nas quais sua função é necessária. Como, por exemplo, a indução pela bile e pelo indol, dos genes *acrAB* em *E. coli* e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (BAUCHERON et al., 2014; HIRAKAWA et al., 2005; NIKAIDO et al., 2011, 2012).

## 2.4 BOMBAS DE EFLUXO

Consideradas um dos mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos e biocidas, os transportadores integrais de membrana são conhecidos como bombas de efluxo de drogas (LEVY, 1992; SUN; DENG; YAN, 2014). Foram descritas pela primeira vez por McMurry e colaboradores, em cepas de *E. coli* resistentes à tetraciclina (MCMURRY; PETRUCCI; LEVY, 1980).

Foram identificadas em proteínas codificadas por genes plasmidiais, enquadrando-se no paradigma inicial da aquisição de genes de resistência, que estipulava a resistência a uma família de antibióticos e obtenção de resistência apenas por transferência horizontal de genes (BENVENISTE; DAVIES, 1973; DAVIES, 1994). Atualmente é reconhecido que esses genes podem estar localizados tanto no cromossomo, quanto em elementos genéticos móveis, como plasmídeos (MARTÍNEZ-SUÁREZ et al., 1987).

A genômica revelou que as bombas de efluxo, como determinantes de resistência, são elementos onipresentes entre os organismos, encontrando-se em células eucarióticas e

procarióticas (MARTINEZ et al., 2009a, 2009b; VAN BAMBEKE; BALZI; TULKENS, 2000; WEBBER; PIDDOCK, 2003). A exemplificar, estão presentes em patógenos bacterianos (NIKAIDO, 2009; NIKAIDO; TAKATSUKA, 2009), células humanas e patógenos eucarióticos, como *Candida albicans* (CANNON et al., 2009; VAN BAMBEKE; MICHOT; TULKENS, 2003), ou *Plasmodium falciparum* (BABIKER et al., 2001).

A depender da substância a ser extrudada, o efluxo é considerado o mecanismo de resistência mais rápido e eficaz no repertório bacteriano, portanto, esse mecanismo tem atraído a atenção de muitos pesquisadores. Não obstante, projetos de sequenciamento do genoma bacteriano, têm intensificado estudos nessa área e identificado novos genes responsáveis pela resistência bacteriana (BISWAS; RAOULT; ROLAIN, 2008; HARBOTTLE et al., 2006; KUMAR et al., 2013), sendo que esses genes de resistência, quando encontrados no ambiente, são coletivamente denominados resistoma (BAYSAROWICH et al., 2008; WRIGHT, 2007, 2010b).

Com a exposição da bactéria aos antibióticos e biocidas, é desencadeado um conjunto de reações que levam ao aumento da codificação de proteínas transportadoras de membrana, responsáveis pelo efluxo, amplamente conhecidas por sistema de efluxo de múltiplas drogas, do inglês *multidrug efflux systems* (MES) (NICHOLS et al., 2011).

Este sistema fornece várias vias de efluxo, funcionando de maneira cooperativa, ou com funcionalidade redundante (LEE et al., 2000; TAL; SCHULDINER, 2009). O sistema MES é responsável pelo fenótipo de resistência a múltiplas drogas, do inglês *multidrug resistance* (MDR), que é definida como insensibilidade de um micro-organismo aos compostos estruturalmente não relacionados e que têm alvos moleculares diferentes, apesar da sensibilidade anterior pela bactéria a este composto, ou simplificada quando uma bactéria é resistente a diferentes antibióticos não relacionados estruturalmente (NIKAIDO, 2009; POOLE; SRIKUMAR, 2001; RAHMAN; YARNALL; DOYLE, 2017).

Deve-se ainda ressaltar que o fenótipo MDR pode ocorrer devido à resistência cruzada. A resistência cruzada ocorre quando um único mecanismo de resistência, como, por exemplo, uma bomba de efluxo, fornece resistência a diferentes compostos simultaneamente como antibióticos de diferentes classes, biocidas e metais tóxicos (GANDRA et al., 2020).

A exposição da bomba de efluxo aos agentes com mesmo perfil estrutural, favorece a superexpressão dos genes e como consequência, a resistência cruzada aos substratos de outras classes estruturais. Sendo dessa forma que as bactérias usam uma única bomba de efluxo para bombear vários antibióticos diferentes, como pode ser observado pelo sistema de transporte

MexAB-OprM em *Pseudomonas aeruginosa*, onde a superexpressão dessa bomba torna a cepa menos sensível tanto aos  $\beta$ -lactâmicos e fluoroquinolonas, como ao biocida doméstico triclosan (CHUANCHUEN et al., 2001; HIRAI et al., 1987; NAKAE et al., 1999; NAKAJIMA et al., 2002).

As bombas de efluxo são imprescindíveis tanto na fisiologia como na defesa bacteriana, sendo responsáveis por exportar substratos estruturalmente diversos incluindo fluoroquinolonas como norfloxacin e ciprofloxacina; tetraciclina e cloranfenicol; detergentes como Triton X-100 e dodecilsulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*, SDS); corantes como brometo de etídio e acriflavina; e desinfetantes (biocidas) como cetrimida e triclosan (ALVAREZ-ORTEGA; OLIVARES; MARTÍNEZ, 2013; BLANCO et al., 2016; LI; NIKAIDO, 2009; POOLE, 2008; PU et al., 2016). Esses substratos serão exportados de acordo com a superfamília que possuem afinidade (BABIKER et al., 2001; NIES, 2003; RAMOS et al., 2002; ZGURSKAYA; NIKAIDO, 2000).

Sendo assim, sugeriu-se papéis fisiológicos das bombas de efluxo MDR, onde seu papel como determinante da resistência aos antibióticos é provavelmente secundário a outros papéis funcionais, relevantes para a bactéria (ALVAREZ-ORTEGA; OLIVARES; MARTÍNEZ, 2013; MARTINEZ, 2009; MARTINEZ et al., 2009a). Como, por exemplo, verificou-se a capacidade dessas proteínas de extrudar moléculas antibacterianas produzidas pelo organismo hospedeiro, como sais biliares, atuando neste caso, como um mecanismo de defesa para a bactéria, permitindo a sua sobrevivência em seu nicho ecológico (BINA; MEKALANOS, 2001; LACROIX et al., 1996; LIN et al., 2003; PROUTY et al., 2004).

Em *E. coli*, o AcrAB-TolC foi responsável pela extrusão de substratos como a bile (KORONAKIS; ESWARAN; HUGHES, 2004) e hormônios esteroides de mamíferos (ELKINS; MULLIS, 2006). Também AcrAB auxiliou na colonização em *Erwinia amylovora*, tendo como substratos derivados do hospedeiro como isoflavonoides, isoprenoides e alcaloides (BURSE; WEINGART; ULLRICH, 2004).

Além disso, as bombas de efluxo exportam fatores de virulência como adesinas e toxinas, sendo evidenciado seu papel de patogenicidade. A bomba de efluxo AcrAB-TolC de *S. enterica* serovar Typhimurium é um exemplo, auxiliando na infecção em camundongos BALB/c e influenciando na aderência e invasão de outras células hospedeiras (BUCKLEY et al., 2006; LACROIX et al., 1996; NISHINO; LATIFI; GROISMAN, 2006; STONE; MILLER, 1995). Estudos indicaram a importância de MexAB-OprM em *P. aeruginosa* ao exportar determinantes de virulência que facilitam a invasão em células epiteliais (HIRAKATA et al.,

2002) e que MtrCDE em *N. gonorrhoeae* foi importante para a infecção do trato genitourinário de camundongos (JERSE et al., 2003).

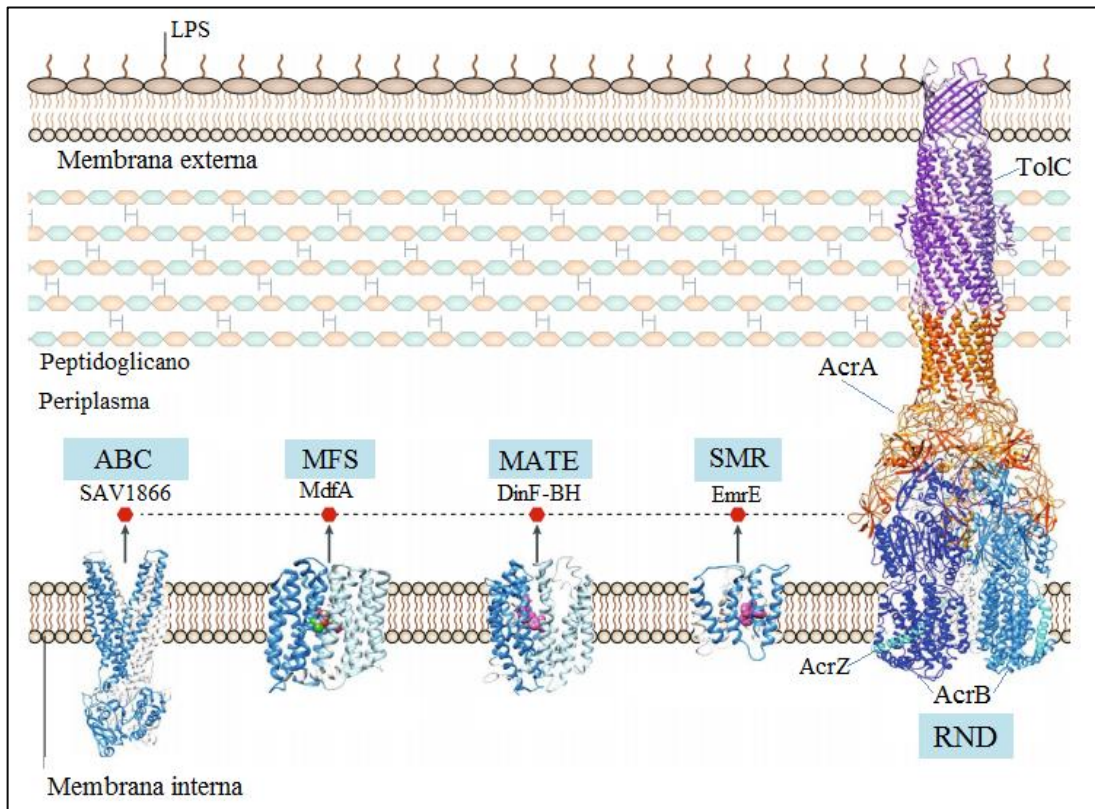
Muitas toxinas também são liberadas através das bombas de efluxo como mecanismo de defesa das bactérias e assim estabelecer uma infecção, dentre essas toxinas destacam-se: a proteína tipo I (BINET et al., 1997; KORONAKIS; HUGHES, 1996); hemolisina e colicina V, secretadas pelo TolC em *E. coli* (BHAKDI et al., 1988; GILSON; MAHANTY; KOLTER, 1990); e a toxina RTX, um membro da família de repetições em toxinas, liberada pelo TolC em *Vibrio cholerae* (BINA; MEKALANOS, 2001; BOARDMAN; FULLNER SATCHELL, 2004).

Nos procariotos as bombas de efluxo são agrupadas nas seguintes principais famílias: família de cassetes de ligação ao ATP (ABC) (LOCHER, 2009; LUBELSKI; KONINGS; DRIESSEN, 2007; SZAKÁCS et al., 2008), família de múltiplas drogas e extrusão de compostos tóxicos (MATE) (KURODA; TSUCHIYA, 2009), superfamília de facilitadores principais (MFS) (KUMAR; MUKHERJEE; VARELA, 2013; LAW; MALONEY; WANG, 2008; YAN, 2015), família de pequenas proteínas de resistência a múltiplas drogas (SMR) (CHUNG; SAIER, 2001) e a família de resistência-nodulação-divisão celular (RND) (Figura 5) (DAURY et al., 2016; DU et al., 2014; TSENG et al., 1999; YAMAGUCHI; NAKASHIMA; SAKURAI, 2015). Recentemente estudos têm identificado outras famílias de transportadores de drogas, destacando-se a família de efluxo de compostos antimicrobianos proteobacterianos ou PACE (*proteobacterial antimicrobial compound efflux*). As proteínas dessa família, transportam biocidas como clorexidina e acriflavina (HASSAN et al., 2015; CHITSAZ; BROWN, 2017; HASSAN et al., 2018).

A superfamília RND é predominante em Gram-negativas, enquanto os sistemas de efluxo das famílias ABC, MATE, MFS e SMR são amplamente distribuídos entre bactérias Gram-positivas, como também podem ser encontradas em bactérias Gram-negativas (HANDZLIK; MATYS; KIEĆ-KONONOWICZ, 2013). É o caso da proteína MacAB-TolC pertencente à família ABC (KOBAYASHI; NISHINO; YAMAGUCHI, 2001; OKADA et al., 2017); proteínas NorM em *Vibrio parahaemolyticus* e YdhE de *E. coli* pertencentes à família MATE (BROWN; PAULSEN; SKURRAY, 1999; KURODA; TSUCHIYA, 2009; MORITA et al., 1998); proteínas Bcr, EmrAB e EmrD de *E. coli*, pertencentes à família MFS (BENTLEY et al., 1993; LOMOVSKAYA; LEWIS, 1992; NARODITSKAYA et al., 1993); e por fim em SMR são exemplos as proteínas Mmr de *Mycobacterium tuberculosis*, QacE de *Klebsiella*



**Figura 5** – Estrutura dos representantes de cada superfamília de bombas de efluxo.

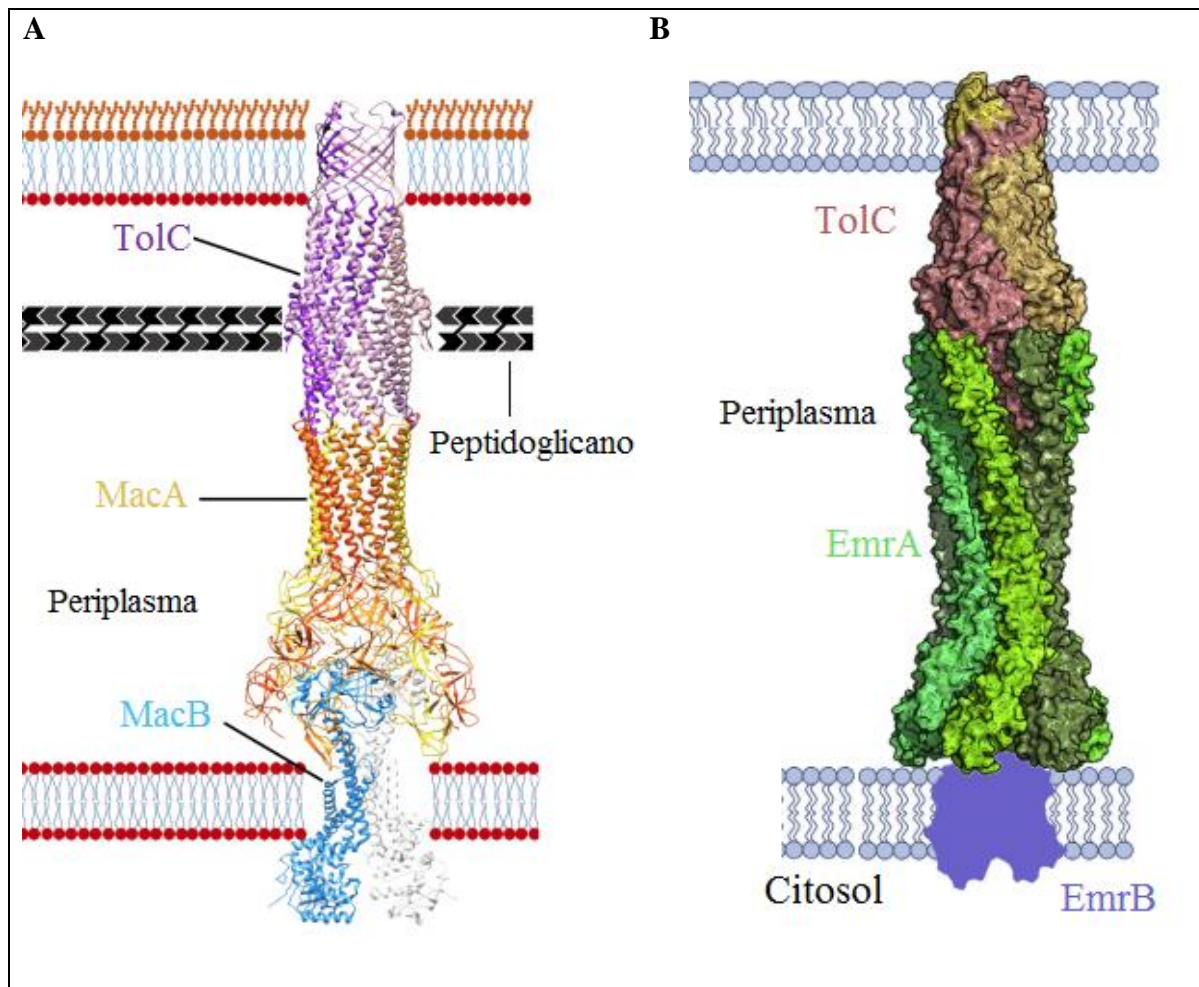


As superfamílias ABC, MATE, MFS e SMR estão representadas em Gram-positivas e RND geralmente se apresenta em Gram-negativas unindo-se em um sistema tripartido como na figura esquemática. SAV1866 está como representante da família ABC, MdfA de MFS, DinF-BH representa a família MATE, EmrE representa SMR e AcrAB-ToIC representa a família RND. LPS: lipopolissacarídeo. Fonte: adaptado de Du et al. (2018).

*aerogenes* e EmrE de *E. coli* (DE ROSSI et al., 1998; PAULSEN et al., 1993; POOLE, 2004; PUREWAL, 1991; YERUSHALMI; LEBENDIKER; SCHULDINER, 1995).

Tanto em bactérias Gram-negativas quanto em Gram-positivas, as bombas de efluxo apresentam-se como transportadores de um único componente na membrana interna. No entanto, em bactérias Gram-negativas, algumas famílias também podem formar sistemas tripartidos abrangendo as membranas interna e externa, como é o caso das famílias RND, ABC e MFS (Figura 6) (DU et al., 2015; HINCHLIFFE et al., 2013; NEUBERGER; DU; LUISI, 2018; SYMMONS; MARSHALL; BAVRO, 2015).

**Figura 6** – Estruturas do sistema tripartido de proteínas da família ABC e MFS em bactérias Gram-negativas.



(A) Estrutura cristalina em representação de fita da bomba de efluxo MacAB-TolC. (B) Modelo pseudo-atômico baseado em estruturas de cristal da bomba de efluxo EmrAB-TolC. As denominações das subunidades estão com a cor correspondente à estrutura indicada. Fonte: adaptado de Fitzpatrick et al. (2017); Hinchliffe et al. (2014); Neuberger, Du e Luisi (2018).

A divisão entre essas cinco famílias foi definida com base em: especificidade do substrato que são exportados, no número de regiões transmembranares que a proteína possui, na identidade da sequência de aminoácidos, número de componentes que a bomba possui (único ou múltiplo) e na fonte de energia que utiliza. Um único organismo pode expressar bombas de efluxo MDR de mais de uma família, ou expressar mais de um tipo de bomba de efluxo pertencente à mesma família (LI et al., 2016; LI; NIKAIDO, 2009).

Em relação aos seus componentes, as bombas de efluxo que apresentam um componente único, responsável por si só, pela exportação do substrato, podem ser encontradas em bactérias Gram-positivas, representadas pela superfamília MFS, sendo os membros mais bem estudados,

a proteína NorA de *S. aureus* e PmrA de *Streptococcus pneumoniae* (GILL; BRENWALD; WISE, 1999; LORCA et al., 2007; UBUKATA; ITOH-YAMASHITA; KONNO, 1989).

As bombas de efluxo que são formadas por componentes múltiplos, contêm, além de um transportador de membrana interna, um canal de membrana externa e uma proteína adaptadora periplasmática, formando um complexo tripartido, específico para atravessar as duas membranas das bactérias Gram-negativas, como as bombas de efluxo da família RND (LI; NIKAIDO, 2009; NIKAIDO, 2010). Tendo em vista que essas bactérias apresentam duas membranas plasmáticas que funcionam como uma barreira à entrada de drogas, esse sistema tripartido torna-se necessário, onde o substrato será movido para o periplasma e em seguida para o meio extracelular (LEE et al., 2000; TAL; SCHULDINER, 2009). Exemplos específicos desse sistema serão detalhados adiante.

Em relação à fonte de energia, a superfamília ABC utiliza diretamente a hidrólise de ATP para impulsionar o transporte, enquanto as outras superfamílias realizam o transporte ativo secundário, utilizando energia eletroquímica armazenada em gradientes de íons, ou seja, a força próton-motriz (HENDERSON, 1991a, 1993; KRÄMER, 1994; PAULSEN; BROWN; SKURRAY, 1996; POOLMAN; KONINGS, 1993).

A presença de bomba de efluxo em cepas bacterianas refletirá em consequências no uso clínico dos antibacterianos através do aumento da concentração inibitória mínima (CIM) frente as cepas multirresistentes. Esse aumento equivale, de forma geral, a uma CIM de duas a oito vezes mais alta do que a CIM desses agentes frente a cepa suscetível ao tratamento, sendo que esses valores variam para cada antibiótico e para cada cepa. Porém, ao inibir o gene ou a bomba de efluxo do mutante, a CIM do antibiótico poderá diminuir, sendo restabelecidos os valores do ponto de corte, dando origem a uma cepa hipersusceptível (KAATZ; SEO, 1997; PIDDOCK, 2006b). Também se sugere que o efluxo é um mecanismo de resistência presente em uma bactéria específica, quando há um aumento simultâneo nas CIMs de três ou mais antibióticos, em comparação com as CIMs desses antibióticos frente à cepa progenitora (PIDDOCK, 2006b).

Apesar dos desafios encontrados para superar a resistência causada por bombas de efluxo MDR, seus efeitos são mais fáceis de serem revertidos que os mecanismos de expressão de enzimas que inativam antibióticos, como  $\beta$ -lactamases, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, ou mutações nos genes que codificam as proteínas alvo, tendo em vista que estes últimos apresentam uma magnitude maior, causando um aumento de 100 vezes, ou mais, nos valores da CIM do antibiótico (BILLOT-KLEIN et al., 1994; BUGG et al., 1991; DRLICA et al., 2009; MILLER; MUNITA; ARIAS, 2014; PIDDOCK, 2006b).

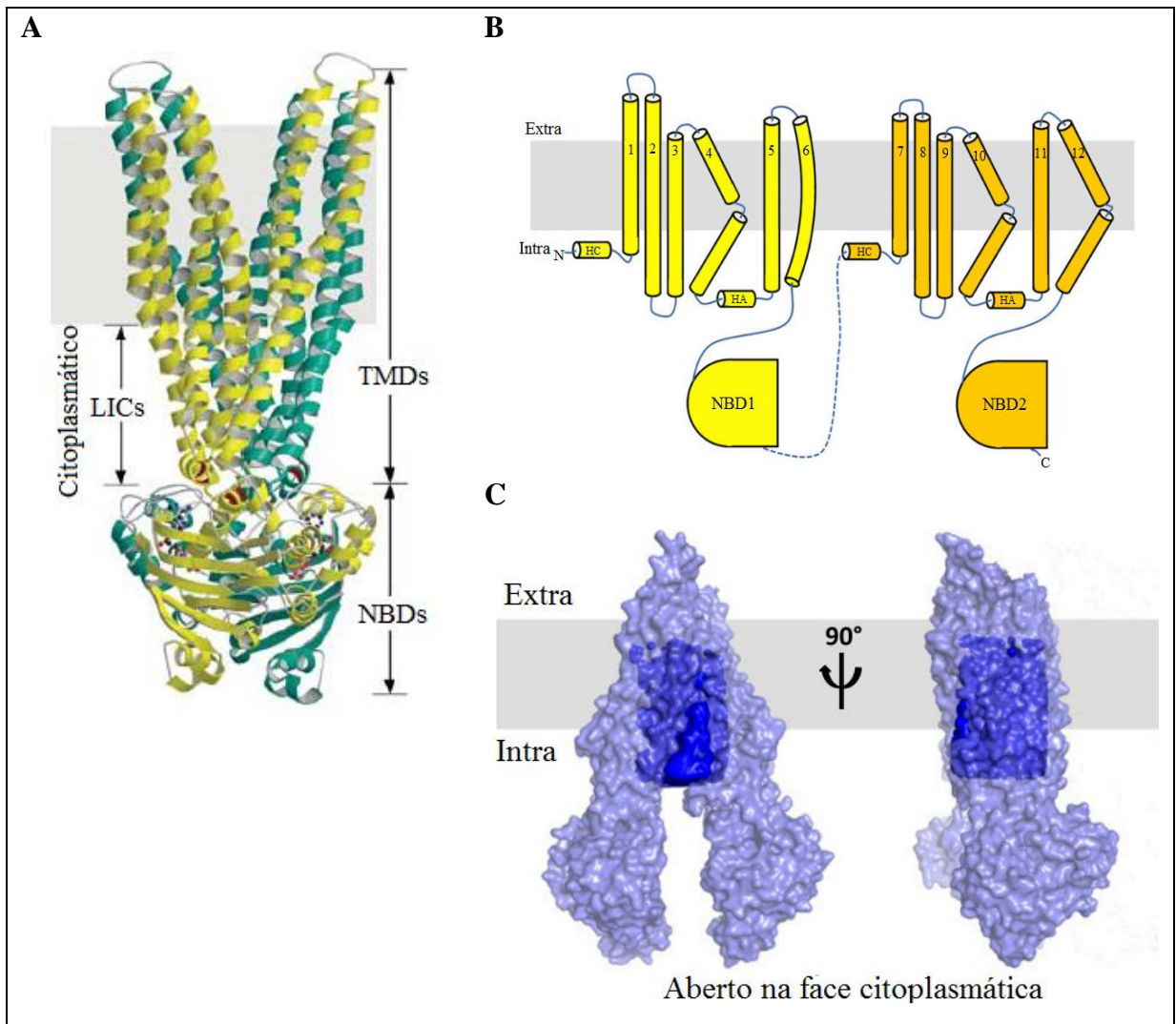
Essas características levantam discussões acerca do tratamento. A ineficácia de certos agentes antibacterianos principalmente no tratamento de infecções em Gram-negativas, deve-se a resistência intrínseca, onde essa resistência era inicialmente atribuída a uma impermeabilidade da membrana bacteriana às drogas, até que Li e colaboradores (1994) puderam verificar em *P. aeruginosa*, que a resistência intrínseca aos antibióticos era devido ao efluxo, seguido por outros estudos relacionados (LIVERMORE, 2003; POOLE et al., 1993). Níveis basais de efluxo conferem a resistência intrínseca, enquanto em bactérias que possuem resistência adquirida, apresentarão um aumento na expressão da proteína de efluxo e consequentemente, uma resistência expressiva (PIDDOCK, 2006b). Após esse apanhado das características gerais de bombas de efluxo, será detalhado a seguir as características específicas das superfamílias MFS, RND, MATE, SMR e ABC.

#### **2.4.1 Superfamília de cassetes de ligação ao ATP ou família ABC (*ATP-binding cassette*)**

O sistema de efluxo da família ABC, apesar de encontrado em procariotos, é o principal mecanismo de efluxo em eucariotos. As proteínas dessa superfamília utilizam a energia de hidrólise do ATP para o transporte de polissacarídeos, aminoácidos, proteínas, açúcares e drogas, para o meio extracelular (FATH; KOLTER, 1993; HIGGINS, 1992). Localiza-se frequentemente na membrana plasmática, mas encontra-se também nas membranas das organelas de eucariotos (CANNON et al., 2009).

Embora poucos sistemas de efluxo pertencentes a essa família, tenham sido descritos em procariotos, estudos indicam que seu papel na resistência microbiana é atualmente subestimado (LUBELSKI; KONINGS; DRIESSEN, 2007). Compreende complexos proteicos formados por proteínas integrais de membrana plasmática, agindo como poro de transporte através desta, com atividade ATPásica. Consistem em dois domínios transmembranares associados a dois domínios de ligação a nucleotídeos ou *nucleotide-binding domain* (NBDs) citoplasmáticos (JONES; O'MARA; GEORGE, 2009; REES; JOHNSON; LEWINSON, 2009). Os dois NBDs (NBD1 e NBD2) ligam-se e hidrolisam o ATP, energizando o transportador, enquanto os dois TMDs contêm uma quantidade variável de hélices de acordo com cada proteína. Em algumas proteínas eucarióticas, cada TMD pode conter seis hélices transmembranares, formando um canal que permite a translocação e especificidade do substrato através da membrana (Figura 7) (JONES; O'MARA; GEORGE, 2009; KAST et al., 1996; REES; JOHNSON; LEWINSON, 2009).

**Figura 7** – Estrutura de Sav1866 de *S. aureus* e glicoproteína-P em células eucarióticas.



(A) Representação em fitas da estrutura da proteína homodimérica Sav1866, com as subunidades coloridas em amarelo e azul-turquesa. A faixa cinza representa a localização provável da proteína na bicamada lipídica com base na hidrofobicidade de superfície. (B) Diagrama da topologia da glicoproteína-P (P-gp ou ABCB1). O comprimento das hélices e a localização de dobras ou curvas, são relativos e ilustrados esquematicamente. (C) Representação da superfície de P-gp eucariótica aberta para dentro da célula. A região azul-escura representa o volume da cavidade interna. A faixa cinza representa a membrana. LIC: laços intracelulares (entre as hélices transmembrana); NBDs: domínios de ligação a nucleotídeos; TMDs: domínios transmembranares; HA: hélices de acoplamento; HC: hélices do cotovelo; N: amino-terminal; C: carboxi-terminal. Fonte: adaptado de Alam et al. (2018), Dawson e Locher (2006), Kim e Chen (2018).

Podem ser encontradas em Gram-positivas como a LmrA e LmrCD, e em e Gram-negativas como VcaM, assumindo nessas últimas, um sistema tripartido como a proteína MacB,

assim como ocorre com as proteínas das famílias MFS e RND em Gram-negativas (HUDA et al., 2003; LUBELSKI et al., 2004; OKADA et al., 2017; VAN VEEN et al., 1996).

Os transportadores ABC são classificados como importadores e exportadores. Os importadores estão presentes exclusivamente em procariotos e estão envolvidos na captação de moléculas extracelulares (ALLOING; DE PHILIP; CLAVERY, 1994; EHRMANN et al., 1998). Exportadores são encontrados em procariotos e eucariotos, onde exportam moléculas como proteínas, peptídeos e drogas (ROSS et al., 1996; SAURIN; HOFNUNG; DASSA, 1999). Portanto, as proteínas pertencentes a essa família, possuem um importante papel biológico, não só no efluxo de drogas e extrusão de metabólitos tóxicos, mas também na absorção de nutrientes e substratos necessários para a célula (KÖHLER; PECHÈRE; PLÉSIAT, 1999).

Dessa forma, essas proteínas são classificadas em três categorias funcionais principais, de acordo com seu substrato e sua função: mediadoras na absorção de nutrientes em procariotos, cujos substratos incluem mono e oligossacarídeos, íons orgânicos e inorgânicos, aminoácidos, peptídeos, metais, até vitaminas; secreção de moléculas como peptídeos, lipídeos, fármacos hidrofóbicos e toxinas como hemolisina; e tradução do mRNA e reparo do DNA (DAVIDSON et al., 2008).

Como bomba de efluxo ABC em procariotos, pode-se citar a LmrA encontrada em *Lactococcus lactis*, que está relacionada com a diminuição da sensibilidade aos aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas, cloranfenicol, estreptograminas, tetraciclina e  $\beta$ -lactâmicos, sendo este o primeiro sistema de efluxo da família ABC identificado em procariotos (BOLHUIS et al., 1996; LAGE, 2003). Nesta família, ainda estão incluídos os sistemas DrrAB de *Streptomyces peuceticus* (KAUR; RUSSELL, 1998); o MsrA, relacionado à resistência de *S. epidermidis* e *S. aureus* à eritromicina (ROSS et al., 1990); o Lsa, presente em *Enterococcus faecalis*, que possui como substratos as lincosamidas e estreptograminas como quinupristina/dalfopristina (SINGH; WEINSTOCK; MURRAY, 2002); MsrC presente em *E. faecium*, relacionada à resistência aos macrolídeos; VgaA e VgaB encontrados no gênero *Staphylococcus*; e os sistemas de transporte MacAB-ToIC e McbEF em *E. coli*, envolvidos no efluxo de macrolídeos e fluoroquinolonas, respectivamente (BORGES-WALMSLEY; MCKEEGAN; WALMSLEY, 2003; LUBELSKI; KONINGS; DRIESSEN, 2007).

#### 2.4.2 Família de extrusão de múltiplas drogas e compostos tóxicos ou MATE (*Multidrug and toxic compound extrusion*)

Inicialmente as proteínas dessa superfamília eram classificadas como membros da superfamília MFS, tendo em vista as semelhanças entre suas características topológicas de membrana, porém, após diversos estudos, verificou-se que não há homologia entre as sequências proteicas dessas duas superfamílias. Proteínas MATE contém 12 segmentos transmembranares e para extrudar moléculas, realizam o antiporte, utilizando o gradiente de  $\text{Na}^+$  ou  $\text{H}^+$  da membrana, efluindo cátions, corantes e fluoroquinolonas (KURODA; TSUCHIYA, 2009).

Encontra-se em Gram-positivas e Gram-negativas e como membro dessa família, destaca-se a proteína MepA em *S. aureus* (KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005). Além desta, o sistema de transporte NorM, foi identificado em *Vibrio parahaemolyticus*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis* conferindo resistência aos detergentes, fluoroquinolonas e aos aminoglicosídeos (BROWN; PAULSEN; SKURRAY, 1999; MORITA et al., 1998, 2000; ROUQUETTE-LOUGHLIN et al., 2003). Em *E. coli* foi caracterizado o sistema de efluxo YdhE como pertencente a essa família, onde se demonstrou uma relação direta entre a presença da proteína e a diminuição da sensibilidade aos antimicrobianos catiônicos, como os compostos de amônio quaternário (POOLE, 2014; YANG; CLAYTON; ZECHIEDRICH, 2003).

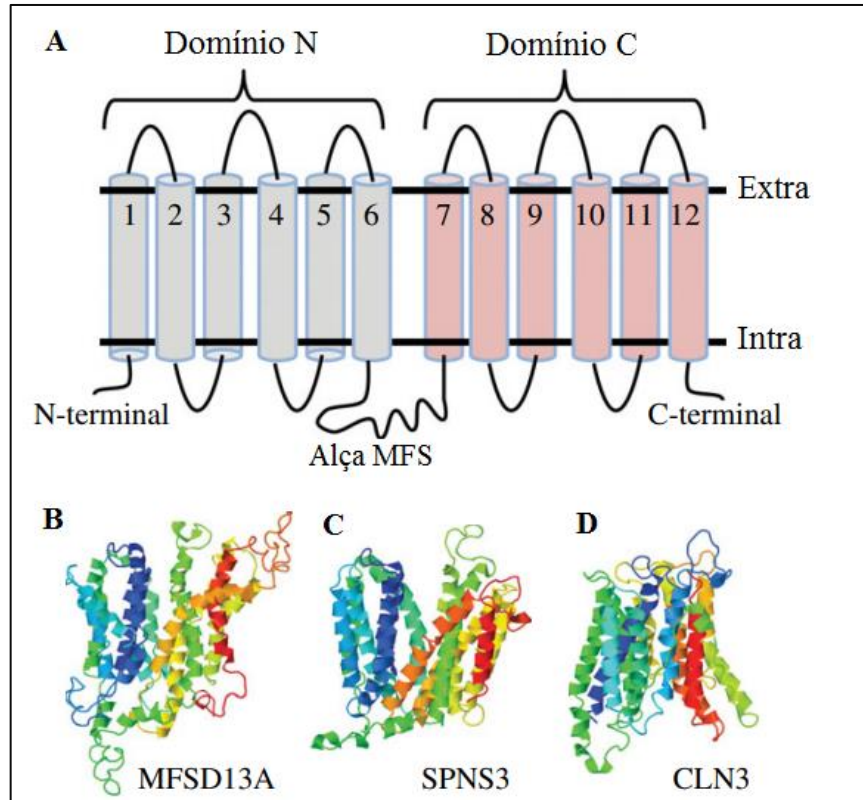
#### 2.4.3 Superfamília de facilitadores principais ou MFS (*Major facilitator superfamily*)

As proteínas que pertencem a essa superfamília, podem realizar o uniporte, simporte ou antiporte, realizando, por exemplo, o simporte substrato/ $\text{H}^+$ , o antiporte envolvendo substrato/ $\text{H}^+$ , ou ainda troca de um substrato por outro (substrato/substrato), o cátion pode ser um  $\text{Na}^+$  ou  $\text{H}^+$ , mas é predominantemente este último (PAO et al., 1998; REDDY et al., 2012). A estrutura morfológica desta proteína consiste em dois domínios transmembranares (TMD), cada um composto por seis segmentos transmembranares (TMS), que atravessam a membrana formando o poro hidrofílico (Figura 8) (GOSWITZ; BROOKER, 1995).

As bombas de efluxo pertencentes a superfamília MFS, podem ser encontradas em Gram-negativas ao adotar uma estrutura tripartida, porém, encontra-se predominantemente em bactérias Gram-positivas, onde os principais sistemas de efluxo responsáveis por sua resistência, codificados por genes cromossômicos, são as proteínas MFS da família Nor, a

exemplo das bombas NorA, NorB e NorC (PAULSEN; BROWN; SKURRAY, 1996; PIDDOCK, 2006a; SUN; DENG; YAN, 2014).

**Figura 8** – Previsão estrutural de transportadores MFS: MFSD13A, SPNS3 e CLN3.



(A) Topologia dos transportadores MFS. Observa-se a presença de uma alça citoplasmática (*loop*), conectando os domínios N e C, formando geralmente 12 segmentos transmembranares (TMS), exceto CLN3, que possui 11 TMS, com o *loop* intracelular ente os segmentos 6 e 7. (B) Representação em fitas da proteína MFSD13A. (C) Representação em fitas da proteína SPNS3. (D) Representação em fitas da proteína CLN3. Fonte: adaptado de Perland et al. (2017).

Os solutos transportados por essas proteínas incluem açúcares, metabólitos, ânions e antibióticos. Em Gram-positivas como é o caso de *S. aureus*, a proteína NorA, assim como outras bombas de efluxo dessa família, estão presentes na forma de um único componente na membrana, ou seja, está ancorada e atua sem a necessidade de proteínas acessórias na membrana (YOSHIDA et al., 1990).

Enquanto isso, nas proteínas da membrana de Gram-negativas, como é o caso da *E. coli*, as proteínas formam um complexo, onde estão presentes as proteínas de membrana externa (OMP), do inglês *outer membrane protein*, as proteínas da membrana interna (IMP), ou *inner membrane protein* e as proteínas de fusão de membrana (MFPs), do inglês *membrane fusion*



*proteins*, conectando ambas. Todos os componentes interagindo entre si para a realização efetiva do transporte através das membranas. A exemplo desse complexo está a proteína EmrAB–TolC, pertencente à superfamília MFS (LOMOVSKAYA; LEWIS, 1992).

Em 1993 os transportadores da superfamília MFS foram agrupados em cinco grupos diferentes de acordo com o uniporte, simporte e antiporte que realizam: o primeiro grupo consistindo nas proteínas que realizam o efluxo como NorA, TetA e QacA; o segundo agrupamento incluindo o uniporte e simportadores de açúcar/H<sup>+</sup>, como simportador hexose/H<sup>+</sup>, simportador arabinose/H<sup>+</sup> e facilitador de galactose; as proteínas dentro do terceiro agrupamento são específicas para intermediários do ciclo de Krebs atuando, por exemplo, no simporte citrato/H<sup>+</sup>; o quarto grupo inclui antiportadores específicos para ésteres de fosfato orgânico, como o antiportador de fosfoglicereto; o quinto grupo consiste nos simportadores de rafinose/H<sup>+</sup> e lactose/H<sup>+</sup> (HENDERSON, 1991b; MARGER; SAIER, 1993).

Posteriormente, todas as famílias que se enquadram na superfamília MFS, foram descritas e categorizadas filogeneticamente, considerando não só a filogenia, mas também a função e os mecanismos de transporte envolvidos, totalizando nessa classificação, 87 famílias. Como representantes do uniporte, simporte e antiporte respectivamente, pode-se citar: família transportadora de açúcar ou *Sugar Porter* (SP); família do simportador oligossacarídeo/H<sup>+</sup> ou *oligosaccharide/H<sup>+</sup> symporter* (OHS) e família do simportador ânion/cátion ou *anion/cation symporter* (ACS); e as famílias do antiportador droga/H<sup>+</sup> 1, 2, 3 e 4 (DHA1, DHA2, DHA3 e DHA4), estas últimas responsáveis pelo efluxo de drogas (PAO; PAULSEN; SAIER, 1998; VISHWAKARMA et al., 2018).

Na família MFS, ao referir-se aos DHAs, a literatura relata principalmente as famílias DHA1 e DHA 2. Essas duas famílias diferem no número de TMS, contendo 12 e 14 TMS, respectivamente (REDDY et al., 2012). Porém, como pode ser observado acima, outra classificação de famílias de antiportadores de drogas já foi comprovada como a DH3 e DH4 (PAULSEN et al., 1996a; SAIER; PAULSEN, 2001).

A família DHA1 encontra-se tanto em procariontes como em eucariotes, sendo responsável pelo transporte de monoaminas, poliaminas, acetilcolina, desacopladores, açúcares, paraquat e metilgliox. Dentre as bombas de efluxo pertencentes a essa categoria destaca-se a Bmr encontrada em *Bacillus subtilis*. Da mesma forma, as bombas de efluxo pertencentes à DHA2 encontram-se tanto em procariontes como em eucariontes, no entanto, diferente da anterior, elas transportam substratos mais específicos e restritos como sais biliares e corantes. Em *S. aureus* a subfamília DHA2 é de grande importância, sendo representada pela proteína

QacA, cuja topologia determinou a presença de 14 hélices transmembranares (PAULSEN et al., 1996a; TENNENT et al., 1989).

Proteínas pertencentes à família DHA3 encontram-se exclusivamente em procariontes e são responsáveis pelo efluxo de agentes antibacterianos em Gram-positivas e Gram-negativas, destacando-se a proteína Tet que confere resistência às tetraciclina em *S. aureus* e MefA em *Streptococcus pyogenes* (CHOPRA; ROBERTS, 2001; CLANCY et al., 1996). As bombas de efluxo de tetraciclina são os membros da superfamília MFS melhor caracterizados até o momento (KUMAR; SCHWEIZER, 2005). DHA1 e DHA3 compreendem 12 hélices que abrangem a membrana. Filogeneticamente sugere-se que essas duas famílias estejam mais intimamente relacionadas entre si do que outras famílias MFS (VISHWAKARMA et al., 2018).

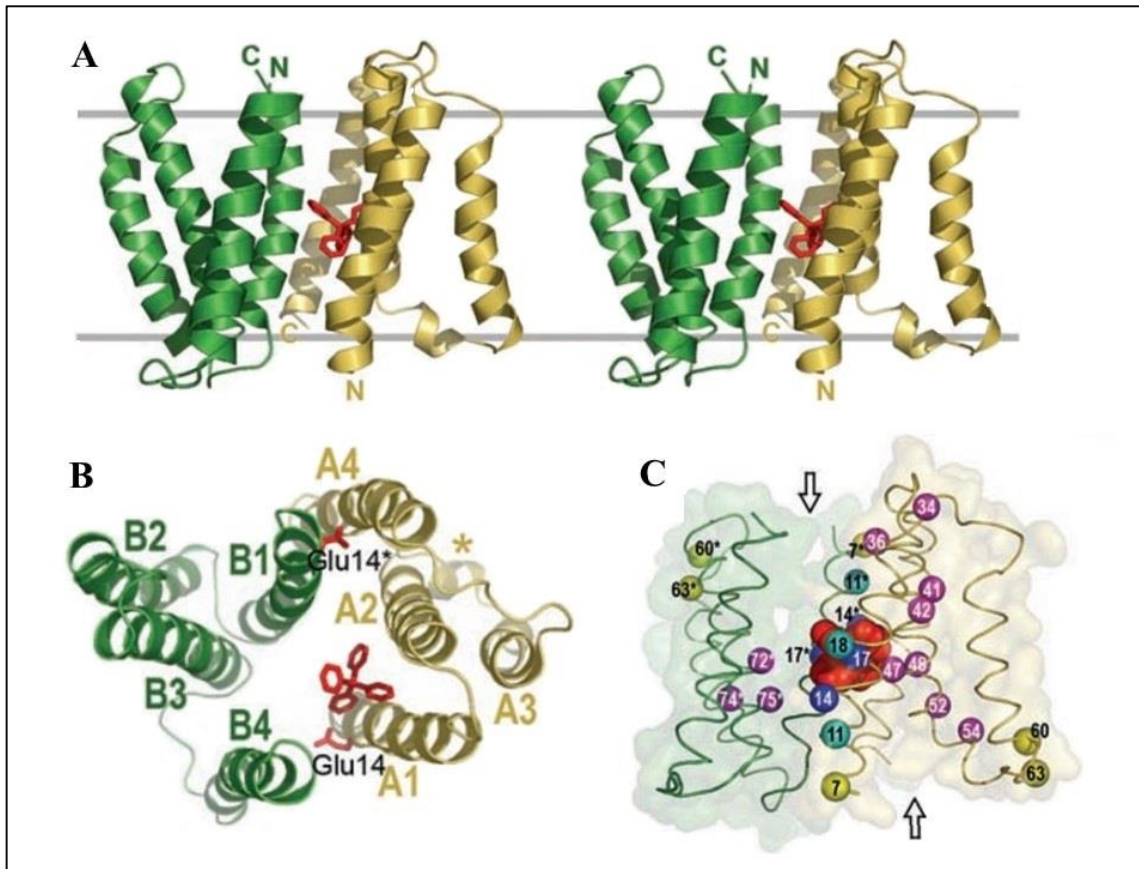
#### **2.4.4 Família pequena de resistência a múltiplas drogas ou SMR (*Small multidrug resistance*)**

Como o próprio nome sugere, é uma família menos numerosa em relação às anteriormente citadas e apresentam proteínas pequenas, contendo apenas quatro segmentos transmembranares, que se associam em tetrâmeros como a bomba de efluxo EmrE de *E. coli* (KORKHOV; TATE, 2008; MA; CHANG, 2004; PAULSEN et al., 1996b). Também foi sugerido que esses transportadores podem funcionar como complexos oligoméricos (BAY; ROMMENS; TURNER, 2008; MA; CHANG, 2004).

Assim como a superfamília MFS, as proteínas da SMR são energizadas através da força próton-motriz, ou seja, utilizam o gradiente dos prótons  $H^+$  através da membrana, como fonte de energia para extrudar drogas da célula (PUTMAN; VAN VEEN; KONINGS, 2000).

Estão presentes em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Dentre as bombas de efluxo SMR que são bem caracterizadas, destacam-se a Smr de *S. aureus* e EmrE de *E. coli* (Figura 9) (GRINIUS et al., 1992; PAULSEN et al., 1996b; SCHULDINER; LEBENDIKER; YERUSHALMI, 1997). Elas são responsáveis pela extrusão de compostos lipofílicos, como composto de amônio quaternário, do inglês *quaternary ammonium compounds* (QACs), corantes intercalantes de DNA, drogas e outros metabólitos tóxicos à bactéria (BAY; ROMMENS; TURNER, 2008; BAY; TURNER, 2009).

**Figura 9** – Estrutura da proteína EmrE e sua via de translocação putativa.



(A) Visão estereoscópica do homodímero EmrE com as subunidades A e B. Os limites da bicamada lipídica são demonstrados pelas linhas cinzas. Os N- e C-terminais são indicados. (B) Vista superior do dímero de EmrE, com as quatro hélices de cada subunidade nomeada. O asterisco indica a hélice curta que conecta as hélices A2 e A3. No centro em vermelho está o tetrafenilfosfônio (*tetraphenylphosphonium*, TPP) vinculado à interface de dimerização. As estruturas laterais em vermelho são os dois resíduos Glu-14. (C) Vista lateral do dímero EmrE, sobreposto em uma superfície semitransparente. As aberturas para as duas bolsas se abrem para lados opostos da bicamada lipídica e são indicadas por setas. As esferas coloridas representam resíduos que demonstraram ser importantes para a ligação e transporte do substrato. Os asteriscos representam os resíduos da subunidade B. Fonte: adaptado de Chen et al. (2007).

#### 2.4.5 Superfamília resistência-nodulação-divisão celular ou RND (*Resistance-nodulation-cell division*)

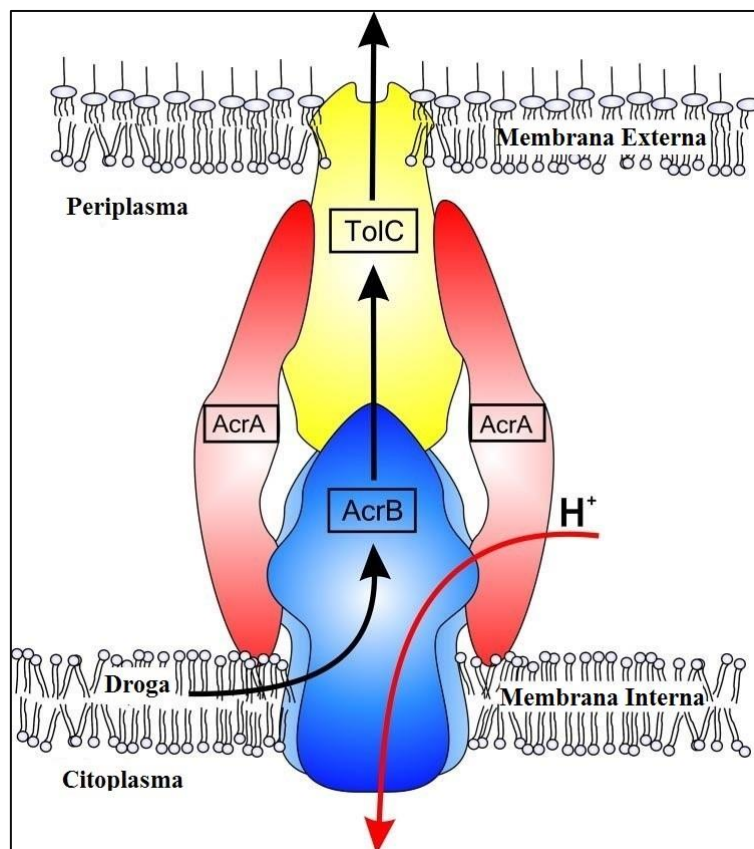
Sistemas de efluxo da família RND desempenham um importante papel na resistência intrínseca e adquirida, sendo prevalentes em bactérias Gram-negativas. Catalisam o efluxo

através do antiporte substrato/ $H^+$ . Todas as bombas de efluxo RND estudadas até o momento, são transportadores de múltiplas drogas (NIKAIDO, 2010).

São codificadas por genes localizados no cromossomo bacteriano, porém, estudos relatam a expressão desses sistemas de efluxo por genes plasmidiais (HANSEN et al., 2004; KUMAR; SCHWEIZER, 2005; TSENG et al., 1999). Exporta diversos substratos, entre os quais estão antibióticos, antissépticos, ácidos graxos tóxicos, sais biliares, homoserina lactona e compostos aromáticos como os solventes (POOLE, 2007).

Os sistemas de efluxo RND, assim algumas proteínas da superfamília MFS, formam um sistema tripartido, como é o caso do sistema AcrAB-TolC em *E. coli*, composto por uma proteína inserida na membrana citoplasmática interna, a IMP, que desempenha a função de bomba, representada pela AcrB; uma proteína de membrana externa, a OMP ou porina, que forma o canal extrusivo, representada pelo TolC e por fim uma proteína de fusão de membrana (MFPs), nesse caso representada pela AcrA, localizada no espaço periplasmático, que une os outros dois constituintes, a bomba e o canal de extrusão (Figura 10 e 11) (MA et al., 1993, 1995; POOLE, 2001; ZGURSKAYA et al., 2009).

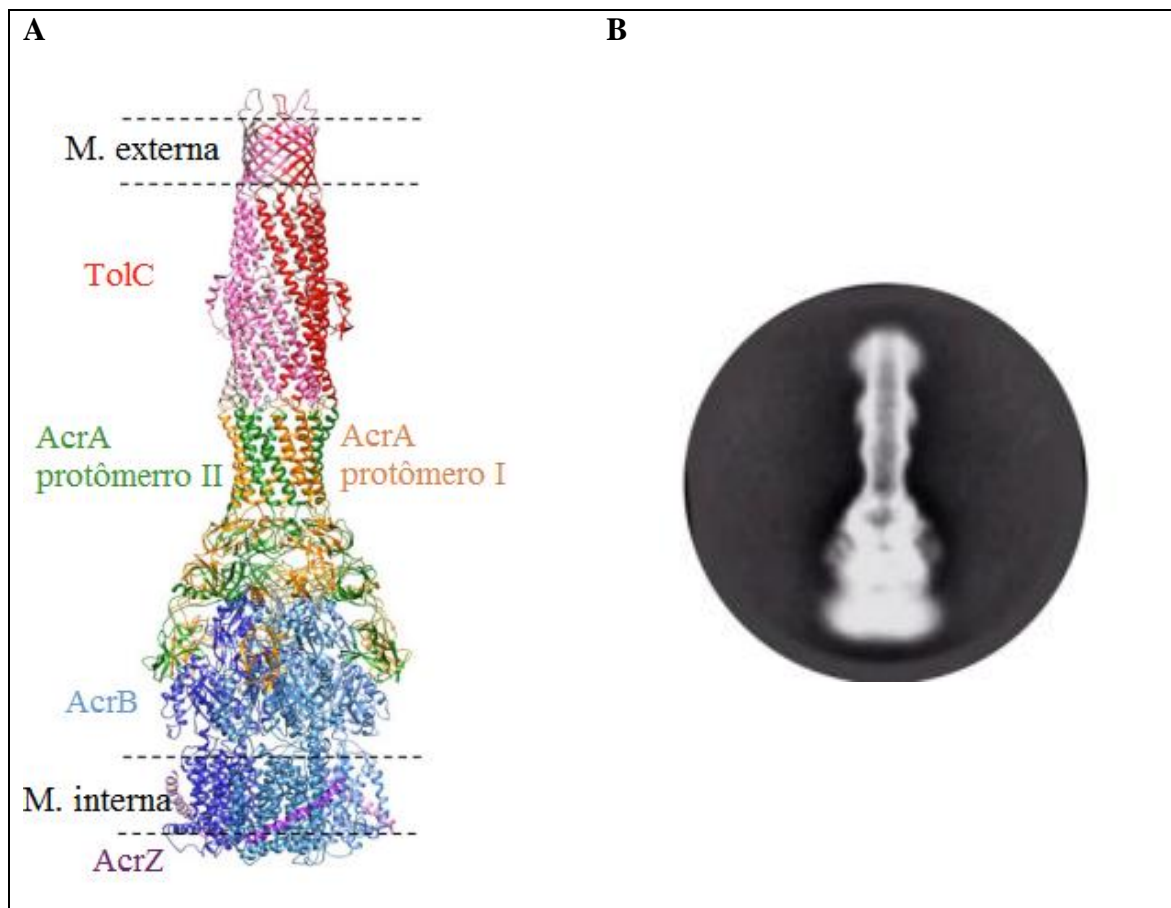
**Figura 10** – Sistema tripartido da bomba de efluxo AcrAB-TolC de *E. coli*, da família RND.



Fonte: adaptado de Lipatov, Li e Feldman (2008).

Essas proteínas apresentam 12  $\alpha$ -hélices transmembranares e *loops*, ou grandes alças perioplasmáticas entre os segmentos transmembranares 1 e 2 e entre os segmentos 7 e 8, como é o caso da subunidade AcrB (Figura 12). Outra característica dessas proteínas é que sua metade N-terminal é homóloga à metade C-terminal, sugerindo-se que essa proteína tenha surgido de uma duplicação em tandem intragênico, ou seja, quando o segmento duplicado está posicionado imediatamente adjacente ao segmento original do gene. Sugere-se que essas proteínas atuem em associação com outras proteínas, ou que elas funcionem como um homodímero, ou heterodímero (GUAN et al., 1999; MURAKAMI et al., 2002; POOLE, 2014; SENNHAUSER et al., 2009).

**Figura 11** – Estrutura da bomba de efluxo AcrAB-TolC.

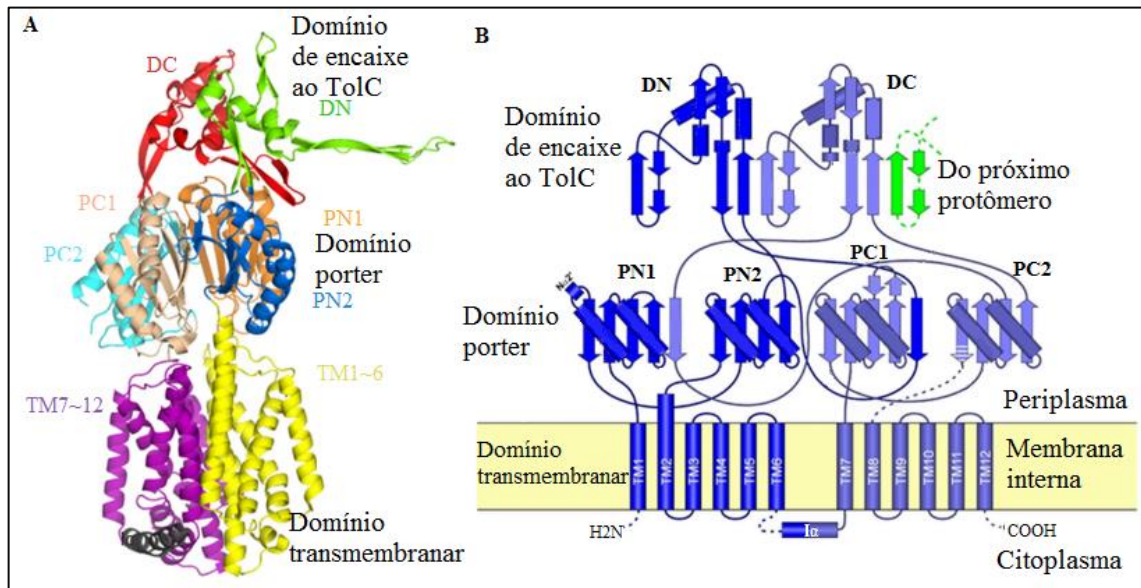


(A) Vista lateral. As subunidades são diferenciadas por cores: TolC (vermelho e rosa), AcrA (laranja e verde), AcrB (azul) e AcrZ (roxo). (B) Microscopia eletrônica criogênica da proteína. Fonte: adaptado de Wang et al. (2017).

Além do sistema AcrAB-TolC em *E. coli*, um dos membros mais estudados dessa família inclui a bomba de efluxo MexAB-OprM de *P. aeruginosa* (DU et al., 2014; LI;

NIKAIDO; POOLE, 1995; POOLE, 2001; POOLE et al., 1993). Esse sistema pode ser específico para um substrato, mas muitos reconhecem um amplo espectro, estando associados com o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (GODOY et al., 2010; KINANA et al., 2016; PIDDOCK, 2006a).

**Figura 12** – Estrutura e diagrama da topologia do monômero AcrB de *E. coli*.



(A) O monômero é mostrado em fitas com cores diferentes destacando os principais domínios e subdomínios da bomba, com as denominações e cores correspondentes à topologia ao lado. (B) Diagrama da topologia de AcrB. As metades do N- e C-terminais são representadas em azul-escuro e azul-claro e denominadas TM1-6 e TM7-12, respectivamente. O domínio *porter* é subdividido em quatro outros domínios: PN1, PN2, PC1 e PC2, projetando-se a partir do TM2 e TM7. O domínio de encaixe ao TolC é dividido nos subdomínios DN e DC. TM: hélices transmembranares;  $l\alpha$ : hélice paralela à face citoplasmática da membrana. As estruturas em gancho em verde são para inserção mútua entre domínios de encaixe ao TolC de monômeros vizinhos. Fonte: adaptado de Murakami (2016), Murakami et al. (2002), Ruggerone et al. (2013), Yamaguchi, Nakashima e Sakurai (2015).

## 2.5 BOMBAS DE EFLUXO ESPECÍFICAS

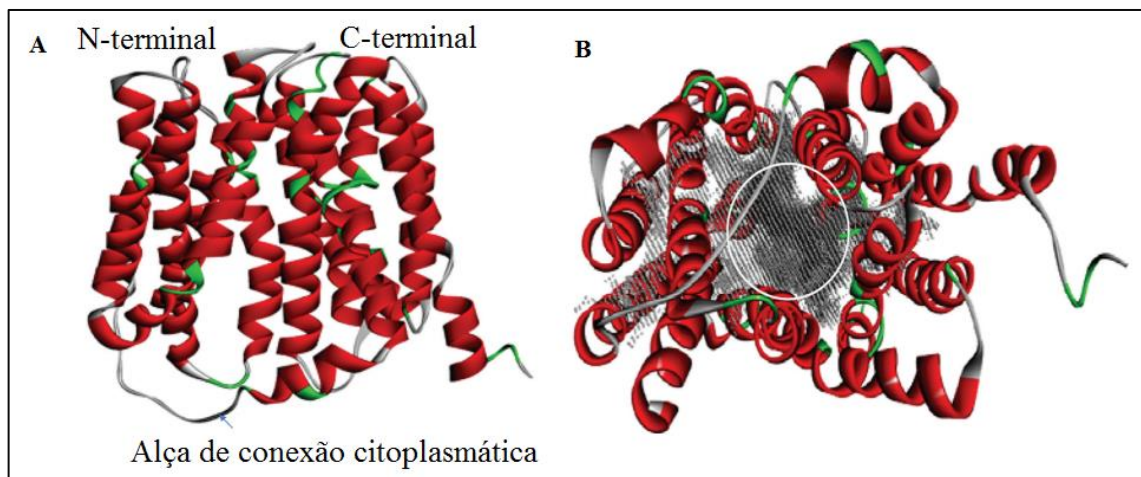
### 2.5.1 Bomba de Efluxo NorA

A NorA é uma bomba de efluxo multidrogas e um dos sistemas de efluxo mais estudados em *S. aureus*. É codificada pelo gene cromossômico *norA*, descrito pela primeira vez em um isolado resistente à fluoroquinolona e coletado pela primeira vez em 1986 em um hospital

japonês (UBUKATA; ITOH-YAMASHITA; KONNO, 1989). O gene *norA* apresenta diversidade genética, com três alelos descritos até o momento, que diferem entre si em até 10% na sequência nucleotídica (NOGUCHI et al., 2004; SCHMITZ et al., 1998a; SIERRA et al., 2000).

NorA está localizada na membrana citoplasmática e é uma proteína de 388 aminoácidos que compreende 12 segmentos transmembranares, além de pertencer à família MFS de bombas de efluxo (NEYFAKH; BORSCH; KAATZ, 1993; YOSHIDA et al., 1990). Vários estudos mostraram que NorA pode extrudar uma série de compostos quimicamente e estruturalmente diferentes, dentre estes corantes como brometo de etídio e biocidas como QACs, além compostos lipofílicos e monocíclicos como cetrimida, cloreto de benzalcônio, brometo de tetrafenilfosfônio e acriflavina (KAATZ; SEO, 1995; KAATZ; SEO; RUBLE, 1993; NEYFAKH; BORSCH; KAATZ, 1993; NG; TRUCKSIS; HOOPER, 1994). Porém, é expressivamente reconhecida por causar resistência moderada aos antibióticos da classe de fluoroquinolonas hidrofílicas como norfloxacin e ciprofloxacina (Figura 13) (NG; TRUCKSIS; HOOPER, 1994; POOLE, 2000; YOSHIDA et al., 1990).

**Figura 13** – Representação em fitas da estrutura de NorA.



(A) domínios N- e C-terminais conectados pela alça de conexão citoplasmática. (B) Visão superior das 12  $\alpha$ -hélices transmembranares com uma cavidade grande de ligação ao substrato em cinza, marcada com um círculo, composta pelas hélices I, II, IV e V da parte N-terminal e as hélices VII, VIII, X e XI da região C-terminal. Fonte: adaptado de Bhaskar et al. (2016).

Da mesma forma que outras bombas de efluxo pertencentes à família MFS, a NorA usa a força próton-motriz, ou seja, o gradiente de prótons através da membrana como fonte de energia para o transporte de antibióticos para o meio extracelular, realizando o antiporte

droga/H<sup>+</sup> (NG; TRUCKSIS; HOOPER, 1994; PALAZZOTTI et al., 2019). Dessa forma, o mecanismo de um inibidor potencial dessa proteína deverá agir, dentre outras formas, inibindo essa fonte de energia, como é o caso do protonóforo carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP), que altera a permeabilidade da membrana ao H<sup>+</sup>, dissipando o gradiente de prótons e o potencial da membrana. Ele atua como um inibidor do efluxo de brometo de etídio e norfloxacin mediado por NorA (KAATZ; SEO; RUBLE, 1993; NG; TRUCKSIS; HOOPER, 1994; PALAZZOTTI et al., 2019) como será detalhado nas sessões adiante.

Essa proteína foi identificada em cepas de *S. aureus* como SA-1199-3, SA-K1904, SA-K2361 e SA-K3092 (SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013). NorA também pode ser encontrada em bactérias Gram-negativas, como *B. fragilis* (MIYAMAE et al., 1998). Porém, umas das cepas mais estudadas que expressam NorA, consistem nas cepas SA-1199, considerada do tipo selvagem e que expressa NorA de forma induzível e a sua mutante ou derivada SA-1199B que superexpressa essa proteína de forma constitutiva (KAATZ; SEO; RUBLE, 1991, 1993).

Na cepa selvagem SA-1199 a bomba de efluxo é expressa em um nível basal, fornecendo um grau ainda que reduzido, de resistência aos antibacterianos (KAATZ; SEO, 1995; KAATZ; SEO; RUBLE, 1993). Nesses estudos com SA-1199, foi observada uma redução da CIM de brometo de etídio e norfloxacin quando adicionado o inibidor reserpina e sugeriu-se que a ação da NorA em cepas do tipo selvagem ocorra em um nível mais baixo, devido à baixa expressão dessa proteína, além de que *norA* é conhecido por ser um gene de ocorrência natural em *S. aureus* (KAATZ; SEO; RUBLE, 1993).

A comprovação de que SA-1199B expressa NorA de maneira constitutiva e não induzível, foi apresentada em estudos onde o micro-organismo pré-exposto e o grupo naive mostram características de crescimento idênticas quando cultivadas na presença de um substrato de NorA, como brometo de etídio e norfloxacin. Além disso, essas cepas apresentam uma superexpressão da proteína NorA (KAATZ; SEO, 1995; KAATZ; SEO; RUBLE, 1993). Embora se sugeriu que em SA-1199B ocorra uma leve indução da transcrição de NorA em resposta à exposição aos seus substratos, esse aumento tem pouco significado biológico, concluindo que a resistência a múltiplas drogas, mediada por NorA nesse organismo, é um fenômeno funcionalmente constitutivo, mas muito eficiente e expressiva em relação à cepa selvagem (COUTO et al., 2008; KAATZ; SEO, 1995).

Comprovou-se que o aumento na quantidade de NorA em *S. aureus* é resultante do aumento da transcrição de *norA* ou da estabilidade de seu mRNA (KAATZ; SEO, 1995;



KAATZ; SEO; RUBLE, 1993; NG; TRUCKSIS; HOOPER, 1994). O aumento da sua expressão na forma constitutiva se dá através da aquisição de mutações na região promotora e na forma induzível através da ação de proteínas reguladoras (KAATZ; SEO, 1995, 1997, 2004). Estudos comprovam que mutações pontuais podem causar diferentes efeitos no mRNA, como: levar ao aumento da meia-vida do mRNA, através de uma alteração na sua estrutura secundária, tornando-o menos sensível à ação das RNases (FOURNIER et al., 2001); um aumento na taxa de transcrição (KAATZ; THYAGARAJAN; SEO, 2005); e deleções e inserções no gene *norA*, levando ao aumento da estabilidade do transcrito (COUTO et al., 2008; DEMARCO et al., 2007; HUET et al., 2008).

As fluoroquinolonas atuam inibindo duas enzimas topoisomerasas envolvidas na replicação de DNA bacteriano, a DNA-girase, ou topoisomerase II e a topoisomerase IV, culminando na morte celular (COZZARELLI, 1980; HOOPER, 1999; SMITH et al., 2001).

Durante a replicação as enzimas helicases desenrolam a dupla hélice de DNA formando a forquilha de replicação, levando a um superenrolamento da dupla hélice, localizado logo à frente da forquilha de replicação. A DNA-girase irá atuar nesse ponto, relaxando a tensão gerada nessa parte restante do DNA. Ela irá quebrar as duas cadeias de DNA, cruzando-as e selando novamente as cadeias originalmente separadas (EZELARAB et al., 2018; GUTIERREZ; STOKES; MATIC, 2018; WANG, 1996). Já a topoisomerase IV é responsável pela decatenação, ou seja, a quebra da ligação, ente os cromossomos-filhos, permitindo sua segregação para duas células filhas (ZECHIEDRICH; COZZARELLI, 1995).

A ação das fluoroquinolonas envolve sua ligação ao complexo DNA-enzima, seja ela a DNA-girase ou topoisomerase IV, isso impedirá o funcionamento normal dessas enzimas, bloqueando a progressão da forquilha de replicação, ou inibindo a segregação dos cromossomos, impedindo a síntese normal de DNA bacteriano, levando a rápida morte celular (EZELARAB et al., 2018; GUTIERREZ; STOKES; MATIC, 2018; MARIANS; HIASA, 1997; NAWAZ et al., 2017).

Nas Gram-negativas as fluoroquinolonas tendem a agir na DNA-girase, enquanto em Gram-positivas, seu alvo é tipicamente a topoisomerase IV (BLONDEAU, 1999; HOOPER, 1999; SMITH et al., 2001). Essas especificações refletem em implicações importantes no desenvolvimento de resistência às fluoroquinolonas antigas e mais recentes. Apesar dessa especificidade mecanicista, com base em estudos enzimáticos e genéticos, constatou-se que as fluoroquinolonas de quarta geração possibilitam um mecanismo de dupla ação, inibindo as duas enzimas em espécies Gram-positivas (BLONDEAU, 1999; FISHER et al., 2003; SCHMITZ et

al., 1998b). Devido à raridade de surgimento de mutações duplas, torna-se importante e preferencial a escolha de fluoroquinolonas mais recentes, na prática clínica, limitando o surgimento de resistência a essa classe de antibióticos (SMITH et al., 2002).

### 2.5.2 Bomba de Efluxo Tet(K)

A Tet(K) está localizada na membrana plasmática e é responsável pela exportação ativa de tetraciclina da célula. Tet(K) apresenta 58% de aminoácidos com característica ácida, contém 14 hélices transmembranares e é pertencente à superfamília MFS (GUAY; KHAN; ROTHSTEIN, 1993).

Essa proteína é codificada pelo gene *tet(K)* e encontram-se predominantemente em Gram-positivas, apesar de ser crescente o número de bactérias Gram-negativas a carregá-lo, como inclusive são denominados genes *Tet* Gram-positivos, pela predominância nesses organismos, incluindo-se nesse grupo os genes *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)* e *tet(S)* (CHOPRA; HAWKEY; HINTON, 1992; GUAY; KHAN; ROTHSTEIN, 1993; ROBERTS, 1996; SPEER; SHOEMAKER; SALYERS, 1992).

Uma das formas de indicação da presença desse gene ocorre quando a Gram-positiva é resistente à tetraciclina, mas não a minociclina ou glicilciclinas (SUM; PETERSEN, 1999; TESTA et al., 1993). Esses genes são geralmente encontrados em pequenos plasmídeos, como os pequenos plasmídeos estafilocócicos, que ocasionalmente se integram ao cromossomo, ou em plasmídeos estafilocócicos maiores (GILLESPIE et al., 1987; NEEDHAM et al., 1994; SCHWARZ et al., 1998). Os pequenos plasmídeos formam uma família de plasmídeos intimamente relacionados, que variam em tamanho de 4,4 a 4,7 kb (kilobases), ou milhares de bases (PROJAN; NOVICK, 1988). A exemplo, destaca-se o plasmídeo pT181, que foi totalmente sequenciado e que também pode transportar outros genes de resistência a múltiplas drogas (KHAN; NOVICK, 1983). O gene *tet(K)* é mais comumente encontrado em *S. aureus*, mas está presente em outras espécies do gênero *Staphylococcus* (SCHWARZ et al., 1998).

A regulação da síntese de Tet(K) ocorre por atenuação traducional, sendo sua produção induzida pela presença da tetraciclina. Entretanto, ela pode ser regulada por outros fatores como pH, Na<sup>+</sup> ou K<sup>+</sup> (MCMURRY; LEVY, 2000).

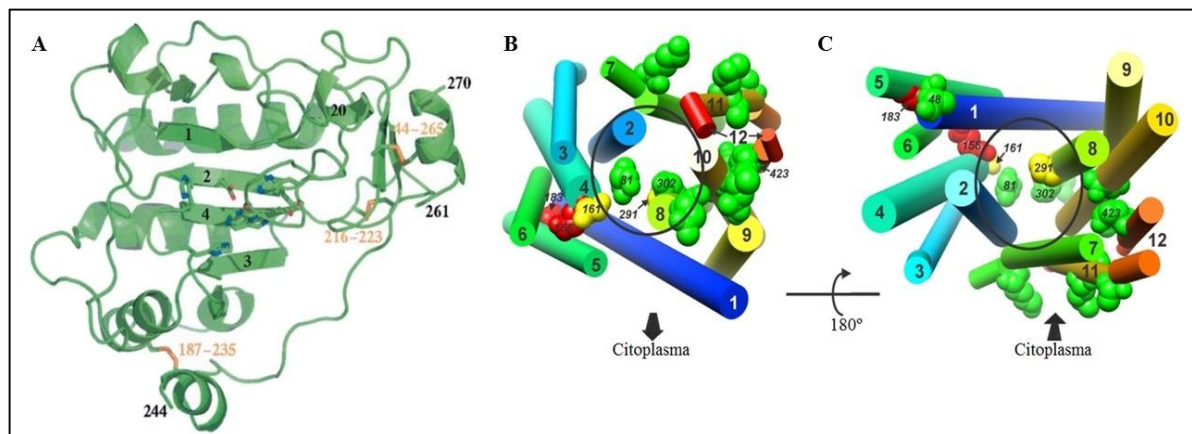
As tetraciclinas exercem sua atividade antibiótica por ligação ao ribossomo bacteriano, interferindo na tradução de proteínas. Tetraciclinas em complexo com Mg<sup>2+</sup> ligam-se à subunidade 30S e essa ligação bloqueia estericamente a ligação aminoacil-tRNA e, como

resultado, inibe a síntese proteica (BRODERSEN et al., 2000). Atuando como uma bomba de prótons, a Tet(K) utiliza-se da força próton-motriz e realiza antiporte, trocando o complexo antibiótico-Mg<sup>2+</sup> do citoplasma por íons H<sup>+</sup>, o que leva a uma diminuição na concentração intracelular de tetraciclina e dificulta o antibiótico atingir os locais-alvo no ribossomo (GINN; BROWN; SKURRAY, 1997; TAMURA et al., 2001; YAMAGUCHI; UDAGAWA; SAWAI, 1990).

### 2.5.3 Bomba de Efluxo MepA

MepA é codificada pelo gene cromossômico *mepA* e foi o primeiro transportador multidrogas da família MATE a ser descrito em *S. aureus*, conferindo o fenótipo de resistência na cepa SA-K2068 (KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005; MCALEESE et al., 2005). Essa proteína possui 451 aminoácidos e 12 segmentos transmembranares. O gene *mepA* está integrado no operon *mepRAB* (KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005). Sua fonte de energia para o transporte de substrato, é o gradiente de prótons, através do antiporte exclusivo dos íons sódio (Na<sup>+</sup>), tendo em vista que pertencem à família MATE, cujas proteínas atuam por esse mecanismo, mas diferente dessas não utilizam também o gradiente de H<sup>+</sup> (Figura 14) (HE et al., 2004; KURODA; TSUCHIYA, 2009; MORITA et al., 2000).

**Figura 14** – Estrutura da proteína MepA.



(A) Representação das fitas na estrutura MepA. Os números de hélice e resíduos específicos são indicados. O resíduo 20 encontra-se na extremidade N-terminal e o resíduo 270 está marcado no C-terminal. As quatro folhas- $\beta$  centrais estão rotuladas. Os resíduos do sítio ativo central são representados em esferas e bastões e as seis cisteínas destacadas em rosa-claro. (B) Vista superior e cilíndrica de MepA. Visão da face voltada para o citoplasma da célula. (C) Visão da face proteica voltada para o exterior da célula, estando a face citoplasmática da proteína, longe do leitor, conforme indicado pelas setas. Os

números de hélice e alguns resíduos específicos são indicados, assim como a cavidade central oval demarcada. Fonte: adaptado de Marcyjaniak et al. (2004) e Schindler et al. (2013).

Seus substratos compõem fluoroquinolonas hidrofílicas como ciprofloxacina, norfloxacina; fluoroquinolonas hidrofóbicas como moxifloxacina, sparfloxacina; glicilciclinas como tigeciclina; compostos de amônio quaternário como cloreto de benzalcônio, dequalinium, tetrafenilfosfônio, ceftrimida, pentamidina; e corantes como brometo de etídio. Vale ressaltar que as fluoroquinolonas ciprofloxacina e norfloxacina demonstraram ser substratos fracos de MepA (KAATZ; DEMARCO; SEO, 2006; KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005; MCALEESE et al., 2005).

#### **2.5.4 Bomba de Efluxo MsrA**

Essa bomba de efluxo é pertencente à família ABC, possui 488 aminoácidos, é encontrada tanto em procariotos quanto em eucariotos e confere alta resistência à macrolídeos como eritromicina e estreptograminas B, sendo encontrada nas bactérias Gram-positivas (HYDE et al., 1990; NOVOTNA et al., 2005; REYNOLDS; ROSS; COVE, 2003; ROSS et al., 1990, 1995, 1996). O gene *msrA* foi isolado pela primeira vez a partir de um plasmídeo em *Staphylococcus epidermidis* de 32 kb descrito como pUL5050. A cepa *S. aureus* RN4220 também carrega *msrA* através do plasmídeo pUL5054 (ROSS et al., 1989).

Para o funcionamento desse transportador ABC, são requeridos dois domínios de ligação ao ATP na região citoplasmática da membrana, que interagem com mais dois domínios hidrofóbicos cada um de 6 e 8 segmentos transmembranares. Esses domínios podem ser expressos como proteínas separadas ou fundidos em polipeptídeos multifuncionais (HIGGINS, 1992). Este último, é o caso da proteína MsrA, onde a proteína contém dois domínios de ligação ao ATP fundidos ao polipeptídeo funcional, mas nenhum domínio transmembranar, ou seja, carecem de domínios hidrofóbicos que atravessam a membrana, característicos dos transportadores clássicos ABCs (ROSS et al., 1996). Estudos anteriores sugerem que a MsrA interage com outra proteína, tendo em vista que não possui os domínios de abrangência de membranas, no entanto, esta proteína putativa não foi identificada em *S. aureus* (ROSS et al., 1995).

Apesar de que até o momento, não há nenhuma evidência direta, lançou-se um mecanismo hipotético para a função de MsrA, onde seu mecanismo alternativo envolve a interação das proteínas NBD2 com o ribossomo, inibindo a ligação do antibiótico ao sítio alvo no rRNA, reduzindo a acessibilidade do sítio alvo ribossômico para drogas MLS (macrolídeos,

lincosamidas e estreptograminas) e reduzindo a força próton-motriz para a importação de antibióticos. Essa é denominada “hipótese de proteção do ribossomo”, que também se estende para outras proteínas ABCs procarióticas que não apresentam os domínios transmembranares, mas que consistem apenas em dois NBDs fundidos em um único polipeptídeo (CAPOBIANCO; GOLDMAN, 1990; KERR, 2004).

Outra teoria denominada “hipótese do cuco”, postula que as proteínas NBD2 associam-se com proteínas que atravessam a membrana interna para formar complexos de funcionais de efluxo, enfatizando o NBD como um domínio maleável funcionalmente (KERR; REYNOLDS; COVE, 2005; REYNOLDS; ROSS; COVE, 2003). Evidências para esse mecanismo, foram baseadas em estudos onde o acúmulo de eritromicina em *S. aureus* é reduzido, após a transformação com o gene *msrA* que codifica NBD2 (ROSS et al., 1990).

É importante ressaltar que os macrolídeos são antibióticos que se caracterizam pela presença de uma lactona macrocíclica, em sua estrutura básica, onde se ligam um ou mais açúcares. Essa estrutura pode conter de 14 a 16 elementos, consistindo em átomos de carbono, oxigênio ou nitrogênio. De acordo com essa estrutura cíclica, os macrolídeos são divididos em grupos, sendo mais aplicados clinicamente o de 14 elementos do qual fazem parte a eritromicina, a roxitromicina, a claritromicina e a diritromicina; e o de 15 elementos, que é o grupo onde se encontra a azitromicina (WALSH, 2003; WANG, 2009).

A eritromicina é um macrolídeo bacteriostático, que inibe a síntese proteica de bactérias. Seu mecanismo de ação envolve sua ligação reversível ao RNA ribossômico 23S, da subunidade 50S do ribossomo, bloqueando a saída da cadeia peptídica em formação através do túnel de saída, na biossíntese proteica bacteriana (KANOH; RUBIN, 2010; SCHLÜNZEN et al., 2001; TENSON; LOVMAR; EHRENBERG, 2003). A resistência a esse antibiótico ocorre por modificação do alvo, ou seja, através da modificação do rRNA 23S. A eritromicina não o reconhecendo, não poderá se ligar ao ribossomo, dando progressão ao processo de síntese normal das proteínas (GUO; YUAN; YANG, 2015; VARALDO; MONTANARI; GIOVANETTI, 2009). As diferenças estruturais entre os macrolídeos irão influenciar no seu modo de ligação e eficácia. Esses fatores devem ser considerados no desenvolvimento de macrolídeos mais potentes, visando superar a resistência bacteriana (LIANG; HAN, 2013).

## 2.6 INIBIDORES DE BOMBA DE EFLUXO

Os inibidores de bomba de efluxo (EPI) têm sido cada vez mais investigados como novos agentes terapêuticos. São moléculas responsáveis pela inibição das proteínas de extrusão, usufruindo-se de um ou mais mecanismos para tal inibição, sendo usadas como adjuvantes na ação protagonista do antibiótico, levando ao acúmulo bem-sucedido deste, e conseqüentemente potencializando seu efeito contra as bactérias. Tais moléculas inibidoras são projetadas com o intuito de aumentar a concentração intracelular do antibiótico, diminuir a resistência bacteriana intrínseca e reverter a resistência adquirida, reduzindo o surgimento de cepas mutantes com resistência (BHARDWAJ; MOHANTY, 2012; LI; NIKAIDO, 2004; SUN; DENG; YAN, 2014; ZECHINI; VERSACE, 2009).

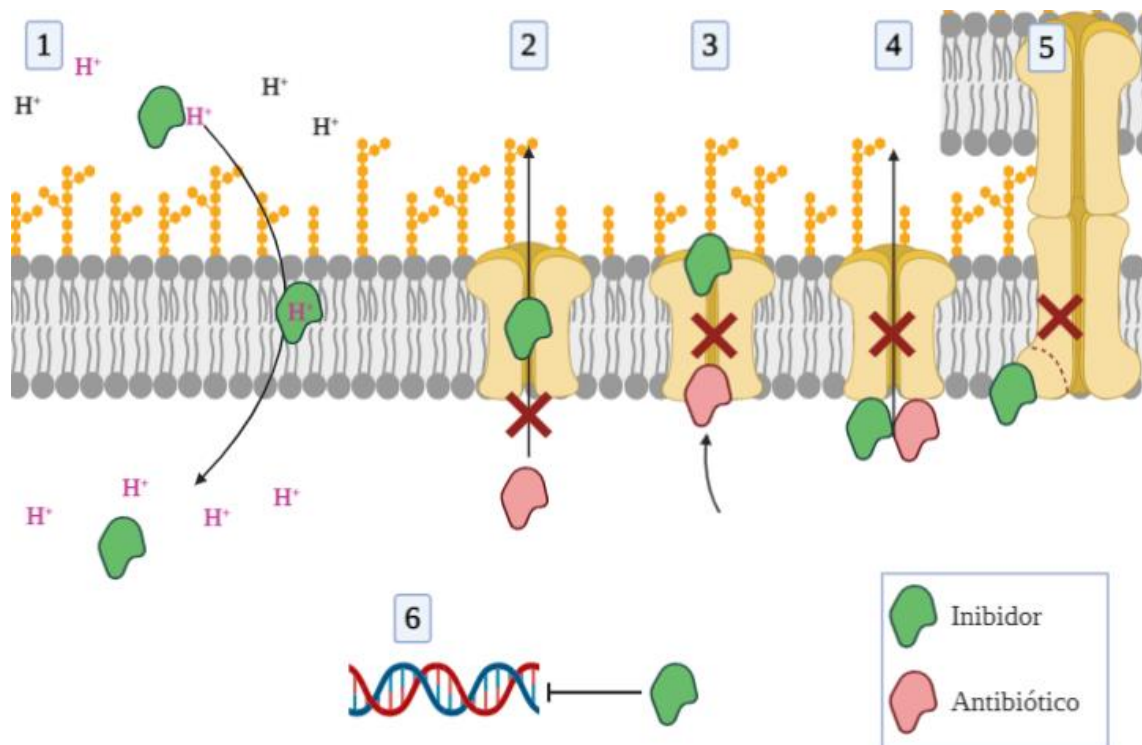
O aumento da concentração intracelular do antibiótico, estimulará um aumento da sua janela de seleção de mutantes, que corresponde a faixa entre a concentração mínima necessária apenas para inibir o crescimento de bactérias selvagens, até a concentração que inibe o crescimento do mutante menos suscetível. Essa concentração do limite superior também é denominada de concentração de prevenção de mutantes. Esse aumento é importante, pois, a colocação de concentrações acima da janela, restringe o enriquecimento seletivo de bactérias resistentes. Esse valor é específico para cada combinação bactéria-antibiótico, mas corresponde a um valor 5 a 10 vezes maior que a CIM (DRLICA, 2003).

As principais estratégias de inibição do efluxo de antibióticos incluem ação direta ou indireta sobre a bomba de efluxo e ação sobre o antibiótico. No primeiro caso, a inibição ocorre através da: modificação nos mecanismos reguladores, levando a repressão da expressão dos genes da bomba de efluxo (PURSELL; POOLE, 2013); obstrução direta do ducto de saída da proteína, impedindo que se complete a extrusão (ZENG et al., 2010); colapso ou recolhimento da energia necessária para o transporte da droga, por exemplo, uso de desacopladores de energia, levando a diminuição do gradiente de prótons (MARTINS et al., 2008; PAGÈS; MASI; BARBE, 2005; VAN BAMBEKE; PAGÈS; LEE, 2006; VIVEIROS et al., 2005); interferência na montagem de bombas de efluxo interrompendo sua funcionalidade, uma estratégia válida especialmente em proteínas de efluxo com um sistema tripartido, como as bombas RND, presentes em Gram-negativas (TIKHONOVA; YAMADA; ZGURSKAYA, 2011; ZGURSKAYA; NIKAIDO, 2000).

A estratégia de inibição envolvendo os antibióticos, ocorre através do redesenho ou modificação estrutural dos antibióticos já existentes, para que não sejam mais reconhecidos

pelas bombas de efluxo, evitando interações com motivos proteicos da bomba (CHOLLET et al., 2004; CHOPRA, 2002; HOBBS et al., 2012; RICE et al., 2005); formação de complexos EPI-substrato, que impedem a extrusão do antibiótico da célula (ZLOH; KAATZ; GIBBONS, 2004); e por fim reduzir a ligação do substrato à proteína através da inibição competitiva ou não competitiva da bomba de efluxo, revertendo a resistência e suprimindo o surgimento de mutações que levam à resistência (Figura 15) (ASHIMA K. BHARDWAJ; PRIYABRATA MOHANTY, 2012; LOMOVSKAYA; BOSTIAN, 2006; MAHAMOUD et al., 2007; MARQUEZ, 2005; NAKASHIMA et al., 2013; NGUYEN et al., 2015; OPPERMAN et al., 2014; OPPERMAN; NGUYEN, 2015; PAGES; AMARAL; FANNING, 2011).

**Figura 15** – Mecanismos gerais de inibição de bomba de efluxo.



Fonte: o autor.

Existem várias características requeridas para a que um EPI seja considerado ideal e possa ser comercializado, destacando-se: deve diminuir a extrusão e aumentar o acúmulo do substrato da bomba de efluxo; possuir seletividade e ser livre de atividades farmacológicas nas células eucarióticas, de forma que não seja tóxico a essas células; ser desprovido de atividade antibacteriana direta, pois, isso levaria ao desenvolvimento de resistência contra o próprio inibidor; ao agir sinergicamente com os antibióticos, produzir um efeito superior em relação ao

antibacteriano isoladamente; sua produção deve ser economicamente viável e sua síntese não pode ser demorada, ou difícil; deve ser proteoliticamente estável para evitar sua degradação, garantindo estabilidade dos níveis séricos aumentados e acúmulo celular, para que seja ativo em infecções intracelulares; ter um índice terapêutico e perfil farmacocinético ideal, garantindo sua especificidade e alto índice terapêutico e perfil adequado de ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) (BHARDWAJ; MOHANTY, 2012; PIDDOCK, 2006; VAN BAMBEKE; PAGÈS; LEE, 2006; ZECHINI; VERSACE, 2009).

Em relação ao seu modo de ação, os inibidores podem ser amplamente caracterizados em duas categorias: os dissipadores de energia e os que se ligam diretamente à bomba de efluxo. Todas as bombas de efluxo necessitam de uma fonte de energia, sendo elas o gradiente de prótons ou ATP, sendo que a dissociação destas fontes acarretaria a inibição da função proteica normal. Como representante desse inibidor está o CCCP, um protonóforo que dissipa a força próton-motriz, modificando o potencial eletroquímico transmembranar para o íon  $H^+$  ( $\Delta\mu H^+$ ). Após ligar-se reversivelmente aos prótons ( $H^+$ ), transporta-os através da membrana levando a despolarização desta, como consequência da interferência no gradiente de concentração eletroquímica, ocorre a diminuição da síntese de ATP pela célula (NI et al., 2016; SPINDLER et al., 2011; YU et al., 2015).

Nesse caso a inibição da bomba de efluxo pode ocorrer tanto pela ausência de gradiente de prótons, necessário para o antiporte durante o efluxo, quanto de forma indireta, onde a despolarização após a dissipação do gradiente eletroquímico, leva a uma interferência da atividade da ATP-sintase e conseqüentemente a redução da produção de ATP e da atividade de bombas que utilizam essa fonte de energia (SPINDLER et al., 2011; YU et al., 2015). Além de reduzir a produção de ATP, também se comprovou que esse protonóforo aumenta a permeabilidade da membrana em bactérias (MOHAMED et al., 2016; NI et al., 2016; PARK; KO, 2015).

Ao verificar que esses mecanismos podem tornar as células bacterianas metabolicamente inativas, levantou-se um debate sobre os possíveis mecanismos de ação secundários do CCCP e se seus efeitos sinérgicos ocorrem por inatividade da bomba de efluxo ou por inatividade metabólica das células. Resultados que embasam essas hipóteses demonstraram um efeito sinérgico entre CCCP e tetraciclina, reativando a atividade desse antibiótico, frente *Helicobacter pylori* e *Klebsiella* spp. (ANOUSHIRAVANI; FALSAFI; NIKNAM, 2009; FENOSA et al., 2009) e seu sinergismo com carbapenêmicos, independente da atividade inibidora do efluxo do CCCP (SEKYERE; AMOAKO, 2017).



Como o CCCP não é usado clinicamente devido sua citotoxicidade, seu uso é limitado para experimentos em laboratório (LI; PLÉSIAT; NIKAIDO, 2015; MAHAMOUD et al., 2007). Diversos métodos de avaliação de inibição utilizando CCCP são utilizados, sendo aplicável inclusive em teste de difusão em disco, onde é mensurado o diâmetro das zonas de inibição ao redor do disco, tendo como ponto de corte, uma inibição  $\geq 5$  mm como padrão positivo (HUANG et al., 2008).

Outra classe de inibidores agrupados com base em seu mecanismo de ação, inclui os inibidores que se ligam direta e funcionalmente à bomba, resultando na inibição da interação da proteína com seu substrato. A ligação entre o EPI e a bomba de efluxo pode ser competitiva, quando o EPI se liga exatamente nos mesmos sítios de ligação do substrato, competindo com este; ou não competitiva, quando o inibidor se liga em outros sítios que não os domínios exatos de ligação do substrato, resultando na diminuição da sua afinidade com a bomba de efluxo. Um exemplo clássico de um inibidor dessa classe é a fenilalanina-arginina  $\beta$ -naftilamida (PA $\beta$ N) também conhecido como MC-207,110, um MC-peptidomimético. O PA $\beta$ N foi descrito pela primeira vez em 1999 e caracterizado em 2001, sendo o primeiro inibidor das bombas da família RND a ser caracterizado, inibindo várias (LOMOVSKAYA et al., 2001; MAHAMOUD et al., 2006), mas nem todas as bombas de efluxo de RND (SÁNCHEZ; LE; MARTÍNEZ, 2003).

O PA $\beta$ N é comumente usado como controle positivo na investigação de vários sistemas de efluxo de bactérias Gram-negativas, principalmente em *P. aeruginosa* e *E. coli*, e como sonda química para estudar a resistência antimicrobiana e avaliar novos inibidores de origem sintética ou natural (MAHMOOD et al., 2016). É considerado de amplo espectro, pois, pode inibir efetivamente diversos sistemas de efluxo como MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM, de *P. aeruginosa* e a bomba AcrAB-TolC de *E. coli* (DREIER; RUGGERONE, 2015; LOMOVSKAYA et al., 2001; RENU et al., 1999).

Sendo um substrato das bombas RND, ele atua como um inibidor competitivo, ligando-se aos sítios da proteína de efluxo de maneira semelhante aos antibióticos, a bomba de efluxo o reconhece como substrato e enfim o expulsa. Enquanto isso, o antibiótico permanece e sua concentração intracelular aumenta, restaurando sua atividade antibacteriana (ASKOURA et al., 2011; LOMOVSKAYA; BOSTIAN, 2006; LOMOVSKAYA; WATKINS, 2001; MAHAMOUD et al., 2007; ZECHINI; VERSACE, 2009).

Algumas evidências alegam que os resíduos de aminoácidos aos quais o PA $\beta$ N interage, afeta adicionalmente a permeabilidade da membrana externa e de maneira dose-dependente, em cepas selvagens de *E. coli* e cepas mutantes de *P. aeruginosa* deficientes da bomba de efluxo

MexAB-OprM, relacionando esse efeito com seu o seu caráter dicatiônico. Outros estudos comprovam o aumento da permeabilidade como método alternativo de ação, causando instabilidade na membrana e potencializando a atividade de antibióticos em cepas sem bomba de efluxo funcional (LAMERS; CAVALLARI; BURROWS, 2013; LOMOVSKAYA et al., 2001; MATSUMOTO et al., 2011; OPPERMAN; NGUYEN, 2015).

Relatou-se que o PA $\beta$ N restaura a atividade da eritromicina, cloranfenicol, levofloxacina e, recentemente, vancomicina (LAMERS; CAVALLARI; BURROWS, 2013; LOMOVSKAYA et al., 2001; RENAU et al., 1999). Porém, não se mostrou tão eficaz quando combinado com tetraciclina e carbenicilina, sugerindo que esses antibióticos possuem sítios de ligação diferentes do PA $\beta$ N (LOMOVSKAYA et al., 2001; RENAU et al., 1999). Em alguns estudos o PA $\beta$ N apresentou efeito sinérgico quando associado à norfloxacina, eritromicina e brometo de etídio, frente as cepas de *S. aureus* portadoras de bombas de efluxo (FIGUEREDO et al., 2020; TINTINO et al., 2016, 2017).

Em estudos de simulação de dinâmica molecular e estudos de ancoragem, o PA $\beta$ N induziu mudanças conformacionais no canal de extrusão, através de torções na estrutura da bolsa distal, prejudicando a ligação adequada dos substratos. Além disso, sua ligação com os bolsos de interação e com o *loop* ou alça G, um componente importante para a extrusão, reduziu sua flexibilidade e comprometeu a exportação de medicamentos por essas estruturas (MÜLLER et al., 2017; VARGIU et al., 2014; VARGIU; NIKAIDO, 2012). No entanto, essa molécula e derivados são considerados muito tóxica para serem utilizados em terapia (LOMOVSKAYA; BOSTIAN, 2006).

A vantagem da utilização desse inibidor, é que dificilmente as bactérias desenvolverão resistência a esse composto, pois, uma mutação na proteína de efluxo também resultaria em inabilidade em expelir o antibiótico do meio intracelular. Em contrapartida, a desvantagem da utilização desse EPI é sua acumulação nos tecidos e sua citotoxicidade já comprovada, impossibilitando sua aplicação clínica (OPPERMAN; NGUYEN, 2015; PAGÈS; AMARAL, 2009; RENAU et al., 2003; SJUTS et al., 2016).

Em estudos de modelagem molecular, foi ainda possível demonstrar que alguns inibidores de bombas MDR possuem afinidade pelo substrato do transportador. Utilizando inibidores como reserpina e GG918, pode-se observar a formação de complexos com os medicamentos anticâncer doxorubicina e vimblastina. Esse complexo inibidor-medicação, facilita a entrada da droga na célula e evita seu efluxo, devido ao complexo inibidor-medicação ser um substrato mais pobre para a bomba de efluxo MDR, sendo dificultado seu

reconhecido pelo transportador (RATHI; KUMAR; KINI, 2020; ZLOH; KAATZ; GIBBONS, 2004).

Além da classificação por mecanismo de ação, os inibidores são classificados com base em sua origem, em três grupos: inibidores de origem natural, sintéticos e medicamentos já comercializados. Dentre os inibidores derivados de plantas destacam-se: alcaloides como piperina (KUMAR et al., 2008); polifenóis como epicatequina-galato e epigallocatequina-galato, este último causou potencialização da tetraciclina frente *S. aureus* portadora de Tet(K) (ROCCARO et al., 2004); a capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida), que demonstrou atividade inibidora de NorA contra SA-1199B (GIBBONS; MOSER; KAATZ, 2004; HAN; TAN; LIM, 2006; KALIA et al., 2012); flavonoides, como baicaleína (CHAN et al., 2011; FUJITA et al., 2005) e diterpenos fenólicos como geraniol (LORENZI et al., 2009).

Os EPIs de origem sintética são: compostos peptidomiméticos como PAβN (LOMOVSKAYA et al., 2001; VARGIU; NIKAIDO, 2012); derivados de quinolonas, como piridoquinolonas (CHEVALIER et al., 2001); as fluoroquinolonas, que são substratos conhecidos para NorA, NorB, NorC e MepA, e diversos derivados de fluoroquinolonas, como os análogos da ofloxacina (GERMAN et al., 2008); análogos da piperina, tendo em vista que a piperina é um alcaloide com ação eficiente frente bombas de efluxo NorA e MdeA de *S. aureus* (BHARDWAJ et al., 2002; KHAN et al., 2006; KUMAR et al., 2008; MIRZA et al., 2011); e inibidores à base de indol, como 5-nitro-2-fenilindol ou INF 55, foi identificado como inibidor de NorA agindo sinergicamente com ciprofloxacina contra SA-1199B (MARKHAM et al., 1999; SAMOSORN et al., 2006).

Dentre os EPIs já comercializados como fármacos, destaca-se a reserpina que se mostrou efetiva frente as cepas de *S. aureus*, inibindo as proteínas NorA, Tet(K) e MepA (AESCHLIMANN et al., 1999; GIBBONS; UDO, 2000; KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005); a paroxetina, um inibidor da receptação de serotonina, foi capaz de inibir as proteínas NorA e MepA em *S. aureus* (KAATZ et al., 2003a); inibidores seletivos da COX-2, como celecoxibe inibiu o efluxo de EtBr na cepa SA-1199B (SABATINI et al., 2012); verapamil, um bloqueador dos canais de cálcio e anti-hipertensivo, potencializou o efeito da ciprofloxacina frente a cepa SA-1199B (HOLLER et al., 2012); e o omeprazol, inibidor de bomba de prótons, atuou frente as cepas SA-1199B e SA-1199-3 (AESCHLIMANN et al., 1999).

Muitos inibidores de bombas de efluxo em mamíferos também podem ser eficientes inibidores em células bacterianas, tendo em vista que compartilham substratos semelhantes e esses sistemas apresentam similaridades estruturais (NEYFAKH; BIDNENKO; LAN BO

CHEN, 1991). Como é o caso do GG918, também conhecido como elacridar, um inibidor sintético da P-gp que potencializou a ação antibiótica da norfloxacina e ciprofloxacina, inibindo as proteínas NorA e MepA (AESCHLIMANN et al., 1999; GIBBONS; OLUWATUYI; KAATZ, 2003; NEYFAKH; BIDNENKO; LAN BO CHEN, 1991).

**Tabela 1** – Bombas de efluxo encontradas em células procarióticas e seus principais substratos.

<b>Cepa</b>	<b>Tipo de membrana/ Coloração de Gram</b>	<b>Bomba de efluxo</b>	<b>Família</b>	<b>Fonte de energia da bomba de efluxo</b>	<b>Substratos</b>	<b>Citações</b>
<i>S. aureus</i> 1199	Gram-positiva	NorA	MFS	Força próton-motriz; antiporte antibiótico/H <sup>+</sup>	Norfloxacina, ciprofloxacina clorafenicol, berberina e brometo de etídio,	(COUTO et al., 2008; DEMARCO et al., 2007; KAATZ; SEO, 1995; LAW; MALONEY; WANG, 2008; NEYFAKH; BORSCH; KAATZ, 1993; TSENG et al., 1999)
<i>S. aureus</i> 1199B	Gram-positiva	NorA	MFS	Força próton-motriz; antiporte antibiótico/H <sup>+</sup>	Norfloxacina, ciprofloxacina clorafenicol, berberina e brometo de etídio.	(COUTO et al., 2008; DEMARCO et al., 2007; KAATZ; SEO, 1995; LAW; MALONEY; WANG, 2008; NEYFAKH; BORSCH; KAATZ, 1993; TSENG et al., 1999)
<i>S. aureus</i> IS-58	Gram-positiva	Tet(K)	MFS	Força próton-motriz; antiporte do complexo	Tetraciclina e brometo de etídio	(BISMUTH et al., 1990; CHOVANOVÁ et al., 2015; GUAY et al., 1993; GUAY; KHAN; ROTHSTEIN, 1993;

---

<i>S. aureus</i> RN4220	Gram-positiva	MsrA	ABC	antibiótico-Mg <sup>2+</sup> por íons H <sup>+</sup> ATP	Macrolídeos como eritromicina, estreptograminas tipo B e brometo de etídio, Norfloxacina, ciprofloxacina, glicilciclias, brometo de etídio, biocidas, como clorexidina, ceftriaxona e dequalinium β-lactâmicos, floroquinolonas, macrolídeos como eritromicina, novobiocina tetraciclina clorafenicol, rifampicina, ácido fusídico, ácido nalidíxico solventes, sais bilíares, cristal violeta e brometo de etídio.	LIMAVERDE et al., 2017; SCHWARZ et al., 1998) (LUBELSKI; KONINGS; DRIESSEN, 2007; REYNOLDS; ROSS; COVE, 2003; WITEK et al., 2020) (KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005; KAATZ; MOUDGAL; SEO, 2002; MCALEESE et al., 2005; MORIYAMA et al., 2008; OMOTE et al., 2006) (CHOLLET et al., 2004; MA et al., 1995; PIDDOCK, 2006b; TSUKAGOSHI; AONO, 2000; WHITE et al., 1997; YAMAGUCHI; NAKASHIMA; SAKURAI, 2015)
<i>S. aureus</i> K- 2068	Gram-positiva	MepA	MATE	Força próton- motriz; antiporte antibiótico/Na <sup>+</sup>		
<i>E. coli</i>	Gram-negativa	AcrAB- TolC	RND	Força próton- motriz; antiporte antibiótico/H <sup>+</sup>		

---

<i>E. coli</i>	Gram-negativa	ErmE	SMR	Força próton-motriz; antiporte antibiótico/H <sup>+</sup>	Macrolídeos, tetraciclinas, acriflavina, cloreto de benzalcônio, eritromicina, sulfadiazina, metil viologen, cristal violeta e brometo de etídio.	(BAY; ROMMENS; TURNER, 2008; NASIE; STEINER-MORDOCH; SCHULDINER, 2012; PAULSEN et al., 1996b; VAN BAMBEKE; PAGÈS; LEE, 2006; YERUSHALMI; LEBENDIKER; SCHULDINER, 1995; CHUNG; SAIER, 2001)
<i>P. aeruginosa</i>	Gram-negativa	MexAB-OprM	RND	Força próton-motriz; antiporte antibiótico/H <sup>+</sup>	β-lactâmicos, fluoroquinolonas como levofloxacina, macrolídeos, tetraciclinas, trimetoprim, sulfonamidas, cloranfenicol, glicilciclinas, e brometo de etídio.	(DEAN et al., 2003; KÖHLER et al., 1996; LAMERS; CAVALLARI; BURROWS, 2013; LI; NIKAIDO; POOLE, 1995; MORITA et al., 2001; NAKAE et al., 1999; TSENG et al., 1999)

### 2.6.1 Identificação da ocorrência de inibição de bomba de efluxo

A avaliação inicial de um EPI consiste na triagem de sua atividade antibacteriana intrínseca, provando inicialmente que a redução de CIM do antibiótico não é consequência da ação antibacteriana do inibidor. Para esses ensaios as cepas são normalmente estudadas em pares, consistindo em um progenitor do tipo selvagem e seu mutante portador de bomba de efluxo. Uma cepa nocaute que também pode ser utilizada. Um indicador de EPI consiste em efeito sinérgico mais expressivo na cepa portadora de bomba de efluxo em relação à cepa selvagem, além de ocorrência de crescimento na cepa nocaute, sem sistema de efluxo. As Gram-positivas frequentemente utilizadas em testes de inibição consistem nas cepas: progenitora do tipo selvagem de *S. aureus* SA-1199 e seu derivado SA-1199B que superexpressa NorA, usadas por serem bem caracterizadas. Seus substratos comuns incluem as fluoroquinolonas, principalmente ciprofloxacina e norfloxacina e EtBr (KAATZ et al., 2003b, 2003a; KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005; KAATZ; SEO, 1997; KAATZ; SEO; RUBLE, 1991; SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013).

Em estudos com Gram-negativas, são amplamente utilizadas as cepas superexpressoras de MexAB-OprM como *P. aeruginosa* PAM1032 e PAM1723 e as cepas superexpressoras de AcrAB-TolC de *Enterobacter aerogenes* EA-27 e CM-64 (LOMOVSKAYA et al., 2001; MARTINS et al., 2010; MOREIRA et al., 2009).

Diferentes métodos podem ser usados para avaliação de potenciais EPIs. Entre eles, um método amplamente usado é a medição de fluorescência de diversas moléculas (JOUX; LEBARON, 2000; MARTINS et al., 2006; OLMSTED; KEARNS, 1977). Esse agente fluorescente deve ser um componente com alta capacidade de permeabilidade, pois, a permeabilidade da membrana pode ser regulada ao reduzir-se o número de porinas ou por aumento da camada de lipopolissacarídeos do envelope celular (DAVIN-REGLI et al., 2008; VIVEIROS et al., 2007).

A exemplo desses agentes, destaca-se o brometo de etídio (EtBr) um fluorocromo intercalante de DNA, substrato comum de bombas de efluxo MDR, incluindo quase todas as bombas de efluxo de *S. aureus* estudadas (AMARAL et al., 2011; AMARAL; FANNING; PAGÉS, 2010). É considerado um corante de alta eficiência, sendo usado como sonda para monitorar tanto o efluxo como capacidade de acumulação na célula, tendo em vista que o efluxo é o único mecanismo de resistência a esse composto. Além de ser um indutor da expressão gênica de NorA (KAATZ; SEO, 1995; MARKHAM et al., 1999).



As bactérias são carregadas com EtBr em doses subletais, seguida da adição de um desacoplador da força próton-motriz ou outro inibidor de efluxo, usado como controle positivo (AMARAL et al., 2011; VIVEIROS et al., 2008a). O EtBr é concentrado a um ponto em que se torna fluorescente (laranja), durante a exposição à ultravioleta e sua fluorescência é detectada utilizando um fluorímetro especializado (JERNAES; STEEN, 1994; SABNIS, 2010; VIVEIROS et al., 2008a).

O princípio desse ensaio consiste na passagem das moléculas fluorescentes através da parede celular e membrana citoplasmática por difusão passiva, acumulando-se no interior da bactéria, mas que só podem ser removidas pelo sistema de efluxo ativo. No caso de bactérias Gram-negativas essa passagem se dá por meio dos canais de porina (AMARAL; FANNING; PAGÉS, 2010). Em solução aquosa da região extracelular, o EtBr emite fluorescência fraca, mas torna-se fortemente fluorescente no periplasma e no citoplasma de células viáveis, devido à intercalação do corante com componentes celulares como o DNA (JERNAES; STEEN, 1994; OLMSTED; KEARNS, 1977). A ligação aos componentes celulares deve ser fraca para que o EtBr haja como sonda do efluxo, pois, uma intercalação posterior no DNA resulta em uma ligação muito forte impedindo sua dissociação e efluxo desse substrato (JERNAES; STEEN, 1994; JOUX; LEBARON, 2000; PAIXÃO et al., 2009). A sua acumulação na célula refletirá o equilíbrio entre influxo por difusão passiva e o efluxo (VIVEIROS et al., 2008b).

Tendo em vista que EtBr emite fluorescência apenas quando no interior celular, onde se intercala no DNA, uma diminuição na fluorescência ao longo do tempo significa que nenhum inibidor de bomba está presente e que o EtBr está sendo expulso das células livremente, pois, o efluxo é a única forma de resistência a esse composto. Do contrário, um aumento na fluorescência após sua adição, é um indicador da presença de EPI (BLAIR; PIDDOCK, 2016; GIBBONS; OLUWATUYI; KAATZ, 2003; MARKHAM et al., 1999). O efluxo continuará até que a concentração de EtBr supere a capacidade da própria bomba, sendo necessário que o carregamento das células com o EtBr ocorra em uma concentração abaixo da sua CIM, para não interferir na viabilidade celular (VIVEIROS et al., 2008a, 2008b).

O princípio da ação inibitória direta do EtBr deve-se ao fato de que ele é uma molécula plana que se intercala entre os pares de bases do DNA e desenrola parcialmente a dupla hélice, inibindo a DNA-polimerase e RNA-polimerase, interferindo, como consequência, a replicação (LEPECQ; PAOLETTI, 1967; WANG, 1969; WARING, 1966). Essa ligação causa uma redução da torção do DNA, que possui um superenrolamento negativo, removendo esse enrolamento das hélices, até que elas fiquem completamente relaxadas e em seguida pode

estimular um superenrolamento positivo, se a concentração desse agente aumentar gradualmente, ou seja, o relaxamento e torção contrária ocorre proporcionalmente à quantidade do corante ligada ao DNA (BAUER; VINOGRAD, 1968; OLAVARRIETA et al., 2002; WANG, 1969). Também foi relatada uma interferência na interação histona-DNA pelo corante EtBr (ERARD et al., 1979). Por essa razão é importante seu uso em doses abaixo de sua CIM, em ensaios microbiológicos.

O EtBr também é efetivo na eliminação de fatores de resistência de bactérias de diversos gêneros como *Enterobacter* e *Staphylococcus*, como comprovado em um dos primeiros estudos da relação entre resistência e EtBr, utilizando a metodologia de microdiluição em caldo (BOUANCHAUD; SCAVIZZI; CHABBERT, 1968).

Em Gram-negativas, a concentração de EtBr ocorre dentro do periplasma (JERNAES; STEEN, 1994). Na fase inicial de entrada, quando o EtBr ainda está em baixas concentrações e não pode ligar-se irreversivelmente aos componentes internos, ele pode ser expelido pelos sistemas de efluxo. Mas quando sua concentração no espaço periplasmático excede significativamente sua extrusão, as moléculas que não são extrudadas atravessam a membrana plasmática interna e intercalam-se quase irreversivelmente aos ácidos nucleicos, fase em que o efluxo não é mais possível (JOUX; LEBARON, 2000; LEE et al., 2000; SEEGER et al., 2008; SHARPLES; BROWN, 1976). No caso dessas bactérias o efluxo é ainda mais lento, pois, ocorre primeiro dissociação dos componentes, seguida do efluxo em duas etapas, onde o EtBr é transportado do citoplasma para o periplasma e deste para o exterior da célula. Nas Gram-positivas, assim que o fluorocromo excede a capacidade das bombas de efluxo da membrana plasmática, ele se liga rapidamente aos ácidos nucleicos (MARTINS et al., 2013; PAIXÃO et al., 2009).

As fluoroquinolonas como ciprofloxacina, também são naturalmente fluorescentes, porém, sua fluorescência é a mesma, seja intra ou extracelular. Neste caso para verificar sua quantidade na célula, o fármaco primeiramente deve ser acumulado no interior celular, as células são então lavadas, lisadas e a quantidade de fluoroquinolona medida através da intensidade de fluorescência e o valor obtido, relacionado ao peso celular seco. Por se tratar de um antibiótico já estabelecido, seu uso torna-se clinicamente relevante em relação aos corantes, na verificação da eficiência de acúmulo intracelular (MORTIMER; PIDDOCK, 1991; PIDDOCK et al., 1999).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir serão detalhados os tópicos referentes a metodologia aplicada para a realização do presente trabalho, incluindo a síntese química, testes microbiológicos e ensaios *in silico*.

#### 3.1 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS DE 1,8-NAFTIRIDINAS SULFONAMÍDICAS

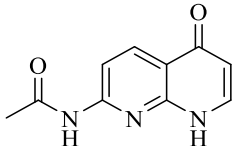
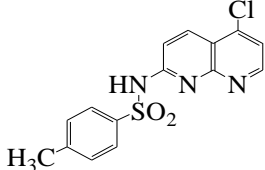
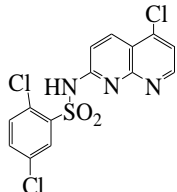
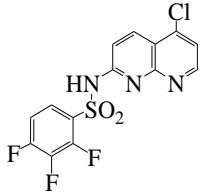
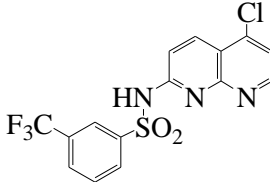
Os compostos foram fornecidos pelo professor Dr. Luiz Everson da Silva da Universidade Federal do Paraná (UFPR). A síntese foi adaptada e conduzida de acordo com a metodologia descrita por Saupe et al. (1991). O processo de síntese iniciou-se pela *N*-(6-aminopiridin-2-il)-acetamida e seus derivados subsequentes. A síntese ocorreu a partir da termólise do aduto do ácido de Meldrum, nesse processo é formada a 2-acetamido-5-cloro-1,8-naftiridina e o derivado amino desta naftiridina, foi obtido por uma reação de hidrólise com ácido sulfúrico. Os derivados sulfonamídicos finais foram obtidos pela sulfonilação da 2-amino-5-cloro-1,8-naftiridina com diferentes cloretos de benzenossulfonila comerciais. Obteve-se através dessa rota sintética *N*-(5-cloro-1,8-naftiridin-2-il)-benzenosulfonamidas que foram testadas no presente estudo, conforme listadas na Tabela 2.

#### 3.2 MODELAGEM MOLECULAR E ESTUDOS DE DOCAGEM

A estrutura tridimensional (3D) de MepA foi elucidada com base na identidade de sequência com alto *scoring*, baixo valor de E, resolução mais alta e o fator R da estrutura do modelo realizada por meio pelo BLASTP com uma sequência de entrada *S. aureus* NCTC 8325 obtida a partir de dados de sequência do genoma de *S. aureus* 8325-4 e SH1000. As coordenadas para a estrutura da consulta foram obtidas pelo alinhamento do Clustal X. O programa Phyre2 foi usado para prever a estrutura tridimensional de MepA, enquanto I-TASSER e MODELLER 9.14, foram usados para confirmar a previsão do Phyre2 (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). O modelo final foi avaliado pelo gráfico de Ramachandran gerado pelo *software* PROCHECK para verificar a qualidade estereoquímica da estrutura da proteína. O desvio quadrático médio do modelo foi calculado pela sobreposição do modelo 3D com o modelo usando o Swiss-PDB Viewer (PDB ID: 4LZ9). A estrutura topográfica dos bolsos e cavidades foi intermediada pelo servidor CASTp com um valor padrão

de 1,4 Å para o raio (<http://cast.engr.uic.edu>). O 3DLigandSite é um servidor da web para previsão de sítios de ligação de ligantes.

**Tabela 2** – 1,8-naftiridinas testadas *in vitro* e *in silico*.

Sigla	Representação estrutural	Nomenclatura química do composto
Composto 1		<i>N</i> -(5-oxo-5,8-dihidro-1,8-naftiridin-2-il)-acetamida
Composto 2		4-metil- <i>N</i> -(5-cloro-1,8-naftiridin-2-il)-benzenosulfonamida
Composto 3		2,5-dicloro- <i>N</i> -(5-cloro-1,8-naftiridin-2-il)-benzenosulfonamida
Composto 4		2,3,4-trifluoro- <i>N</i> -(5-cloro-1,8-naftiridin-2-il)-benzenosulfonamida
Composto 5		3-trifluormetil- <i>N</i> -(5-cloro-1,8-naftiridin-2-il)-benzenosulfonamida

A triagem virtual e o encaixe foram realizados pelo servidor SwissDock (<http://www.swissdock.ch/>) (GROSDIDIER; ZOETE; MICHIELIN, 2011). As coordenadas 3D dos ligantes foram geradas usando o servidor online CORINA, e a energia foi minimizada com um campo de força universal usando um algoritmo de gradiente conjugado com 200 iterações de execução ([http://www.molecularnetworks.com/online\\_demos/corina\\_demo](http://www.molecularnetworks.com/online_demos/corina_demo)). As execuções de acoplamento foram realizadas às cegas, cobrindo toda a proteína e definindo as coordenadas de uma região de interesse como bolsas de ligação para garantir a abordagem de acoplamento cego. Todas as conformações de ligante melhor acopladas foram salvas, e os ângulos, comprimentos e interações de ligações de hidrogênio foram analisadas usando o

programa de visualização UCSF Chimera. O programa Discovery Studio (DS) foi utilizado para detalhar as interações. A pontuação de energia de ligação foi usada para calcular a constante de inibição (valor de  $K_i$ ) com base na equação de Onawole et al. (2018). Para a medição da Eficiência do Ligante (EL) utilizou-se a equação determinada por Nissink (2009).

Também realizou-se a previsão da estrutura 3D de NorA e identificaram-se os bolsos potenciais de ligação responsáveis pelo efluxo, em concordância com o estudo realizado por Santos et al. (2018). As simulações de docagem foram realizadas por AutoDock Vina usando o *software* UCSF Chimera. Utilizou-se o servidor CORINA e a carga parcial de Gasteiger para gerar as coordenadas das estruturas químicas. As energias conformacionais dos inibidores foram minimizadas usando o UCSF Chimera. Antes de realizar a docagem molecular, a proteína NorA foi modelada por Santos et al. (2018) e todos os arquivos foram preparados usando uma ferramenta Dock Prep., disponível no pacote de *software* UCSF Chimera. Para a execução do encaixe flexível definiu-se uma região de coordenada de interesse com 5 Å desta coordenada ( $x = 29,78$ ;  $y = 49,65$ ;  $z = 71,78$  e tamanho da caixa com  $x = 46,00$ ;  $y = 38,00$ ; e  $z = 30,00$ ) da proteína como bolsa de ligação.

### **3.3 ESTUDOS *IN SILICO* DE FARMACOCINÉTICA E PREVISÕES DE BIOATIVIDADE**

#### **3.3.1 Verificação da propriedade de semelhança a drogas, análise da regra de Lipinski e previsões das propriedades ADME**

O reconhecimento de moléculas pelo alvo terapêutico e a resposta biológica, envolve parâmetros farmacocinéticos como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade. Dessa forma, o conhecimento estrutural sobre este alvo ajudará a filtrar candidatos fortes ou fracos nos estágios iniciais do desenvolvimento de fármacos em potencial. Com essa finalidade, utilizou-se o servidor SwissADME para gerar a previsão de descritores físico-químicos, a definição de propriedades farmacocinéticas e propriedades semelhantes a drogas (<http://www.swissadme.ch>).

#### **3.3.2 Previsões de bioatividade usando *Molinspiration Cheminformatics***

A *Molinspiration Cheminformatics* é uma ferramenta de *software* de quiminformática que calcula a bioatividade do ligante para os seguintes alvos: receptores acoplados à proteína

G, inibidores de quinases, bloqueadores/moduladores de canais iônicos, protease, ligantes de receptor nuclear e outros alvos enzimáticos. O potencial de atividade molecular é medido através de *scores*, com base na contribuição do fragmento, de modo que a soma das contribuições da atividade, e *scores* de atividade molecular, foram processadas em uma interface online do servidor *Molinspiration Cheminformatics*. Valores acima de 0, representam uma atividade molecular satisfatória frente o alvo; se o valor de *score* estiver entre -5.0 a 0.0, a molécula é considerada ativa de forma moderada; em contrapartida, *scores* menores que -5.0, representam que uma molécula é inativa (<http://www.molinspiration.com>).

### 3.4 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

Os antibióticos ciprofloxacina, eritromicina, norfloxacina e tetraciclina; o brometo de etídio e o carbonilcianeto 3-clorofenil-hidrazona (CCCP), foram obtidos na Sigma Aldrich Co. Ltd. Os antibióticos e as 1,8-naftiridinas foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% e posteriormente em água estéril até obter-se uma concentração de 1024 µg/mL. O CCCP foi dissolvido numa solução de metanol/água em uma proporção 1:1. As soluções de brometo de etídio foram dissolvidas em água destilada e estéril, e armazenadas a -20 °C, protegidas da luz.

### 3.5 CEPAS BACTERIANAS

Foram utilizadas as seguintes cepas de *S. aureus*: SA-1199, SA-1199B, ambas expressando da bomba de efluxo NorA, conferindo resistência às fluoroquinolonas como norfloxacina e ciprofloxacina; SA IS-58 que expressa Tet(K), extrudindo antibióticos como tetraciclina; SA RN4220 que expressa MsrA, conferindo resistência aos macrolídeos como a eritromicina; e a cepa SA K-2068, que expressa a proteína MepA, capaz de realizar a extrusão de fluoroquinolonas. Essas cepas, foram gentilmente cedidas pelo Prof. Glenn Kaatz (*Wayne State University School of Medicine*) e Prof. Simon Gibbons (*University College London*). Um dia antes da realização dos experimentos, essas estirpes foram semeadas e cultivadas *overnight* a 37 °C em Agar infusão de coração (*Heart Infusion Agar*, HIA, Difco) (GIBBONS; OLUWATUYI; KAATZ, 2003).

### **3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E INIBIDORA DE BOMBA DE EFLUXO**

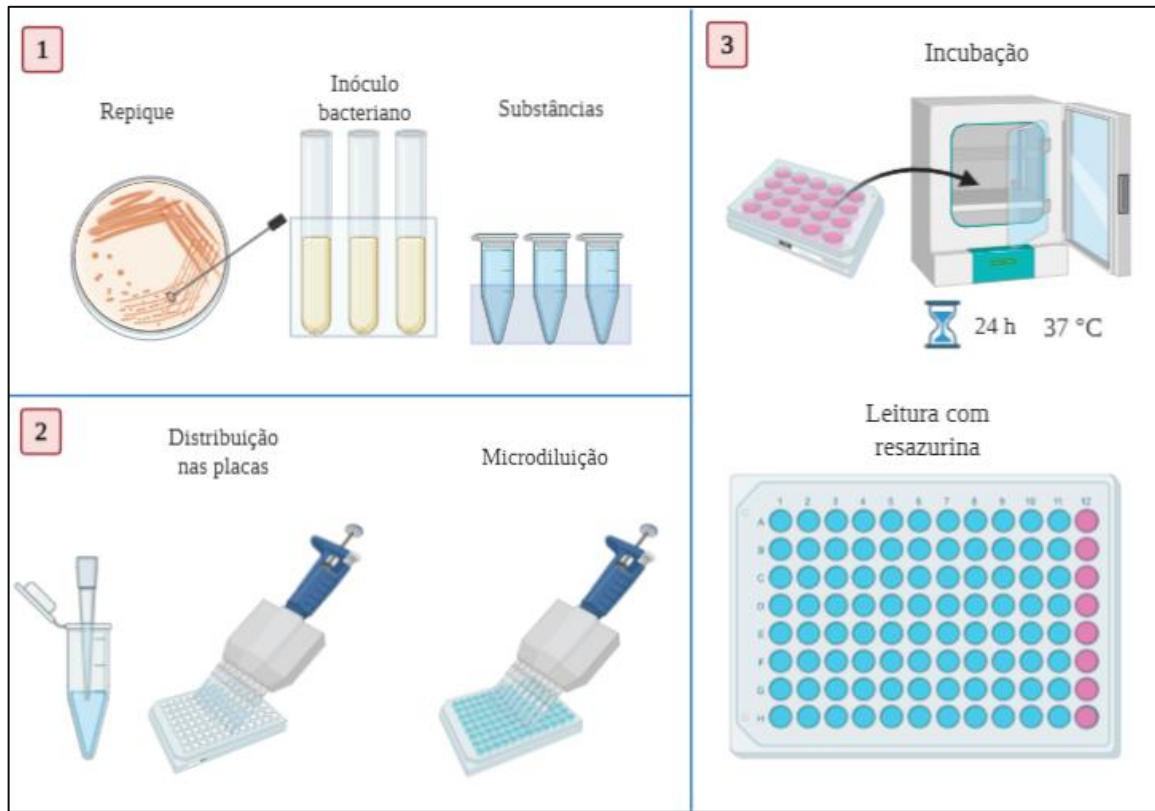
#### **3.6.1 Verificação da atividade antibacteriana pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM)**

Para a determinação da concentração inibitória mínima das 1,8-naftiridinas foram realizados ensaios de microdiluição em caldo, conforme demonstrado na Figura 16. Foram utilizados 100 µL do inóculo bacteriano suspenso em solução salina, correspondente a 0,5 na escala de McFarland. Em Eppendorfs® adicionou-se 900 µL do meio de cultura Agar infusão de cérebro e coração ou BHI (*Brain Heart Infusion*), para obtenção do volume final de 1 mL. Uma alíquota de 100 µL deste meio com inóculo, foi distribuída em placas de microtitulação de 96 poços. Diluições seriadas foram realizadas com ciprofloxacina, ou brometo de etídio e 1,8-naftiridinas, em uma proporção 1:1, até obter concentrações variando de 0,5 a 512 µg/mL. Não houve microdiluição no último poço para garantir o controle do crescimento. Frente as cepas SA-1199, SA-1199B foi utilizado o antibiótico norfloxacina; e contra as cepas SA IS-58, SA RN4220 e SA K-2068 foram utilizados tetraciclina, eritromicina e ciprofloxacina, respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, e o crescimento bacteriano foi avaliado pela adição de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido). A concentração inibitória mínima foi estabelecida como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano (CLSI, 2018; TINTINO et al., 2017).

#### **3.6.2 Avaliação da inibição de bomba de efluxo por redução da CIM dos antibióticos e do brometo de etídio (EtBr)**

Para análise da inibição da bomba de efluxo, as 1,8-naftiridinas foram utilizadas em concentrações subinibitórias (CIM/8). Cada cepa bacteriana foi suspensa em solução salina, formando um inóculo bacteriano com número de células no meio correspondente a 0,5 na escala de McFarland. Na preparação do grupo controle, 150 µL do inóculo bacteriano foi transferido para o Eppendorf® e adicionado 1350 mL de BHI. Para a avaliação das substâncias, foi preparada uma solução contendo 150 µL de cada inóculo, cada naftiridina em CIM/8, e o volume final complementado com BHI até obter-se uma solução final de 1,5 mL. Uma alíquota de 100 µL dessas soluções foram distribuídas em microplacas de 96 poços e diluídas em série

**Figura 16** – Método de microdiluição em caldo, utilizado na verificação da atividade antibacteriana e inibidora de bomba de efluxo.



Fonte: o autor.

na proporção 1:1, com 100  $\mu\text{L}$  do antibiótico correspondente a cada cepa, ou brometo de etídio, ambos em uma concentração inicial de 1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , obtendo concentrações finais variáveis de 0,5 a 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A incubação e a leitura foram realizadas conforme o protocolo mencionado no item anterior. A concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração de antibiótico ou brometo de etídio capaz de inibir o crescimento bacteriano (CLSI, 2018; TINTINO et al., 2017).

### 3.6.3 Avaliação da inibição de bomba de efluxo pelo ensaio de emissão da fluorescência de EtBr

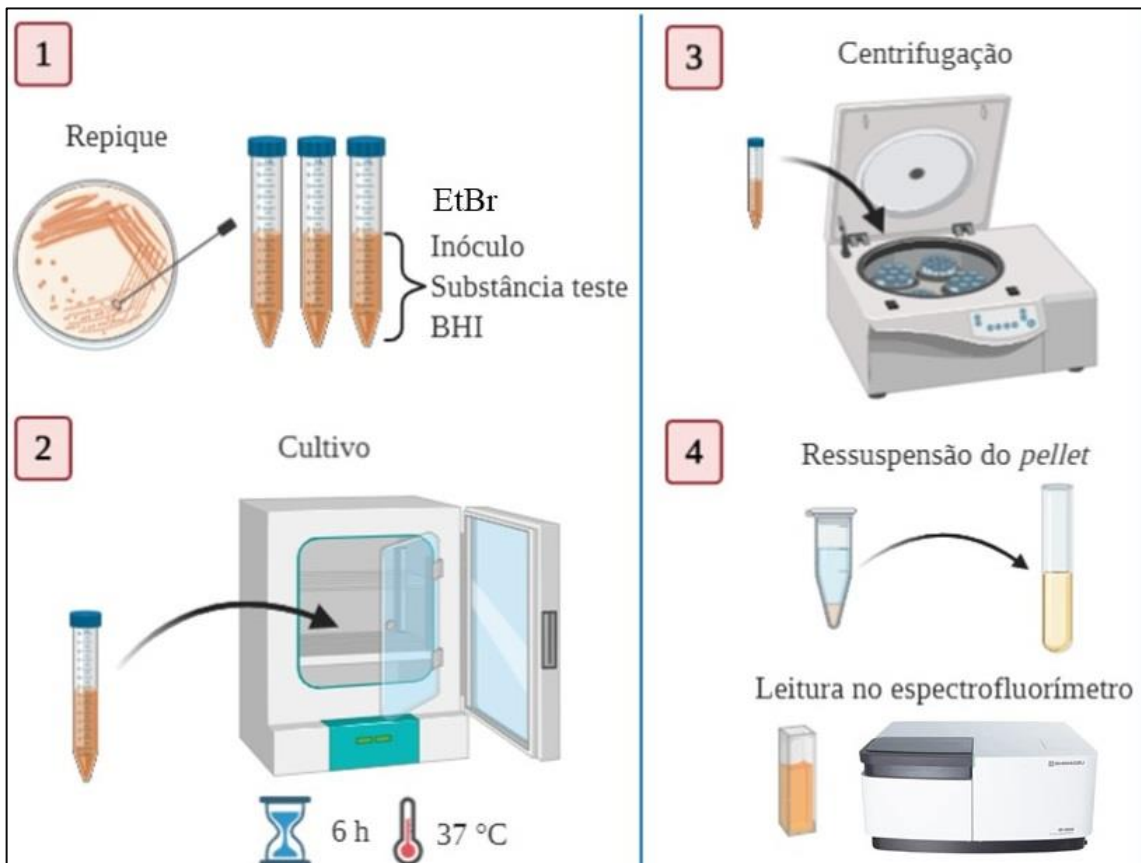
As cepas utilizadas nesse teste foram SA-1199B e SA K-2068. As cepas foram cultivadas em HIA por 24 h, a uma temperatura de 37 °C. Posteriormente foi preparado o inóculo suspendendo as cepas em solução salina, correspondendo a 0,5 na escala de McFarland. Em seguida prepararam-se as soluções de teste, contendo 500  $\mu\text{L}$  do inóculo, as substâncias e



o volume final complementado com BHI até obter-se um volume de 2 mL, mantidas em estufa a 37 °C em incubação por seis horas. Em seguida, centrifugaram-se as amostras a 3.000 rpm por 3 min, e o *pellet* obtido foi ressuspensão em 3 mL solução salina para a leitura da emissão de fluorescência. Os seguintes grupos foram preparados e testados: controle negativo consistindo no inóculo bacteriano + brometo de etídio; controle positivo contendo inóculo + brometo de etídio + CCCP; grupo de teste contendo inóculo + brometo de etídio + 2,3,4-trifluoro-*N*-(5-cloro-1,8-naftiridin-2-il)-benzenosulfonamida (Composto 4). Todas as substâncias estavam em uma concentração subinibitória.

Os espectros de fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro Shimadzu RF6000 com uma lâmpada de xenônio de 150 W para excitação da amostra. As amostras foram adicionadas em uma cubeta de quartzo (caminho óptico de 10 mm) de quatro faces polidas e submetidas à excitação de luz espalhada com comprimento de onda máximo de 530 nm, velocidade de varredura de 600 nm/min e resolução espectral de 3 nm. A emissão foi monitorada de 400 a 800 nm com incrementos de 0,5 nm (TINTINO et al., 2018) (Figura 17).

**Figura 17** – Método de determinação da inibição do efluxo por medição da emissão da fluorescência de EtBr.



Fonte: o autor.

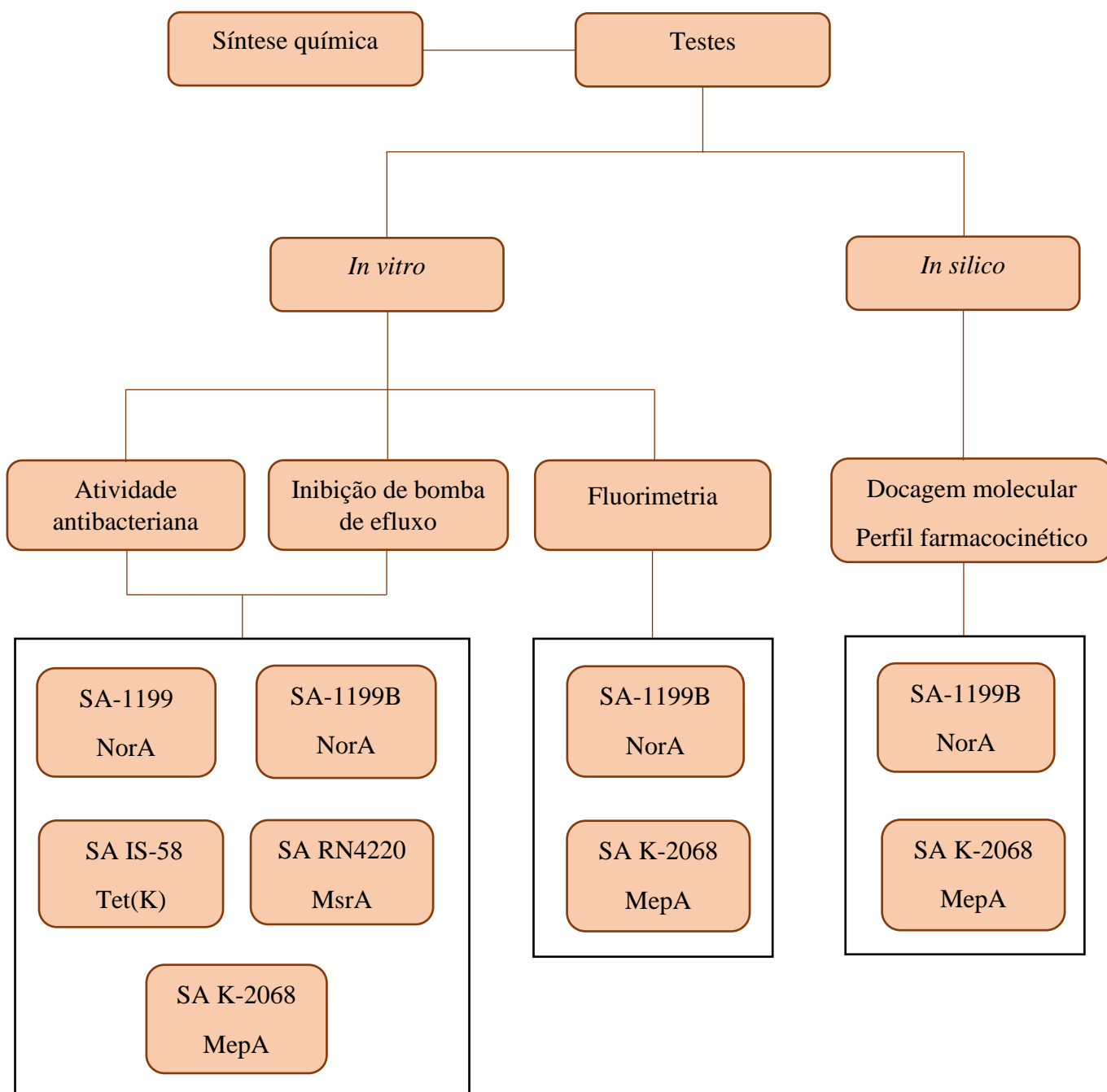
### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios microbiológicos foram realizados em triplicatas, e os resultados foram expressos em média geométrica. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de duas vias, seguida do *post hoc* Bonferroni, utilizando o *software* GraphPad Prism® versão 5.0.

### 3.8 SÚMULA METODOLÓGICA

A seguir é apresentado um diagrama esquemático, demonstrando os testes realizados e as respectivas cepas utilizadas. Os testes foram realizados seguindo a ordem proposta na Figura 18.

**Figura 18** – Diagrama da organização dos testes.



#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados em forma de Artigos referentes aos artigos produzidos, conforme mostra a Tabela 3.

**Tabela 3** – Organização dos Resultados obtidos.

Capítulo/Artigo	Título	Situação	Periódico
Artigo 1	Chemical synthesis, molecular docking and MepA efflux pump inhibitory effect by 1,8-naphthyridines sulfonamides.	Publicado	European Journal of Pharmaceutical Sciences (EJPS)
Artigo 2	The 1,8-naphthyridines sulfonamides are NorA efflux pump inhibitors.	Publicado	Journal of Global Antimicrobial Resistance (JGAR)
Artigo 3	Do 1,8-naphthyridine sulfonamides possess an inhibitory action against Tet(K) and MsrA efflux pumps in multiresistant <i>Staphylococcus aureus</i> strains?	Publicado	Microbial Pathogenesis

#### **4.1 ARTIGO 1: CHEMICAL SYNTHESIS, MOLECULAR DOCKING AND MepA EFFLUX PUMP INHIBITORY EFFECT BY 1,8-NAPHTHYRIDINES SULFONAMIDES**

Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino<sup>1</sup>, Saulo Relison Tintino<sup>2</sup>, Débora Feitosa Muniz<sup>2</sup>, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>2</sup>, Raimundo Luiz Silva Pereira<sup>2</sup>, Iêda Maria Begnini<sup>3</sup>, Ricardo Andrade Rebelo<sup>3</sup>, Luiz Everson da Silva<sup>4</sup>, Sandro Lucio Mireski<sup>3</sup>, Michele Caroline Nasato<sup>3</sup>, Maria Isabel Lacowicz Krautler<sup>3</sup>, Pedro Silvino Pereira<sup>1</sup>, Tereza Cristina Leal Balbino<sup>5</sup>, José Galberto Martins da Costa<sup>6</sup>, Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues<sup>6</sup>, Alexandre Magno Rodrigues Teixeira<sup>7</sup>, Humberto Medeiros Barreto<sup>8</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>9</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>2</sup>, Teresinha Gonçalves da Silva<sup>1</sup>

Manuscrito publicado no periódico: European Journal of Pharmaceutical Sciences (EJPS)

Link para acesso: <https://www.journals.elsevier.com/european-journal-of-pharmaceutical-sciences>

Qualis (2017-2020): A1

Fator de impacto em 2021: 3,616



**Chemical synthesis, molecular docking and MepA efflux pump inhibitory effect by 1,8-naphthyridines sulfonamides**

Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino<sup>1</sup>, Saulo Relison Tintino<sup>2</sup>, Débora Feitosa Muniz<sup>2</sup>, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>2</sup>, Raimundo Luiz Silva Pereira<sup>2</sup>, Iêda Maria Begnini<sup>3</sup>, Ricardo Andrade Rebelo<sup>3</sup>, Luiz Everson da Silva<sup>4</sup>, Sandro Lucio Mireski<sup>3</sup>, Michele Caroline Nasato<sup>3</sup>, Maria Isabel Lacowicz Krautler<sup>3</sup>, Pedro Silvino Pereira<sup>1</sup>, Tereza Cristina Leal Balbino<sup>5</sup>, José Galberto Martins da Costa<sup>6</sup>, Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues<sup>6</sup>, Alexandre Magno Rodrigues Teixeira<sup>7</sup>, Humberto Medeiros Barreto<sup>8</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>9</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>2\*</sup>, Teresinha Gonçalves da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Pharmatotoxicological Prospecting of Bioactive Products, Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, UFPE, Recife, PE, Brazil

<sup>2</sup> Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

<sup>3</sup> Department of Chemistry, Regional University of Blumenau, FURB, Itoupava Seca, 89030-903, Blumenau, SC, Brazil

<sup>4</sup> Postgraduate Program in Sustainable Territorial Development, Coastal Sector, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

<sup>5</sup> Department of Microbiology, Oswaldo Cruz Foundation, Aggeu Magalhães Research Center, CPqAM/Fiocruz, UFPE Campus, Recife, PE, Brazil

<sup>6</sup> Laboratory of Natural Products, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

<sup>7</sup> Laboratory of Simulations and Molecular Spectroscopy, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

<sup>8</sup> Laboratory of Microbiology, Federal University of Piauí, UFPI, Teresina, PI, Brazil

<sup>9</sup> Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

\* Corresponding author:

Henrique Douglas Melo Coutinho

E-mail: [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com);

## Abstract

This study aimed to evaluate the antibacterial activity and to verify, *in silico* and *in vitro*, the inhibition of efflux mechanisms using a series of synthesized 1,8-naphthyridines sulfonamides against *Staphylococcus aureus* strains carrying MepA efflux pumps. The chemical synthesis occurred through the thermolysis of the Meldrum's acid adduct. The sulfonamide derivatives were obtained by the sulfonylation of 2-amino-5-chloro-1,8-naphthyridine with commercial benzenesulfonyl chloride. Antibacterial activity was assessed by the broth microdilution test. Efflux pump inhibitory capacity was evaluated *in silico* by molecular docking and *in vitro* by analyzing synergistic effects on ciprofloxacin and ethidium bromide (EtBr) and by EtBr fluorescence emission assays. The following 1,8-naphthyridines were synthesized: 4-methyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Compound 10a); 2,5-dichloro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Compound 10b); 4-fluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Compound 10c); 2,3,4-trifluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Compound 10d); 3-trifluoromethyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Compound 10e); 4-bromo-2,5-difluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Compound 10f). The 1,8-naphthyridines derivatives associated with sulfonamides did not show antibacterial activity. However, they showed a favorable pharmacokinetic profile with possible MepA efflux pump inhibitory action, demonstrated in molecular docking. In addition to the promising results in reducing the concentration of intracellular EtBr, 1,8-naphthyridines act as putative agents in the inhibitory action of the MepA efflux pump.

**Keywords:** antibacterial agent; bacterial resistance; ethidium bromide; fluorescence; SA-K2068; MepA efflux pump

## 1 Introduction

The *Staphylococcus aureus* bacterium is an opportunistic pathogen, where imbalances in metabolism, use of prostheses and catheters, or during invasive procedures, allow its entry into the circulation, causing serious infections, especially for immunosuppressed individuals (Cluff and Reynolds, 1965; Malanoski et al., 1995; Mathew et al., 1995; Wertheim et al., 2005). It is responsible for several infections such as infectious endocarditis, bacteremia, osteomyelitis, scalded skin syndrome, toxic shock syndrome, pulmonary and urinary tract infections (Carvalho et al., 2005; Cavalcanti et al., 2005; Tong et al., 2015). The development of resistance to multiple drugs through resistance mechanisms has been an aggravating factor, provided by the efflux pumps, responsible for the extrusion of antibiotics, such as the MepA efflux pump (Kaatz et al., 2005; Schindler, Patel, Seo, & Kaatz, B.D. 2013). In view of the various infections caused by this pathogen, several studies aim to discover and synthesize new agents that try to circumvent bacterial resistance or restore the effectiveness of existing antibiotics.

The 1,8-naphthyridines are among these synthetic substances to be analyzed, aiming to use them in antibacterial action. They are heterocyclic compounds formed by two condensed aromatic rings, each containing a nitrogen atom (Litvinov, 2004, 2006). The first naphthyridine derivative was synthesized in 1893 by Reissert, and unsubstituted representatives 1,5-naphthyridine and 1,8-naphthyridine, synthesized in 1927 (Bobrański and Sucharda, 1927; Koller, 1927b; G. 1927a, G. 1927c; Lowe, 2009; Reissert, 1893). The great interest in this class of compounds can be seen by the significant number of publications, many addressing the chemistry of these heterocycles and their pharmacological and microbiological properties (Fu et al., 2015; Gurjar and Pal, 2019; Leshner et al., 1962; Litvinov, 2004; Madaan et al., 2015; Thomas et al., 2003).

Little research exists on the antibacterial activity of 1,8-naphthyridine derivatives associated with sulfonamides. In addition, they are precursors of fluoroquinolones (FQs) (Ball and Tillotson, 1995; Hong et al., 1997; Liliam and Jackson, 1998; Tillotson, 1996). Therefore, this study aimed to evaluate the antibacterial activity and to verify, *in silico* and *in vitro*, the inhibition of efflux resistance mechanisms of a series of synthesized 1,8-naphthyridines sulfonamides against strains carrying the MepA efflux pumps.



## 2 Methods

### 2.1 Synthesis

#### 2.1.1 Experimental

The melting points were obtained on a Köfler (Microquímica APF-301) hot-stage apparatus and were uncorrected. Each analytical sample was homogeneous as confirmed by thin-layer chromatography (TLC) performed on silica-gel (Kieselgel 60 F 254-Merck) plates, which were visualized with UV light, while flash chromatography was performed using a Merck silica-gel 60 (230–400 mesh). Infrared spectra were determined using a Bruker Vertex 70 spectrophotometer with ATR/FTIR. Nuclear magnetic resonance spectra were recorded with a Bruker Ultrashield™ 300 spectrometer using tetramethylsilane as the internal standard. Chemical shifts were recorded in ppm with the solvent resonance as the internal standard. Data are reported as chemical shifts, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet), coupling constants (Hz), and integration. The 2,6-diaminopyridine (**1**) was obtained commercially (Aldrich) and purified by refluxing in chloroform for 5 h.

High-resolution mass spectra were obtained with a Bruker micrOTOF-Q 10243 apparatus using an electrospray ionization source in the positive mode (ESI(+)) by direct injection in the CEBIME (Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural) of the Federal University of Santa Catarina.

#### 2.1.2 General procedure for synthesis

##### Scheme 1.

**N-(6-aminopyridin-2-yl)-acetamide (2)** (Carboni, Da Settimo, Hertini, Mori, & Tonetti, 1971): 2,6-diaminopyridine **1** (9.0 g; 82.6 mmol) and triethylamine (11.0 mL; 78.9 mmol) solutions were prepared in tetrahydrofuran (THF) (150 mL). An acetic anhydride (7.8 mL; 82.5 mmol) solution in THF (50 mL) was then added slowly, drop by drop, with continuous stirring. The reaction mixture was stirred at room temperature for an additional 23 h. Water (150 mL) was then added to the mixture, and the THF was evaporated on a rotary evaporator, and the mixture was left in a freezer for 96 h. The white crystals formed were filtered, washed

with ice water, and dried under vacuum without heating. The compound was purified by column chromatography using a mixture of ethyl ether/ethyl acetate (7:3) as the eluent. Yield: 48%; mp: 155.5–155.7 °C.

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3458 (vN-H), 3356 (vN-H), 3224 (vN-H), 1674 (vC=O), 1626, 1564, 1537, 1367, 1302, 1242, 1161, 987; 792.  $^1\text{H}$  NMR: ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$ ppm): 2.02 (s, 3H, - $\text{CH}_3$ ); 5.69 (s, 2H, - $\text{NH}_2$ ); 6.15 (d,  $J=9.0$  Hz, 1H, CHAr); 7.20 (d,  $J=9.0$  Hz, 1H, CHAr); 7.32 (t,  $J=6.0$  Hz, 1H, CHAr); 9.83 (s, 1H, -NH).  $^{13}\text{C}$  NMR: ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$ ppm): 23.92 (- $\text{CH}_3$ ); 100.79; 103.21; 138.80; 150.50; 158.42; 168.79 (-C=O). Anal. calcd. for  $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_3\text{O}$ : C, 55.62; H, 6.00; N, 27.80. Found: C, 55.47; H, 6.02; N, 27.80.

**Meldrum's Acid - 2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione (3)** (Davidson & Bernhard, 1948):

Concentrated sulfuric acid (0.3 mL) was added to a malonic acid (10 g; 0.0961 mol) suspension in acetic anhydride (11 mL; 0.1165 mol), under continuous stirring. The suspension was cooled and acetone (7.6 mL; 0.1035 mol) was added during cooling to maintain the temperature at 0 °C. The solution was stirred for 30 min. The reaction mixture was allowed to stand for 24h in the refrigerator, and the resulting solid was filtered by suction and washed with ice water. Recrystallization is conveniently effected without being heated by dissolving this in acetone (15 mL) and slowly adding ice water (30 mL) before being allowed to stand for 24h in the refrigerator. The crystals were filtered by suction, washed with ice water, and dried under vacuum without heating. Yield: 32%; mp: 96–96.2 °C.

***N*-(6-([2,2-dimethyl-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-ylidene)methyl]amino)2-pyridinyl)acetamide**

**(5)** (Graf et al., 2002; Nicoletti et al., 2012): Meldrum's acid **3** (2.1 g; 14.6 mmol) was refluxed with trimethyl orthoformate (9.0 mL) for 2h to generate the methoxymethylene derivate **4** *in situ*. After this period the compound **2** (1.0 g; 6.6 mmol) was added and refluxed for a further 20 min. The reaction mixture was cooled slightly to form the crystals, while the still-hot mixture was filtered using a Büchner funnel and washed with cold ethanol. The solid was dried under a vacuum. Yield: 40%; mp: 222.8–222.9 °C.

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3255 (vN-H), 1734 (vC=O), 1691 (vC=O), 1668 (vC=O), 1620, 1570, 1544, 1444, 1394, 1313, 1276, 1255, 1244, 1190, 933, 804; 786.  $^1\text{H}$  NMR: ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$ ppm): 1.76 (s, 6H, - $\text{CH}_3$ ), 2.28 (s, 3H, - $\text{CH}_3$ ), 6.72 (d,  $J=9.0$  Hz, 1H, CHAr), 7.74 (t,  $J=6.0$  Hz, 1H, CHAr), 8.05 (d,  $J=9.0$  Hz, 1H, CHAr), 8.10 (s, 1H, -NH), 9.26 (d,  $J=15.0$  Hz, 1H,  $\text{CH}_{\text{Olefinic}}$ ); 11.17 (d,  $J=15.0$  Hz, 1H, -NH).  $^{13}\text{C}$  NMR: ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$ ppm): 24.70 (- $\text{CH}_3$ ); 27.09 (-

CH<sub>3</sub>); 88.65; 105.29; 107.89; 110.95; 141.40; 147.32; 150.64; 151.16; 163.36 (-C=O); 165.35 (-C=O); 168.87 (-C=O). Anal. calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: C, 56.56; H, 5.05; N, 14.14. Found: C, 56.08; H, 5.06; N, 13.97.

***N*-(5-oxo-5,8-dihydro-1,8-naphthyridin-2-yl)-acetamide (6)** (Hermezc et al., 1977; Nicoletti et al., 2012): Diphenyl ether (60 mL) was refluxed at 250 °C to add slowly Meldrum's acid adduct **5** (1.45 g; 4.7 mmol) was slowly added. Reflux was performed for a further 15 min. Following cooling, ethyl ether (24 mL) was added, the suspension was filtered using a Büchner funnel and washed with ethyl ether. The solid obtained was washed with hot hexane and dried under vacuum. Yield: 84%; mp: 298–299 °C.

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3331 (ν<sub>N-H</sub>); 2953 (ν<sub>C-H</sub>); 1674 (ν<sub>C=O</sub>); 1611 (ν<sub>C=O</sub>); 1516; 1306; 1196; 835; 598. <sup>1</sup>H NMR: (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, δ ppm): 2.14 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>); 6.02 (d, *J*=7,6 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7.80 (d, *J*=7,6 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 8.03 (d, *J*=8,8 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 8.37 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 10.69 (s, 1H, -NH); 11.64 (d, *J*=4.8 Hz, 1H, -NH). <sup>13</sup>C NMR: (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz, δ ppm): 24.91 (-CH<sub>3</sub>); 110.50; 111.09; 117.53; 137.68; 140.47; 150.20; 154.78; 170.76 (-C=O); 177.59 (-C=O).

**2-acetamido-5-chloro-1,8-naphthyridine (7)** (Carboni et al., 1971; Nicoletti et al., 2012): Under atmosphere N<sub>2</sub>, *N*-(5-oxo-5,8-dihydro-1,8-naphthyridin-2-yl) acetamide **6** (0.6952 g, 0.0034 mol) was added to 14 mL of dimethylformamide under continuous stirring, then dichloromethane (21 mL) was added to the mixture. The mixture was ice-cooled (-15 °C) under stirring for 15 min. Then the POCl<sub>3</sub> (1.1 mL) was added, and the mixture remained in an ice bath for another 10 min. The ice bath was removed, and the mixture remained for another two hours under continuous stirring. Then, 18 mL of NH<sub>4</sub>OH were added to neutralize the reaction, and the solution was extracted using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 10 mL) and washed with H<sub>2</sub>O. The organic phase was filtered over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the solvent was concentrated on a rotary evaporator. Yield: 70%, mass: 1.7 g; mp: 251-253 °C.

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3387 (ν<sub>N-H</sub>); 3051 (ν<sub>C-H</sub>); 1709 (ν<sub>C=O</sub>); 1609; 1535; 1491; 1400; 1306; 1240; 1136 (ν<sub>C-Cl</sub>); 995; 835. <sup>1</sup>H NMR: (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, δ ppm): 2.31 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>); 7.47 (d, *J*=3.0 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 8.58 (d, *J*=9.0 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 8.64 (d, *J*=9.0 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 8.88 (d, *J*=6.0 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 9.47 (s, 1H, -NH). <sup>13</sup>C NMR: (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz, δ ppm): 24.99 (-CH<sub>3</sub>); 116.24; 119.34; 120.84; 136.26; 142.85; 153.16; 154.61; 155.39; 169.86 (-C=O).

**2-amino-5-chloro-1,8-naphthyridine (8)** (Luigi Ferrarini, Manera, Mori, Badawneh, & Saccomanni, 1998): A suspension of **7** (1.7 g; 7.6 mmol) in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% (18 mL) was heated and refluxed for 10 min. After cooling, NH<sub>4</sub>OH was added until complete neutralization was achieved. The solution was transferred to an extraction funnel and extracted using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 10 mL). The organic phases obtained were combined, filtered over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the solvent was concentrated on a rotary evaporator, resulting in a pale-yellow solid. Yield: 91%; mp: 174–176 °C.

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3354 (ν<sub>N-H</sub>); 3169 (ν<sub>N-H</sub>); 1651; 1622; 1584; 1549; 1431; 1383; 1140 (ν<sub>C-Cl</sub>); 968; 826; 675. <sup>1</sup>H NMR: (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, δ ppm): 6.97 (d, *J*=8.8 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7.21 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>); 7.34 (d, *J*=4.8 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 8.16 (d, *J*=9.2 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 8.63 (d, *J*=4.4 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>). <sup>13</sup>C NMR: (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz, δ ppm): 114.53; 114.77; 117.30; 133.33; 140.98; 151.86; 157.51; 161.22.

### *2.1.3 The general methodology for the synthesis of sulfonamides derived from N-(6-aminopyridin-2-yl)-acetamide (10a-f)*

The syntheses of the compounds (**10a-f**) were conducted and adapted according to the methodology described by Saupe et al. (1991). In a round bottom flask, 0.1 g of the 2-amino-5-chloro-1,8-naphthyridine **8** (0.6 mmol), 40.0 mL THF and 0.8 g NaH (33.0 mmol) were added under an inert atmosphere (N<sub>2</sub>). The reaction mixture was placed under continuous stirring and heated at 60 °C for 1h. Then, benzenesulfonyl chloride **9** (4.2 mmol) was added, and the reaction was kept under continuous stirring at 60 °C for 1.5–3.5 h, depending on the benzenesulfonyl chloride derivative used (as determined by the TLC). The solution was allowed to cool to room temperature, transferred to an extraction funnel, and extracted with EtOAc (3 × 10 mL). The organic phases were pooled, transferred to an extraction funnel, and washed with a saturated NH<sub>4</sub>Cl solution (3 × 10 mL). The organic phase was separated and filtered over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrated on a rotary evaporator, and dried under vacuum at room temperature. The residual solid obtained was purified on a silica gel chromatography column (0.063–0.200 mm; 70–30 mesh) using pure CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98:2), or pure AcOEt, depending on the compound. The compounds (**10a-f**) listed below were obtained:

**4-methyl-N-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (10a)**: 2h reaction time as determined by TLC. Extraction was performed with ethyl acetate, and the product was

purified with a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98:2) mixture. Yellow solid. Yield: 84%, mp: 249-250 °C. IR (ATR/FTIR, cm<sup>-1</sup>): 3413 (N-H), 3062 (=CH), 1638 (N-H), 1408, 1480, 1531 e 1596 (C=C), 1301 (as S=O), 1143 (s S=O), 1085 (Ar-Cl), 828 (=CH). <sup>1</sup>H NMR: (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz, δ ppm): 2,35 (s, 3 H, -CH<sub>3</sub>), 7,36 (d, *J*=8,2 Hz, 2 H, CH<sub>AR</sub>), 7,62 (d, *J*=5,1 Hz, 2 H CH<sub>AR</sub>), 7,83 (s, 2 H, CH<sub>AR</sub>), 8,39 (d, *J*=9,3 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>), 8,68 (s, 1 H, CH<sub>AR</sub>), 13,59 (s, 1 H, N-H). <sup>13</sup>C NMR: (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz, δ ppm): 21,44 (-CH<sub>3</sub>); 121,10; 123,79; 129,43; 129,70; 129,92; 132,63; 136,85; 139,51; 142,39; 145,09; 153,62; 156,32. **HR-MS (ESI, TOF):** C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>SCl, theoretical [M]<sup>+</sup> m/z=334,0411; experimental [M]<sup>+</sup> m/z=334,0412.

**2,5-dichloro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (10b):** 1.5h reaction time as determined by TLC. Extraction was performed with ethyl acetate, and the product was purified with a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98:2) mixture. Yellow copper solid. Yield: 71 %, mp: 247.5-248 °C. Unpublished compound. IR (ATR/FTIR, cm<sup>-1</sup>): 3222 (N-H), 3046 (=CH), 1621 (N-H), 1591, 1530 e 1402 (C=C), 1289 (as S=O), 1131 (s S=O), 1107 (C-N), 1041 (Ar-Cl), 827 (=CH). <sup>1</sup>H NMR: (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz, δ ppm): 7,59-7,72 (m, 3 H, CH<sub>AR</sub>, ); 7,75 (d, *J*=9,7 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 8,14 (d, *J*=2,0 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 8,42 (d, *J*=9,7 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 8,67 (d, *J*=5,1 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 13,84 (s, 1 H, N-H). <sup>13</sup>C NMR: (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 114,97; 118,82; 121,39; 129,42; 130,32; 132,43; 133,65; 133,89; 137,53; 142,08; 142,61; 149,95; 153,71; 157,51. **HR-MS (ESI, TOF):** C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>SCl<sub>3</sub>, theoretical [M]<sup>+</sup> m/z=387,9472; experimental [M]<sup>+</sup> m/z=387,9476.

**4-fluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (10c):** 1.5h reaction time as determined by TLC. Extraction was performed with ethyl acetate, and the product was purified with a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98:2) mixture. Yellow copper solid. Yield: 34.71 %, mp: 196.9-197.9 °C. Unpublished compound. IR (ATR/FTIR, cm<sup>-1</sup>): 3042 (ν=CH), 1631 (δ N-H), 1378 (as S=O), 1142 (s S=O), 1595, 1529, 1484 e 1409 (ν C=C), 1085 (Ar-Cl), 833 (=CH). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz, δ ppm): 7.39 (t, *J*=8.8 Hz, 2 H, CH<sub>AR</sub>); 7.60 (d, *J*=5.1 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 7.67 (d, *J*=9.3 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 8.02 (dd, *J*=8.3, 5.4 Hz, 2 H, CH<sub>AR</sub>); 8.39 (d, *J*=9.5 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 8.67 (d, *J*=5.1 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 13.45 (s, 1 H, N-H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz, δ ppm): 115.18; 116.43; 116.73; 117.93; 120.58; 121.16; 127.73; 128.39; 129.81; 137.06; 139.36; 142.46; 151.51; 153.62; 156.8137; 162.80; 166.12.

**2,3,4-trifluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (10d):** 3.5h reaction time as determined by TLC. Extraction was performed with ethyl acetate, and the

product was purified with a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98:2) mixture. Orange solid. Yield: 57 %, mp: 198.6-199.6 °C. Unpublished compound. **IR (ATR/FTIR, cm<sup>-1</sup>):** 3200 (N-H), 1639 (N-H), 1599, 1506, 1459 e 1405 (C=C), 1314 (as S=O), 1149 (s S=O), 1123 (Ar-F), 1037 (Ar-Cl), 826 (=CH). **<sup>1</sup>H NMR (Acetonitrile-*d*<sub>3</sub>, 300 MHz, δ ppm):** 7.25 (ddd, *J*=9.5, 2.38, 2.20 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 7.33 (d, *J*=9.5 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 7.53 (d, *J*=5.1 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>) 7.77-7.86 (m, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 8.34 (d, *J*=9.5 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 8.60 (d, *J*=5.1 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 11.62 (s, 1 H, N-H). **<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz, δ ppm):** 111.33; 111.38; 111.42; 111.57; 111.62; 113.30; 114.00; 114.06; 114.25; 114.30; 115.97; 116.66; 119.33; 119.68; 122.36; 125.15; 135.98; 138.67; 140.97; 143.64; 143.70; 148.04; 150.70; 151.94; 154.59; 155.90; 158.55. **HR-MS (ESI, TOF):** C<sub>14</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>SClF<sub>3</sub>, theoretical [M]<sup>+</sup> m/z=373.9975; experimental [M]<sup>+</sup> m/z=373.9972.

**3-trifluoromethyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (10e):** 3.5h reaction time as determined by TLC. Extraction was performed with ethyl acetate, and the product was purified with a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98:2) mixture. Light yellow solid. Yield: 53%, mp: 222.2-224 °C. Unpublished compound. **IR (ATR/FTIR, cm<sup>-1</sup>):** 3265 (N-H), 3066 (=CH), 1645 (N-H), 1600, 1534, 1468 e 1410 (C=C), 1323 (as S=O), 1122 (s S=O), 1100 (Ar-Cl), 826 (=CH). **<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz, δ ppm):** 7.33 (d, *J*=9.72 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 7.50 (d, *J*=5.1 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 7.71-7.78 (m, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 7.88-7.93 (m, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 8.19-8.27 (m, 2 H, CH<sub>AR</sub>); 8.30 (d, *J*=9.7 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 8.59 (d, *J*=5.1 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 11.47 (s, 1 H, N-H). **<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz, δ ppm):** 107.83; 112.65; 112.88; 113.26; 121.36; 121.97; 124.67; 125.58; 129.51; 129.94; 130.37; 130.81; 131.29; 133.65; 136.65; 137.50; 140.86; 144.10; 149.05; 154.98; 172.95. **<sup>19</sup>F NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 282 MHz, δ ppm):** -58.5 (v Ar-CF<sub>3</sub>). **HR-MS (ESI, TOF):** C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>SClF<sub>3</sub>, theoretical [M]<sup>+</sup> m/z=388.0130; experimental [M]<sup>+</sup> m/z=388.0129.

**4-Bromo-2,5-difluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (10f):** 1.5h reaction time as determined by TLC. Extraction was performed with ethyl acetate, and the product was purified with a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100%. Yellow copper solid. Yield: 69.06%, mp: 222.7-223.5 °C. Unpublished compound. **IR (ATR/FTIR, cm<sup>-1</sup>):** 3250 (v N-H), 3040 (v=CH), 1633 (δ N-H), 1597, 1531, 1473 e 1407 (v C=C), 1312 (as S=O), 1132 (s S=O), 1132 (v Ar-F). **<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz, δ ppm):** 7.68 (d, *J*=5.1 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 7.75 (d, *J*=10.0 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 7.92 – 8.00 (m, 2 H, CH<sub>AR</sub>); 8.46 (d, *J*=9.7 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 8.71 (d, *J*=5.1 Hz, 1 H, CH<sub>AR</sub>); 14.02 (s, 1 H, N-H). **<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz, δ ppm):** 115.09; 116.58; 116.69; 116.80; 116.96; 117.82; 118.51; 119.27; 119.64; 121.21; 121.50; 122.77; 123.12; 124.22; 125.47; 125.83; 132.35;

137.89; 140.61; 142.68; 145.42; 152.54; 152.84; 153.04; 153.83; 155.55; 155.72; 156.29; 156.53; 157.75; 158.9277; 160.40.

## 2.2 Molecular modeling and docking studies

The three-dimensional (3D) structure of MepA was elucidated based on sequence identity with a high score, lower *e*-value, highest resolution, and the R-factor of the template structure by performing BLASTP with an *S. aureus* NCTC 8325 input sequence obtained from *S. aureus* 8325-4 and SH1000 genome sequence data. The coordinates for the query structure were obtained by Clustal X alignment. Phyre2 (Protein Homology/Analogy Recognition Engine - <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) was used to predict the three-dimensional structure of MepA, while I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) and MODELLER 9.14 were used to confirm the Phyre2 prediction. The final model was evaluated by the Ramachandran plot using PROCHECK to check the stereochemical quality of the protein structure. The root-mean-square deviation (RMSD) of the model was calculated by the superimposition of the 3D model with the template using the Swiss-PDB Viewer (PDB ID: 4LZ9). The topographic structure of the pockets and cavities can be intermediated by the CASTp server (<http://cast.engr.uic.edu>) with a standard value of 1.4 Å for the radius. The 3DLigandSite is a web server for the prediction of ligand-binding sites.

Virtual screening and docking were performed by the SwissDock web server (<http://www.swissdock.ch/>) (Grosdidier, Zoete, & Michielin, 2011). SwissDock is a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. Nucleic acids research, 39 (suppl\_2), W270-W277, and conformed by AutoDock Vina. The 3D coordinates of ligands were generated using the CORINA online server (Molecular Networks. CORINA online Demo: [http://www.molecularnetworks.com/online\\_demos/corina\\_demo](http://www.molecularnetworks.com/online_demos/corina_demo)), and energy was minimized with a universal force field using a conjugate-gradient algorithm with 200 run iterations. Docking runs were performed blinded by covering the entire protein and defining the protein coordinates of a region of interest as binding pockets to ensure blind docking. The best-docked ligand conformations were saved, and the bond angles, bond lengths, and hydrogen bonding interactions were analyzed using UCSF Chimera visualization program. The Discovery Studio (DS) program was utilized in detail. The binding energy score was used to calculate the inhibition constant ( $K_i$  value) based on the equation by Onawole et al. (2018) and Ligand efficiency (LE) measurement using the equation determined by Nissink (2009).

### ***2.2.1 The measure of Drug Likelihood, Lipinski rule analysis, and ADME predictions***

The therapeutic target in the organism is dependent on pharmacokinetic parameters, such as absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME). Moreover, several parameters can influence several structural parameters. Thus, an understanding of this helps screen out weak candidates in the early stages of drug development from potential drug candidates. The SwissADME server (<http://www.swissadme.ch>) generated the prediction of physical-chemical descriptors and the definition of pharmacokinetics and drug-like properties, as well as other ADME properties.

### ***2.2.2 Bioactivity Predictions Using Molinspiration***

Molinspiration is a cheminformatics software tool that calculates the bioactivity of G protein-coupled receptors ligand (GPCR ligands), kinase, ion channel blockers/modulators, protease, nuclear receptor ligands, and enzyme inhibition based on fragment contribution, such that the sum of activity contributions and molecular activity scores are processed in an online interface from the Molinspiration Chem informatics server (<http://www.molinspiration.com>).

## **2.3 Substances and drugs used**

The ethidium bromide (EtBr) and ciprofloxacin were obtained from Sigma Aldrich Co. Ltda. All 1,8-naphthyridines used were synthesized and donated by researchers from the Federal University of Paraná and Regional University of Blumenau. All 1,8-naphthyridines, the ciprofloxacin, and EtBr were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and further diluted in water to a concentration of 1024 µg/mL.

## **2.4 Bacterial strains**

For the assays, strain SA-K2068 was used, which codes for the MepA efflux protein, the basis for the majority of the multiple drug resistance (MDR) phenotype in this mutant strain, and is responsible for extruding DNA-intercalating dyes, hydrophilic fluoroquinolones, and other drugs (Kaatz et al., 2005; Schindler, Patel, et al., 2013). The strain, kindly provided by



Prof. Glenn Kaatz (Wayne State University), was grown overnight at 37 °C in Heart Infusion Agar slants (HIA, Difco) before use (Gibbons, Oluwatuyi, & Kaatz, 2003).

## **2.5 Antibacterial activity and efflux pump inhibition**

### ***2.5.1 Antibacterial activity test by minimum inhibitory concentration (MIC)***

The minimum inhibitory concentration of 1,8-naphthyridines was determined in a microdilution assay. 100 µL of the bacterial inoculum suspended in saline solution was used, corresponding to 0.5 on the McFarland scale, followed by the addition of 900 µL of brain heart infusion (BHI) culture media in Eppendorf to obtain a volume of 1 mL.

An aliquot of this medium with the bacteria was distributed in 96-well microtiter plates. Serial dilutions were performed using the ciprofloxacin, or ethidium bromide and 1,8-naphthyridines with concentrations ranging from 0.5 to 512 µg/mL (1:1). The last well was left to ensure the control of growth. The plates were incubated at 37 °C for 24h, and resazurin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide) was added to assess bacterial growth. The minimum inhibitory concentration was the lowest concentration in which there was no bacterial growth, according to Tintino et al. (2017).

### ***2.5.2 Efflux pump inhibition tests***

To assess whether 1,8-naphthyridines were a potential efflux pump inhibitor, their ability to decrease the minimum inhibitory concentration of the antibiotic and ethidium bromide were evaluated. The substrates for the MepA pump used were ethidium bromide, a substrate for many MDR pumps, and the antibiotic ciprofloxacin, according to the methodology by Tintino et al. (2017).

### ***2.5.3 Evaluation of efflux pump inhibition by antibiotic and ethidium bromide MIC reduction***

Efflux pump inhibition was tested using a sub-inhibitory 1,8-naphthyridine concentration (MIC/8). In preparing the controls, 150µL of each bacterial inoculum was suspended in saline, corresponding to 0.5 on the McFarland scale, and transferred to Eppendorf

along with 1350  $\mu\text{L}$  of brain and heart infusion (BHI). In the test solutions, a solution was prepared to contain 150  $\mu\text{L}$  of each bacterial inoculum suspended in saline, 1,8-naphthyridines (MIC/8), and BHI. The solutions were transferred to 96-well microtiter plates. 100  $\mu\text{L}$  of ciprofloxacin or ethidium bromide was used for micro dilutions (1:1). The incubation and reading followed the same pattern as the previous item. The minimum inhibitory concentration of the control was assessed using ciprofloxacin or ethidium bromide alone (Tintino et al., 2017).

#### ***2.5.4 Evaluation of MepA efflux pump inhibition by ethidium bromide fluorescence emission***

The strains were grown in HIA for 24h, at a temperature of 37 °C. Subsequently, the inoculum was prepared by suspending the strains in saline solution, corresponding to 0.5 on the McFarland scale. Then the test solutions were prepared, containing 500  $\mu\text{L}$  of the inoculum, the substances, and the final volume supplemented with BHI until a volume of 2 mL was obtained, kept in a greenhouse at 37 °C in incubation for 6 h. Then, the samples were centrifuged at 3,000 rpm for 3 min, and the pellet obtained was resuspended in 3 mL saline solution to read the fluorescence emission. The following groups were tested: bacterial inoculum and ethidium bromide, as a negative control; bacterial inoculum, ethidium bromide, and 2,3,4-trifluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (compound 10d), as a test group; bacterial inoculum, ethidium bromide, and carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP), as a positive control. All substances in a MIC/8 concentration. Fluorescence spectra were obtained on a Shimadzu RF6000 spectrofluorometer with a 150W xenon lamp for sample excitation. The samples were packed in a quartz cuvette (10 mm optical path) of four polished faces and subjected to scattered light excitation with a maximum wavelength of 530 nm, scanning speed of 600 nm/min, and 3 nm spectral resolution. The emission was monitored from 400 to 800 nm with 0.5 nm increments (Tintino et al., 2018).

#### **2.6 Statistical Analysis of Microbiological Results**

Antibacterial assays were performed in triplicates, and the results were expressed as the geometric mean of replicates. Statistical hypothesis analysis was performed using a two-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test, using GraphPad Prism 5.0 software.

### 3 Results and discussion

#### 3.1 Synthesis

The synthesis of 1,8-naphthyridines was performed using the methodology described by Silva et al. (2008), through the thermolysis of Meldrum's acid adduct, with some modifications made in the synthesis process. Initially, monoacetylation of 2,6-diaminopyridine **1** was carried out by reacting 2,6-diaminopyridine **1** with acetic anhydride in THF and using TEA as the base, yielding the monoacetylated product **2** with a 48% yield and mp 155–157 °C (Yield 49% and mp 159–160 °C) (Bernardino et al., 2012). The synthesis of Meldrum acid **3** was then performed by the reaction between malonic acid, acetic anhydride, and concentrated sulfuric acid as the catalyst, followed by the addition of acetone, slowly at 0 °C, according to the methodology described by Davidson and Bernhard (Davidson & Bernhard, 1948). A yield of 32% and an mp of 96–96.2 °C were obtained [(literature: yield 34% and mp 94–95 °C)] (Bernardino et al., 2012) (91–92 °C) (Davidson & Bernhard, 1948). After Meldrum's acid **3** was obtained, the methoxymethylenic derivative of Meldrum's acid **4** was obtained by the reaction of Meldrum's acid **3** in trimethyl orthoformate, which is not isolated and reacted with 2-acetamido-6-aminopyridine **2** to provide the Meldrum's acid adduct **5**. The yield obtained for the adduct **5** was 40% and the mp was 222.8–222.9 °C. The Meldrum's acid adduct **5** was then thermolyzed in diphenyl ether at 250 °C for 15 min to give naphthyridinone, or compound **6** (Scheme 1) with an 84% yield and mp 297.5–299 °C (Literature: mp > 300 °C) (Bernardino et al., 2012).

Chlorination of compound **6** was carried out, using an adaptation of the methodology described by Salvio et al. (2014) to obtain 2-acetamido-5-bromo-1,8-naphthyridine using DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and PBr<sub>3</sub>. Thus, the halogenating agent was replaced, and the procedure was maintained. Chlorination was performed using DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and POCl<sub>3</sub> in an ice bath at –15 °C to form 2-acetamido-5-chloro-1,8-naphthyridine **7** (Scheme 1), obtaining a 70% yield and mp > 250 °C. The compound **7** was then deacetylated in a reflux system with 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 10 min to generate 2-amino-5-chloro-1,8-naphthyridine **8** with a 91% yield and mp 174.5–176.5 °C.

The 1,8-naphthyridine sulfonamide **10a–10f** preparation was conducted based on the methodology described by Saupe et al. (1991), where 2-amino-5-chloro-1,8-naphthyridine **8**

was reacted with different commercial benzenesulfonyl chlorides. Reactions were performed in THF at a temperature of 60 °C using NaH as the base.

The time for the reactions varied from 1h to 3.5h for each sulfonamide. Thus, the synthetic route tested proved to be very interesting due to the significant decrease in reaction time compared to the similar methodologies described in the literature (Davidson & Bernhard, 1948). The reactions were accompanied by TLC (thin layer chromatography), and the obtained compounds listed in Table 1 were characterized by their melting point, IR spectroscopy, <sup>13</sup>C, and <sup>1</sup>H NMR, and high-resolution mass spectrometry.

### **Table 1.**

## **3.2 Molecular modeling and docking studies**

### ***3.2.1 Receptor Homology***

The phyre2-predicted MepA model included 98% of MepA residues, with the calculated confidence of the model being 100%. I-TASSER and Modeller generated a highly similar model using 99% and 97% of MepA residues, with a predicted accuracy of 95% and 93%, respectively. The final model was corroborated by Ramachandran plot calculations using PROCHECK which revealed 361 residues (90.9%) were aligned within the most favored region, 30 residues (7.6%) were located within the additionally allowed regions, three residues (0.8%) were plotted within the generously allowed region, and three residues (0.8%) were aligned within the disallowed region. Quadrant II shows the largest region in the graph with the most favorable atom conformations, sterically allowed conformations for beta-strands. However, quadrant III shows the majority of amino acids are present in this largest region of the graph, where right-handed alpha helices are shown (Figure 1).

In the evaluation of receptor homology, it was shown in the Ramachandran plot that most of the amino acids present in the protein structure appear as alpha helices that are hallmark characteristics of the transmembrane segments. The results presented herein corroborate with the study by Schindler et al. (2013).

### **Figure 1.**

### 3.2.2 Efflux pump molecular docking

Docking simulations were carried out for ligand-bound protein complexes to minimize energy and stabilize the docked complex. The best-docked ligand conformations were saved in output clusters 0. The docking studies revealed that 1,8-naphthyridine derivatives were recorded with the most favorable link energy in the range varying from  $-8.2$  to  $-8.8$  kcal/mol for MepA (Table 2). The results corroborate with the experimental MIC, in which the compounds with better binding and interaction energy stability obtained lower MIC values.

The fact of having a small MIC value to inhibit bacterial growth indicates a greater efficiency of the compound. The excellent energy interaction values suggest that possibly naphthyridine interacts efficiently with the MepA protein and, therefore, acts with an inhibitor by the following possible mechanisms: directly obstructing the protein's duct (Zeng et al., 2010); or inhibiting the efflux pump in a competitive or non-competitive way, reducing the binding of the substrate to the protein (Bhardwaj and Mohanty, 2012; Lomovskaya and Bostian, 2006; Mahamoud et al., 2007; Marquez, 2005; Nakashima et al., 2013; Nguyen et al., 2015; Opperman et al., 2014; Opperman and Nguyen, 2015; Pages; Amaral; Fanning, 2011).

#### Table 2.

Figure 2 shows the 3D structure of both efflux pump binding pockets and interaction maps. To understand the underlying mechanism behind the potential of 1,8-naphthyridines to promote efflux inhibition against bacterial resistance, we investigated the binding modes of 1,8-naphthyridine derivatives by molecular docking experiments.

The MepA interaction map for ethidium bromide and compound 10d show similar Van der Waals interactions with amino acids Tyr35, Val176, Thr201, and Tyr138 in addition to Pi-alkyl interactions with Ile40 and Leu59. Ethidium bromide is stabilized by hydrogen bonds with Asn183 (4.47 Å) and Ala197 (3.35 Å), while compound 10d shows interactions with Arg281 (6.56 Å) and Asn39 (4.68 Å). The better interactions energy of compound 10d may be explained by other types of interactions, such as carbon-hydrogen bonds with Ser175 (3.91 Å) and Gly36 (3.64 Å), as well as halogen interactions with Asn179 (4.41 Å) and Asn205 (4.66 Å) and different alkyl and Pi-alkyl connections with 5 Å distances, approximately. Thus, the sum of all interactions and their diversity resulted in 12 amino acids and five types of interactions for CCCP; 17 amino acids, and six types for compound 10d; and 16 amino acids but only three

types for ethidium bromide. The differences in the interactions between the receptor-ligands may explain the affinity and stability of naphthyridine.

## Figure 2.

### 3.2.3 *In silico* pharmacokinetic studies and bioactivity predictions

In the search for new compounds with antimicrobial activity that cause a reduction in bacterial resistance, it is essential to understand the pharmacokinetic parameters such as absorption, distribution, and metabolism for oral bioavailability, potency, and selectivity. The results are shown in Table 3 obtained from *in silico* runs using SwissADME indicate a possible effective permeation of intestinal epithelium in oral absorption for all ligands. Results from the partition coefficient indicate the presence of halogenic groups influence the lipophilicity of all compounds, but they do not cross the blood-brain barrier. The compounds showed an ideal Log P (<5).

Other parameters such as molar refractivity, total polar surface area (TPSA), hydrogen bond donors, and acceptors are favorable indications to classify virtual drug-like molecules. The compounds showed <10 rotatable bonds representing lower molecular flexibility. The TPSA for all proposed compounds showed a range of 71.97–80.33, indicating that the compounds could easily enter a cell. Lower TPSA is a parameter for drug-likeness and corroborates signifying with good oral bioavailability. Molar refractivity is associated not only with the volume of the molecules but also represent the London dispersive forces that can be influenced in drug-receptor interactions. Finally, they presented a number of hydrogen bond acceptors <10, and number of hydrogen bond donors <5. The results have shown no violations of Lipinski's rule of five, which indicate drug-like characteristics, with adverse or toxic effects, mitigated. The chemical properties present a positive correlation with the docking results, where, characteristics such as hydrogen bonds, molar refractivity, and lipophiles can be represented in interactions maps by different types of hydrogen bonds, Van der Waals, Pi-alkyl, and alkyl interactions.

For metabolism, the results showed that the compound 10d was the one that least inhibited cytochrome P450 (CYP) isoforms involved in metabolism, this being an relevant factor for their relationship with drug-drug interactions. It is also observed that they cannot be substrates of P-glycoprotein (P-gp). The P-gp suggests an influence in ATP-binding cassette

transporters or ABC-transporters, but only ethidium bromide and ciprofloxacin were predicted to be the substrates for this protein. The results were promising because the efflux of the drug by the P-gp of the gastrointestinal lumen, interferes in its bioavailability and in the ADME properties (Beaulieu et al., 1997; Edwards et al., 2005; Ma et al., 2010; Raghava and Lakshmi, 2012).

### **Table 3.**

Predictions of bioactivity scores were made for six different protein structures viz, the GPCR ligand, ion channel modulator, kinase inhibitor, nuclear receptor ligand, protease, and enzyme inhibition. The values attained indicated the binding affinity of the selected candidates to the mentioned enzymes and receptors (the larger the score value, the more probability the molecule is to be active). The results shown in Table 4 demonstrate that all compounds, as well as ciprofloxacin, present significant enzyme inhibitory activity and lower interaction capacity with GPCR or inhibition with Kinase enzymes. These results corroborate with the docking analysis that showed a favorable interaction with MepA depicting its potential for inhibition.

### **Table 4.**

### **3.3 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)**

1,8-Naphthyridides did not show clinically relevant antibacterial activity, with all MICs  $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ . However, significant results were obtained concerning its efflux pump inhibitory potential by reducing the antibiotic and ethidium bromide minimum inhibitory concentration. In addition, one of the advantages of efflux inhibitors is that they are free of any antibacterial activity, reducing their likelihood of future bacterial resistance against new drugs (Ashima K. Bhardwaj & Priyabrata Mohanty, 2012).

### **3.4 Efflux pump inhibition by antibiotic and ethidium bromide MIC reduction**

In the present study the naphthyridines 4-methyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (compound 10a), 2,5-dichloro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (compound 10b), 2,3,4-trifluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-

benzenesulfonamide (compound 10d), and 3-trifluoromethyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (compound 10e) showed an unique ability to reduce the MICs, when associated with both the ciprofloxacin and ethidium bromide, against SA-K2068 (Figure 3A and 3B and Table 5).

According to the data published so far, possible inhibition of the efflux pump can be assessed by the occurrence of a reduction of twice or more in the MIC of antibiotics that are the substrate of the pump and ethidium bromide in comparison with the control, and checking the inhibition of ethidium bromide fluorescence within the cell (Davies & Wright, 1997; El-Baky, Sandle, John, Abuo-Rahma, & Hetta, 2019; Kaatz, Moudgal, Seo, & Kristiansen, 2003; Kristiansen, Thomsen, Martins, Viveiros, & Amaral, 2010; Patel, Kosmidis, Seo, & Kaatz, 2010; Piddock, 2006; Ramalhete et al., 2011; Trzcinski, Cooper, Hryniewicz, & Dowson, 2000). This result was observed in the present study, both in association with the control antibiotic and with ethidium bromide.

MepA is encoded by the chromosomal gene of the same name, *mepA*, and was the first multidrug transporter of the MATE family to be described in *S. aureus*, conferring resistance to this strain, being responsible for the multidrug resistance (MDR) phenotype in the SA-K2068. This protein has 451 amino acids and 12 transmembrane segments (Kaatz et al., 2005; McAleese et al., 2005). Its source of energy for substrate transport is the proton gradient, through the sodium ions (Na<sup>+</sup>) antiport, considering that it belongs to the MATE family, whose proteins work by this mechanism (He et al., 2004; Kuroda & Tsuchiya, 2009). The substrates of this protein are hydrophilic fluoroquinolones such as ciprofloxacin, norfloxacin; hydrophobic fluoroquinolones such as moxifloxacin, sparfloxacin; glycylicyclines; biocides; and dyes such as ethidium bromide (Kaatz, DeMarco, & Seo, 2006; Kaatz et al., 2005; McAleese et al., 2005). Reserpine, a commonly used efflux pump inhibitor (EPI), has been shown to decrease the MIC of substances tested in strains containing MepA, as well as block the flow of ethidium bromide (Kaatz et al., 2005).

The 1,8-naphthyridines studied herein have in their radical structures capable of binding to the efflux pump structure, according to the *in silico* data obtained. Compound 10d, among others analyzed, possesses a larger number of substituent groups capable of binding MepA protein active sites due to the presence of three fluorine substituent groups. It is also important to emphasize that fluorine is the most electronegative of the substituents and part of fluoroquinolones and quinolones composition, suggesting that this element may be responsible



for the greatest inhibitory effect of Compound 10d (Hooper, 2001; Pham, Ziora, & Blaskovich, 2019).

Another compound that stood out was the Compound 10b. It is possible to observe in its structure the presence of chloride, an element that distinguishes it from other derivatives. It is known that chloride is responsible for significant antibacterial activity. Therefore, it is suggested that this ion may have influenced the observed action of compound 10b (Dasari TP and Y, 2015; Gahtori et al., 2012; Share et al., 2016; Sławiński et al., 2013).

1,8-naphthyridines are precursors of fluoroquinolones, considering that FQs are synthesized through modification of 1-alkyl-1,8-naphthyridin-4-one-3-carboxylic acid, which makes its use as an efflux pump inhibitor even more advantageous (Bryskier & Chantot, 1995; Leshner et al., 1962). It is suggested that, in this case, 1,8-naphthyridine removal does not occur, but a disruption of MepA function, through substituent groups binding to the active site, occurs.

Silva et al. (2020) demonstrated that Meldrum's Acid, a precursor of 1,8-naphthyridines presented in the current work, did not show direct antibacterial activity, but inhibited bacterial growth when associated with fluoroquinolones, corroborating our results. It is known in the literature that various modified antibiotics function as efflux pump inhibitors (Anderson, Headley, Stapleton, & Taylor, 2005b, 2005a; Chollet, Chevalier, Bryskier, & Pagès, 2004; Chopra & Roberts, 2001; Rice et al., 2005; Sabatini et al., 2011; Schindler, Jacinto, & Kaatz, 2013). Substances of chemically similar characteristics have also been reported inhibiting efflux pumps for cancer cells, for example, pyronaridine, a type of naphthyridine that is capable of inhibiting the P-gp pump of carcinogenic cells. But there are hardly any reports of these compounds in action against bacterial cell efflux pumps (Amaral et al., 2012; Kim et al., 2003; Misbahi et al., 2002; Qi et al., 2004, 2002).

**Figure 3.**

**Table 5.**

### **3.5 Evaluation of pump inhibition by ethidium bromide fluorescence emission**

In the fluorescence emission assessment, a subtle increase in fluorescence intensity is observed when comparing the EtBr peak associated with 2,3,4-trifluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide relative to EtBr alone (Figure 4).

Ethidium bromide retention within the cell enables its binding to bacterial DNA such that the greater the amount of ethidium bromide retained within the cell, the greater the amount of possible DNA binding exists, thus the greater the fluorescence emission. When efflux pumps are inhibited, ethidium bromide is trapped inside the cell resulting in increased fluorescence emission (Blair & Piddock, 2016; Gibbons et al., 2003; M. Viveiros et al., 2008; Miguel Viveiros et al., 2008).

Studies have been published showing the ability of various substances in acting as efflux pump inhibitors by assessing increased fluorescence emission (Pannek et al., 2006). However, despite not showing significant results, this study is innovative in that it does not evaluate this effect at different times but at an exact time point, and thus evaluates the final result of the efflux pump action.

#### **Figure 4.**

## **4 Conclusions**

The sum of the results found that 4-methyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide, 2,5-dichloro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide, 2,3,4-trifluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide and 3-trifluoromethyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide, possess a favorable pharmacokinetic profile and interaction energy. Numerous and diverse bonds have been established in the protein-naphthyridine complex, and satisfactory ADME properties have been observed. The *in silico* data corresponded to the microbiological data. Despite not showing antibacterial activity, these heterocyclic compounds showed synergistic effects when associated with antibiotics and ethidium bromide, inducing a reduction in the minimum inhibitory concentration and indicating inhibitory effects of the MepA efflux pumps. The naphthyridine was also able to increase the intensity of fluorescence emission of ethidium bromide, reinforcing the hypothesis that these heterocyclic compounds act as MepA inhibitors. Further tests involving antibacterial activity and inhibition of different efflux pumps from other bacterial strains are being developed. In addition, *in vivo* studies are necessary to ascertain the safety and therapeutic window of these compounds.

## **Acknowledgments**

We thank Prof. Glenn Kaatz of Wayne State University for kindly giving the strains. This study was funded, by the Foundation for Support of Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE), process number IBPG-1241-4.03/16; National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) process 150456/2018-2 and 406685/2018-5; Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), finance code 001; and Financier of Studies and Projects (FINEP). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

## **Conflict of interest**

The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Amaral, L., Spengler, G., Martins, A., Armada, A., Handzlik, J., Kiec-Kononowicz, K., Molnar, J., 2012. Inhibitors of bacterial efflux pumps that also inhibit efflux pumps of cancer cells. *Anticancer Res.*
- Anderson, J.C., Headley, C., Stapleton, P.D., Taylor, P.W., 2005a. Synthesis and antibacterial activity of hydrolytically stable (-)-epicatechin gallate analogues for the modulation of  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.03.063>
- Anderson, J.C., Headley, C., Stapleton, P.D., Taylor, P.W., 2005b. Asymmetric total synthesis of B-ring modified (-)-epicatechin gallate analogues and their modulation of  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Tetrahedron.* <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.05.086>
- Ashima K. Bhardwaj, Priyabrata Mohanty, 2012. Bacterial Efflux Pumps Involved in Multidrug Resistance and their Inhibitors: Rejuvenating the Antimicrobial Chemotherapy. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* <https://doi.org/10.2174/157489112799829710>
- Ball, P., Tillotson, G., 1995. Tolerability of Fluoroquinolone Antibiotics: Past, Present and Future. *Drug Saf.* <https://doi.org/10.2165/00002018-199513060-00004>
- Beaulieu, É., Demeule, M., Ghitescu, L., Béliveau, R., 1997. P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain. *Biochem J.* <https://doi.org/10.1042/bj3260539>.
- Bernardino, A.M., Azevedo, A.R., Pinheiro, L.C., Borges, J.C., Paixão, I.C., Mesquita, M., Souza, T.M., dos Santos, M.S., 2012. Synthesis and anti-HSV-1 evaluation of new 3H-benzo[b]pyrazolo[3,4-h]-1,6-naphthyridines and 3H-pyrido[2,3-b]pyrazolo[3,4-h]-1,6-naphthyridines. *Org. Med. Chem. Lett.* <https://doi.org/10.1186/2191-2858-2-3>
- Blair, J.M.A., Piddock, L.J.V., 2016. How to measure export via bacterial multidrug resistance efflux pumps. *MBio.* <https://doi.org/10.1128/mBio.00840-16>
- Bobrański, B., Sucharda, E., 1927. Über eine Synthese des 1.5-Naphthyridins. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft (A B Ser.)* <https://doi.org/10.1002/cber.19270600514>
- Bryskier, A., Chantot, J.F., 1995. Classification and Structure-Activity Relationships of Fluoroquinolones. *Drugs.* <https://doi.org/10.2165/00003495-199500492-00005>
- Carboni, S., Da Settimo, A., Hertini, D., Mori, C., Tonetti, I., 1971. Studies on the synthesis

- of anthryridine. *J. Heterocycl. Chem.* <https://doi.org/10.1002/jhet.5570080418>
- Carvalho, C.E., Berezin, E.N., Pistelli, I.P., Mímica, L., Cardoso, M.R.A., 2005. Monitoramento microbiológico sequencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. *J. Pediatr. (Rio. J.)*. <https://doi.org/10.1590/s0021-75572005000100007>
- Cavalcanti, S.M.D.M., De França, E.R., Cabral, C., Vilela, M.A., Montenegro, F., Menezes, D., Medeiros, Â.C.R., 2005. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. *Brazilian J. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1590/S1413-86702005000100010>
- Chollet, R., Chevalier, J., Bryskier, A., Pagès, J.M., 2004. The AcrAB-TolC pump is involved in macrolide resistance but not in telithromycin efflux in *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* <https://doi.org/10.1128/AAC.48.9.3621-3624.2004>
- Chopra, I., Roberts, M., 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* <https://doi.org/10.1128/mmbr.65.2.232-260.2001>
- Cluff, L.E., Reynolds, R.J., 1965. Management of staphylococcal infections. *Am. J. Med.* [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(65\)90100-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(65)90100-2)
- Da Silva, L.E., Joussef, A.C., Nunes, R.J., De Oliveira, K.N., 2008. Synthesis of 1,8-naphthyridine-4(1H)-one sulfonamides by thermolysis of 2-aminopyridinemethylene (Meldrum's acid) derivative. *Synth. Commun.* <https://doi.org/10.1080/00397910701648744>
- Dasari TP, S., Y, Z., 2015. Antibacterial Activity and Cytotoxicity of Gold (I) and (III) Ions and Gold Nanoparticles. *Biochem. Pharmacol. Open Access.* <https://doi.org/10.4172/2167-0501.1000199>
- Davidson, D., Bernhard, S.A., 1948. The Structure of Meldrum's Supposed  $\beta$ -Lactonic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* <https://doi.org/10.1021/ja01190a060>
- Davies, J., Wright, G.D., 1997. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol.* [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)01033-0](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01033-0)
- Edwards, J. E., Alcorn, J., Savolainen, J., Anderson, B. D., McNamara, P. J., 2005. Role of P-glycoprotein in distribution of nelfinavir across the blood-mammary tissue barrier and blood-brain barrier. *Antimicrob Agents Chemother.* <https://doi.org/10.1128/AAC.49.4.1626-1628.2005>.

- El-Baky, R.M.A., Sandle, T., John, J., Abuo-Rahma, G.E.D.A., Hetta, H.F., 2019. A novel mechanism of action of ketoconazole: Inhibition of the NorA efflux pump system and biofilm formation in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Drug Resist.* <https://doi.org/10.2147/IDR.S201124>
- Fu, L., Feng, X., Wang, J.J., Xun, Z., Hu, J.D., Zhang, J.J., Zhao, Y.W., Huang, Z. Bin, Shi, D.Q., 2015. Efficient synthesis and evaluation of antitumor activities of novel functionalized 1,8-naphthyridine derivatives. *ACS Comb. Sci.* <https://doi.org/10.1021/co500120b>
- Gahtori, P., Ghosh, S.K., Singh, B., Singh, U.P., Bhat, H.R., Uppal, A., 2012. Synthesis, SAR and antibacterial activity of hybrid chloro, dichloro-phenylthiazolyl-s-triazines. *Saudi Pharm. J.* <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2011.05.003>
- Gibbons, S., Oluwatuyi, M., Kaatz, G.W., 2003. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* <https://doi.org/10.1093/jac/dkg044>
- Graf, G.I., Hastreiter, D., Da Silva, L.E., Rebelo, R.A., Montalban, A.G., McKillop, A., 2002. The synthesis of aromatic diazatricycles from phenylenediamine-bis(methylene Meldrum's acid) derivatives. *Tetrahedron.* [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(02\)01085-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(02)01085-2)
- Grosdidier, A., Zoete, V., Michielin, O., 2011. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/gkr366>
- Gurjar, V.K., Pal, D., 2019. Recent developments and multiple biological activities available with 1, 8-naphthyridine derivatives: A review. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* <https://doi.org/10.22159/ijpps.2019v11i1.30429>
- He, G.X., Kuroda, T., Mima, T., Morita, Y., Mizushima, T., Tsuchiya, T., 2004. An H<sup>+</sup>-Coupled Multidrug Efflux Pump, PmpM, a Member of the MATE Family of Transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/JB.186.1.262-265.2004>
- Hermez, I., Mészáros, Z., Vasvári-Debreczy, L., Horváth, Á., Horváth, G., Pongor-Csákvári, M., 1977. Nitrogen bridgehead compounds. Part 4. 1 → 3N → C-acyl migration. Part 2. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* <https://doi.org/10.1039/p19770000789>
- Hong, C.Y., Kim, Y.K., Chang, J.H., Kim, S.H., Choi, H., Nam, D.H., Kim, Y.Z., Kwak, J.H., 1997. Novel fluoroquinolone antibacterial agents containing oxime-substituted (Aminomethyl)pyrrolidines: Synthesis and antibacterial activity of 7-(4- (Aminomethyl)-

- 3-(methoxyimino) pyrrolidin-1-yl)-1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydro[1,8]naphthyridine-3-. J. Med. Chem. <https://doi.org/10.1021/jm970202e>
- Hooper, D.C., 2001. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance, in: Emerging Infectious Diseases. <https://doi.org/10.3201/eid0702.010239>
- Kaatz, G.W., DeMarco, C.E., Seo, S.M., 2006. MepR, a repressor of the *Staphylococcus aureus* MATE family multidrug efflux pump MepA, is a substrate-responsive regulatory protein. Antimicrob. Agents Chemother. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1276-1281.2006>
- Kaatz, G.W., McAleese, F., Seo, S.M., 2005. Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein. Antimicrob. Agents Chemother. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1857-1864.2005>
- Kaatz, G.W., Moudgal, V. V., Seo, S.M., Kristiansen, J.E., 2003. Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.719-726.2003>
- Kim, M.J., Yun, H.J., Kang, J.W., Kim, S., Kwak, J.H., Choi, E.C., 2003. *In vitro* development of resistance to a novel fluoroquinolone, DW286, in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. J. Antimicrob. Chemother. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg162>
- Koller, G., 1927a. Über das 1.8-Naphthyridin und seine Derivate (Vorläufige Mitteilung). Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft (A B Ser. <https://doi.org/10.1002/cber.19270600719>
- Koller, G., 1927b. Über das 1.8-Naphthyridin. Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft (A B Ser. <https://doi.org/10.1002/cber.19270600840>
- Koller, G., 1927c. Über eine Synthese von Derivaten des 1.8-Naphthyridins. Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft (A B Ser. <https://doi.org/10.1002/cber.19270600224>
- Kristiansen, J.E., Thomsen, V.F., Martins, A., Viveiros, M., Amaral, L., 2010. Non-antibiotics reverse resistance of bacteria to antibiotics. In Vivo (Brooklyn).
- Kuroda, T., Tsuchiya, T., 2009. Multidrug efflux transporters in the MATE family. Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.012>
- Leshner, G.Y., Froelich, E.J., Gruett, M.D., Bailey, J.H., Brundage, R.P., 1962. 1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents. J. Med. Pharm. Chem. <https://doi.org/10.1021/jm01240a021>

- Liliam, D., Jackson, C., 1998. Quinolonas y terapia antimicrobiana. Acta Medica Cordoba.
- Litvinov, V.P., 2004. The chemistry and biological activities of 1,8-naphthyridines. Usp. Khim. <https://doi.org/10.1070/rc2004v073n07abeh000856>
- Litvinov, V.P., 2006. Advances in the Chemistry of Naphthyridines. Adv. Heterocycl. Chem. [https://doi.org/10.1016/S0065-2725\(06\)91004-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2725(06)91004-6)
- Lomovskaya, O., Bostian, K.A., 2006. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic - A vision for applied use. Biochem. Pharmacol. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.12.008>
- Lowe, P.A., 2009. Naphthyridines, Pyridoquinolines, Anthyridines and Similar Compounds, in: Comprehensive Heterocyclic Chemistry. <https://doi.org/10.1016/B978-008096519-2.00033-3>
- Luigi Ferrarini, P., Manera, C., Mori, C., Badawneh, M., Saccomanni, G., 1998. Synthesis and evaluation of antimycobacterial activity of 4-phenyl-1,8-naphthyridine derivatives. Farmaco. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(98\)00094-9](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(98)00094-9)
- Ma, J. D., Tsunoda, S. M., Bertino, J.S., Trivedi, M., Beale, K.K., Nafziger, A.N., 2010. Evaluation of *in vivo* P-glycoprotein phenotyping probes: A need for validation. Clin Pharmacokinet. <https://doi.org/10.2165/11318000-000000000-00000>.
- Madaan, A., Verma, R., Kumar, V., Singh, A.T., Jain, S.K., Jaggi, M., 2015. 1,8-Naphthyridine Derivatives: A Review of Multiple Biological Activities. Arch. Pharm. (Weinheim). <https://doi.org/10.1002/ardp.201500237>
- Mahamoud, A., Chevalier, J., Alibert-Franco, S., Kern, W. V., Pagès, J.M., 2007. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: The inhibitor response strategy. J. Antimicrob. Chemother. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl493>
- Malanoski, G.J., Samore, M.H., Pefanis, A., Karchmer, A.W., 1995. *Staphylococcus aureus* Catheter-Associated Bacteremia: Minimal Effective Therapy and Unusual Infectious Complications Associated With Arterial Sheath Catheters. Arch. Intern. Med. <https://doi.org/10.1001/archinte.1995.00430110069007>
- Marquez, B., 2005. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. Biochimie. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.04.012>
- Mathew, J., Addai, T., Anand, A., Morrobel, A., Maheshwari, P., Freels, S., 1995. Clinical Features, Site of Involvement, Bacteriologic Findings, and Outcome of Infective Endocarditis in Intravenous Drug Users. Arch. Intern. Med. <https://doi.org/10.1001/archinte.1995.00430150125013>



- McAleese, F., Petersen, P., Ruzin, A., Dunman, P.M., Murphy, E., Projan, S.J., Bradford, P.A., 2005. A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived *Staphylococcus aureus* mutants to tigecycline. *Antimicrob. Agents Chemother.* <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1865-1871.2005>
- Misbahi, H., Brouant, P., Hevér, A., Molnár, A.M., Wolfard, K., Spengler, G., Mefetah, H., Molnár, J., Barbe, J., 2002. Benzo[b]-1,8-naphthyridine derivatives: Synthesis and reversal activity on multidrug resistance. *Anticancer Res.*
- Nakashima, R., Sakurai, K., Yamasaki, S., Hayashi, K., Nagata, C., Hoshino, K., Onodera, Y., Nishino, K., Yamaguchi, A., 2013. Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/nature12300>
- Nguyen, S.T., Kwasny, S.M., Ding, X., Cardinale, S.C., McCarthy, C.T., Kim, H.S., Nikaido, H., Peet, N.P., Williams, J.D., Bowlin, T.L., Opperman, T.J., 2015. Structure-activity relationships of a novel pyranopyridine series of Gram-negative bacterial efflux pump inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.016>
- Nicoletti, C.R., Garcia, D.N., Da Silva, L.E., Beghini, I.M., Rebelo, R.A., Joussef, A.C., Machado, V.G., 2012. Synthesis of 1,8-naphthyridines and their application in the development of anionic fluorogenic chemosensors. *J. Fluoresc.* <https://doi.org/10.1007/s10895-012-1041-5>
- Nissink, J.W.M., 2009. Simple size-independent measure of ligand efficiency. *J. Chem. Inf. Model.* <https://doi.org/10.1021/ci900094m>
- Onawole, A.T., Abdul Halim, M., Ullah, N., Al-Saadi, A.A., 2018. Structural, spectroscopic and docking properties of resorcinol, its -OD isotopomer and dianion derivative: a comparative study. *Struct. Chem.* <https://doi.org/10.1007/s11224-017-1037-5>
- Opperman, T.J., Kwasny, S.M., Kim, H.S., Nguyen, S.T., Houseweart, C., D'Souza, S., Walker, G.C., Peet, N.P., Nikaido, H., Bowlin, T.L., 2014. Characterization of a novel pyranopyridine inhibitor of the AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* <https://doi.org/10.1128/AAC.01866-13>
- Opperman, T.J., Nguyen, S.T., 2015. Recent advances toward a molecular mechanism of efflux pump inhibition. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00421>
- Pages, J.-M., Amaral, L., Fanning, S., 2011. An Original Deal for New Molecule: Reversal of Efflux Pump Activity, A Rational Strategy to Combat Gram-Negative Resistant Bacteria. *Curr. Med. Chem.* <https://doi.org/10.2174/092986711796150469>
- Pannek, S., Higgins, P.G., Steinke, P., Jonas, D., Akova, M., Bohnert, J.A., Seifert, H., Kern,

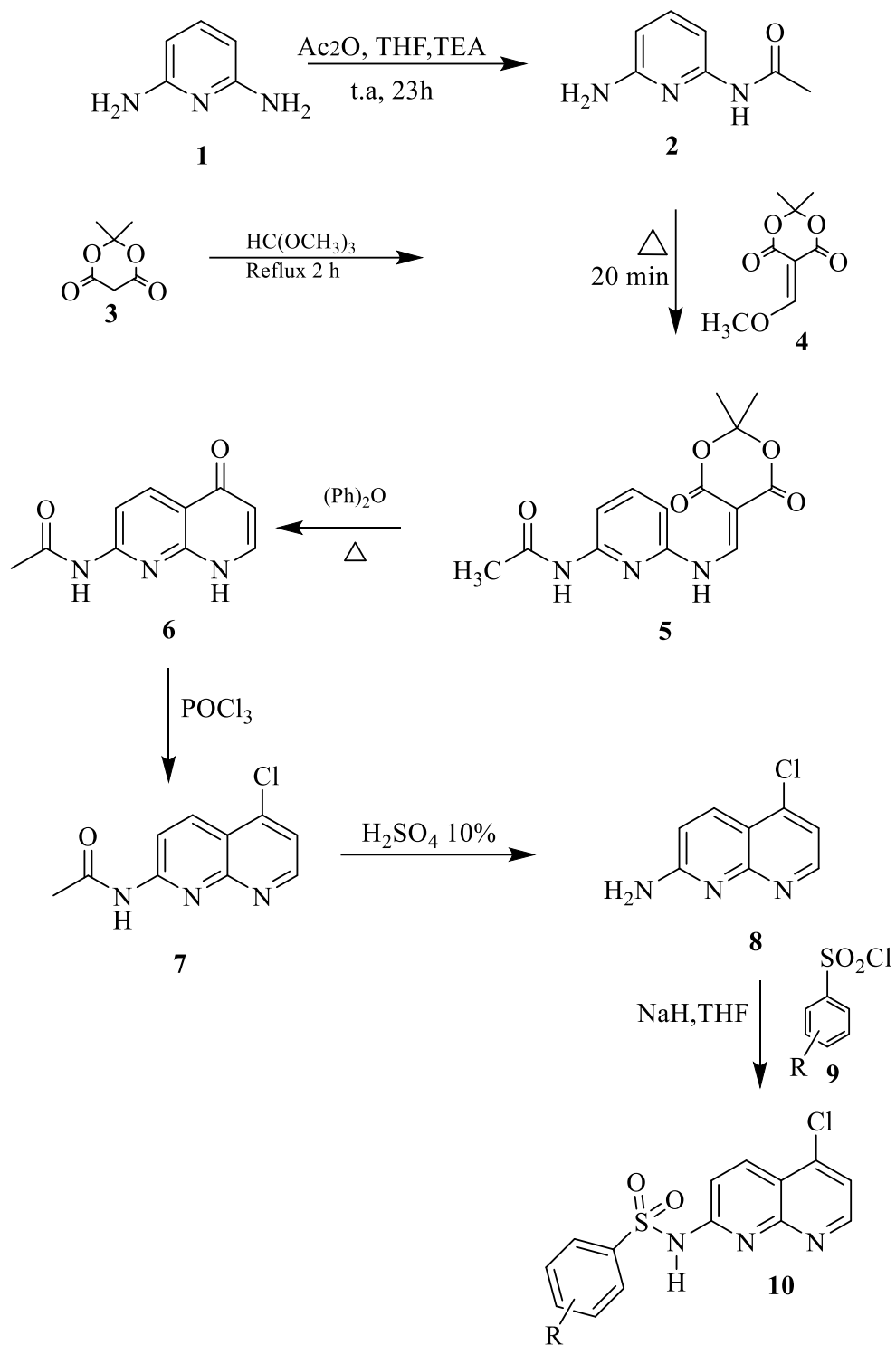
- W. V., 2006. Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: Comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine- $\beta$ -naphthylamide. *J. Antimicrob. Chemother.* <https://doi.org/10.1093/jac/dkl081>
- Patel, D., Kosmidis, C., Seo, S.M., Kaatz, G.W., 2010. Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* <https://doi.org/10.1128/AAC.01058-10>
- Pham, T.D.M., Ziora, Z.M., Blaskovich, M.A.T., 2019. Quinolone antibiotics. *Medchemcomm.* <https://doi.org/10.1039/c9md00120d>
- Piddock, L.J.V., 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.382-402.2006>
- Qi, J., Wang, S., Liu, G., Peng, H., Wang, J., Zhu, Z., Yang, C., 2004. Pyronaridine, a novel modulator of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.099>
- Qi, J., Yang, C.Z., Wang, C.Y., Wang, S. Bin, Yang, M., Wang, J.H., 2002. Function and mechanism of pyronaridine: A new inhibitor of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Acta Pharmacol. Sin.*
- Raghava, K. M., Lakshmi, P., 2012. K. Overview of P-glycoprotein inhibitors: A rational outlook. *Brazilian J Pharm Sci.* <https://doi.org/10.1590/S1984-82502012000300002>.
- Ramalhete, C., Spengler, G., Martins, A., Martins, M., Viveiros, M., Mulhovo, S., Ferreira, M.J.U., Amaral, L., 2011. Inhibition of efflux pumps in meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* resistant strains by triterpenoids from *Momordica balsamina*, in: *International Journal of Antimicrobial Agents.* <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.09.011>
- Reissert, A., 1893. Ueber Di-( $\gamma$  - amidopropyl) essigsäure (Diamino.1.7.heptanmethylsäure.4) und ihr inneres Condensationsproduct, das Octohydro.1.8.naphtyridin. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft.* <https://doi.org/10.1002/cber.189302602190>
- Rice, A., Liu, Y., Michaelis, M. Lou, Himes, R.H., Georg, G.I., Audus, K.L., 2005. Chemical modification of paclitaxel (taxol) reduces P-glycoprotein interactions and increases permeation across the blood-brain barrier *in vitro* and *in situ*. *J. Med. Chem.* <https://doi.org/10.1021/jm040114b>
- Sabatini, S., Gosetto, F., Manfroni, G., Tabarrini, O., Kaatz, G.W., Patel, D., Cecchetti, V., 2011. Evolution from a natural flavones nucleus to obtain 2-(4-propoxyphenyl) quinoline

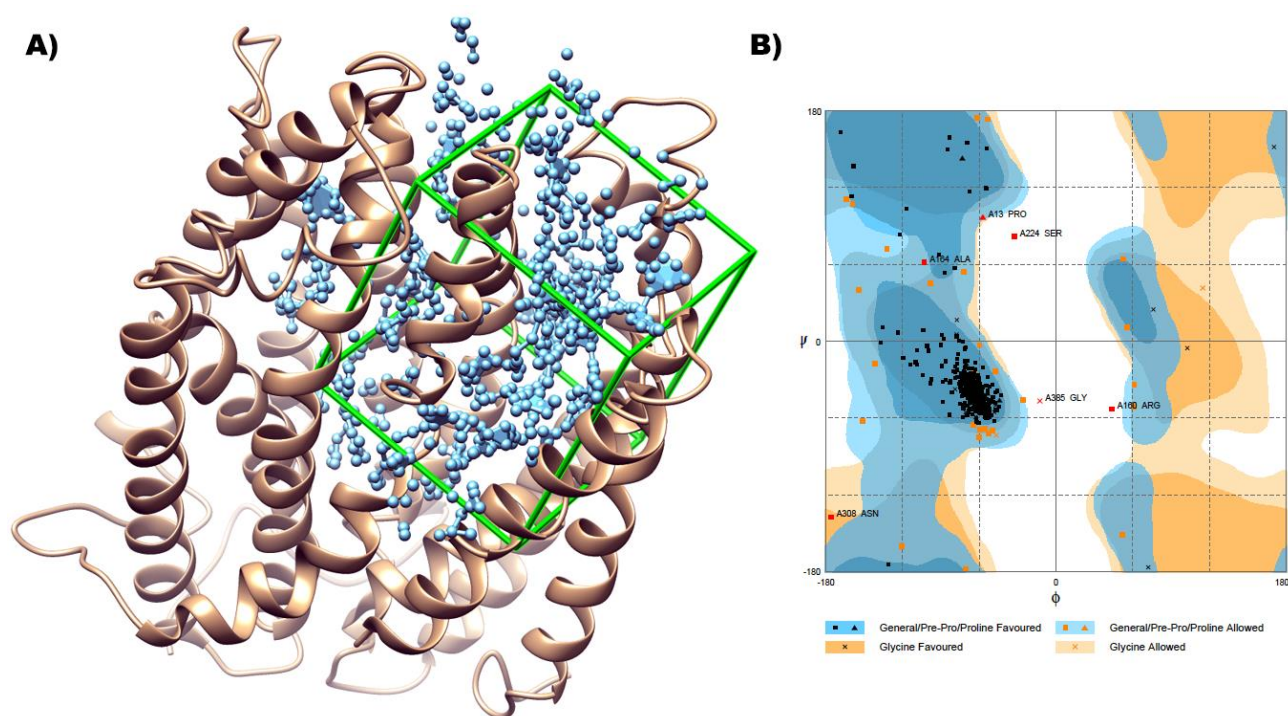
- derivatives as potent inhibitors of the *S. aureus* NorA efflux pump. *J. Med. Chem.*  
<https://doi.org/10.1021/jm200370y>
- Salvio, R., Moliterno, M., Bella, M., 2014. Alkynes in organocatalysis. *Asian J. Org. Chem.*  
<https://doi.org/10.1002/ajoc.201400021>
- Saupe, T. B.; Klebe, G.; Schirmer, U.; Paul G.; Kober, R.; Wuerzer, B.; Berghaus, R.; Meyer, N.; Westphalen, K. O. Heterocyclic sulfonamides. United States Patent. n° 4,999,045. mar, 1991, USA.
- Schindler, B.D., Jacinto, P., Kaatz, G.W., 2013a. Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: Current status of potentiating existing antibiotics. *Future Microbiol.* <https://doi.org/10.2217/fmb.13.16>
- Schindler, B.D., Patel, D., Seo, S.M., Kaatz, G.W., 2013b. Mutagenesis and modeling to predict structural and functional characteristics of the *Staphylococcus aureus* MepA multidrug efflux pump. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/JB.01679-12>
- Share, A.I., Patel, K., Nativi, C., Cho, E.J., Francesconi, O., Busschaert, N., Gale, P.A., Roelens, S., Sessler, J.L., 2016. Chloride anion transporters inhibit growth of methicillin-resistant: *Staphylococcus aureus* (MRSA) *in vitro*. *Chem. Commun.*  
<https://doi.org/10.1039/c6cc03645g>
- Silva, M. M., de Araújo-Neto, J. B., de Araújo, A. C., Freitas, P. R., Oliveira-Tintino, C. D. D. M., Begnini, I. M., Rebelo, R. A., Silva, L. E., Mireski, S. L., Nasato, M. C., Krautler, M. I. L., Ribeiro-Filho, J., Coutinho, H. D. M., Tintino, S. R., 2020. Potentiation of Antibiotic Activity by a Meldrum's Acid Arylamino Methylene Derivative against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. *Indian Journal of Microbiology.*  
<https://doi.org/10.1007/s12088-020-00910-6>
- Sławiński, J., Zołnowska, B., Pirska, D., Kędzia, A., Kwapisz, E., 2013. Synthesis and antibacterial activity of novel 4-chloro-2- mercaptobenzenesulfonamide derivatives. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* <https://doi.org/10.3109/14756366.2011.625024>
- Thomas, L.J., Gangadhar, R., Kishore, S.G., Ramchandran, S., Saravanan, M., Sridhar, S.K., 2003. Synthesis and pharmacological activities of 1,8-naphthyridine derivatives. *Indian Drugs.*
- Tillotson, G.S., 1996. Quinolones: Structure-activity relationships and future predictions. *J. Med. Microbiol.* <https://doi.org/10.1099/00222615-44-5-320>
- Tintino, S. R., Oliveira-Tintino, C. D., Campina, F. F., Limaverde, P. W., Pereira, P. S., Siqueira-Junior, J. P. Coutinho, H.D.M., Quintans-Júnior, L.J., Silva, T.G., Leal-Balbino,

- T.C., Balbino, V. Q. 2018. Vitamin K enhances the effect of antibiotics inhibiting the efflux pumps of *Staphylococcus aureus* strains. *Medicinal Chemistry Research*. DOI: 10.1007/s00044-017-2063-y.
- Tintino, S.R., Morais-Tintino, C.D., Campina, F.F., Costa, M. do S., Menezes, I.R.A., de Matos, Y.M.L.S., Calixto-Júnior, J.T., Pereira, P.S., Siqueira-Junior, J.P., Leal-Balbino, T.C., Coutinho, H.D.M., Balbino, V.Q., 2017. Tannic acid affects the phenotype of *Staphylococcus aureus* resistant to tetracycline and erythromycin by inhibition of efflux pumps. *Bioorg. Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.08.004>
- Tong, S.Y.C., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., Fowler, V.G., 2015. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
- Trzcinski, K., Cooper, B.S., Hryniewicz, W., Dowson, C.G., 2000. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* <https://doi.org/10.1093/jac/45.6.763>
- Viveiros, M., Martins, M., Couto, I., Rodrigues, L., Spengler, G., Martins, A., Kristiansen, J., Molnar, J., Amaral, L., 2008. New Methods for the Identification of Efflux Mediated MDR Bacteria, Genetic Assessment of Regulators and Efflux Pump Constituents, Characterization of Efflux Systems and Screening for Inhibitors of Efflux Pumps. *Curr. Drug Targets.* <https://doi.org/10.2174/138945008785747734>
- Viveiros, Miguel, Martins, A., Paixão, L., Rodrigues, L., Martins, M., Couto, I., Fähnrich, E., Kern, W. V., Amaral, L., 2008. Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. *Int. J. Antimicrob. Agents.* <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.12.015>
- Wertheim, H.F.L., Melles, D.C., Vos, M.C., Van Leeuwen, W., Van Belkum, A., Verbrugh, H.A., Nouwen, J.L., 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70295-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70295-4)
- Zeng, B., Wang, H., Zou, L., Zhang, A., Yang, X., Guan, Z., 2010. Evaluation and target validation of indole derivatives as inhibitors of the AcrAB-TolC efflux pump. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* <https://doi.org/10.1271/bbb.100433>

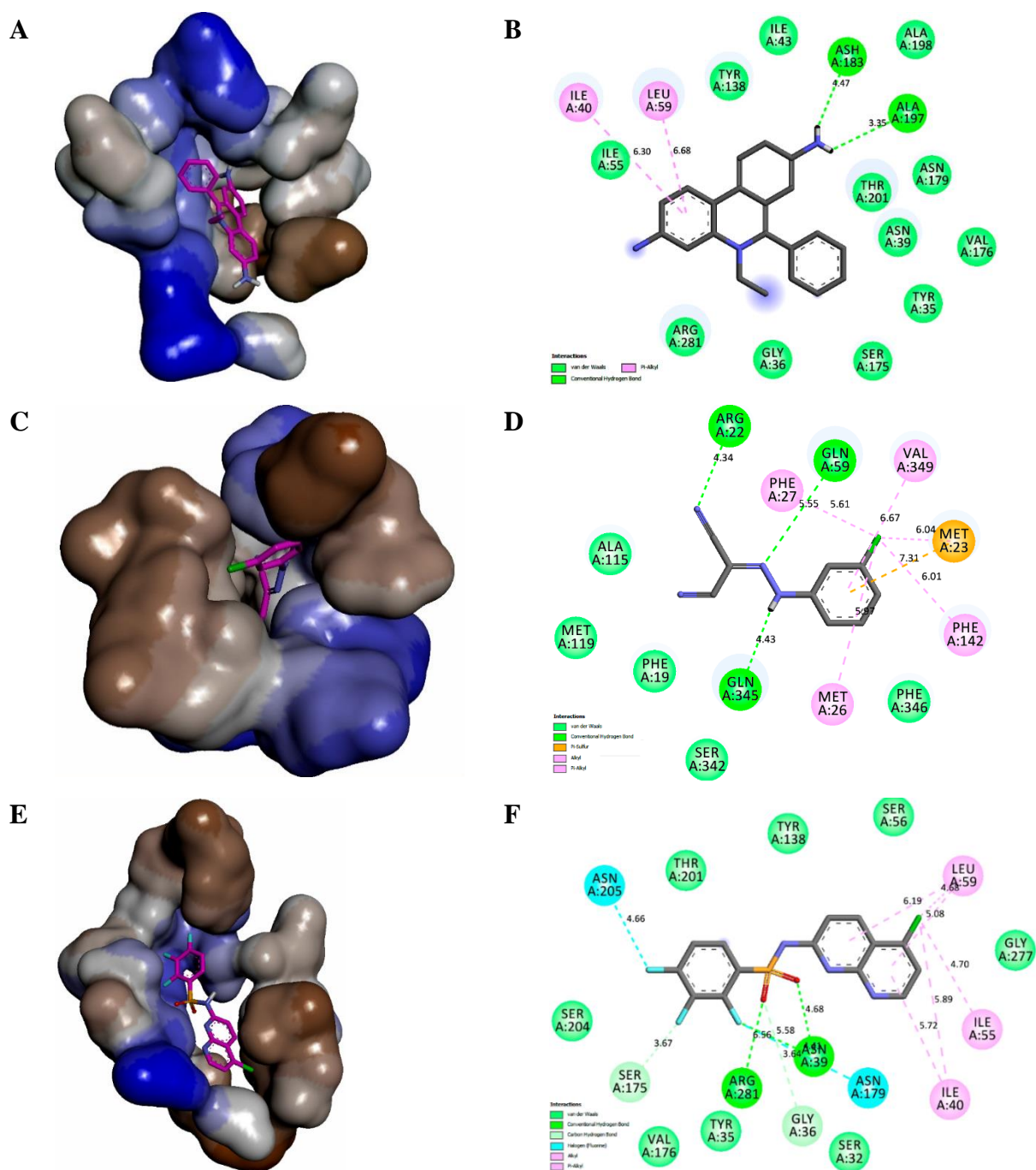
## FIGURES

**Scheme 1.** General scheme for the preparation of 1,8-naphthyridines sulfonamides 10a–10f. R = 4-methyl; 2,5-dichloro; 4-fluoro; 2,3,4-trifluoro; 3-trifluoromethyl; 4-bromo-2,5-difluoro.

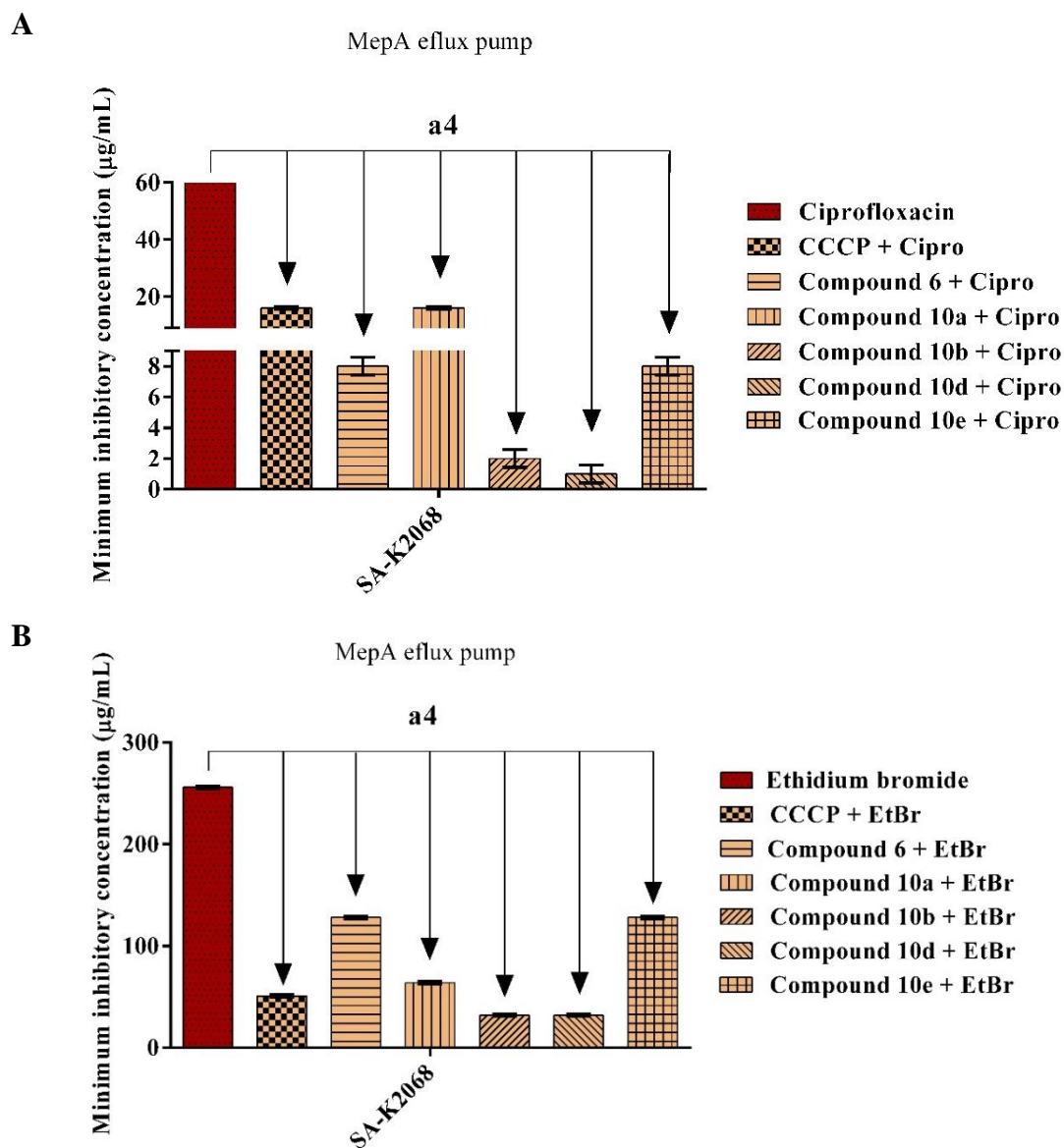




**Figure 1.** Final MepA receptor structure. A) The blue ball shows the most probable active sites of interactions and the green grid box used in docking simulations. B) Ramachandran plot for the MepA structure.

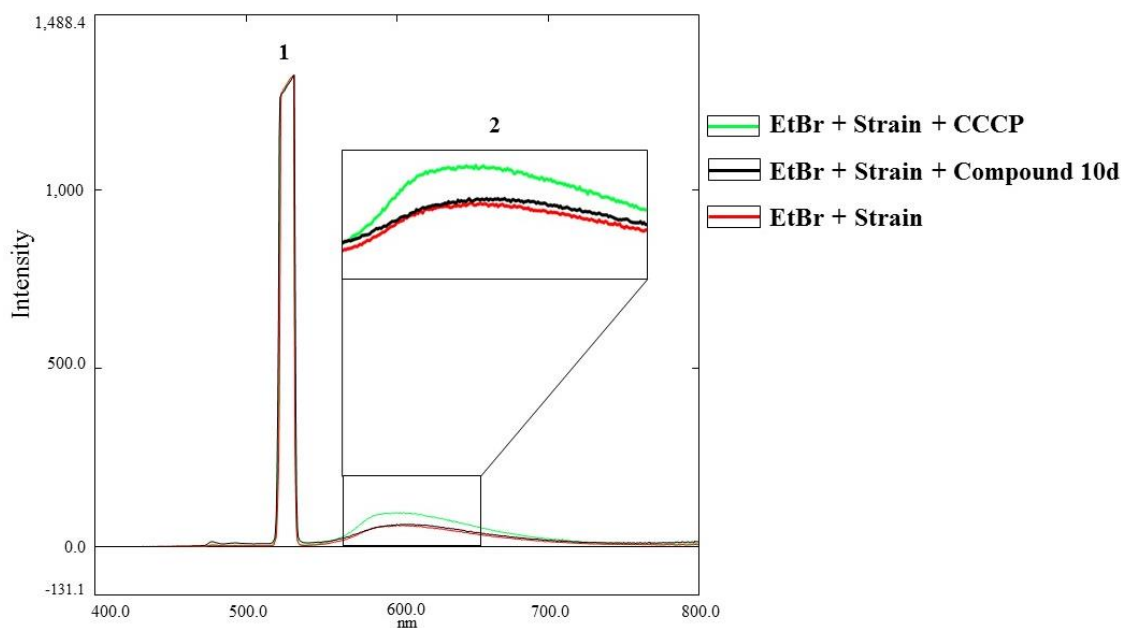


**Figure 2.** The 3D structure of the binding pocket of the efflux pump MepA and map of amino acid residues. A) Binding pocket for the best binding with the highest stability for ethidium bromide and MepA. B) Map of amino acids residues within the ethidium bromide binding pocket of MepA. C) Binding pocket for the best binding with the highest stability for CCCP and MepA. D) Map of amino acid residues within the CCCP binding pocket of MepA. E) Binding pocket for the best binding with the highest stability for compound 10d interaction with MepA. F) Map of amino acid residues interactions with the compound 10d binding pocket of MepA.



**Figure 3.** Ability of compounds 6, 10a, 10b, 10d, and 10e of inhibiting MepA efflux pump in association with ciprofloxacin and ethidium bromide, against the SA-K2068 multiresistant strain. The values represent the geometric mean  $\pm$  S.E.M. (standard error of the mean). Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's test. A) Associated with antibiotic. B) Associated with ethidium bromide. a4 =  $P < 0.0001$  vs control; CCCP = carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone; Cipro = ciprofloxacin; Compound 10a = 4-methyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; Compound 10b = 2,5-dichloro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; Compound 10d = 2,3,4-trifluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; Compound 10e = 3-trifluoromethyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; EtBr = ethidium bromide.

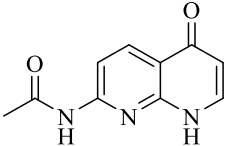
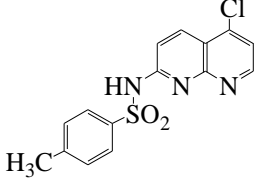
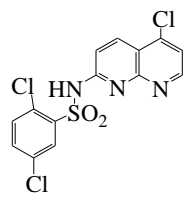
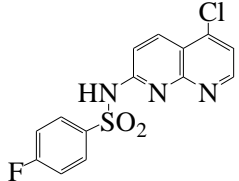
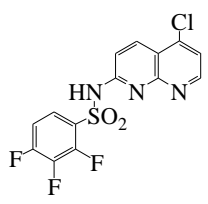
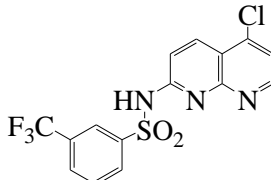
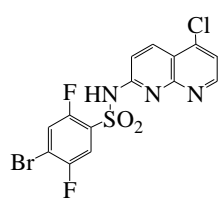




**Figure 4.** Fluorescence emission of the ethidium bromide retained within the bacterial cell. **1:** Peak corresponding to the emission caused by bacterial cellular contents; **2:** Enlarged image of the emission peak for ethidium bromide. CCCP = carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone; Compound 10d = 2,3,4-trifluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; EtBr = ethidium bromide.

## TABLES

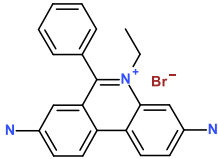
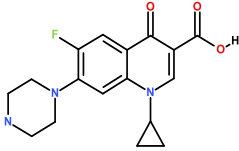
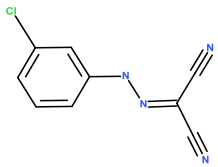
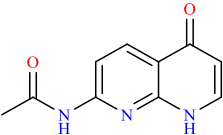
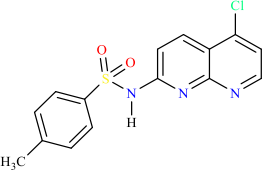
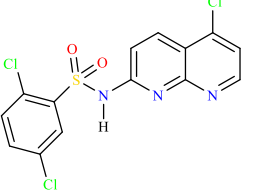
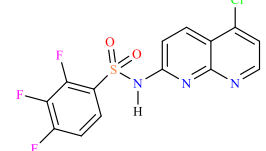
**Table 1.** 1,8-naphthyridines sulfonamides structures and molecular mass.

Compound	Structure	Theoretical molecular mass (g.mol <sup>-1</sup> )	Available mass (g)	Yield (%)	M.P. (°C)
Compound 6		–	–	–	298–299
Compound 10a		333.82	0.0282	84.0	249–250
Compound 10b		388.67	0.0213	70.8	247.5–248
Compound 10c		337.78	0.0105	34.7	196.9–197.9
Compound 10d		373.76	0.0247	56.5	198.6–199.6
Compound 10e		387.79	0.0531	52.6	222.2–224
Compound 10f		434.66	0.0095	69.1	222.7–223.5

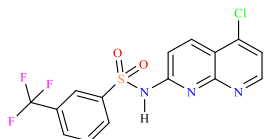
---

**Compound 6** = *N*-(5-oxo-5,8-dihydro-1,8-naphthyridin-2-yl)-acetamide; **Compound 10a** = 4-methyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; **Compound 10b** = 2,5-dichloro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; **Compound 10c** = 4-fluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; **Compound 10d** = 2,3,4-trifluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; **Compound 10e** = 3-trifluoromethyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; **Compound 10f** = 4-bromo-2,5-difluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide.

**Table 2.** Molecular docking results for different 1,8-naphthyridines investigated with the MepA efflux pump, presenting the structure, MIC of the substances associated with EtBr and ciprofloxacin, Energy of interactions, Ki value and size-independent ligand efficiency (SILE).

Compound	Structure	MIC Substance + EtBr ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC Substance + Cipro ( $\mu\text{g/mL}$ )	Energy of interactions kcal/mol	Calculated Ki ( $\mu\text{M}$ )	SILE
Ethidium bromide		256	–	–8.6	0.51	0.19
Ciprofloxacin		–	64	–8.2	0.99	0.39
CCCP		50.8	16	–6.5	17.44	7.90
Compound 6		128	8	–7.1	6.33	2.82
Compound 10a		64	16	–8.4	0.71	0.28
Compound 10b		32	2	–8.2	0.99	0.39
Compound 10d		32	1	–8.8	0.36	0.14

**Compound  
10e**



128

8

-8.6

0.51

0.19

**CCCP** = carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone; **Compound 6** = *N*-(5-oxo-5,8-dihydro-1,8-naphthyridin-2-yl)-acetamide; **Compound 10a** = 4-methyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; **Compound 10b** = 2,5-dichloro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; **Compound 10d** = 2,3,4-trifluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; **Compound 10e** = 3-trifluoromethyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide.

**Table 3.** Physicochemical and Pharmacokinetic Predictions by Swiss ADME of 1,8-naphthyridines sulfonamides.

Compound	Molecular Properties of the ligands						Pharmacokinetics parameters								
	NRB	NHba	NHbd	MR	TPSA	CLog Po/w	GI	BBB	P-gp substrate	CYP1A2 inhibitor	CYP2C19 inhibitor	CYP2C9 inhibitor	CYP2D6 inhibitor	CYP3A4 inhibitor	RL-5
<b>Ethidium bromide</b>	2	0	2	113.02	55.92	2.17	Hight	Yes	Yes	No	No	No	Yes	No	No
<b>CCCP</b>	2	3	1	53.55	71.97	1.83	Hight	Yes	No	Yes	No	No	No	No	No
<b>Ciprofloxacin</b>	3	5	2	92.55	74.57	0.98	Hight	No	Yes	No	No	No	No	No	No
<b>6</b>	2	3	2	56.68	74.85	0.67	Hight	No	No	Yes	No	No	No	No	No
<b>10a</b>	3	4	1	86.63	80.33	2.88	Hight	No	No	Yes	Yes	No	No	No	No
<b>10b</b>	3	4	1	91.68	80.33	3.49	Hight	No	No	Yes	Yes	Yes	No	No	No
<b>10d</b>	3	7	1	81.54	80.33	3.33	Hight	No	No	No	Yes	No	No	No	No
<b>10e</b>	4	7	1	86.66	80.33	3.74	Hight	No	No	Yes	Yes	Yes	No	No	No

**BBB** = blood-brain barrier permeation; **CCCP** = carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone; **CLog Po/w** = the arithmetic mean of the values predicted by the five proposed methods; **Compound 6** = *N*-(5-oxo-5,8-dihydro-1,8-naphthyridin-2-yl)-acetamide; **Compound 10a** = 4-methyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; **Compound 10b** = 2,5-dichloro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; **Compound 10d** = 2,3,4-trifluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; **Compound 10e** = 3-trifluoromethyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; **GI** = human gastrointestinal absorption (HIA); **MR** = Molar refractivity; **NRB** = Number of rotatable bonds; **NHba** = Number of hydrogen-bond acceptors; **NHbd** = Number of hydrogen-bond donors; **RL-5** = Violation in Lipinski's Rule of five; **TPSA** = Topological polar surface area.

**Table 4.** Molinspiration bioactivity score of 1,8-naphthyridines sulfonamides.

<b>Compound</b>	<b>GPCR ligand</b>	<b>Ion channel modulator</b>	<b>Kinase inhibitor</b>	<b>Nuclear receptor ligand</b>	<b>Protease inhibitor</b>	<b>Enzyme inhibitor</b>
<b>Ethidium bromide</b>	0.08	<b>0.72</b>	-0.19	-0.90	-0.33	<b>0.69</b>
<b>CCCP</b>	-1.02	-0.80	-1.26	-1.85	-1.34	-0.64
<b>Ciprofloxacin</b>	0.20	-0.08	0.01	-0.03	-0.27	<b>0.17</b>
<b>Compound 6</b>	-0.33	-0.07	0.08	-1.15	-0.82	<b>0.12</b>
<b>Compound 10a</b>	0.02	-0.25	0.00	-0.52	-0.27	<b>0.14</b>
<b>Compound 10b</b>	0.09	-0.17	0.04	-0.44	-0.23	<b>0.20</b>
<b>Compound 10d</b>	0.07	-0.28	-0.02	-0.47	-0.13	<b>0.22</b>
<b>Compound 10e</b>	0.13	-0.10	0.08	-0.26	-0.10	<b>0.17</b>

CCCP = carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone; **Compound 6** = *N*-(5-oxo-5,8-dihydro-1,8-naphthyridin-2-yl)-acetamide; **Compound 10a** = 4-methyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; **Compound 10b** = 2,5-dichloro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; **Compound 10d** = 2,3,4-trifluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; **Compound 10e** = 3-trifluoromethyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide.

**Table 5.** Minimum inhibitory concentration (MIC) values of ciprofloxacin and ethidium bromide alone and in combination with of compounds 6, 10a, 10b, 10d, and 10e in subinhibitory concentration, against the SA-K2068 multiresistant strain.

<b>Compound</b>	<b>MIC of substances (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>MIC Cipro + Compound (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>MIC EtBr + Compound (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
<b>Ethidium Bromide</b>	256	–	–
<b>Ciprofloxacin</b>	64	–	–
<b>Compound 6</b>	$\geq 1024$	8	128
<b>Compound 10a</b>	$\geq 1024$	16	64
<b>Compound 10b</b>	$\geq 1024$	2	32
<b>Compound 10d</b>	$\geq 1024$	1	32
<b>Compound 10e</b>	$\geq 1024$	8	128

**Compound 6** = *N*-(5-oxo-5,8-dihydro-1,8-naphthyridin-2-yl)-acetamide; **Compound 10a** = 4-methyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; **Compound 10b** = 2,5-dichloro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; **Compound 10d** = 2,3,4-trifluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide; **Compound 10e** = 3-trifluoromethyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide.



## 4.2 ARTIGO 2: THE 1,8-NAPHTHYRIDINES SULFONAMIDES ARE NorA EFFLUX PUMP INHIBITORS

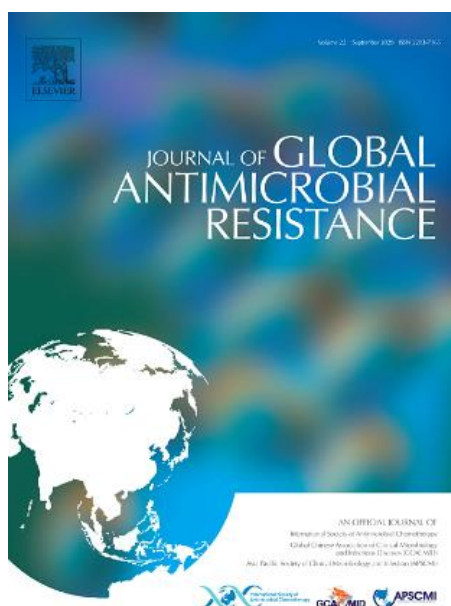
Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino<sup>1\*</sup>, Débora Feitosa Muniz<sup>2</sup>, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>2</sup>, Raimundo Luiz Silva Pereira<sup>2</sup>, Iêda Maria Begnini<sup>3</sup>, Ricardo Andrade Rebelo<sup>3</sup>, Luiz Everson da Silva<sup>4</sup>, Sandro Lucio Mireski<sup>3</sup>, Michele Caroline Nasato<sup>3</sup>, Maria Isabel Lacowicz Krautler<sup>3</sup>, Pedro Silvino Pereira<sup>1</sup>, José Galberto Martins da Costa<sup>5</sup>, Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues<sup>5</sup>, Alexandre Magno Rodrigues Teixeira<sup>6</sup>, Jaime Ribeiro-Filho<sup>7</sup>, Saulo Relison Tintino<sup>2</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>8</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>2</sup>, Teresinha Gonçalves da Silva<sup>1</sup>

Manuscrito publicado no periódico: Journal of Global Antimicrobial Resistance (JGAR)

Link para acesso: <https://www.sciencedirect.com/journal/journal-of-global-antimicrobial-resistance>

Qualis (2017-2020): B1

Fator de impacto em 2021: 2,706



## The 1,8-naphthyridines sulfonamides are NorA efflux pump inhibitors

Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino<sup>1\*</sup>, Débora Feitosa Muniz<sup>2</sup>, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>2</sup>, Raimundo Luiz Silva Pereira<sup>2</sup>, Iêda Maria Begnini<sup>3</sup>, Ricardo Andrade Rebelo<sup>3</sup>, Luiz Everson da Silva<sup>4</sup>, Sandro Lucio Mireski<sup>3</sup>, Michele Caroline Nasato<sup>3</sup>, Maria Isabel Lacowicz Krautler<sup>3</sup>, Pedro Silvino Pereira<sup>1</sup>, José Galberto Martins da Costa<sup>5</sup>, Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues<sup>5</sup>, Alexandre Magno Rodrigues Teixeira<sup>6</sup>, Jaime Ribeiro-Filho<sup>7</sup>, Saulo Relison Tintino<sup>2</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>8</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>2</sup>, Teresinha Gonçalves da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Pharmatotoxicological Prospecting of Bioactive Products, Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, UFPE, Recife, PE, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Regional University of Blumenau, FURB, Itoupava Seca, 89030-903, Blumenau, SC, Brazil

<sup>4</sup> Postgraduate Program in Sustainable Territorial Development, Coastal Sector, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

<sup>5</sup>Laboratory of Natural Products, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

<sup>6</sup>Laboratory of simulations and molecular spectroscopy, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

<sup>7</sup>Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, IGM-Fiocruz, Salvador, BA, Brazil

<sup>8</sup>Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

\* Corresponding author:

Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino

Laboratory of Pharmatotoxicological Prospecting of Bioactive Products, Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Artur de Sá, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE 54740-520, Brazil

E-mail: [datianemorais@hotmail.com](mailto:datianemorais@hotmail.com)

## Abstract

**Objective:** Efflux pumps are transmembrane proteins associated with bacterial resistance mechanisms. Bacteria use these proteins to actively transport antibiotics to the extracellular medium, preventing the pharmacological action of these drugs. This study aimed to evaluate *in vitro* the antibacterial activity of 1,8-naphthyridines sulfonamides, as well as their ability to inhibit efflux systems of *Staphylococcus aureus* strains expressing different levels of the NorA efflux pump.

**Methods:** The broth microdilution test was performed to assess antibacterial activity. Efflux pump inhibition was evaluated *in silico* by molecular docking and *in vitro* by fluorometric tests, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined. The MIC was determined in the association between 1,8-naphthyridine and norfloxacin or ethidium bromide.

**Results:** The 1,8-naphthyridines did not show direct antibacterial activity. However, they effectively reduced the MIC of multidrug-resistant bacteria by associating with norfloxacin and ethidium bromide, in addition to increasing the fluorescence emission. *In silico* analysis addressing the binding between NorA and 1,8-naphthyridines suggests that hydrogen bonds and hydrophilic interactions represent the interactions with the most favourable binding energy, corroborating the experimental data.

**Conclusion:** Our data suggest that 1,8-naphthyridines sulfonamides inhibit bacterial resistance through molecular mechanisms associated with inhibition of the NorA efflux pump in *S. aureus* strains.

**Keywords:** Antibacterial agents; Ethidium bromide fluorescence; Molecular docking; NorA efflux pump; 1,8-naphthyridines

## 1 Introduction

Infections caused by multidrug-resistant bacteria have increased globally. As development of new antibiotics has not matched the rise in resistant microorganisms, the number of untreatable infections has become an alarming public health problem [1]. Acquired resistance to antibiotics provides an adaptation by which bacteria grow and reproduce even within the harmful environment of antibacterial agents [2,3]. This phenomenon may occur through a variety of mechanisms, such as elimination of the antibiotic by efflux pumps [4–6].

Efflux pumps are proteins found in the bacterial membrane that actively expel toxic substances, such as antibiotics, from the intracellular environment, both in Gram-positive and Gram-negative bacteria [7,8]. In this context, they can be specific drug resistance (SDR) or multidrug resistance (MDR) pumps and, therefore, can affect the action of one or more classes of antibiotics and structurally related compounds [9–12]. The NorA efflux pump is one of the most well studied efflux systems in *Staphylococcus aureus*. Belonging to the major facilitator superfamily (MFS), this protein contains 388 amino acids and 12 transmembrane segments and is encoded by the chromosomal gene *norA*, described in a fluoroquinolone-resistant strain collected in 1986 [13–16]. This protein was identified in strains of *S. aureus* as SA-1199-3, SA-K1904, SA-K2361, and SA-K3092 [17]. The most well studied strain that expresses NorA is strain SA-1199, considered wild-type and which expresses NorA inducibly, and its mutant or derivative SA-1199B which constitutively overexpresses this protein [18,19].

Given the importance of this mechanism for bacterial resistance, there is research interest in study into these protein with a view to development of inhibitors. Efflux pump inhibitors (EPI) are used as adjuvants to antibiotic action, leading to accumulation of the antibiotic, and consequently potentiating its effect against bacteria. Such inhibitory molecules are designed to increase the intracellular concentration of the antibiotic and reverse the acquired resistance, reducing the appearance of resistant strains. Therefore, association of EPI with conventional antibiotics may represent an effective strategy against bacterial resistance, such as successfully validated for other classes of substances such as  $\beta$ -lactamase inhibitors [20–22].

The development of new EPI requires that either the effectiveness and safety of the substance is proven and that the EPI candidate specifically reverses the intrinsic bacterial resistance to antibiotics even against multidrug-resistant strains [2,23,24]. Accordingly, the effectiveness of various synthetic and natural compounds as EPI has been proven, although *in vivo* studies using infection models warn about the high toxicity of some of these [25–30].

Despite being precursors of fluoroquinolones (FQs), few studies have been done so far on their action on efflux pumps [31,32]. Thus, this study aims to evaluate the antibacterial activity of the NorA efflux pump by 1,8-naphthyridines sulfonamides against strains of *S. aureus*.

## 2 Material and methods

### 2.1 Substances

Norfloxacin, ethidium bromide (EtBr), and carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP), were obtained from Sigma Aldrich Co. Ltd. All 1,8-naphthyridines were synthesized and provided by Dr. Luiz Everson da Silva from the Federal University of Paraná, and by researchers Dr. Iêda Maria Begnini, Dr. Ricardo Andrade Rebelo, Dr. Sandro Lucio Mireski, Dr. Michele Caroline Nasato, and Dr. Maria Isabel Lacowicz Krautler from the Regional University of Blumenau.

The following 1,8-naphthyridines were tested in the present study: 4-methyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (**Compound 10a**), 2,5-dichloro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (**Compound 10b**), 2,3,4-trifluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (**Compound 10c**) and 3-trifluoromethyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (**Compound 10d**) (Table 1).

### Table 1.

### 2.2 Bacterial strains

The strains used in these studies were the wild strain SA-1199 and the mutant strain SA-1199B. The mutant strain overexpresses the *norA* gene, which encodes the NorA efflux protein. This protein extrudes FQs and other substances, including intercalating DNA dyes such as EtBr [33]. Prof. Glenn Kaatz provided the strains studied.

### 2.3 Analysis of the antibacterial activity and efflux pump inhibition in association

For analysis of the antibacterial activity, a bacterial inoculum suspension corresponding to 0.5 on the McFarland scale was prepared. This inoculum was diluted in the brain and heart infusion (BHI) medium and distributed on 96-well plates. The test substances were then microdiluted in a 1:1 ratio, and the plates were incubated at 37 °C for 24 h. Following incubation, resazurin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide) was added and used as an indicator of bacterial growth. The MIC was established as the lowest concentration at which no bacterial growth was observed [34,35].

For analysis of efflux pump inhibition, the 1,8-naphthyridines were used at subinhibitory concentrations (MIC/8). The control group consisted of the bacterial inoculum, diluted in a final volume of 150 mL of saline, and added to a tube containing 1.350 mL of BHI. In the evaluation of the substances, a solution was prepared to contain 150 µL of each inoculum, the 1,8-naphthyridines in MIC/8, and the final volume supplemented with BHI. An aliquot of 100 µL of each tube was distributed in 96-well microplates and microdiluted with 100 µL of norfloxacin or EtBr at an initial concentration of 1024 µg/mL, and then serial dilutions were made to obtain solutions with concentrations ranging from 0.5–512 µg/mL. Incubation and reading were performed according to the protocol mentioned above. The MIC was defined as the lowest concentration of norfloxacin or EtBr capable of inhibiting bacterial growth [34,35].

#### **2.4 Evaluation of NorA inhibition by ethidium bromide fluorescence emission**

The SA-1199B strain was cultured in HIA for 24 h, at a temperature of 37 °C. Subsequently, the inoculum was prepared by suspending the strain in saline, corresponding to 0.5 on the McFarland scale. Then the test solutions were prepared, containing 500 µL of the inoculum, the substances, and the final volume supplemented with BHI until a volume of 2 mL was obtained, kept in a greenhouse at 37 °C in incubation for a period of 6 h. Then, the samples were centrifuged at 3,000 rpm for 3 min, and the pellet obtained was resuspended in 3 mL saline solution to read the fluorescence emission. The following groups were prepared and tested: negative control consisting of strain + EtBr; positive control containing strain + EtBr + carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP); test group containing strain + EtBr + 2,3,4-trifluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Compound 10c). All substances were at a MIC/8 concentration. Fluorescence spectra were measured using a Shimadzu RF6000 spectrophotometer with sample excitation performed by a 150 W xenon lamp. The samples were added in a quartz cuvette and subjected to light scattered excitation

with a wavelength of 530 nm, a spectral resolution of 3 nm with an increase of 0.5 nm, and a scanning rate of 600 nm/min. Emission was monitored from 400 to 800 nm [35].

## 2.5 Statistical analysis

The assays were performed in triplicate, with results expressed as the geometric means. Differences were analysed by two-way ANOVA, followed by Tukeys post hoc test, using GraphPad Prism software version 5.0.

## 2.6 Absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) calculation and molecular modeling studies in the NorA binding site

In concordance with the study by dos Santos et al. [36], we identified potential efflux binding pockets of NorA and performed a prediction of the 3D structure. Docking simulations were performed by Autodock vina using UCSF Chimera package software. CORINA and partial charge Gasteiger were used to generate all the coordinates of the chemical structures. The conformational energies of inhibitors were minimized by using the UCSF Chimera. Before performing molecular docking, the NorA protein was modelled by Santos et al. [36] and all files were prepared using a Dock prep tool available in the software package UCSF chimera. The flexible docking runs were performed as blind by covering the entire protein and defining the interest coordinate region with 5 Å of this coordinate ( $x = 29.78$ ,  $y = 49.65$ ,  $z = 71.78$  and box size with  $x = 46.00$ ,  $y = 38.00$ , and  $z = 30.00$ ) of the protein as bonding pocket to ensure a blind docking approach.

We used the UCSF Chimera visualization program to verify the docking results and the Discovery studio (DS) to show how 1,8-naphthyridine interacted with NorA. The binding energy score was used to calculate the inhibition constant ( $K_i$  value) using equation 1 ( $K_i = 10^{-\text{Binding Energy}/1.366}$ ) [37]. Ligand efficiency was determined using equation 2 with size-independent ligand efficiency (SILE) ( $\text{SILE} = k_i/N^{0.3}$ ) [38].

The ADME properties were estimated by the Swiss ADME predictor (<http://www.swissadme.ch>) server. Different pharmacokinetic parameters such as toxicity, metabolizing enzyme interactions, and absorption parameters were evaluated [39].

### 3 Results

#### 3.1 Antibacterial activity and pump efflux inhibition in association with norfloxacin and ethidium bromide

The 1,8-naphthyridines showed no clinically relevant antibacterial activity against SA-1199 and SA-1199B, with MIC values  $\geq 1024$   $\mu\text{g/mL}$  (Table 2).

##### Table 2.

Association of 1,8-naphthyridines with norfloxacin resulted in a reduction in the MIC of this antibiotic. This synergism was evident. In tests with the SA-1199 strain, the addition of compound 10a and 10d resulted in a 32-fold decrease in the MIC values. Similarly, for compound 10b and 10c, the MIC values were reduced 64-folds and 128-folds, respectively. In SA-1199B, compounds 10a, 10b, and 10d caused a reduction in MIC values of 4-fold; and compound 10c caused a reduction of 16-fold. These data indicate that compound 10c has the most significant synergistic activity. The decrease in the MIC values was more expressive for the wild strain, probably because of its lower levels of NorA expression. As the resistance mechanism of the strains used in this test is mainly the expression of NorA, these substances may have caused a decrease in MIC values through inhibition of efflux pumps. Finally, for both strains, positive control CCCP also reduced the MIC of the antibiotic (Figure 1).

##### Figure 1.

To consolidate the data obtained in the previous test, we investigated the effect of the association between 1,8-naphthyridines and EtBr, an efflux pump substrate. As shown in Figure 2, in experiments with strain SA-1199, a 4-fold reduction in MIC values occurred after the addition of compounds s 10a and 10b, and an 8-fold reduction was seen compound 10c and EtBr were combined. Against the SA-1199B, the MIC was reduced 2-fold after addition of compounds 10a and 10b. A 4-fold reduction in MIC values occurred after the addition of compound 10c. As in the tests with norfloxacin, the synergistic activity was more significant for the wild strain, which expresses lower levels of NorA. Also, compound 10c was the



compound that caused an expressive reduction in MIC, suggesting that this substance is more potent in terms of NorA efflux pump inhibition.

**Figure 2.**

### 3.2 NorA inhibition in the ethidium bromide fluorescence assay

Given the promising results obtained, especially with compound 10c, it was decided to evaluate NorA efflux pump inhibition by this compound by evaluating the fluorescence emission emitted by EtBr. As shown in Figure 3 at peak emission 2, the addition of compound 10c caused an increase in fluorescence emission compared with control groups (EtBr alone).

**Figure 3.**

### 3.3 Molecular docking for analysis of efflux pump inhibition

Docking simulations were carried out for ligand-bound protein complexes to minimize the energy and stabilize the docked complex. The best-docked ligand conformations were saved in output clusters 0. The docking studies revealed that the 1,8-naphthyridine derivative was recorded as the most favourable link energy in a range that varied from  $-8.2$  to  $-9.1$  kcal/mol to NorA (Table 3). The results were corroborated by the experimental data, in which the compounds with better binding energy and stability of interaction had lower MIC values.

**Table 3.**

Figure 4 shows the 3D structure of a binding pocket of the efflux pump NorA and the maps of interactions, necessary to understand the molecular interactions responsible for its inhibition. Ethidium bromide is stabilized by van der Waals interactions with a distance of around  $5 \text{ \AA}$  with ARG106, GLN345, GLY53, GLY56, HIS223, ILE52, LEU226, PHE142, PHE27, PHE346;  $\pi$ - $\pi$  interactions with PHE146;  $\pi$ -alkyl connections with MET26 and alkyl connections with MET227, LEU30, and VAL349 (Figure 4A and 4B). The interaction map for NorA and compound 10c shows a similar relationship orchestrated by hydrogen bonds with GLY56 ( $2.70 \text{ \AA}$ ); carbon-hydrogen bonds with ALA350 ( $2.82 \text{ \AA}$ ), and GLY53 ( $2.53 \text{ \AA}$ );

halogen with ILE52 (2.97 Å);  $\pi$ - $\pi$  with PHE346 (4.76 Å);  $\pi$ -alkyl with VAL349 (4.69 Å), PHE142 (4.51 Å) and HIS223 (4.07 Å) and  $\pi$ -sulphur with MET26 (5.78 Å) (Figure 4C and D).

#### Figure 4.

Chemical scaffolds influence the estimation of ADME properties. However, there was no rule-of-five violation according to the Lipinski rule, which strongly suggests that the compound 10c is an oral drug candidate. The results presented in Table 4 indicate that all the compounds can undergo gastrointestinal absorption and do not cross the blood-brain barrier. Compound 10c showed an optimal LogP value and the lowest potential for inhibiting CYP isoforms, suggesting that the drug would be relatively non-toxic for individual consumption. Except for norfloxacin, all molecules are highly lipophilic. Although the partition coefficient of all compounds shows a tendency of hydrophobicity and high permeability properties, only EtBr potentially interacted with the P-glycoprotein (P-gp). The results showed that CCCP, like the other compounds, cannot be a substrate for the P-gp protein.

#### Table 4.

The docking protocol was carried out using only compounds that showed expressive synergistic activity against the SA-1199B multiresistant strain. In this study, this was represented by compound 10c. The binding energy shows positive correlations with MIC value for both assays and a negative correlation with the lipophilicity parameter Log Po/w. There is also a positive correlation between the Ki and SILE, according to the correlation matrix of Pearson coefficients (Table 5).

#### Table 5.

## 4 Discussion

The 1,8-naphthyridines may not be effective in controlling *S. aureus* infections when used as monotherapy, given the absence of clinically relevant MIC values. However, the lack of a direct antibacterial activity would not impair the use of these substances as adjuvants, as in

this case, being free of any antibacterial activity might reduce the likelihood of bacterial resistance development to the inhibitor [21].

In the present study, it was demonstrated that four different 1,8-naphthyridines caused reductions in the MIC of norfloxacin and EtBr of at least 4-fold. Studies indicate that substances that cause synergism of this magnitude in the effect of the antibiotic and EtBr are possible EPI [9,17,48,40–47].

When associated with EtBr, an EPI can increase its antibacterial effects [49]. The resistance to bromide is exclusively mediated by efflux pumps, which may be useful as a parameter of assessment of pump inhibition [50].

Several studies have shown that NorA can extrude a number of chemically and structurally different compounds, including dyes such as EtBr and biocides such as QACs or lipophilic and monocyclic compounds such as cetrimide, benzalkonium chloride, tetraphenylphosphonium, and acriflavine [16,18,51,52]. However, it is expressly recognized for causing moderate resistance to antibiotics of the hydrophilic FQ class, such as norfloxacin and ciprofloxacin [15,52,53]. Like other efflux pumps belonging to the MFS family, NorA uses the proton motive force, that is, the proton gradient across the membrane as an energy source for transport of antibiotics into the extracellular environment, performing the antibiotic antiport/ $H^+$  [52,54]. Thus, the mechanism of a potential inhibitor of this protein should act, among other ways, by inhibiting this energy source, as is the case with the protonophore CCCP, which dissipates the proton gradient and the membrane potential. It acts as an inhibitor of EtBr and norfloxacin efflux, mediated by NorA [18,52,54].

Table 1 shows that compound 10c has three more fluorine substituent groups than all other molecules, providing a higher number of radicals that could bind to active sites in the NorA protein, according to the data obtained *in silico*. Besides, this substituent participates in the composition of FQ antibiotics, which are substrates of NorA proteins [55]. This suggests that 1,8-naphthyridines bind to NorA active sites through these substituent groups and disrupt its function.

Measurement of fluorescence intensity is an essential parameter in the evaluation of pump inhibitors. Several studies are addressing this technique using both liquid and solid culture media, demonstrating that this method is valid and reliable. Within the bacterial cell, EtBr can intercalate and cause DNA damage while emitting a concentration-dependent fluorescence. Nevertheless, in response to the presence of EtBr, the bacterium may increase the expression of efflux pumps as a compensating mechanism [51,56–59].

The peak size is proportional to the amount of EtBr inside the cell as EtBr is responsible for the fluorescence emission when inserted in the DNA [33,59,60]. The increase in fluorescence observed in the compound 10c group indicates a concentration of EtBr in the bacterial cytoplasm as a result of inhibition of the efflux pump, possibly by compound 10c [61]. Meanwhile, the peak of the standard CCCP inhibitor, observed below the compound 10c peak, may be justified by its strong toxic effect on bacteria, which, even at sub-inhibitory concentration, caused interference with bacterial growth.

In recent years, the ability of several substances to inhibit efflux pumps has been proven, such as boronic acid derivatives against strain SA-1199B, reducing the MIC of FQ [62,63]. Studies have reported through a fluorometric approach that indole-based compounds were able to inhibit EtBr efflux and showed synergistic activity. However, most compounds did not show intrinsic antibacterial activity [64,65]. Quinoline-based NorA inhibitors also showed significant inhibition of bacterial efflux in the fluorimetric evaluation, in addition to presenting synergistic results in combination with the FQ ciprofloxacin. However, they did not show intrinsic antibacterial activity for most of the compounds tested. All of these results corroborate with those of the present study [66–68].

With regards to the molecular docking data, ADME properties, and the  $K_i$  and SILE values are suggestive of clinical relevance. Therefore, the inhibition constant and ligand efficacy calculated also show positive correlations with the microbiological data. Concerning the Nora-ligand interaction, the type and diversity of interactions explain the affinity and stability of the NorA-ligand complex. The interactions are numerous and diverse in the NorA-compound 10c complex stabilization, with nine amino acid residues involved. Especially the carbon-hydrogen and  $\pi$ -alkyl interactions, resulting in excellent stability and better interaction energy for the complex. The lipophilicity of the compounds indicates a tendency for intestinal absorption. The P-gp is a transmembrane protein member of the ABC family of transporters that plays a crucial role in the elimination of substances by active efflux through biological membranes in the gastrointestinal lumen tract and endothelial cells of the blood-brain barrier (BBB) [69–72]. As shown, the compounds tested are not P-gp substrates, preventing efflux of these substances by this protein and avoiding possible interference in the ADME properties of the compounds.

In conclusion, despite not showing antibacterial activity, the 1,8-naphthyridine sulfonamides significantly reduced bacterial growth, both when associated with EtBr and when associated with antibiotics. Compound 10c induced an increase in EtBr fluorescence emission

and demonstrated a favourable interaction with NorA in molecular docking tests. Therefore, these data indicate that 1,8-naphthyridine sulfonamides can attenuate bacterial resistance through molecular mechanisms associated with inhibition of the NorA efflux pump in *S. aureus* strains.

### **Funding**

This study was financed by the Foundation for Support of Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) process number IBPG-1241-4.03/16, Financier of Studies and Projects (FINEP), National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) process 150456/2018-2 and 406685/2018-5, and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), finance code 001.

### **Competing interests**

None declared.

### **Ethical approval**

Not required.

### **Acknowledgements**

We thank Prof. Glenn Kaatz of Wayne State University for kindly giving the strains.

### **Declarations of interest**

The authors have no conflict of interest to declare.

## References

- [1] Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2015. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>.
- [2] Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: A successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev* 2013. <https://doi.org/10.1128/CMR.00059-12>.
- [3] Wannmacher L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? *ISSN 1810-0791* 2004.
- [4] Langton KP, Henderson PJF, Herbert RB. Antibiotic resistance: Multidrug efflux proteins, a common transport mechanism? *Nat Prod Rep* 2005. <https://doi.org/10.1039/b413734p>.
- [5] Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: An update. *Drugs* 2009. <https://doi.org/10.2165/11317030-000000000-00000>.
- [6] Nikaido H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003. <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.4.593-656.2003>.
- [7] Piddock LJ V. Multidrug-resistance efflux pumps - Not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* 2006. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1464>.
- [8] Nikaido H. Multidrug Resistance in Bacteria. *Annu Rev Biochem* 2009. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923>.
- [9] Kaatz GW, Moudgal V V., Seo SM, Kristiansen JE. Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.719-726.2003>.
- [10] Kalia NP, Mahajan P, Mehra R, Nargotra A, Sharma JP, Koul S, et al. Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2012. <https://doi.org/10.1093/jac/dks232>.
- [11] Marquez B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie* 2005. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.04.012>.
- [12] P. Tegos G, Haynes M, Jacob Strouse J, Md. T. Khan M, G. Bologna C, I. Oprea T, et al. Microbial Efflux Pump Inhibition: Tactics and Strategies. *Curr Pharm Des* 2012. <https://doi.org/10.2174/138161211795703726>.
- [13] Ubukata K, Itoh-Yamashita N, Konno M. Cloning and expression of the *norA* gene for fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*

1989. <https://doi.org/10.1128/AAC.33.9.1535>.
- [14] Costa SS, Viveiros M, Amaral L, Couto I. Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *Open Microbiol J* 2013. <https://doi.org/10.2174/1874285801307010059>.
- [15] Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S, Ubukata K, Konno M. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus norA* gene, which confers resistance to quinolones. *J Bacteriol* 1990. <https://doi.org/10.1128/jb.172.12.6942-6949.1990>.
- [16] Neyfakh AA, Borsch CM, Kaatz GW. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrob Agents Chemother* 1993. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.1.128>.
- [17] Schindler BD, Jacinto P, Kaatz GW. Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: Current status of potentiating existing antibiotics. *Future Microbiol* 2013. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.16>.
- [18] Kaatz GW, Seo SM, Ruble CA. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.5.1086>.
- [19] Kaatz GW, Seo SM, Ruble CA. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 1991. <https://doi.org/10.1093/infdis/163.5.1080>.
- [20] Wright GD. Resisting resistance: New chemical strategies for battling superbugs. *Chem Biol* 2000. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00126-5](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00126-5).
- [21] Ashima K, Bhardwaj, Priyabrata Mohanty. Bacterial Efflux Pumps Involved in Multidrug Resistance and their Inhibitors: Rejuvenating the Antimicrobial Chemotherapy. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2012. <https://doi.org/10.2174/157489112799829710>.
- [22] Zechini B, Versace I. Inhibitors of Multidrug Resistant Efflux Systems in Bacteria. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2009. <https://doi.org/10.2174/157489109787236256>.
- [23] Miller LA, Ratnam K, Payne DJ.  $\beta$ -lactamase-inhibitor combinations in the 21st century: Current agents and new developments. *Curr Opin Pharmacol* 2001. [https://doi.org/10.1016/S1471-4892\(01\)00079-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4892(01)00079-0).
- [24] Lomovskaya O, Lee A, Hoshino K, Ishida H, Mistry A, Warren MS, et al. Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999. <https://doi.org/10.1128/aac.43.6.1340>.

- [25] Lomovskaya O, Bostian KA. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic - A vision for applied use. *Biochem Pharmacol* 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.12.008>.
- [26] Watkins WJ, Landaverry Y, Léger R, Litman R, Renau TE, Williams N, et al. The relationship between physicochemical properties, *in vitro* activity and pharmacokinetic profiles of analogues of diamine-containing efflux pump inhibitors. *Bioorganic Med Chem Lett* 2003. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2003.07.030>.
- [27] Antas E Silva D, Falcão-Silva VS, Serrano Gomes AY, Da Costa DA, Soares Lemos V, De Fátima Agra MD, et al. Triterpenes and phenolic compounds isolated from the aerial parts of *Herissantia tiubae* and evaluation of 5,4',-dihydroxy-3,6,7,8,3'-pentamethoxyflavone as a modulator of bacterial drug resistance. *Pharm Biol* 2009. <https://doi.org/10.1080/13880200802436570>.
- [28] Gibbons S. Phytochemicals for bacterial resistance - Strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Med.*, 2008. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1074518>.
- [29] Stavri M, Piddock LJV, Gibbons S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J Antimicrob Chemother* 2007. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl460>.
- [30] Falcão-Silva VS, Silva DA, Souza MDF V., Siqueira JP. Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by a kaempferol glycoside from *Herissantia tiubae* (Malvaceae). *Phyther Res* 2009. <https://doi.org/10.1002/ptr.2695>.
- [31] Hong CY, Kim YK, Chang JH, Kim SH, Choi H, Nam DH, et al. Novel fluoroquinolone antibacterial agents containing oxime-substituted (Aminomethyl)pyrrolidines: Synthesis and antibacterial activity of 7-(4- (Aminomethyl)-3-(methoxyimino) pyrrolidin-1-yl)-1-cyclopropyl-6-fluoro-4- oxo-1,4-dihydro[1,8]naphthyridine-3-. *J Med Chem* 1997. <https://doi.org/10.1021/jm970202e>.
- [32] Tillotson GS. Quinolones: Structure-activity relationships and future predictions. *J Med Microbiol* 1996. <https://doi.org/10.1099/00222615-44-5-320>.
- [33] Gibbons S, Oluwatuyi M, Kaatz GW. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2003. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg044>.
- [34] (CLSI) C and LS institute. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 28th ed. 2018. 2018. <https://doi.org/10.1108/08876049410065598>.
- [35] Tintino S.R., Oliveira-Tintino C.D.M., Campina F.F., Limaverde P.W., Pereira P.S.,



- Siqueira-Júnior S.P., et al. Vitamin K enhances the effect of antibiotics inhibiting the efflux pumps of *Staphylococcus aureus* strains. *Medicinal Chemistry Research*, 2018. ISSN: 15548120. DOI: 10.1007/s00044-017-2063-y.
- [36] dos Santos JFS, Tintino SR, de Freitas TS, Campina FF, Irwin IR, Siqueira-Júnior JP, et al. *In vitro e in silico* evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.03.001>.
- [37] Onawole AT, Abdul Halim M, Ullah N, Al-Saadi AA. Structural, spectroscopic and docking properties of resorcinol, its -OD isotopomer and dianion derivative: a comparative study. *Struct Chem* 2018. <https://doi.org/10.1007/s11224-017-1037-5>.
- [38] Nissink JWM. Simple size-independent measure of ligand efficiency. *J Chem Inf Model* 2009. <https://doi.org/10.1021/ci900094m>.
- [39] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep* 2017. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- [40] DeMarco CE, Cushing LA, Frempong-Manso E, Seo SM, Jaravaza TAA, Kaatz GW. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007. <https://doi.org/10.1128/AAC.00430-07>.
- [41] Costa S, Falcão C, Viveiros M, MacHado D, Martins M, Melo-Cristino J, et al. Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* 2011. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-241>.
- [42] Kristiansen JE, Thomsen VF, Martins A, Viveiros M, Amaral L. Non-antibiotics reverse resistance of bacteria to antibiotics. In *Vivo (Brooklyn)* 2010.
- [43] Trzcinski K, Cooper BS, Hryniewicz W, Dowson CG. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2000. <https://doi.org/10.1093/jac/45.6.763>.
- [44] Patel D, Kosmidis C, Seo SM, Kaatz GW. Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010. <https://doi.org/10.1128/AAC.01058-10>.
- [45] Piddock LJV. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2006. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.382->

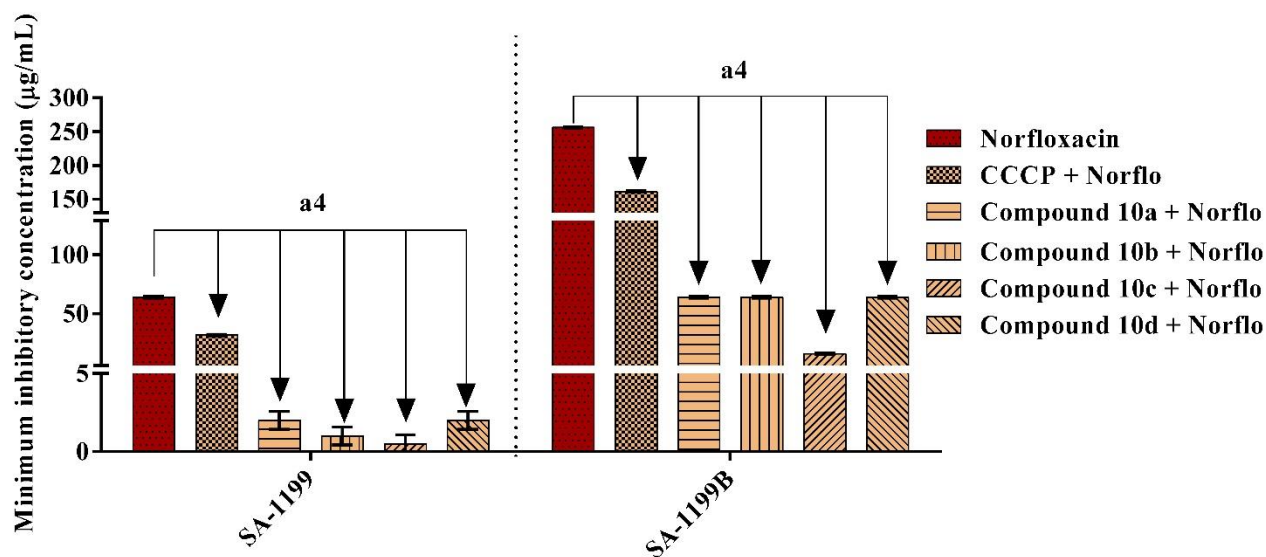
- 402.2006.
- [46] El-Baky RMA, Sandle T, John J, Abuo-Rahma GEDA, Hetta HF. A novel mechanism of action of ketoconazole: Inhibition of the NorA efflux pump system and biofilm formation in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Drug Resist* 2019. <https://doi.org/10.2147/IDR.S201124>.
- [47] Ramalhete C, Spengler G, Martins A, Martins M, Viveiros M, Mulhovo S, et al. Inhibition of efflux pumps in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* resistant strains by triterpenoids from *Momordica balsamina*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.09.011>.
- [48] Davies J, Wright GD. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol* 1997. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)01033-0](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01033-0).
- [49] Wang Y, Venter H, Ma S. Efflux Pump Inhibitors: A Novel Approach to Combat Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. *Curr Drug Targets* 2015. <https://doi.org/10.2174/1389450116666151001103948>.
- [50] Martins M, Viveiros M, Couto I, Costa SS, Pacheco T, Fanning S, et al. Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the ethidium bromide-agar cartwheel method. *In Vivo (Brooklyn)* 2011.
- [51] Kaatz GW, Seo SM. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.12.2650>.
- [52] Ng EYW, Trucksis M, Hooper DC. Quinolone resistance mediated by *norA*: Physiologic characterization and relationship to *flqB*, a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus aureus* chromosome. *Antimicrob Agents Chemother* 1994. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.6.1345>.
- [53] Poole K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2000. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.9.2233-2241.2000>.
- [54] Palazzotti D, Bissaro M, Bolcato G, Astolfi A, Felicetti T, Sabatini S, et al. Deciphering the molecular recognition mechanism of multidrug resistance *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump using a supervised molecular dynamics approach. *Int J Mol Sci* 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20164041>.
- [55] Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg. Infect. Dis.*, 2001. <https://doi.org/10.3201/eid0702.010239>.
- [56] Amaral L, Cerca P, Spengler G, MacHado L, Martins A, Couto I, et al. Ethidium bromide

- efflux by *Salmonella*: Modulation by metabolic energy, pH, ions and phenothiazines. *Int J Antimicrob Agents* 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.03.014>.
- [57] Amaral L, Fanning S, Pagés JM. Efflux pumps of gram-negative bacteria: Genetic responses to stress and the modulation of their activity by pH, inhibitors, and phenothiazines. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 2010. <https://doi.org/10.1002/9780470920541.ch2>.
- [58] Olmsted J, Kearns DR. Mechanism of Ethidium Bromide Fluorescence Enhancement on Binding to Nucleic Acids. *Biochemistry* 1977. <https://doi.org/10.1021/bi00635a022>.
- [59] Markham PN, Westhaus E, Klyachko K, Johnson ME, Neyfakh AA. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999. <https://doi.org/10.1128/aac.43.10.2404>.
- [60] Blair JMA, Piddock LJV. How to measure export via bacterial multidrug resistance efflux pumps. *MBio* 2016. <https://doi.org/10.1128/mBio.00840-16>.
- [61] Raherison S, Gonzalez P, Renaudin H, Charron A, Bébéar C, Bébéar CM. Increased expression of two multidrug transporter-like genes is associated with ethidium bromide and ciprofloxacin resistance in *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.421-424.2005>.
- [62] Fontaine F, Héquet A, Voisin-Chiret AS, Bouillon A, Lesnard A, Cresteil T, et al. Boronic species as promising inhibitors of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump: Study of 6-substituted pyridine-3-boronic acid derivatives. *Eur J Med Chem* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.02.056>.
- [63] Fontaine F, Hequet A, Voisin-Chiret AS, Bouillon A, Lesnard A, Cresteil T, et al. First identification of boronic species as novel potential inhibitors of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump. *J Med Chem* 2014. <https://doi.org/10.1021/jm401808n>.
- [64] Lepri S, Buonerba F, Goracci L, Velilla I, Ruzziconi R, Schindler BD, et al. Indole Based Weapons to Fight Antibiotic Resistance: A Structure-Activity Relationship Study. *J Med Chem* 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01219>.
- [65] Buonerba F, Lepri S, Goracci L, Schindler BD, Seo SM, Kaatz GW, et al. Improved Potency of Indole-Based NorA Efflux Pump Inhibitors: From Serendipity toward Rational Design and Development. *J Med Chem* 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01281>.
- [66] Felicetti T, Cannalire R, Pietrella D, Latacz G, Lubelska A, Manfroni G, et al. 2-Phenylquinoline *S. aureus* NorA Efflux Pump Inhibitors: Evaluation of the Importance

- of Methoxy Group Introduction. *J Med Chem* 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00791>.
- [67] Felicetti T, Cannalire R, Nizi MG, Tabarrini O, Massari S, Barreca ML, et al. Studies on 2-phenylquinoline *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors: New insights on the C-6 position. *Eur J Med Chem* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.06.013>.
- [68] Felicetti T, Mangiaterra G, Cannalire R, Cedraro N, Pietrella D, Astolfi A, et al. C-2 phenyl replacements to obtain potent quinoline-based *Staphylococcus aureus* NorA inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2020. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1719083>.
- [69] Ma JD, Tsunoda SM, Bertino JS, Trivedi M, Beale KK, Nafziger AN. Evaluation of *in vivo* P-glycoprotein phenotyping probes: A need for validation. *Clin Pharmacokinet* 2010. <https://doi.org/10.2165/11318000-000000000-00000>.
- [70] Raghava KM, Lakshmi PK. Overview of P-glycoprotein inhibitors: A rational outlook. *Brazilian J Pharm Sci* 2012. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502012000300002>.
- [71] Edwards JE, Alcorn J, Savolainen J, Anderson BD, McNamara PJ. Role of P-glycoprotein in distribution of nelfinavir across the blood-mammary tissue barrier and blood-brain barrier. *Antimicrob Agents Chemother* 2005. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.4.1626-1628.2005>.
- [72] Beaulieu É, Demeule M, Ghitescu L, Béliveau R. P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain. *Biochem J* 1997. <https://doi.org/10.1042/bj3260539>.

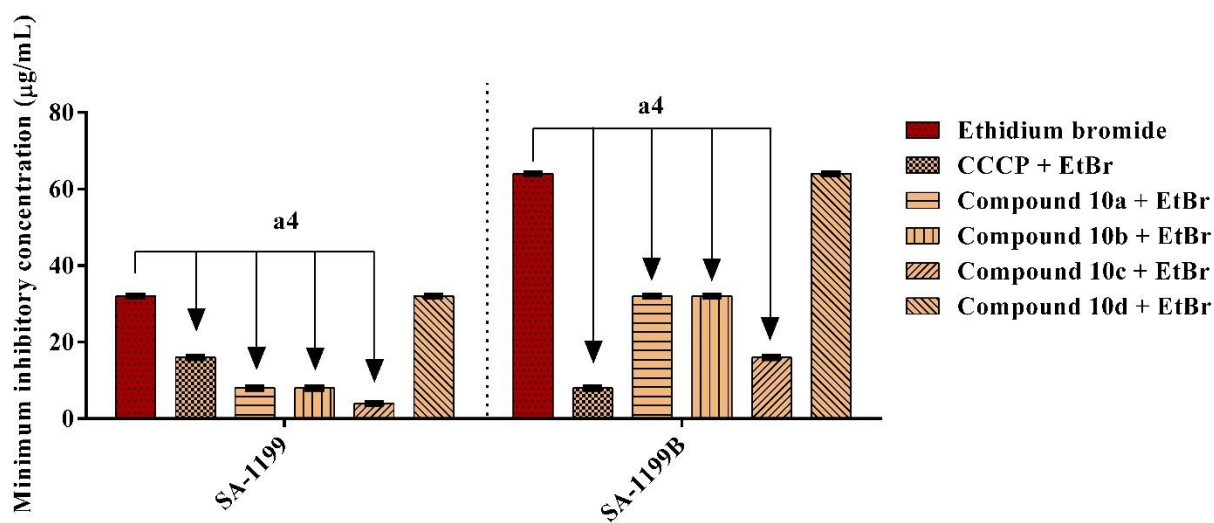
## FIGURES

**Figure 1.** Ability of compounds 10a, 10b, 10c, and 10d to inhibit NorA efflux pump in association with norfloxacin, against the SA-1199 and SA-1199B.



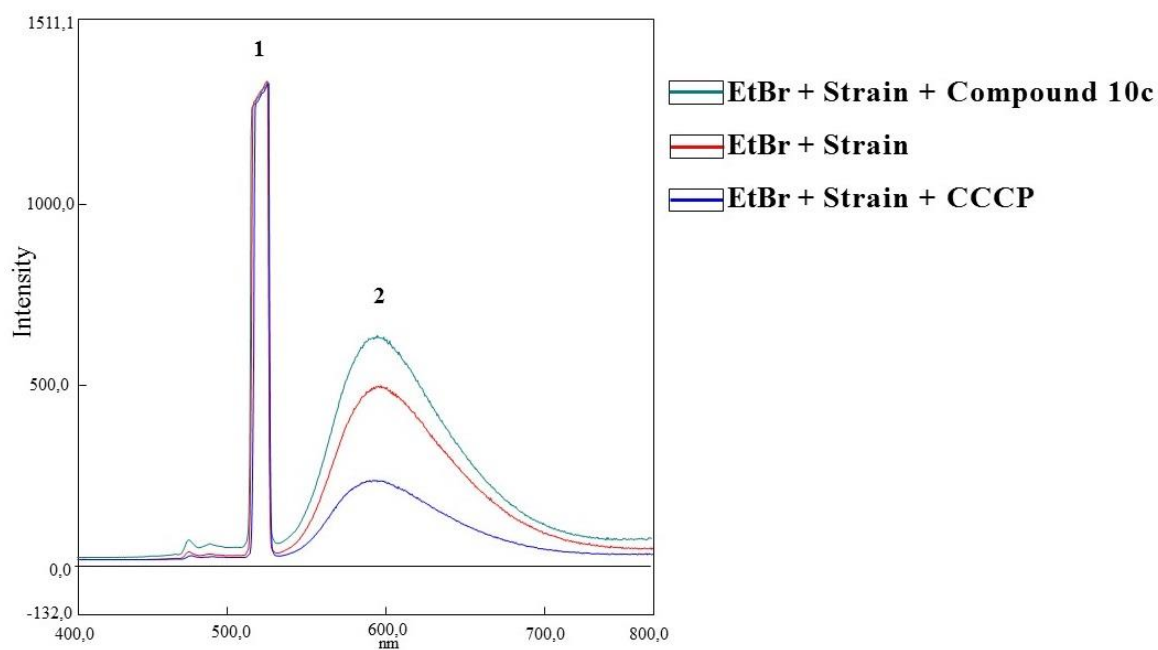
These values represent the geometric means  $\pm$  S.E.M. (standard error of the mean). Analysis was performed with two-way ANOVA, followed by Tukey's test. a4 =  $p < 0.0001$  vs norfloxacin control; CCCP = carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone.

**Figure 2.** Ability of compounds 10a, 10b, 10c, and 10d to inhibit NorA efflux pump in association with ethidium bromide, against the SA-1199 and SA-1199B.



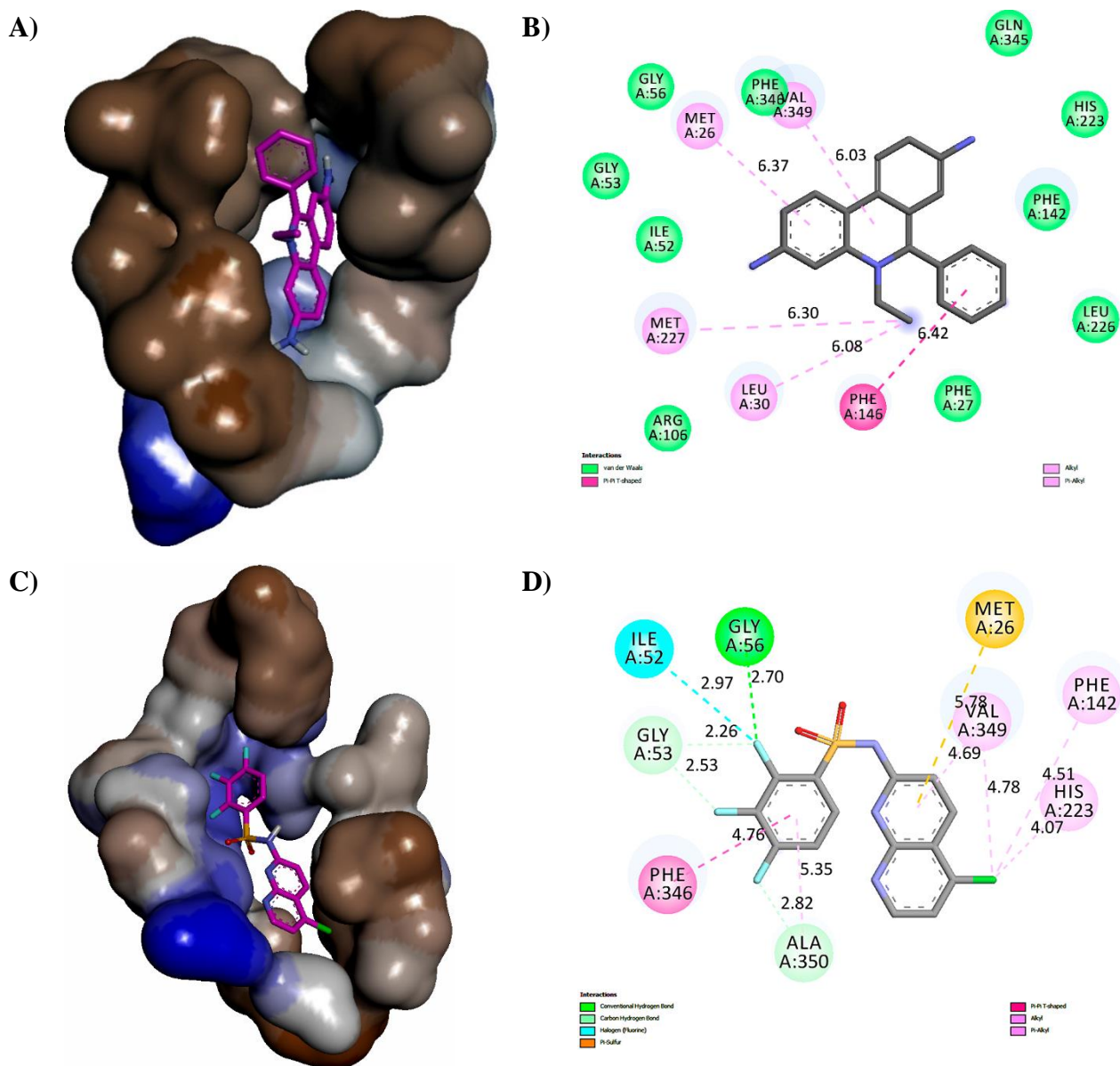
These values represent the geometric means  $\pm$  S.E.M. (standard error of the mean). Analysis was performed with two-way ANOVA, followed by Tukey's test. a4 =  $p < 0.0001$  vs ethidium bromide control; CCCP = carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone.

**Figure 3.** Action of 1,8-naphthyridines on ethidium bromide fluorescence emission retained within the bacterial cell of SA-1199B.



Peak 1: corresponding to the emission caused by bacterial cellular contents; Peak 2: ethidium bromide emission peak; Compound 10c: 2,3,4-trifluoro-N-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl) benzenesulfonamide.

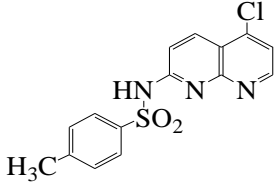
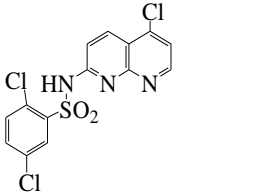
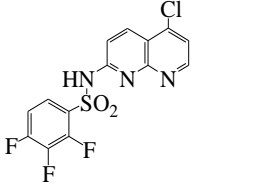
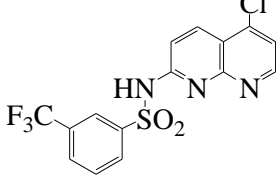
**Figure 4.** The 3D structure of the binding pocket of the efflux pump NorA and map of amino acid residues. (A) The binding poses of best stability between ethidium bromide and NorA. (B) Map of amino acid residues within the ethidium bromide in the binding pocket of NorA. (C) The binding poses of best stability between compound 10c and NorA. (D) Map of amino acid residues within the compound 10c in the binding pocket of NorA.





## TABLES

**Table 1.** Chemical structures of the 1,8-naphthyridines sulfonamides used in the study.

Compound	Chemical Structure	Full Name
Compound 10a		4-methyl- <i>N</i> -(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide
Compound 10b		2,5-dichloro- <i>N</i> -(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide
Compound 10c		2,3,4-trifluoro- <i>N</i> -(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide
Compound 10d		3-trifluoromethyl- <i>N</i> -(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide

**Table 2.** Minimum inhibitory concentration (MIC) values of norfloxacin, ethidium bromide, and compounds 10a, 10b, 10c, and 10d, against the SA-1199 and SA-1199B multiresistant strains.

Compound	MIC of substances	
	( $\mu\text{g/mL}$ ) SA-1199	( $\mu\text{g/mL}$ ) SA-1199B
Norfloxacin	64	256
Ethidium bromide	32	64
Compound 10a	$\geq 1024$	$\geq 1024$
Compound 10b	$\geq 1024$	$\geq 1024$
Compound 10c	$\geq 1024$	$\geq 1024$
Compound 10d	$\geq 1024$	$\geq 1024$

**Table 3.** Molecular docking analysis and MIC of different 1,8-naphthyridine sulfonamides.

Compound	MIC	MIC	MIC	MIC	Energy of interactions kcal/mol	Calculated Ki ( $\mu\text{M}$ )	SILE
	Substance	Substance	Substance	Substance +			
	+ Norflo	+ EtBr	+ Norflo	EtBr			
	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )			
	SA-1199	SA-1199	SA-1199B	SA-1199B			
Norfloxacin	64	–	256	–	–6.8	10.52	4.11
Ethidium bromide	–	32	–	64	–7.8	1.95	0.74
CCCP	32	16	161.27	8	–6.5	17.44	7.90
Compound 10a	2	8	64	32	–8.2	0.99	0.39
Compound 10b	1	8	64	32	–8.3	0.84	0.33
Compound 10c	0.5	4	16	16	–9.1	0.22	0.08
Compound 10d	2	32	64	64	–8.2	0.18	0.07

**Table 4.** The physiochemical properties depicting the oral bioavailability by SwissADME of 1,8-naphthyridines sulfonamides.

Compound	GI	BBB	P-gp	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4	Consensus Log
									Po/w
<b>Norfloxacin</b>	High	No	Yes	No	No	No	No	No	0.98
<b>EtBr</b>	High	Yes	Yes	No	No	No	Yes	No	2.17
<b>CCCP</b>	High	Yes	No	Yes	No	No	No	No	1.83
<b>Compound 10a</b>	High	No	No	Yes	Yes	Yes	No	No	2.88
<b>Compound 10b</b>	High	No	No	Yes	Yes	Yes	No	No	3.49
<b>Compound 10c</b>	High	No	No	No	Yes	No	No	No	3.33
<b>Compound 10d</b>	High	No	No	Yes	Yes	Yes	No	No	3.74

GI = human gastrointestinal absorption (HIA); BBB = blood-brain barrier; EtBr = ethidium bromide; P-gp = P-glycoprotein substrate; CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4 = Potential of inhibition of cytochrome P450 isoforms.

**Table 5.** Correlation matrix of Pearson coefficients.

	<b>Consensus Log Po/w</b>	<b>MIC (<math>\mu\text{g/mL}</math>) SA-1199</b>	<b>MIC (<math>\mu\text{g/mL}</math>) SA-1199B</b>	<b>Energy of interactions kcal/mol</b>	<b>Calculated Ki (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>SILE</b>
<b>Consensus Log Po/w</b>	–	–0.77	–0.87	–0.83	–0.76	–0.72
<b>MIC (<math>\mu\text{g/mL}</math>) to SA-1199</b>	–0.77	–	0.91	0.77	0.57	0.52
<b>MIC (<math>\mu\text{g/mL}</math>) to SA-1199B</b>	–0.87	0.91	–	0.87	0.80	0.75
<b>Energy of interactions kcal/mol</b>	–0.83	0.77	0.87	–	0.91	0.89
<b>Calculated Ki (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	–0.76	0.57	0.80	0.91	–	1.00
<b>SILE</b>	–0.72	0.52	0.75	0.89	1.00	–

### 4.3 ARTIGO 3: DO 1,8-NAPHTHYRIDINE SULFONAMIDES POSSESS AN INHIBITORY ACTION AGAINST Tet(K) AND MsrA EFFLUX PUMPS IN MULTIRESISTANT *Staphylococcus aureus* STRAINS?

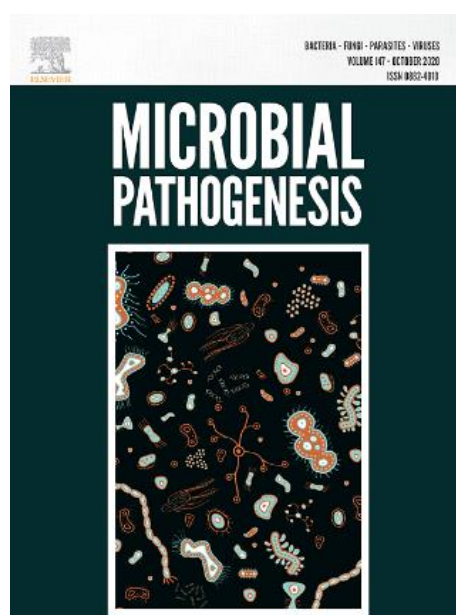
Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino<sup>1</sup>, Saulo Relison Tintino<sup>2</sup>, Débora Feitosa Muniz<sup>2</sup>, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>2</sup>, Raimundo Luiz Silva Pereira<sup>2</sup>, Iêda Maria Begnini<sup>3</sup>, Ricardo Andrade Rebelo<sup>3</sup>, Luiz Everson da Silva<sup>4</sup>, Sandro Lucio Mireski<sup>3</sup>, Michele Caroline Nasato<sup>3</sup>, Maria Isabel Lacowicz Krautler<sup>3</sup>, Pedro Silvino Pereira<sup>1</sup>, Alexandre Magno Rodrigues Teixeira<sup>5</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>6</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>2</sup>, Teresinha Gonçalves da Silva<sup>1</sup>

Manuscrito publicado no periódico: Microbial Pathogenesis

Link para acesso: <https://www.sciencedirect.com/journal/microbialpathogenesis/articles-inpress>

Qualis (2017-2020): A3

Fator de impacto em 2021: 2,914



**Do 1,8-naphthyridine sulfonamides possess an inhibitory action against Tet(K) and MsrA efflux pumps in multiresistant *Staphylococcus aureus* strains?**

Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino<sup>1</sup>, Saulo Relison Tintino<sup>2</sup>, Débora Feitosa Muniz<sup>2</sup>, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>2</sup>, Raimundo Luiz Silva Pereira<sup>2</sup>, Iêda Maria Begnini<sup>3</sup>, Ricardo Andrade Rebelo<sup>3</sup>, Luiz Everson da Silva<sup>4</sup>, Sandro Lucio Mireski<sup>3</sup>, Michele Caroline Nasato<sup>3</sup>, Maria Isabel Lacowicz Krautler<sup>3</sup>, Pedro Silvino Pereira<sup>1</sup>, Alexandre Magno Rodrigues Teixeira<sup>5</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>6</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>2</sup>, Teresinha Gonçalves da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Pharmatotoxicological Prospecting of Bioactive Products, Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, UFPE, Recife, PE, Brazil

<sup>2</sup> Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

<sup>3</sup> Department of Chemistry, Regional University of Blumenau, FURB, Itoupava Seca, 89030-903, Blumenau, SC, Brazil

<sup>4</sup> Postgraduate Program in Sustainable Territorial Development, Coastal Sector, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

<sup>5</sup> Laboratory of Simulations and Molecular Spectroscopy, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

<sup>6</sup> Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

\* Corresponding author:

Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino

Laboratory of Pharmatotoxicological Prospecting of Bioactive Products, Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Artur de Sá, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE 54740-520, Brazil

E-mail: [datianemoraes@hotmail.com](mailto:datianemoraes@hotmail.com)

### Abstract

Naphthyridines represent a class of heterocyclic compounds formed by two condensed aromatic rings. This study aimed to evaluate the antibacterial activity and *in vitro* inhibition of efflux resistance mechanisms of a series of 1,8-naphthyridine sulfonamides against strains carrying Tet(K) and MsrA efflux pumps. The efflux pump inhibitory capacity was evaluated by analyzing synergistic effects between 1,8-naphthyridine sulfonamides and standard antibiotics, as well as ethidium bromide. The following 1,8-naphthyridines were used: 4-methyl-N-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Naph 1); 2,5-dichloro-N-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Naph 2); 2,3,4-trifluoro-N-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)benzenesulfonamide (Naph 7); 3-trifluoromethyl-N-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Naph 9). The 1,8-naphthyridine sulfonamide derivatives possessed a potential Tet(K) and MsrA efflux pump inhibitory action.

**Keywords:** antibacterial agent; bacterial resistance; efflux pump; ethidium bromide; synergism

## Introduction

The occurrence and rise of antibiotic resistance in microbial populations are unavoidable due to the principles of biology and evolution, with antibiotic resistance genes being found in different environments. Resistance may be intrinsic or acquired through spontaneous mutations or due to horizontal gene transfer from donor bacteria, phages or free DNA. Actions associated with intrinsic or acquired resistance include: deactivating or degradation of antibiotics; preventing antibiotics from penetrating the bacterial cell wall and extrusion before the antibiotic reaches its target through specific efflux pumps (EP) [1-3].

The *Staphylococcus aureus* bacterium is a Gram-positive, facultative anaerobic pathogen with strains found widely in the hospital environment. Though traditionally opportunistic, many *S. aureus* strains can be aggressively pathogenic, being the most common skin bacterium, with 60% of humans being intermittent carriers and 20% being persistent carriers, chronically harboring at least one strain. *S. aureus* has evolved an arsenal of extracellular proteins and defense factors unassociated with antibiotic resistance, these include hemolysins, proteases, hyaluronidases, collagenases and an enterotoxin that causes gastroenteritis [4,5].

The strain *S. aureus* IS-58 presents the plasmid pT181, containing the gene *tet(K)*, which encodes a cytoplasmic membrane-bounded efflux protein of 14 transmembrane segments (TMS), from the major facilitator superfamily (MFS) that actively effluxes tetracycline [6,7]. The *S. aureus* RN4220 strain has the *msrA* gene and displays an inducible resistance mechanism to erythromycin by encoding an ATP-dependent efflux pump, a family member of the ATP binding cassette (ABC) [8-10].

Efflux pump inhibitors (EPIs) decrease the intrinsic resistance of bacteria to antibiotics and reverse acquired resistance, even in highly resistant strains with multiple target mutations. Over the past decades, many EPIs have been identified, including carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP), which can reverse tetracycline and erythromycin resistance, unfortunately, their clinical application is difficult due to the toxicity, stability and bioavailability of these molecules [11-16]. Current methods for the demonstration of a clinical isolate efflux system usually involve an ethidium bromide (EtBr) assay, a common substrate of bacterial efflux pumps [17].

Naphthyridines, also known as pyridopyridines, are heterocyclic compounds formed by two condensed aromatic rings containing one nitrogen atom in each ring [18,19]. Several



studies that contemplate the interest in this class of compounds exist, from the synthesis and chemical properties, to the diverse biological activities presented by naphthyridines [18,20]. However, studies addressing the antibacterial activity of 1,8-naphthyridine derivatives are still scarce, especially with respect to their association with sulfonamides.

Therefore, the present study aims to evaluate the antibacterial activity and *in vitro* inhibition of efflux resistance mechanisms of a series of 1,8-naphthyridine sulfonamides against IS-58 and RN4220 strains, which express high levels of the Tet(K) and MsrA efflux pumps, respectively.

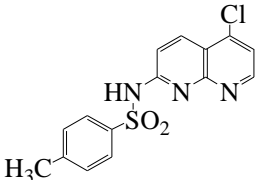
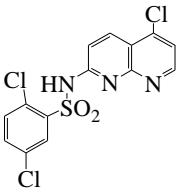
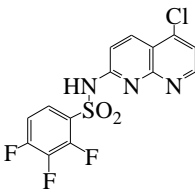
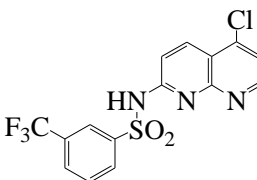
## Methods

### 2.1 Substances and antibiotics used

The antibiotics tetracycline and erythromycin, as well as ethidium bromide and carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP), were obtained from Sigma Aldrich Co. Ltd. All naphthyridines used were synthesized and donated by Dr. Luiz Everson da Silva from the Federal University of Paraná and by researchers Dr. Iêda Maria Begnini, Dr. Ricardo Andrade Rebelo, Dr. Sandro Lucio Mireski, Dr. Michele Caroline Nasato and Dr. Maria Isabel Lacowicz Krautler from the Regional University of Blumenau. The antibiotics, ethidium bromide and naphthyridines were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and afterwards in sterile water to a concentration of 1024 µg/mL. The CCCP was dissolved in a methanol/water (1:1, v/v) solution. Ethidium bromide solutions were dissolved in distilled, sterile water, stored at -20 °C and kept protected from light.

The naphthyridines used were: 4-methyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Naph 1), 2,5-dichloro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Naph 2), 2,3,4-trifluoro-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Naph 7) and 3-trifluoromethyl-*N*-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Naph 9) (table 1).

**Table 1:** Structure of the used 1-8,naphthyridine sulfonamides and 1-8 naphthyridinone

Identification Acronym	Structure	Compound name
Naph 1		4-methyl- <i>N</i> -(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide
Naph 2		2,5-dichloro- <i>N</i> -(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide
Naph 7		2,3,4-trifluoro- <i>N</i> -(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide
Naph 9		3-trifluoromethyl- <i>N</i> -(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide

## 2.2 Bacterial strains

The *S. aureus* strains used were: SA IS-58, which overexpresses the *tet(K)* gene encoding the Tet(K) efflux protein, which extrudes tetracycline and other drugs such as DNA-intercalating dyes; SA RN4220, which overexpresses the *msrA* gene encoding the MsrA efflux protein, which extrudes erythromycin and other drugs such as DNA-intercalating dyes. The strains, kindly provided by Prof. Glenn Kaatz (Wayne State University), were grown overnight at 37 °C in Heart Infusion Agar slants (HIA, Difco) prior to use [21].

## 2.5 Antibacterial activity and efflux pump inhibition

### Antibacterial activity test by minimum inhibitory concentration (MIC)

The antibacterial activity assay was performed with bacterial inoculum suspensions in saline solution, corresponding to 0.5 of the McFarland scale, followed by the addition of brain

heart infusion (BHI) culture medium to complete a 1 mL solution in an eppendorf. The solutions were then transferred to a 96 well microtiter plate. Tetracycline was the antibiotic used against the IS-58 strain and erythromycin was used against the RN4220 strain. The plates were incubated at 37 °C for 24 h and bacterial growth was assessed by the addition of resazurin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide). The minimum inhibitory concentration was defined according to CLSI and Tintino et al. [22,23] this being the lowest concentration at which no growth can be observed.

### **Evaluation of efflux pump inhibition by the antibiotics and ethidium bromide MIC reduction**

Efflux pump inhibition was tested using a sub-inhibitory naphthyridine concentration (MIC/8). For the preparation of the controls, each bacterial strain was suspended in saline, forming a bacterial inoculum with cell numbers in the medium corresponding to 0.5 of the McFarland scale. Thereafter, 1.350 mL of BHI broth were added, completing a 1.5 mL solution in an eppendorf. For the tests, 150 µL of each bacterial inoculum were added to an eppendorf along with each diluted naphthyridine at a concentration corresponding to the MIC/8, then supplemented with BHI to reach a 1.5 mL solution. The solutions were then transferred to a 96-well microtiter plate and serially diluted (1:1) with 100 µl of antibacterial drugs or ethidium bromide at an initial concentration of 1024 µg/mL. The plates were incubated at 37 °C and bacterial growth was evaluated with resazurin after 24 h. The minimum inhibitory concentration was defined as the concentration of tetracycline and erythromycin or ethidium bromide obtained, ranging from 0.5 to 512 µg/mL [22,23].

### **2.6 Statistical analysis of microbiological results**

Antibacterial assays were performed in triplicates and the results were expressed as the geometric mean of replicates. Statistical hypothesis analysis was performed using a two-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test, using the GraphPad Prism 5.0 software.

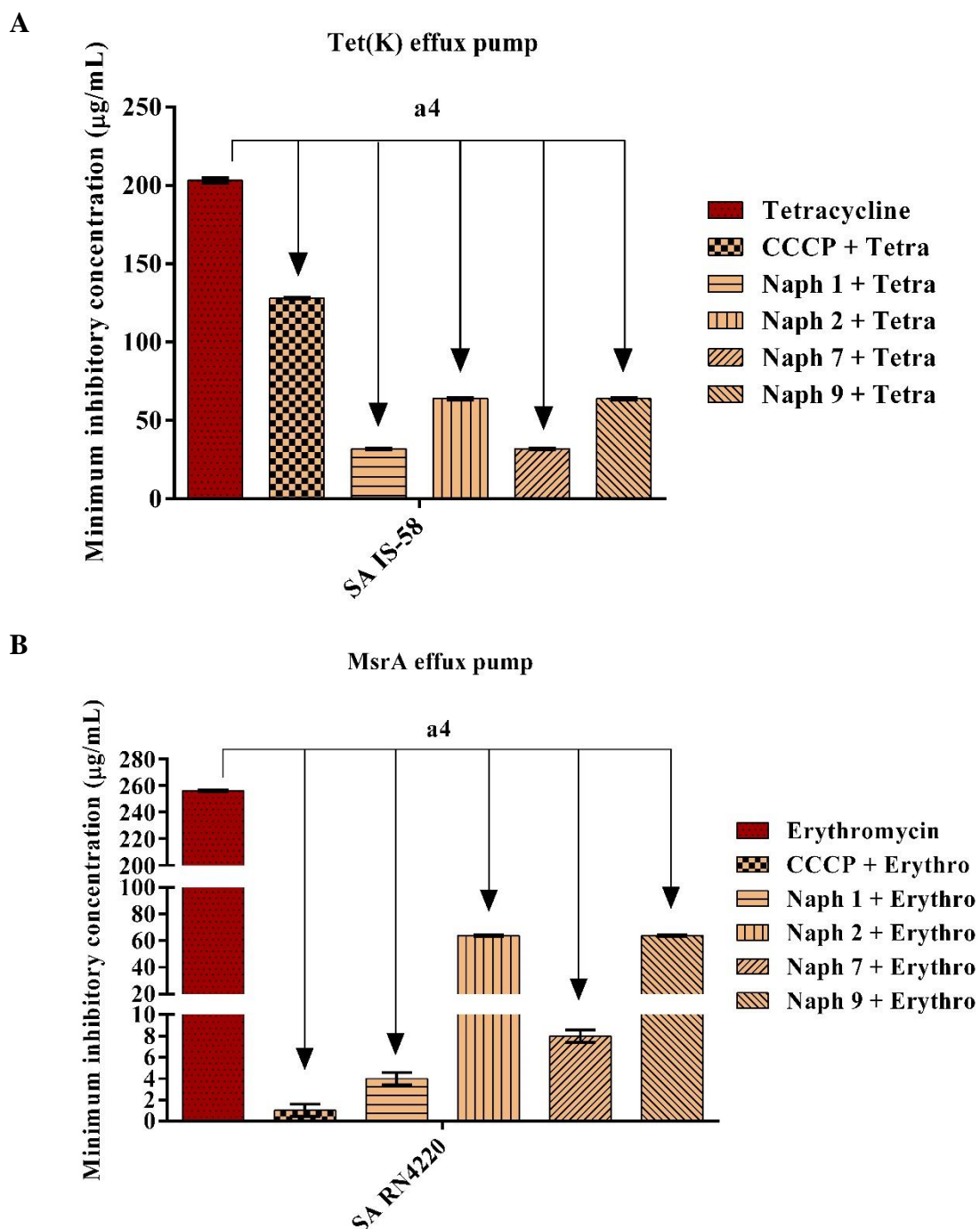
### 3 Results and discussion

#### 3.2 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and efflux pump inhibition by antibiotic MIC reduction

The naphthyridines did not present a clinically relevant antibacterial activity, obtaining MIC values  $\geq 1024$   $\mu\text{g/mL}$  for the *S. aureus* IS-58 and RN4220 strains. However, when combined with the antibiotics tetracycline and erythromycin, all naphthyridines reduced the minimal inhibitory concentration of these, to differing degrees. Naph 1 and Naph 7 obtained the best results against the IS-58 and RN4220 strains, although all were statistically significant. A 6.3-fold decrease in MIC values after the addition of Naphs 1 and 7 was observed against the IS-58 strain, while a 3.2-fold decrease in MIC was observed after the addition of Naphs 2 and 9. A 64-fold reduction in MIC was observed for Naph 1 against the RN4220 strain, a 4-fold reduction was observed for Naphs 2 and 9 and a 32-fold reduction for Naph 7 was observed (figure 1 A and B). The aforementioned results suggest an effective efflux pump inhibition occurred, given a significant reduction in minimum inhibitory concentration was observed in the association of tetracycline and erythromycin with naphthyridines, compared to the antibiotic control.

An antibiotic and EtBr MIC reduction of 2-fold or more by an EPI, such as CCCP, is an indication that efflux pump expression is the major resistance mechanism of the tested strain. MIC reductions by modifying antibacterial activity is used to test the ability of substances to reverse bacterial resistance, which corroborates with the present study [24-29].

**Figure 1.** Ability of naphthyridine 1 through to naphthyridine 9 substances to inhibit Tet(K) and MsrA efflux pumps in association with tetracycline and erythromycin, against the SA IS-58 and RN4220 multiresistant strains, respectively.



The values represent the geometric mean  $\pm$  S.E.M. (standard error of the mean). Two-way ANOVA followed by Tukey's test. a4:  $p < 0.0001$  vs erythromycin control; CCCP: carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone; Naph: naphthyridine.

When comparing the results obtained for the two strains, it is notable that 1,8-naphthyridines showed a better MIC reduction capacity against the RN4220 strain, compared to the IS-58 strain. This behavior may be justified by the type of pump each strain expresses. The RN4220 strain possesses the MsrA efflux pump, encoded by the *MsrA* gene, belonging to the ABC transporter superfamily. This protein has 488 amino acids with two ATP binding motifs and is found in both eukaryotes and prokaryotes [9-10,30]. The Tet(K) efflux pump belongs to the major facilitator superfamily (MFS) and has a structure consisting of 14  $\alpha$ -helices, with important N-terminal regions for potassium uptake [6, 31]. Therefore, structural differences may contribute to the differences in results observed for both strains, where the structure and accessibility of MsrA amino acids may favor interactions with Naphs 1 and 7.

The efflux pump inhibitor (EPIs) theme is being increasingly addressed, where several studies promote this strategy to solve resistance mechanisms. EPIs have been shown to act on efflux proteins by various mechanisms, such as by acting synergistically with standard antibiotics, restoring the efficacy of antibiotics that are already resistance targets, reducing pathogenic infections by attenuating bacteria through efflux inhibition and preventing the development of highly drug-resistant biofilms [32].

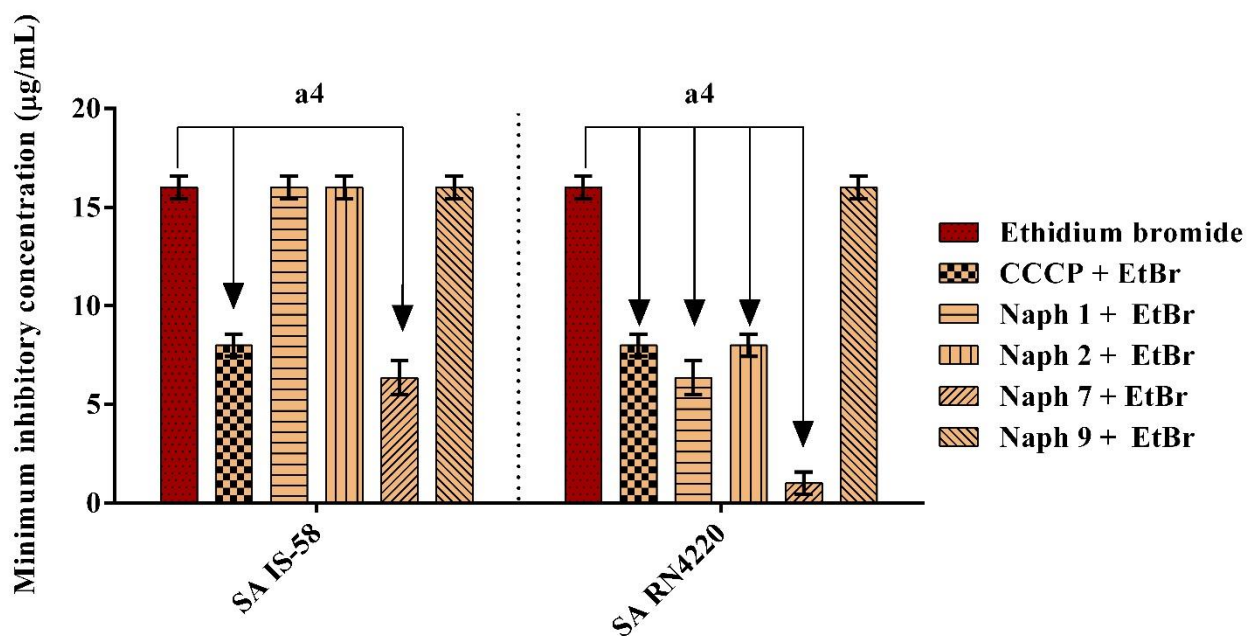
The naphthyridines addressed in the present study differ only in the addition of radicals, which are electronegative elements, such as three fluorine substituent groups, in addition to the presence of methyl group. Hydrophobic compounds have been shown to have greater affinity for the efflux-associated site of the protein [33]. Therefore, the methyl and fluorine groups present in Naph 1 and 7 possibly favored their greater interaction with Tet(K) and MsrA proteins. Furthermore, the hydrophobic compound pyronaridine was found to inhibit the P-gp pump, which belongs to the ABC class, the class which the MsrA protein belongs to, which corroborates with the present study [34]. Importantly, in addition to direct pump inhibition, antibiotic adjuvants can also act in parallel mechanisms where they can directly reduce efflux protein gene expression, as reported in the study by Chovanova et al. [35], which reports the effective action of bioactive essential oil compounds in association with tetracycline against strains containing the Tet(K) protein.

### **3.3 Efflux pump inhibition by ethidium bromide MIC reduction**

A reduction in ethidium bromide MIC against the IS-58 strain was observed only when in association with Naph 7 showing a 2.6-fold decrease in MIC values. For the RN4220 strain,

MIC reductions were observed in associations with Naph 1, Naph 2 and Naph 7, showing 2.5, 2 and 16-fold MIC reductions, respectively, compared to EtBr alone (figure 2). Other mechanisms involved in naphthyridine action, which may act either by inhibiting different pumps or by inhibiting other mechanisms present in *S. aureus*, such as permeability barrier inhibition,  $\beta$ -lactamase inhibition and topoisomerase inhibition, may also exist, but there is a strong indicative of efflux pump inhibition in the present study [36,37].

**Figure 2:** Ability of naphthyridine 1 through to naphthyridine 9 substances to inhibit Tet(K) and MsrA efflux pumps in association with ethidium bromide, against the SA IS-58 and RN4420 multiresistant strains, respectively.



The values represent the geometric mean  $\pm$  S.E.M. (standard error of the mean). Two-way ANOVA followed by Tukey's test. a4:  $p < 0.0001$  vs ethidium bromide control; CCCP: carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone; EtBr: Ethidium bromide; Naph: naphthyridine.

Unlike antibiotics, bromide resistance is exclusively mediated by efflux pumps, which is a more conclusive parameter for the evaluation of EP inhibition [38]. However, an association with the antibiotic cannot be ruled out since this method shows an employability of the drug for future clinical use [39]. The use of ethidium bromide to evaluate EP inhibition is well known for being a DNA intercalating agent that accumulates in the cell interior, as well as a substrate for proteins that pump out toxic substances from the cell interior [40,41]. Therefore, EPs can

increase the amount of bromide within a cell by preventing its extrusion and consequently reducing the MIC [42].

## **Conclusion**

The inhibition of bacterial antibiotic resistance mechanisms is a strategy for controlling highly virulent multidrug resistant (MDR) strains. Naphthyridines may not have presented an antibacterial activity but these may be used as a putative flux inhibitor with possible inhibitory action over Tet(K) and MsrA efflux pumps, reestablishing the antibacterial activity of other drugs, with the aim of effectively reducing bacterial growth, both when associated with ethidium bromide and antibiotics, characterizing efflux pump inhibition.

## **Acknowledgements**

This study was funded, by the Foundation for Support of Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE), process number IBPG-1241-4.03/16, National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) Process (150456/2018-2 and 406685/2018-5) Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) Finance Code 001, Cearense Foundation for Scientific and Technological Development Support (FUNCAP), and Financier of Studies and Projects - Brazil (FINEP).



## References

- [1] G. Cox, G.D. Wright, Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions, *Int. J. Med. Microbiol.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>.
- [2] A. Fajardo, N. Martínez-Martín, M. Mercadillo, J.C. Galán, B. Ghysels, S. Matthijs, P. Cornelis, L. Wiehlmann, B. Tümmler, F. Baquero, J.L. Martínez, The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens, *PLoS One.* (2008). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001619>.
- [3] A.H.A.M. Van Hoek, D. Mevius, B. Guerra, P. Mullany, A.P. Roberts, H.J.M. Aarts, Acquired antibiotic resistance genes: An overview, *Front. Microbiol.* (2011). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203>.
- [4] Walsh, C. Antibiotics: actions, origins, resistance, *Am. Soc. Microbiol.* (2003).
- [5] Kluytmans J., van Belkum A et Verbrugh H., J. Kluytmans, A. van Belkum, H.A. Verbrugh. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews*, 10 (3), 505-520, *Clin. Microbiol. Rev.* (1997). [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(03\)00146-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(03)00146-0).
- [6] G.G. Guay, S.A. Khan, D.M. Rothstein, The *tet(K)* gene of plasmid pT181 of *Staphylococcus aureus* encodes an efflux protein that contains 14 transmembrane helices, *Plasmid.* (1993). <https://doi.org/10.1006/plas.1993.1045>.
- [7] A. Młynarczyk, G. Młynarczyk, J. Jeljaszewicz, The genome of *Staphylococcus aureus*: A review, *Zentralblatt Fur Bakteriologie*. (1998). [https://doi.org/10.1016/S0934-8840\(98\)80165-5](https://doi.org/10.1016/S0934-8840(98)80165-5)
- [8] J.I. Ross, E.A. Eady, J.H. Cove, S. Baumberg, Identification of a chromosomally encoded ABC-transport system with which the staphylococcal erythromycin exporter MsrA may interact, *Gene.* (1995). [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)00833-E](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)00833-E).
- [9] J.I. Ross, E.A. Eady, J.H. Cove, S. Baumberg, Minimal functional system required for expression of erythromycin resistance by *msrA* in *Staphylococcus aureus* RN4220, *Gene.* (1996). [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00541-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00541-0).
- [10] J.I. Ross, E.A. Eady, J.H. Cove, W.J. Cunliffe, S. Baumberg, J.C. Wootton, Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family, *Mol. Microbiol.* (1990). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00696.x>.
- [11] A. Sharma, V.K. Gupta, R. Pathania, Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From

- bench to bedside, Indian J. Med. Res. (2019). [https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR\\_2079\\_17](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_2079_17).
- [12] M. Viveiros, A. Jesus, M. Brito, C. Leandro, M. Martins, D. Ordway, A.M. Molnar, J. Molnar, L. Amaral, Inducement and reversal of tetracycline resistance in *Escherichia coli* K-12 and expression of proton gradient-dependent multidrug efflux pump genes, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2005). <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3578-3582.200>
- [13] M. Anoushiravani, T. Falsafi, V. Niknam, Proton motive force-dependent efflux of tetracycline in clinical isolates of *Helicobacter pylori*, *J. Med. Microbiol.* (2009). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.010876-0>.
- [14] O. Lomovskaya, A. Lee, K. Hoshino, H. Ishida, A. Mistry, M.S. Warren, E. Boyer, S. Chamberland, V.J. Lee, Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob. Agents Chemother.* (1999). <https://doi.org/10.1128/aac.43.6.1340>.
- [15] M. Matsuoka, Y. Nakajima, A distinctive effect of CCCP on the transfer of erythromycin to 1-octanol: A possible model in promoting the intracellular antibiotic-accumulation through lipid in a staphylococcal cytoplasmic membrane, *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* (1996).
- [16] M. Matsuoka, L. Jánosi, K. Endou, Y. Nakajima, Cloning and sequences of inducible and constitutive macrolide resistance genes in *Staphylococcus aureus* that correspond to an ABC transporter, *FEMS Microbiol. Lett.* (1999). [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00518-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00518-2)
- [17] M. Viveiros, L. Rodrigues, M. Martins, I. Couto, G. Spengler, A. Martins, L. Amaral, Evaluation of efflux activity of bacteria by a semi-automated fluorometric system., *Methods Mol. Biol.* (2010). [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-279-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-279-7_12).
- [18] V.P. Litvinov, The chemistry and biological activities of 1,8-naphthyridines, *Usp. Khim.* (2004). <https://doi.org/10.1070/rc2004v073n07abeh000856>.
- [19] V.P. Litvinov, Advances in the Chemistry of Naphthyridines, *Adv. Heterocycl. Chem.* (2006). [https://doi.org/10.1016/S0065-2725\(06\)91004-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2725(06)91004-6).
- [20] A. Madaan, R. Verma, V. Kumar, A.T. Singh, S.K. Jain, M. Jaggi, 1,8-Naphthyridine Derivatives: A Review of Multiple Biological Activities, *Arch. Pharm. (Weinheim)*. (2015). <https://doi.org/10.1002/ardp.201500237>.

- [21] S. Gibbons, M. Oluwatuyi, G.W. Kaatz, A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*, *J. Antimicrob. Chemother.* (2003). <https://doi.org/10.1093/jac/dkg044>.
- [22] S.R. Tintino, C.D. Morais-Tintino, F.F. Campina, M. do S. Costa, I.R.A. Menezes, Y.M.L.S. de Matos, J.T. Calixto-Júnior, P.S. Pereira, J.P. Siqueira-Junior, T.C. Leal-Balbino, H.D.M. Coutinho, V.Q. Balbino, Tannic acid affects the phenotype of *Staphylococcus aureus* resistant to tetracycline and erythromycin by inhibition of efflux pumps, *Bioorg. Chem.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.08.004>.
- [23] C. and L.S. institute (CLSI), M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 28th ed. 2018, 2018. <https://doi.org/10.1108/08876049410065598>.
- [24] J.E. Kristiansen, V.F. Thomsen, A. Martins, M. Viveiros, L. Amaral, Non-antibiotics reverse resistance of bacteria to antibiotics, *In Vivo (Brooklyn)*. (2010).
- [25] K. Trzcinski, B.S. Cooper, W. Hryniewicz, C.G. Dowson, Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J. Antimicrob. Chemother.* (2000). <https://doi.org/10.1093/jac/45.6.763>.
- [26] J.E. Kristiansen, V.F. Thomsen, A. Martins, M. Viveiros, L. Amaral, Non-antibiotics reverse resistance of bacteria to antibiotics, *In Vivo (Brooklyn)*. (2010).
- [27] D. Patel, C. Kosmidis, S.M. Seo, G.W. Kaatz, Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2010). <https://doi.org/10.1128/AAC.01058-10>.
- [28] L.J.V. Piddock, Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria, *Clin. Microbiol. Rev.* (2006). <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.382-402.2006>
- [29] R.M.A. El-Baky, T. Sandle, J. John, G.E.D.A. Abuo-Rahma, H.F. Hetta, A novel mechanism of action of ketoconazole: Inhibition of the NorA efflux pump system and biofilm formation in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*, *Infect. Drug Resist.* (2019). <https://doi.org/10.2147/IDR.S201124>.
- [30] S.C. Hyde, P. Emsley, M.J. Hartshorn, M.M. Mimmack, U. Gileadi, S.R. Pearce, M.P. Gallagher, D.R. Gill, R.E. Hubbard, C.F. Higgins, Structural model of ATP-binding proteing associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport, *Nature*. (1990). <https://doi.org/10.1038/346362a0>.
- [31] G.G. Guay, M. Tuckman, P. McNicholas, D.M. Rothstein, The *tet(K)* gene from

- Staphylococcus aureus* mediates the transport of potassium in *Escherichia coli*, J. Bacteriol. (1993). <https://doi.org/10.1128/jb.175.15.4927-4929.1993>.
- [32] Y. Wang, H. Venter, S. Ma, Efflux Pump Inhibitors: A Novel Approach to Combat Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria, *Curr. Drug Targets*. (2015). <https://doi.org/10.2174/1389450116666151001103948>.
- [33] H.I. Zgurskaya, Molecular analysis of efflux pump-based antibiotic resistance, *Int. J. Med. Microbiol.* (2002). <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00195>.
- [34] J. Qi, S. Wang, G. Liu, H. Peng, J. Wang, Z. Zhu, C. Yang, Pyronaridine, a novel modulator of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells *in vitro* and *in vivo*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2004). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.099>.
- [35] R. Chovanová, J. Mezovská, Vaverková, M. Mikulášová, The inhibition the Tet(K) efflux pump of tetracycline resistant *Staphylococcus epidermidis* by essential oils from three *Salvia* species, *Lett. Appl. Microbiol.* (2015). <https://doi.org/10.1111/lam.12424>.
- [36] J.M.A. Blair, M.A. Webber, A.J. Baylay, D.O. Ogbolu, L.J. V Piddock, Molecular mechanisms of antibiotic resistance, *Nat. Rev. Microbiol.* (2015). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>.
- [37] D.C. Hooper, G.A. Jacoby, Mechanisms of drug resistance: Quinolone resistance, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2015). <https://doi.org/10.1111/nyas.12830>.
- [38] M. Martins, M. Viveiros, I. Couto, S.S. Costa, T. Pacheco, S. Fanning, J.M. Pagès, L. Amaral, Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the ethidium bromide-agar cartwheel method, *In Vivo (Brooklyn)*. (2011).
- [39] M.A. Webber, L.J.V. Piddock, The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance, *J. Antimicrob. Chemother.* (2003). <https://doi.org/10.1093/jac/dkg050>.
- [40] S. Nafisi, A.A. Saboury, N. Keramat, J.F. Neault, H.A. Tajmir-Riahi, Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue, *J. Mol. Struct.* (2007). <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2006.05.004>.
- [41] A. Kumar, I.A. Khan, S. Koul, J.L. Koul, S.C. Taneja, I. Ali, F. Ali, S. Sharma, Z.M. Mirza, M. Kumar, P.L. Sangwan, P. Gupta, N. Thota, G.N. Qazi, Novel structural analogues of piperine as inhibitors of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*, *J. Antimicrob. Chemother.* (2008). <https://doi.org/10.1093/jac/dkn088>.
- [42] J.P. Brincat, E. Carosati, S. Sabatini, G. Manfroni, A. Fravolini, J.L. Raygada, D. Patel, G.W. Kaatz, G. Cruciani, Discovery of novel inhibitors of the NorA multidrug

transporter of *Staphylococcus aureus*, J. Med. Chem. (2011).  
<https://doi.org/10.1021/jm1011963>.

## 5 CONCLUSÃO

- A síntese de 1,8-naftiridinas sulfonamídicas foi relevante e eficiente, e o método aplicado foi conveniente na obtenção dos compostos, obtendo-se um rendimento satisfatório de 61,4%;
- As 1,8-naftiridinas sulfonamídicas sintetizadas não apresentaram atividade antibacteriana clínica relevante, frente as cepas SA-1199, SA-1199B, SA IS-58, SA RN4220 e SA K-2068;
- Os compostos heterocíclicos apresentaram efeitos sinérgicos quando associados aos antibióticos e ao brometo de etídio, induzindo redução da concentração inibitória mínima e indicando efeitos inibidores das bombas de efluxo NorA, Tet(K), MsrA e MepA;
- As naftiridinas apresentaram um bom perfil farmacocinético e energia de interação favorável, estabelecendo ligações numerosas e diversas no complexo proteína-naftiridina 4, onde os dados *in silico* corresponderam aos dados microbiológicos;
- Na avaliação de emissão de fluorescência, o composto 4 foi capaz de elevar a intensidade de emissão de fluorescência do brometo de etídio, reforçando a hipótese que esses compostos heterocíclicos atuam como inibidores das bombas de efluxo NorA e MepA;
- As 1,8-naftiridinas sulfonamídicas sintetizadas apresentaram resultados inéditos para as atividades biológicas testadas. Os compostos podem ser fortes candidatos a medicamentos orais atuando como inibidores putativos de bombas de efluxo em cepas de *S. aureus*.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, J. A.; STUART, R. K. Vosaroxin: A novel antineoplastic quinolone. **Expert. Opinion on Investigational Drugs**, v. 21, n. 8, p. 1223-1233, 2012.
- ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, v. 146, n. 3713, p. 837-837, 1940.
- ADAMS, J. T.; BRADSHAW, C. K.; BRESLOW, D. S.; AMORE, S. T.; & HAUSER, C. R. Synthesis of antimalarials. VI. Synthesis of certain 1,5- and 1,8-naphthyridine derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, v. 68, n. 7, p. 1317-1319, 1946.
- AESCHLIMANN, J. R.; DRESSER, L. D.; KAATZ, G. W.; RYBAK, M. J. Effects of NorA inhibitors on *in vitro* antibacterial activities and postantibiotic effects of levofloxacin, ciprofloxacin, and norfloxacin in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 2, p. 335-340, 1999.
- AHMED, N. S.; ALFOOTY, K. O.; KHALIFAH, S. S. Synthesis of 1,8-naphthyridine derivatives under ultrasound irradiation and cytotoxic activity against hepg2 cell lines. **Journal of Chemistry**, v. 2014, 2014.
- ALAM, A. et al. Structure of a zosuquidar and UIC2-bound human-mouse chimeric ABCB1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 9, p. E1973-E1982, 2018.
- ALCOCK, B. P. et al. CARD 2020: Antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D517-D525, 2020.
- ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1037-1050, 2007.
- ALLOING, G.; DE PHILIP, P.; CLAVERYS, J. P. Three highly homologous membrane-bound lipoproteins participate in oligopeptide transport by the Ami system of the gram-positive *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Molecular Biology**, v. 241, n. 1, p. 44-58, 1994.
- ALVAREZ-ORTEGA, C.; OLIVARES, J.; MARTÍNEZ, J. L. RND multidrug efflux pumps: What are they good for? **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 7, 2013.
- ALWARAWRAH, Y.; KIERNAN, K.; MACIVER, N. J. Changes in nutritional status impact immune cell metabolism and function. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1055, 2018.
- AMARAL, L. et al. Ethidium bromide efflux by *Salmonella*: Modulation by metabolic energy, pH, ions and phenothiazines. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 2, p. 140-145, 2011.
- AMARAL, L.; FANNING, S.; PAGÉS, J. M. Efflux pumps of gram-negative bacteria: Genetic responses to stress and the modulation of their activity by pH, inhibitors, and phenothiazines. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, 2010.

AMINOV, R. I.; MACKIE, R. I. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 271, n. 2, p. 147-161, 2007.

ANAND, N. Sulfonamides and Sulfones. In: **Mechanism of Action of Antimicrobial and Antitumor Agents**. 1975.

ANDRAS, J. P.; FIELDS, P. D.; DU PASQUIER, L.; FREDERICKSEN, M.; EBERT, D. Genome-wide association analysis identifies a genetic basis of infectivity in a model bacterial pathogen. **Molecular Biology and Evolution**, v. 37, n. 12, p. 3439-3452, 2020.

ANOUSHIRAVANI, M.; FALSAFI, T.; NIKNAM, V. Proton motive force-dependent efflux of tetracycline in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 1309-1313, 2009.

ARCHER, G. L. *Staphylococcus aureus*: A well-armed pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, n. 5, p. 1179-1181, 1998.

ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L. Implant infections: Adhesion, biofilm formation and immune evasion. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 397-409, 2018.

ARGIROPOULOS, G. et al. Cytotoxic and DNA binding properties of aminoalkyl derivatives of di- and triazaphenanthrenes. **Anti-Cancer Drug Design**, v. 7, n. 4, p. 285-296, 1992.

ARGYROPOULOU, I. et al. Synthesis and biological evaluation of sulfonamide thiazole and benzothiazole derivatives as antimicrobial agents. **Arkivoc**, v. 6, n. 2009, p. 89-102, 2009.

ARIAS, C. A. et al. A prospective cohort multicenter study of molecular epidemiology and phylogenomics of *Staphylococcus aureus* bacteremia in nine Latin American countries. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 10, 2017.

ASHIMA K. BHARDWAJ; PRIYABRATA MOHANTY. Bacterial Efflux Pumps Involved in Multidrug Resistance and their Inhibitors: Rejuvenating the Antimicrobial Chemotherapy. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 7, n. 1, p. 73-89, 2012.

ASKOURA, M. et al. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. **Libyan Journal of Medicine**, v. 6, n. 1, 2011.

BABIKER, H. A. et al. High-Level Chloroquine Resistance in Sudanese Isolates of *Plasmodium falciparum* Is Associated with Mutations in the Chloroquine Resistance Transporter Gene *pfcr1* and the Multidrug Resistance Gene *pfmdr1*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 10, p. 1535-1538, 2001.

BACHAND, B. et al. **Antiviral methods using [1, 8] naphthyridine derivatives**. U.S. Patent n. 6,340,690, 22 jan. 2002.

BADAWNEH, M. et al. Synthesis and evaluation of antihypertensive activity of 1,8-naphthyridine derivatives. Part X. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 11-12, p. 925-934, 2001.



- BAIER, R. E. et al. Surface properties determine bioadhesive outcomes: Methods and results. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 18, n. 4, p. 337-355, 1984.
- BAKER, S. et al. Genomic insights into the emergence and spread of antimicrobial-resistant bacterial pathogens. **Science**, v. 360, n. 6390, p. 733-738, 2018.
- BANBURY, M. K. Experience in prevention of sternal wound infections in nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. **Surgery**, v. 134, n. 5, p. S18-S22, 2003.
- BANTI, I. et al. Synthesis and in-vitro antitumour activity of new naphthyridine derivatives on human pancreatic cancer cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 8, p. 1057-1066, 2009.
- BARLIN, G. B.; TAN, W. L. Potential antimalarials. I 1, 8-naphthyridines. **Australian Journal of Chemistry**, v. 37, n. 5, p. 1065-1073, 1984.
- BARREIRO, E. J. et al. Design, synthesis, and pharmacological profile of novel fused pyrazolo[4,3-d]pyridine and pyrazolo[3,4-b][1,8]naphthyridine isosteres: A new class of potent and selective acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 1144-1152, 2003.
- BAUCHERON, S. et al. Bile-mediated activation of the *acrAB* and *tolC* multidrug efflux genes occurs mainly through transcriptional derepression of *ramA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 9, p. 2400-2406, 2014.
- BAUER, W.; VINOGRAD, J. The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. **Journal of Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 141-171, 1968.
- BAY, D. C.; ROMMENS, K. L.; TURNER, R. J. Small multidrug resistance proteins: A multidrug transporter family that continues to grow. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 9, p. 1814-1838, 2008.
- BAY, D. C.; TURNER, R. J. Diversity and evolution of the small multidrug resistance protein family. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 1, p. 1-27, 2009.
- BAYM, M.; STONE, L. K.; KISHONY, R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. **Science**, v. 351, n. 6268, 2016.
- BAYSAROWICH, J. et al. Rifamycin antibiotic resistance by ADP-ribosylation: Structure and diversity of Arr. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 12, p. 4886-4891, 2008.
- BELL, G.; MACLEAN, C. The Search for 'Evolution-Proof' Antibiotics. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 471-483, 2018.
- BENVENISTE, R.; DAVIES, J. Aminoglycoside antibiotic inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic resistant bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 8, p. 2276-2280, 1973.

- BERMINGHAM, A.; DERRICK, J. P. The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: Evaluation of potential for antibacterial drug discovery. **BioEssays**, v. 24, n. 7, p. 637-648, 2002.
- BHAKDI, S. et al. The hemolysin of *Escherichia coli*. **European Journal of Epidemiology**, v. 4, n. 2, p. 135-143, 1988.
- BHARDWAJ, R. K. et al. Piperine, a major constituent of black pepper, inhibits human P-glycoprotein and CYP3A4. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, n. 2, p. 645-650, 2002.
- BHASKAR, B. V. et al. Homology modeling, molecular dynamics, and virtual screening of NorA efflux pump inhibitors of *Staphylococcus aureus*. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 3237, 2016.
- BILLOT-KLEIN, D. et al. Association constants for the binding of vancomycin and teicoplanin to N-acetyl-D-alanyl-D-alanine and N-acetyl-D-alanyl-D-serine. **Biochemical Journal**, v. 304, n. 3, p. 1021-1022, 1994.
- BINA, J. E.; MEKALANOS, J. J. *Vibrio cholerae* *tolC* is required for bile resistance and colonization. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 7, p. 4681-4685, 2001.
- BINDA, E.; MARINELLI, F.; MARCONE, G. L. Old and new glycopeptide antibiotics: Action and resistance. **Antibiotics**, v. 3, n. 4, p. 572-594, 2014.
- BINET, R. et al. Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters - A review. **Gene**, v. 192, n. 1, p. 7-11, 1997.
- BISMUTH, R. et al. Gene heterogeneity for tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 8, p. 1611-1614, 1990.
- BISWAS, S.; RAOULT, D.; ROLAIN, J. M. A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 3, p. 207-220, 2008.
- BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.
- BLAIR, J. M. A.; PIDDOCK, L. J. V. How to measure export via bacterial multidrug resistance efflux pumps. **mBio**, v. 7, n. 4, 2016.
- BLANCO, M. G.; HARDISSON, C.; SALAS, J. A. Resistance to inhibitors of RNA polymerase in actinomycetes which produce them. **Journal of General Microbiology**, v. 130, n. 11, p. 2883-2891, 1984.
- BLANCO, P. et al. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. **Microorganisms**, v. 4, n. 1, p. 14, 2016.
- BLONDEAU, J. M. Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: A review.

**Clinical Therapeutics**, v. 21, n. 1, p. 3-40, 1999.

BLOUNT, Z. D. et al. Genomic analysis of a key innovation in an experimental *Escherichia coli* population. **Nature**, v. 489, n. 7417, p. 513-518, 2012.

BLUM, C. A. et al. Discovery of novel 6,6-heterocycles as transient receptor potential vanilloid (TRPV1) antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3330-3348, 2010.

BOARDMAN, B. K.; FULLNER SATCHELL, K. J. *Vibrio cholerae* strains with mutations in an atypical type I secretion system accumulate RTX toxin intracellularly. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 23, p. 8137-8143, 2004.

BOBRAŃSKI, B.; SUCHARDA, E. Über eine Synthese des 1.5-Naphthyridins. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)**, v. 60, n. 5, p. 1081-1084, 1927.

BOLHUIS, H. et al. Energetics and mechanism of drug transport mediated by the lactococcal multidrug transporter LmrP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 39, p. 24123-24128, 1996.

BORGES-WALMSLEY, M. I.; MCKEEGAN, K. S.; WALMSLEY, A. R. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. **Biochemical Journal**, v. 376, n. 2, p. 313-338, 2003.

BOUANCHAUD, D. H.; SCAVIZZI, M. R.; CHABBERT, Y. A. Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in enterobacteria and staphylococci. **Journal of general microbiology**, v. 54, n. 3, p. 417-425, 1968.

BOYD, A. E. Sulfonylurea receptors, ion channels, and fruit flies. **Diabetes**, v. 37, n. 7, p. 847-850, 1988.

BRODERSEN, D. E. et al. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B, on the 30S ribosomal subunit. **Cell**, v. 103, n. 7, p. 1143-1154, 2000.

BROWN, M. H.; PAULSEN, I. T.; SKURRAY, R. A. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. **Molecular Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 394-395, 1999.

BUCHAN, K. D.; FOSTER, S. J.; RENSHAW, S. A. *Staphylococcus aureus*: Setting its sights on the human innate immune system. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 165, n. 4, p. 367-385, 2019.

BUCKLEY, A. M. et al. The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 847-856, 2006.

BUGG, T. D. H. et al. Molecular Basis for Vancomycin Resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: Biosynthesis of a Depsipeptide Peptidoglycan Precursor by Vancomycin Resistance Proteins VanH and VanA. **Biochemistry**, v. 30, n. 43, p. 10408-10415, 1991.

BURSE, A.; WEINGART, H.; ULLRICH, M. S. The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 1, p. 43-54, 2004.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

BUSSCHER, H. J. et al. Biomaterial-associated infection: Locating the finish line in the race for the surface. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 153, p. 153rv10-153rv10, 2012.

CANNON, R. D. et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 291-321, 2009.

CAPOBIANCO, J. O.; GOLDMAN, R. C. Erythromycin and azithromycin transport into *Haemophilus influenzae* ATCC 19418 under conditions of depressed proton motive force ( $\Delta\mu\text{H}$ ). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 9, p. 1787-1791, 1990.

CARVALHO, C. E. et al. Monitoramento microbiológico sequencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. **Jornal de Pediatria**, v. 81, n. 1, p. 29-33, 2005.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. ANNE. What is a host? Attributes of individual susceptibility. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 2, 2018.

CASINI, A. et al. Sulfonamides and Sulfonylated Derivatives as Anticancer Agents. **Current Cancer Drug Targets**, 2005.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: What is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 70-76, 2005.

CAVALCANTI, S. M. D. M. et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 56-63, 2005.

CHAMBERS, H. F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging Infectious Diseases**. v. 7, n. 2, p. 178, 2001.

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.

CHANG, J. O.; LEE, R. E.; LEE, W. A pursuit of *Staphylococcus aureus* continues: a role of persister cells. **Archives of Pharmacal Research**, p. 1-9, 2020.

CHAVAKIS, T. et al. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. **Nature Medicine**, v. 8, n. 7, p. 687-693, 2002.

CHEN, Y. J. et al. X-ray structure of EmrE supports dual topology model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 48, p. 18999-19004, 2007.

CHEUNG, A. L. et al. Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (sar) distinct from agr. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 14, p. 6462-6466, 1992.

CHEVALIER, J. et al. New pyridoquinoline derivatives as potential inhibitors of the fluoroquinolone efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 23, p. 4023-4026, 2001.

CHOI, H. J. et al. Broad-spectrum *in vitro* antimicrobial activities of *Streptomyces* sp. strain BCNU 1001. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 3, p. 576-583, 2012.

CHOLLET, R. et al. The AcrAB-TolC pump is involved in macrolide resistance but not in telithromycin efflux in *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 9, p. 3621-3624, 2004.

CHOPRA, I. New developments in tetracycline antibiotics: Glycylcyclines and tetracycline efflux pump inhibitors. **Drug Resistance Updates**, v. 5, n. 3-4, p. 119-125, 2002.

CHOPRA, I.; HAWKEY, P. M.; HINTON, M. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 29, n. 3, p. 245-277, 1992.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232-260, 2001.

CHOVANOVÁ, R. et al. The inhibition the Tet(K) efflux pump of tetracycline resistant *Staphylococcus epidermidis* by essential oils from three *Salvia* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 58-62, 2015.

CHUANCHUEN, R. et al. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: Exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 2, p. 428-432, 2001.

CLANCY, J. et al. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, mefA, from *Streptococcus pyogenes*. **Molecular Microbiology**, v. 22, n. 5, p. 867-879, 1996.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **CLSI supplement M100**, 2017.

CLUFF, L. E.; REYNOLDS, R. J. Management of staphylococcal infections. **The American Journal of Medicine**, v. 39, n. 5, p. 812-825, 1965.

COGGESHALL, L. T. The selective action of sulfanilamide on the parasites of experimental malaria in monkeys *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 71, n. 1, p.

13-20, 1940.

COLEMAN, P. J. et al. Nonpeptide  $\alpha\beta$ 3 antagonists. Part 11: Discovery and preclinical evaluation of potent  $\alpha\beta$ 3 antagonists for the prevention and treatment of osteoporosis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 20, p. 4829-4837, 2004.

CONLON, B. P. *Staphylococcus aureus* chronic and relapsing infections: Evidence of a role for persister cells: An investigation of persister cells, their formation and their role in *S. aureus* disease. **BioEssays**, v. 36, n. 10, p. 991-996, 2014.

COSTA, S. S. et al. Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. **The Open Microbiology Journal**, v. 7, p. 59, 2013.

COUTO, I. et al. Efflux-mediated response of *Staphylococcus aureus* exposed to ethidium bromide. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 3, p. 504-513, 2008.

COX, G.; WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6-7, p. 287-292, 2013.

COZZARELLI, N. R. DNA Gyrase and the supercoiling of DNA. **Science**, v. 207, n. 4434, p. 953-960, 1980.

CROSS, A. S. What is a virulence factor? **Critical care**, v. 12, n. 6, p. 1-2, 2008.

CZUBA, W. Synthesis and reactions of naphthyridines (review). **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 15, n. 1, p. 1-13, 1979.

D`COSTA, V. M.; GRIFFITHS, E.; WRIGHT, G. D. Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 481-489, 2007.

DAI, Y. et al. Decreasing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections is attributable to the disappearance of predominant MRSA ST239 clones, Shanghai, 2008–2017. **Emerging Microbes and Infections**, v. 8, n. 1, p. 471-478, 2019.

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

DAURY, L. et al. Tripartite assembly of RND multidrug efflux pumps. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2016.

DAVIDSON, A. L. et al. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 2, p. 317-364, 2008.

DAVIES, J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. **Science**, v. 264, n. 5157, p. 375-382, 1994.

- DAVIN-REGLI, A. et al. Membrane Permeability and Regulation of Drug "Influx and Efflux" in Enterobacterial Pathogens. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 9, p. 750-759, 2008.
- DAVIS, J. S. Management of bone and joint infections due to *Staphylococcus aureus*. **Internal Medicine Journal**, v. 35, p. S79-96, 2005.
- DAWSON, R. J. P.; LOCHER, K. P. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. **Nature**, v. 443, n. 7108, p. 180-185, 2006.
- DE HAAS, C. J. C. et al. Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus*, a Bacterial Antiinflammatory Agent. **Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 5, p. 687-695, 2004.
- DE OLIVEIRA, P. M. N. et al. Surveillance of multidrug-resistant bacteria in pediatric and neonatal intensive care units in Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.
- DEAN, C. R. et al. Efflux-mediated resistance to tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 3, p. 972-978, 2003.
- DEDIEU-CHAUFOR, C. et al. Pharmacological profile of UP 5145-52, 1 an original antiulcer and antisecretory agent. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 259, n. 1, p. 190-197, 1991.
- DEMARCO, C. E. et al. 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.
- DEURENBERG, R.; STOBBERINGH, E. The Molecular Evolution of Hospital- and Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Current Molecular Medicine**, v. 9, n. 2, p. 100-115, 2009.
- DEVRIES, A. S.; LESHER, L.; SCHLIEVERT, P. M.; ROGERS, T.; VILLAUME, L. G.; DANILA, R.; & LYNFIELD, R. Staphylococcal toxic shock syndrome 2000-2006: epidemiology, clinical features, and molecular characteristics. **PloS one**, v. 6, n. 8, p. e22997, 2011.
- DHAR, A. K. et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel 2-(4-substituted piperazin-1-yl)1, 8 Naphthyridine 3-carboxylic acids as 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists for the management of depression. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 84, n. 6, p. 721-731, 2014.
- DI BRACCIO, M. et al. 1,8-Naphthyridines IX. Potent anti-inflammatory and/or analgesic activity of a new group of substituted 5-amino[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,8]naphthyridine-6-carboxamides, of some their Mannich base derivatives and of one novel substituted 5-amino-10-oxo-10H. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 394-405, 2014.
- DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000.
- DOMAGALA, J. M.; MICH, T. F.; NICHOLS, Jeffrey B. **Naphthyridine antibacterial**

agents. U.S. Patent n. 5,281,612, 25 jan. 1994.

DOMAGK, G. Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. **Angewandte Chemie**, v. 48, n. 42, p. 657-667, 1935.

DOS SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: Visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

DOS SANTOS, J. F. S. et al. *In vitro* e *in silico* evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 57, p. 22-28, 2018.

DREIER, J.; RUGGERONE, P. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 660, 2015.

DRLICA, K. The mutant selection window and antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 11-17, 2003.

DRLICA, K. et al. Quinolones: Action and Resistance Updated. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 11, p. 981-998, 2009.

DU, D. et al. Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. **Nature**, v. 509, n. 7501, p. 512-515, 2014.

EHRMANN, M. et al. The ABC maltose transporter. **Molecular Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 685-694, 1998.

ELANSARY, A. K. et al. Synthesis and antitumour activity of certain pyrido[2,3-d ] pyrimidine and 1,8-naphthyridine derivatives. **Journal of Chemical Research**, v. 38, n. 3, p. 147-153, 2014.

ELKINS, C. A.; MULLIS, L. B. Mammalian steroid hormones are substrates for the major RND- and MFS-type tripartite multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 3, p. 1191-1195, 2006.

ERARD, M. et al. Ethidium bromide binding to core particle: Comparison with native chromatin. **Nucleic Acids Research**, v. 6, n. 10, p. 3231-3254, 1979.

EVERSON DA SILVA, L. et al. Synthesis and Antiparasitic Activity Against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis* of Chlorinated 1,7- and 1,8-Naphthyridines. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 4, n. 2, p. 154-159, 2007.

EZELARAB, H. A. A. et al. Recent updates of fluoroquinolones as antibacterial agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 351, n. 9, p. 1800141, 2018.

FAJARDO, A. et al. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, p. e1619, 2008.

FATH, M. J.; KOLTER, R. ABC transporters: Bacterial exporters. **Microbiological Reviews**,



v. 57, n. 4, p. 995-1017, 1993.

FEDTKE, I.; GÖTZ, F.; PESCHEL, A. Bacterial evasion of innate host defenses - The *Staphylococcus aureus* lesson. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, n. 2-3, p. 189-194, 2004.

FENOSA, A. et al. Role of TolC in *Klebsiella oxytoca* resistance to antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 4, p. 668-674, 2009.

FERNANDES, P.; MARTENS, E. Antibiotics in late clinical development. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 152-163, 2017.

FERNSTROM, A.; GOLDBLATT, M. Aerobiology and Its Role in the Transmission of Infectious Diseases. **Journal of Pathogens**, v. 2013, 2013.

FERRARINI, P. L. et al. Unusual nitration of substituted 7-amino-1,8-naphthyridine in the synthesis of compounds with antiplatelet activity. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 34, n. 5, p. 1501-1510, 1997.

FERRARINI, P. L. et al. Synthesis of 1,8-naphthyridine derivatives: Potential antihypertensive agents - Part VIII. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 5, p. 383-397, 1998.

FERRARINI, P. L. et al. Synthesis and antiplatelet activity of some 3-phenyl-1,8-naphthyridine derivatives. **II Farmaco**, v. 55, n. 9-10, p. 603-610, 2000.

FERRARINI, P. L. et al. Synthesis and antiplatelet activity of some 2,7-di(N-cycloamino)-3-phenyl-1,8-naphthyridine derivatives. **II Farmaco**, v. 56, n. 4, p. 311-318, 2001.

FIGUEREDO, F. G. et al. Effect of hydroxyamines derived from lapachol and norlachol against *Staphylococcus aureus* strains carrying the NorA efflux pump. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 84, p. 104370, 2020.

FISHER, L. M. et al. Dual activity of fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* (multiple letters) **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 463-464, 2003.

FISHER, R. A.; GOLLAN, B.; HELAINE, S. Persistent bacterial infections and persister cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 8, p. 453, 2017.

FISHOVITZ, J. et al. Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **IUBMB Life**, v. 66, n. 8, p. 572-577, 2014.

FITZPATRICK, A. W. P. et al. Structure of the MacAB-TolC ABC-type tripartite multidrug efflux pump. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 7, p. 1-8, 2017.

FLANNAGAN, R. S.; HEIT, B.; HEINRICHS, D. E. Antimicrobial mechanisms of macrophages and the immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. **Pathogens**, v. 4, n. 4, p. 826-868, 2015.

FORSTER, W. G. Treatment of trachoma with sulfanilamide. **American Journal of**

**Ophthalmology**, v. 23, n. 5, p. 532-534, 1940.

FOSTER, T. J. Immune evasion by staphylococci. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 948-958, 2005.

FOSTER, T. J. et al. Adhesion, invasion and evasion: The many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 49-62, 2014.

FOSTER, T. J.; MCDEVITT, D. Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*: Their possible roles in virulence. **FEMS Microbiology Letters**, v. 118, n. 3, p. 199-205, 1994.

FOURNIER, B. et al. A mutation in the 5' untranslated region increases stability of *norA* mRNA, encoding a multidrug resistance transporter of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 7, p. 2367-2371, 2001.

FOUTS, J. R.; KAMM, J. J.; BRODIE, B. B. Enzymatic reduction of prontosil and other azo dyes. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 120, n. 3, p. 291-300, 1957.

FRANÇOIS, P. et al. Host-Bacteria Interactions in Foreign Body Infections. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 17, n. 8, p. 514-520, 1996.

FREEMAN, C. et al. Vosaroxin: A new valuable tool with the potential to replace anthracyclines in the treatment of AML? **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 14, n. 10, p. 1417-1427, 2013.

FRITSCHÉ, T. R. et al. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 1843-1845, 2008.

FU, L. et al. Efficient synthesis and evaluation of antitumor activities of novel functionalized 1,8-naphthyridine derivatives. **ACS Combinatorial Science**, v. 17, n. 1, p. 24-31, 2015.

FUJITA, M. et al. Remarkable synergies between baicalein and tetracycline, and baicalein and  $\beta$ -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbiology and Immunology**, v. 49, n. 4, p. 391-396, 2005.

GANDRA, Sumanth et al. Faropenem resistance causes in vitro cross-resistance to carbapenems in ESBL-producing *Escherichia coli*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 55, n. 3, p. 105902, 2020.

GAO, L. Z. et al. [Design, synthesis, antibacterial and anti-cell proliferation activities of [1,2,4]triazino[3,4-h] [1,8]naphthyridine-8-one-7-carboxylic acid derivatives]. **Yao Xue Xue Bao**, v. 50, n. 3, p. 332-336, 2015.

GAUTAM, B. K. et al. Antidepressant-like activity of 2-(4-phenylpiperazin-1-yl)-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid (7a), a 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist in behaviour based rodent models: Evidence for the involvement of serotonergic system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 109, p. 91-97, 2013.

GE, B. et al. MRSA and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. retail meats, 2010–2011. **Food Microbiology**, v. 62, p. 289-297, 2017.

GERMAN, N. et al. Synthesis and evaluation of fluoroquinolone derivatives as substrate-based inhibitors of bacterial efflux pumps. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 11, p. 2453-2463, 2008.

GIBBONS, S.; MOSER, E.; KAATZ, G. W. Catechin gallates inhibit multidrug resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus*. **Planta Medica**, v. 70, n. 12, p. 1240-1242, 2004.

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, p. 13-17, 2003.

GIBBONS, S.; UDO, E. E. The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux pumps, on the *in vitro* activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the *tet*(K) determinant. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 2, p. 139-140, 2000.

GIFFORD, D. R. et al. Identifying and exploiting genes that potentiate the evolution of antibiotic resistance. **Nature Ecology and Evolution**, v. 2, n. 6, p. 1033-1039, 2018.

GILLESPIE, M. T. et al. Homologous direct repeat sequences associated with mercury, methicillin, tetracycline and trimethoprim resistance determinants in *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 43, n. 2, p. 165-171, 1987.

GILSON, L.; MAHANTY, H. K.; KOLTER, R. Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V. **The EMBO Journal**, v. 9, n. 12, p. 3875-3884, 1990.

GINN, S. L.; BROWN, M. H.; SKURRAY, R. A. Membrane topology of the metal-tetracycline/H<sup>+</sup> antiporter TetA(K) from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 11, p. 3786-3789, 1997.

GIRAUDO, A. T. et al. Characterization of a Tn551-mutant of *Staphylococcus aureus* defective in the production of several exoproteins. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 677-681, 1994.

GIRAUDO, A. T.; CHEUNG, A. L.; NAGEL, R. The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. **Archives of Microbiology**, v. 168, n. 1, p. 53-58, 1997.

GNANAMANI, A.; HARIHARAN, P.; PAUL-SATYASEELA, M. *Staphylococcus aureus*: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach. **Frontiers in Staphylococcus aureus**. v. 4, p. 28, 2017.

GODOY, P. et al. Characterization of the RND family of multidrug efflux pumps: *In silico* to *in vivo* confirmation of four functionally distinct subgroups. **Microbial Biotechnology**, v. 3, n. 6, p. 691-700, 2010.

- GOLDBERGER, H. A. The potentiation of the sulfonamides in the local therapy of wounds and surgical infections by the use of oxidants. **The American Journal of Surgery**, v. 56, n. 2, p. 353-374, 1942.
- GORDON, R. J.; LOWY, F. D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. Supplement\_5, p. S350-S359, 2008.
- GOSBELL, I. B. Diagnosis and management of catheter-related bloodstream infections due to *Staphylococcus aureus*. **Internal Medicine Journal**, v. 35, p. S45-62, 2005.
- GOSWITZ, V. C.; BROOKER, R. J. Structural features of the uniporter/symporter/antiporter superfamily. **Protein Science**, v. 4, n. 3, p. 534-537, 1995.
- GOULIAN, M. et al. Mechanism of thymineless death. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 195, p. 89-95, 1986.
- GRESHAM, H. D. et al. Survival of *Staphylococcus aureus* Inside Neutrophils Contributes to Infection . **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 7, p. 3713-3722, 2000.
- GRINIUS, L. et al. A staphylococcal multidrug resistance gene product is a member of a new protein family. **Plasmid**, v. 27, n. 2, p. 119-129, 1992.
- GRISTINA, A. G. Implant failure and the immuno-incompetent fibro-inflammatory zone. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 298, p. 106-118, 1994.
- GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. suppl\_2, p. W270-W277, 2011.
- GRUMANN, D.; NÜBEL, U.; BRÖKER, B. M. *Staphylococcus aureus* toxins - Their functions and genetics. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 583-592, 2014.
- GUAN, L. et al. Membrane topology of the xenobiotic-exporting subunit, MexB, of the MexA,B-OprM extrusion pump in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 15, p. 10517-10522, 1999.
- GUAY, G. G. et al. The *tet(K)* gene from *Staphylococcus aureus* mediates the transport of potassium in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 15, p. 4927-4929, 1993.
- GUAY, G. G.; KHAN, S. A.; ROTHSTEIN, D. M. The *tet(K)* gene of plasmid pT181 of *Staphylococcus aureus* encodes an efflux protein that contains 14 transmembrane helices. **Plasmid**, v. 30, n. 2, p. 163-166, 1993.
- GUINEA, J. et al. E-4695, a new C-7 azetidiny fluoronaphthyridine with enhanced activity against gram-positive and anaerobic pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 2, p. 413-421, 1995.
- GUO, M. T.; YUAN, Q. BIN; YANG, J. Insights into the amplification of bacterial resistance to erythromycin in activated sludge. **Chemosphere**, v. 136, p. 79-85, 2015.

GUTIERREZ, A.; STOKES, J. M.; MATIC, I. Our evolving understanding of the mechanism of quinolones. **Antibiotics**, v. 7, n. 2, p. 32, 2018.

GUZMÁN-BLANCO, M. et al. Epidemiology of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2009.

GYLES, C.; BOERLIN, P. Horizontally Transferred Genetic Elements and Their Role in Pathogenesis of Bacterial Disease. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 328-340, 2014.

HAMRE, D.; RAKE, G. Studies on Lymphogranuloma Venereum: V. The Action of Some Antibiotic Substances and Sulfonamides *in vitro* and *in vivo* upon the Agents of Feline Pneumonitis and Lymphogranuloma Venereum. **Journal of Infectious Diseases**, p. 175-190, 1947.

HAN, Y.; TAN, T. M. C.; LIM, L. Y. Effects of capsaicin on P-gp function and expression in Caco-2 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 12, p. 1727-1734, 2006.

HANSEN, L. H. et al. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 9, p. 3332-3337, 2004.

HARBOTTLE, H. et al. Genetics of antimicrobial resistance. **Animal Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 111-124, 2006.

HARMS, A.; MAISONNEUVE, E.; GERDES, K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. **Science**, v. 354, n. 6318, 2016.

HASSAN, Karl A. et al. Homologs of the *Acinetobacter baumannii* AceI transporter represent a new family of bacterial multidrug efflux systems. **MBio**, v. 6, n. 1, 2015.

CHITSAZ, M.; BROWN, M. H. The role played by drug efflux pumps in bacterial multidrug resistance. **Essays in biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 127-139, 2017.

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.

HAWTIN, R. E. et al. Homologous recombination repair is essential for repair of vosaroxin-induced DNA double-strand breaks. **Oncotarget**, v. 1, n. 7, p. 606, 2010.

HAYAKAWA, I. et al. Synthesis of Antimicrobial Agents. VI. Studies on the Synthesis of Furo[3,2-b][1,8]naphthyridine Derivatives. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 12, p. 4914-4922, 1984.

HE, G. X. et al. An H<sup>+</sup>-Coupled Multidrug Efflux Pump, PmpM, a Member of the MATE Family of Transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 1, p. 262-265, 2004.

HELAINÉ, S.; KUGELBERG, E. Bacterial persisters: Formation, eradication, and experimental systems, **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 7, p. 417-424, 2014.

HENDERSON, P. J. F. Studies of translocation catalysis. **Bioscience Reports**, v. 11, n. 6, p. 477-538, 1991a.

HENDERSON, P. J. F. Sugar transport proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 1, n. 4, p. 590-601, 1991b.

HENDERSON, P. J. F. The 12-transmembrane helix transporters. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 5, n. 4, p. 708-721, 1993.

HERRMANN, M. et al. Adhesion of *Staphylococcus aureus* to Surface-Bound Platelets: Role of Fibrinogen/Fibrin and Platelet Integrins. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, n. 2, p. 312-322, 1993.

HIDALGO, L. et al. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in enterobacteriaceae isolated in India and the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 7, p. 1543-1550, 2013.

HIGGINS, C. F. ABC Transporters: From microorganisms to man. **Annual Review of Cell Biology**, v. 8, n. 1, p. 67-113, 1992.

HINCHLIFFE, P. et al. Structure of the periplasmic adaptor protein from a major facilitator superfamily (MFS) multidrug efflux pump. **FEBS Letters**, v. 588, n. 17, p. 3147-3153, 2014.

HIRAI, K. et al. Mutations producing resistance to norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, n. 4, p. 582-586, 1987.

HIRAKATA, Y. et al. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 1, p. 109-118, 2002.

HIRAKAWA, H. et al. Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1113-1126, 2005.

HIRSCHFELDER, M. Treatment of Trachoma with Sulfanilamide. **American Journal of Ophthalmology**, v. 22, n. 3, p. 299-300, 1939.

HOBBS, E. C. et al. Conserved small protein associates with the multidrug efflux pump AcrB and differentially affects antibiotic resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 41, p. 16696-16701, 2012.

HOCH, U. et al. Voreloxin, formerly SNS-595, has potent activity against a broad panel of cancer cell lines and *in vivo* tumor models. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 64, n. 1, p. 53, 2009.

HOLLER, J. G. et al. Novel inhibitory activity of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump by a kaempferol rhamnoside isolated from *Persea lingue* Nees. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 5, p. 1138-1144, 2012.

HOLMES, N. E.; LINDSAY GRAYSON, M. Sulfonamides. In: Kucers, A. **The Use of**

**Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs**, Seventh Edition, Butterworth-Heinemann, 1997.

HOLT, J. et al. Bergey's manual of determinative microbiology, 9th edn. **Lippincot, Williams and Wilkins, Baltimore**, 1994.

HOOPEr, D. C. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 2, n. 1, p. 38-55, 1999.

HOWARD, J. B.; KLOOS, W. E. Staphylococci. In: CARSON D.; BIRCHOR S (Ed). **Clinical and Pathogenic Microbiology**. Mosby Co., St Louis, Missouri. pp. 231–244, 1987.

HUANG, L. et al. Differential susceptibility to carbapenems due to the AdeABC efflux pump among nosocomial outbreak isolates of *Acinetobacter baumannii* in a Chinese hospital. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 62, n. 3, p. 326-332, 2008.

HUANG, S. et al. Design and synthesis of imidazo[1,2- $\alpha$ ][1,8]naphthyridine derivatives as anti-HCV agents via direct C-H arylation. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 12, n. 15, p. 2344-2348, 2014.

HUANG, X. et al. The synthesis and biological evaluation of a novel series of C7 non-basic substituted fluoroquinolones as antibacterial agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 15, p. 4130-4133, 2009.

HUANG, X. et al. 4-Substituted 4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)piperidine: Novel C7 moieties of fluoroquinolones as antibacterial agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 9, p. 2859-2863, 2010.

HUDA, N. et al. Molecular cloning and characterization of an ABC multidrug efflux pump, VcaM, in non-O1 *Vibrio cholerae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 8, p. 2413-2417, 2003.

HUET, A. A. et al. 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.

HUTCHINSON, J. H. et al. Nonpeptide  $\alpha\beta$ 3 Antagonists. 8. *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation of a Potent  $\alpha\beta$ 3 Antagonist for the Prevention and Treatment of Osteoporosis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 22, p. 4790-4798, 2003.

HWANG, H. J. et al. Novel dihydrobenzofuro[4,5-b][1,8]naphthyridin-6-one derivative, MHY-449, induces apoptosis and cell cycle arrest in HCT116 human colon cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 41, n. 6, p. 2057-2064, 2012.

HWANG, Y. J. et al. Cytotoxicity and structure-activity relationships of naphthyridine derivatives in human cervical cancer, leukemia, and prostate cancer. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 17, n. 6, p. 517, 2013.

HYDE, S. C. et al. Structural model of ATP-binding proteing associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. **Nature**, v. 346, n. 6282, p. 362-365, 1990.

IARIA, S. T.; FURLANETTO, S. M.; CAMPOS, M. L. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais, São Paulo, 1976. **Revista de Saude Publica**, v. 14, n. 1, p. 93-100, 1980.

IWATSUKI, K. et al. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. **Journal of dermatological science**, v. 42, n. 3, p. 203-214, 2006.

JACOBSON, M. A.; GELLERMANN, H.; CHAMBERS, H. *Staphylococcus aureus* bacteremia and recurrent staphylococcal infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome and aids-related complex. **The American Journal of Medicine**, v. 85, n. 2, p. 172-176, 1988.

JACOBY, G. A. AmpC B-Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161-182, 2009.

JENUL, C.; HORSWILL, A. R. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. **Microbiology Spectrum**, 2019.

JERNAES, M. W.; STEEN, H. B. Staining of *Escherichia coli* for flow cytometry: Influx and efflux of ethidium bromide. **Cytometry**, v. 17, n. 4, p. 302-309, 1994.

JERSE, A. E. et al. A gonococcal efflux pump system enhances bacterial survival in a female mouse model of genital tract infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 10, p. 5576-5582, 2003.

JOHNSON, A. P.; WOODFORD, N. Global spread of antibiotic resistance: The example of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 499-513, 2013.

JONES, P. M.; O'MARA, M. L.; GEORGE, A. M. ABC transporters: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 34, n. 10, p. 520-531, 2009.

JOUX, F.; LEBARON, P. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 12, p. 1523-1535, 2000.

KAATZ, G. W. et al. Phenylpiperidine selective serotonin reuptake inhibitors interfere with multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 3, p. 254-261, 2003a.

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

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

KAATZ, G. W.; MCALEESE, F.; SEO, S. M. Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein.



**Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1857-1864, 2005.

KAATZ, G. W.; MOUDGAL, V. V.; SEO, S. M. Identification and characterization of a novel efflux-related multidrug resistance phenotype in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 833-838, 2002.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 12, p. 2650-2655, 1995.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 12, p. 2733-2737, 1997.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M. Effect of substrate exposure and other growth condition manipulations on *norA* expression. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 364-369, 2004.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M.; RUBLE, C. A. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 163, n. 5, p. 1080-1086, 1991.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M.; RUBLE, C. A. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 1086-1094, 1993.

KAATZ, G. W.; THYAGARAJAN, R. V.; SEO, S. M. Effect of promoter region mutations and *mgrA* overexpression on transcription of *norA*, which encodes a *Staphylococcus aureus* multidrug efflux transporter. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 161-169, 2005.

KAHL, B. C.; BECKER, K.; LÖFFLER, B. Clinical significance and pathogenesis of staphylococcal small colony variants in persistent infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 401-427, 2016.

KALIA, N. P. et al. Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 10, p. 2401-2408, 2012.

KANO, S.; RUBIN, B. K. **Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications** **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 590-615, 2010.

KAPP, E. et al. Small Molecule Efflux Pump Inhibitors in Mycobacterium tuberculosis: A Rational Drug Design Perspective. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 72-86, 2018.

SCHLEIFER, K. H. et al. Family VIII. Staphylococcaceae fam. nov. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition**. v. 3, p. 392, 2009.

KAST, C. et al. Transmembrane organization of mouse P-glycoprotein determined by epitope

insertion and immunofluorescence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 16, p. 9240-9248, 1996.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1549-1555, 2000.

KAUR, P.; RUSSELL, J. Biochemical coupling between the DrrA and DrrB proteins of the doxorubicin efflux pump of *Streptomyces peucetius*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 28, p. 17933-17939, 1998.

KEHRENBERG, C. et al. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: Methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 1064-1073, 2005.

KERR, I. D. Sequence analysis of twin ATP binding cassette proteins involved in translational control, antibiotic resistance, and ribonuclease L inhibition. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 315, n. 1, p. 166-173, 2004.

KERR, I. D.; REYNOLDS, E. D.; COVE, J. H. ABC proteins and antibiotic drug resistance: Is it all about transport? **Biochemical Society Transactions**, 2005.

KHAN, I. A. et al. Piperine, a phytochemical potentiator of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 810-812, 2006.

KHAN, S. A.; NOVICK, R. P. Complete nucleotide sequence of pT181, a tetracycline-resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. **Plasmid**, v. 10, n. 3, p. 251-259, 1983.

KIM, E. J.; SHIN, W. H. General pharmacology of DW-286a, a new fluoronaphthyridone antibiotic: Effects on central nervous, cardiovascular, and respiratory systems. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 5, p. 641-646, 2004.

KIM, Y.; CHEN, J. Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation. **Science**, v. 359, n. 6378, p. 915-919, 2018.

KINANA, A. D. et al. Aminoacyl  $\beta$ -naphthylamides as substrates and modulators of AcrB multidrug efflux pump. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 5, p. 1405-1410, 2016.

KLEMM, E. J.; WONG, V. K.; DOUGAN, G. Emergence of dominant multidrug-resistant bacterial clades: Lessons from history and whole-genome sequencing, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 51, p. 12872-12877, 2018.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 1, p. 117-140, 1994.

KLOOS, W. E.; MUSSELWHITE, M. S. Distribution and Persistence of Staphylococcus and Micrococcus Species and Other Aerobic Bacteria on Human Skin<sup>1</sup>. **Applied Microbiology**,

v. 30, n. 3, p. 381-395, 1975.

KNOX, J.; UHLEMANN, A. C.; LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections: Transmission within households and the community, **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 7, p. 437-444, 2015.

KNOX, K. W.; WICKEN, A. J. Immunological properties of teichoic acids, **Bacteriological Reviews**, v. 37, n. 2, p. 215, 1973.

KÖHLER, T. et al. Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 10, p. 2288-2290, 1996.

KÖHLER, T.; PECHÈRE, J. C.; PLÉSIAT, P. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 56, n. 9, p. 771-778, 1999.

KOJIMA, S.; NIKAIDO, H. Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 28, p. E2629-E2634, 2013.

KOLLER, G. Über das 1.8-Naphthyridin. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)**, v. 60, n. 8, p. 1918-1920, 1927a.

KOLLER, G. Über das 1.8-Naphthyridin und seine Derivate (Vorläufige Mitteilung). **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)**, v. 60, n. 7, p. 1572-1575, 1927b.

KOLLER, G. Über eine Synthese von Derivaten des 1.8-Naphthyridins. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)**, v. 60, n. 2, p. 407-410, 1927c.

KONDO, H. et al. Synthesis and Antibacterial Activity of Thiazolo-, Oxazolo-, and Imidazolo[3,2-a][1,8]naphthyridinecarboxylic Acids. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 7, p. 2012-2015, 1990.

KORKHOV, V. M.; TATE, C. G. Electron Crystallography Reveals Plasticity within the Drug Binding Site of the Small Multidrug Transporter EmrE. **Journal of Molecular Biology**, v. 377, n. 4, p. 1094-1103, 2008.

KORONAKIS, V.; ESWARAN, J.; HUGHES, C. Structure and Function of TolC: The Bacterial Exit Duct for Proteins and Drugs. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 467-489, 2004.

KORONAKIS, V.; HUGHES, C. Synthesis, maturation and export of the *E. coli* hemolysin, **Medical Microbiology and Immunology**, v. 185, n. 2, p. 65-71, 1996.

KRÄMER, R. Functional principles of solute transport systems: concepts and perspectives. **BBA - Bioenergetics**, v. 1185, n. 1, p. 1-34, 1994.

KREUTNER, W. et al. Antiallergy activity of Sch 37224, a new inhibitor of leukotriene formation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 247, n. 3, p. 997-

1003, 1988.

KUMAR, A. et al. Novel structural analogues of piperine as inhibitors of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1270-1276, 2008.

KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1486-1513, 2005.

KUMAR, N. et al. Crystal structure of the transcriptional regulator Rv1219c of *Mycobacterium tuberculosis*. **Protein Science**, v. 23, n. 4, p. 423-432, 2014.

KUMAR, S. et al. Genome sequence of non-O1 *Vibrio cholerae* PS15. **Genome Announcements**, v. 1, n. 1, 2013.

KUMAR, S.; MUKHERJEE, M. M.; VARELA, M. F. Modulation of Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps of the Major Facilitator Superfamily. **International Journal of Bacteriology**, v. 2013, 2013.

KUMAR, V. et al. 1,8-Naphthyridine-3-carboxamide derivatives with anticancer and anti-inflammatory activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 3356-3362, 2009.

KUO, S. C. et al. Studies on Heterocyclic Compounds. IX.1) Synthesis and Antiallergic Activity of Furo[2,3-b][1,8]naphthyridine-3,4(2H,9H)-diones and 4H-Furo[2,3-d]pyrido[1,2-a]-pyrimidine-3,4(2H)-diones. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 11, p. 4403-4407, 1988.

KURODA, M. et al. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v. 357, n. 9264, p. 1225-1240, 2001.

KURODA, T. et al. A Novel Synthesis and Potent Antiinflammatory Activity of 4-Hydroxy-2(1H)-oxo-1-phenyl-1,8-naphthyridine-3-carboxamides. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 6, p. 1130-1136, 1992.

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

LACROIX, F. J. C. et al. *Salmonella typhimurium* *acrB*-like gene: Identification and role in resistance to biliary salts and detergents and in murine infection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 135, n. 2-3, p. 161-167, 1996.

LADHANI, S. et al. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 224-242, 1999.

LAGE, H. ABC-transporters: Implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 3, p. 188-199, 2003.

LAMERS, R. P.; CAVALLARI, J. F.; BURROWS, L. L. The Efflux Inhibitor Phenylalanine-

Arginine Beta-Naphthylamide (PA $\beta$ N) Permeabilizes the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e60666, 2013.

LAPPIN, E.; FERGUSON, A. J. **Gram-positive toxic shock syndromes** **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 281-290, 2009.

LAUPLAND, K. B. Incidence of bloodstream infection: A review of population-based studies, **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 6, p. 492-500, 2013.

LAVIGNE, J. P. et al. An adaptive response of *Enterobacter aerogenes* to imipenem: Regulation of porin balance in clinical isolates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 2, p. 130-136, 2013.

LAW, C. J.; MALONEY, P. C.; WANG, D.-N. Ins and Outs of Major Facilitator Superfamily Antiporters. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, p. 289-305, 2008.

LEE, A. et al. Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 11, p. 3142-3150, 2000.

LEE, A. S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-23, 2018.

LEE, L. Y. et al. The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 10, p. 1461-1471, 2002.

LEONARD, J. T. et al. Synthesis and pharmacological activities of 1,8-naphthyridine derivatives. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 6, p. 798-802, 2002.

LEPECQ, J.-B.; PAOLETTI, C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. **Journal of Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 87-106, 1967.

LESHER, G. Y. et al. 1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents. **Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**, v. 5, n. 5, p. 1063-1065, 1962.

LEVY, S. B. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 4, p. 695, 1992.

LI, H. et al. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies, **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, n. 2, p. 63-68, 2012.

LI, X. Z.; LIVERMORE, D. M.; NIKAIDO, H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 8, p. 1732-1741, 1994.

LI, X. Z.; NIKAIDO, H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria, **Drugs**, v. 64, n. 2, p. 159-204, 2004.

- LI, X. Z.; NIKAIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: An update, **Drugs**, v. 69, n. 12, p. 1555-1623, 2009.
- LI, X. Z.; NIKAIDO, H.; POOLE, K. Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 9, p. 1948-1953, 1995.
- LI, X. Z.; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 337-418, 2015.
- LIANG, J.-H.; HAN, X. Structure-Activity Relationships and Mechanism of Action of Macrolides Derived from Erythromycin as Antibacterial Agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 24, p. 3131-3164, 2013.
- LIMA, M. F. P. et al. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares—Revisão de Literatura. **Revista Uningá Review**, v. 21, n. 1, 2015.
- LIMAVERDE, P. W. et al. Inhibition of the TetK efflux-pump by the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. and  $\alpha$ -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 957-961, 2017.
- LIN, J. et al. Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and *in vivo* colonization of *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4250-4259, 2003.
- LIPATOV, M.; LI, S.; FELDMAN, M. W. Economics, cultural transmission, and the dynamics of the sex ratio at birth in China. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 49, p. 19171-19176, 2008.
- LITVINOV, V. P. Advances in the Chemistry of Naphthyridines, **Advances in Heterocyclic Chemistry**, v. 91, p. 189-300, 2006.
- LITVINOV, V. P.; ROMAN, S. V.; DYACHENKO, V. D. Naphthyridines. Structure, physicochemical properties and general methods of synthesis. **Russian Chemical Reviews**, v. 69, n. 3, p. 201-220, 2000.
- LITVINOV, V. P.; ROMAN, S. V.; DYACHENKO, V. D. Pyridopyridines. **Russian Chemical Reviews**, v. 70, n. 4, p. 299-320, 2001.
- LITVINOV, V. P. Chemistry and biological activities of 1, 8-naphthyridines. **Russian chemical reviews**, v. 73, n. 7, p. 637-670, 2004.
- LIU, J. et al. Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, **Microbial Pathogenesis**, v. 101, p. 56-67, 2016.
- LIVERMORE, D. M. Linezolid *in vitro*: Mechanism and antibacterial spectrum, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. suppl\_2, p. ii9-ii16, 2003.
- LLEWELYN, M.; COHEN, J. Superantigens: Microbial agents that corrupt

immunity **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 156-162, 2002.

LOCHER, K. P. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1514, p. 239-245, 2009.

LOGAN, L. K.; WEINSTEIN, R. A. The epidemiology of Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. suppl\_1, p. S28-S36, 2017.

LOMOVSKAYA, O. et al. Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 1340-1346, 1999.

LOMOVSKAYA, O. et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel agents for combination therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 105-116, 2001.

LOMOVSKAYA, O.; BOSTIAN, K. A. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic - A vision for applied use. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 7, p. 910-918, 2006.

LOMOVSKAYA, O.; LEWIS, K. emr, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 19, p. 8938-8942, 1992.

LOMOVSKAYA, O.; WATKINS, W. Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 225-236, 2001.

LONG, K. S. et al. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 7, p. 2500-2505, 2006.

LORENZI, V. et al. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gram-negative species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 2209-2211, 2009.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* Infections. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520-532, 1998a.

LOWY, F. D. **Medical progress: Staphylococcus aureus infections** **New England Journal of Medicine**, 1998b.

LUBELSKI, J. et al. *ydaG* and *ydbA* of *Lactococcus lactis* encode a heterodimeric ATP-binding cassette-type multidrug transporter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 33, p. 34449-34455, 2004.

LUBELSKI, J.; KONINGS, W. N.; DRIESSEN, A. J. M. Distribution and Physiology of ABC-Type Transporters Contributing to Multidrug Resistance in Bacteria. **Microbiology and**

**Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 463-476, 2007.

LUTZ, L. et al. Clinical failure of vancomycin treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 224-228, 2003.

LYNCH, J. P.; CLARK, N. M.; ZHANEL, G. G. Evolution of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae (focus on extended spectrum  $\beta$ -lactamases and carbapenemases), **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 14, n. 2, p. 199-210, 2013.

MA, C.; CHANG, G. Structure of the multidrug efflux transporter EmrE from *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 9, p. 2852-2857, 2004.

MA, D. et al. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 19, p. 6299-6313, 1993.

MA, D. et al. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 45-55, 1995.

MADAAN, A. et al. Anti-inflammatory activity of a naphthyridine derivative (7-chloro-6-fluoro-N-(2-hydroxy-3-oxo-1-phenyl-3-(phenylamino)propyl)-4-oxo-1-(prop-2-yn-1-yl)-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxamide) possessing *in vitro* anticancer potential. **International Immunopharmacology**, v. 15, n. 3, p. 606-613, 2013.

MADAAN, A. et al. 1,8-Naphthyridine Derivatives: A Review of Multiple Biological Activities, **Archiv der Pharmazie**, v. 348, n. 12, p. 837-860, 2015.

MAHAMOUD, A. et al. Quinoline Derivatives as Promising Inhibitors of Antibiotic Efflux Pump in Multidrug Resistant *Enterobacter aerogenes* Isolates. **Current Drug Targets**, v. 7, n. 7, p. 843-847, 2006.

MAHAMOUD, A. et al. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: The inhibitor response strategy, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 1223-1229, 2007.

MAHESH, R. et al. Design, synthesis and evaluation of antidepressant activity of novel 2-methoxy 1, 8 naphthyridine 3-carboxamides as 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 83, n. 5, p. 583-591, 2014.

MAIKRANZ, E. et al. Different binding mechanisms of *Staphylococcus aureus* to hydrophobic and hydrophilic surfaces. **Nanoscale**, v. 12, n. 37, p. 19267-19275, 2020.

MALANOSKI, G. J. et al. *Staphylococcus aureus* Catheter-Associated Bacteremia: Minimal Effective Therapy and Unusual Infectious Complications Associated With Arterial Sheath Catheters. **Archives of Internal Medicine**, v. 155, n. 11, p. 1161-1166, 1995.

MARCYJANIAK, M. et al. Peptidoglycan amidase MepA is a LAS metallopeptidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 42, p. 43982-43989, 2004.



MARGER, M. D.; SAIER, M. H. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 18, n. 1, p. 13-20, 1993.

MARIANS, K. J.; HIASA, H. Mechanism of quinolone action. A drug-induced structural perturbation of the DNA precedes strand cleavage by topoisomerase IV. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 14, p. 9401-9409, 1997.

MARKHAM, P. N. et al. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 10, p. 2404-2408, 1999.

MARQUEZ, B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors, **Biochimie**, v. 87, n. 12, p. 1137-1147, 2005.

MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 718-733, 2011.

MARTÍNEZ-SUÁREZ, J. V. et al. Acquisition of antibiotic resistance plasmids *in vivo* by extraintestinal *Salmonella* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 20, n. 3, p. 452-453, 1987.

MARTINEZ, J. L. et al. A global view of antibiotic resistance, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 1, p. 44-65, 2009a.

MARTINEZ, J. L. et al. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 2, p. 430-449, 2009b.

MARTINEZ, J. L. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria, **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1667, p. 2521-2530, 2009.

MARTÍNEZ, J. L. Ecology and Evolution of Chromosomal Gene Transfer between Environmental Microorganisms and Pathogens. **Microbiology Spectrum**, p. 139-160, 2018.

MARTÍNEZ, J. L.; BAQUERO, F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: Pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 647-679, 2002.

MARTINS, A. et al. Physiological characterisation of the efflux pump system of antibiotic-susceptible and multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 4, p. 313-318, 2010.

MARTINS, M. et al. An instrument-free method for the demonstration of efflux pump activity of bacteria. **In Vivo**, v. 20, n. 5, p. 657-664, 2006.

MARTINS, M. et al. Potential role of non-antibiotics (helper compounds) in the treatment of multidrug-resistant Gram-negative infections: mechanisms for their direct and indirect activities, **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, n. 3, p. 198-208, 2008.

MARTINS, M. et al. A Simple Method for Assessment of MDR Bacteria for Over-Expressed Efflux Pumps. **The Open Microbiology Journal**, v. 7, p. 72, 2013.

MASCARETTI, O. A. Bacterial Pathogenesis. In: **Bacteria versus Antibacterial Agents**. **American Society of Microbiology**, p. 33-42, 2014.

THIRY, A. et al. Anticonvulsant Sulfonamides/Sulfamates/Sulfamides with Carbonic Anhydrase Inhibitory Activity: Drug Design and Mechanism of Action. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 7, p. 661-671, 2008.

MATHEW, J. et al. Clinical Features, Site of Involvement, Bacteriologic Findings, and Outcome of Infective Endocarditis in Intravenous Drug Users. **Archives of Internal Medicine**, v. 155, n. 15, p. 1641-1648, 1995.

MATSUMOTO, J. I. et al. Pyridonecarboxylic Acids as Antibacterial Agents. 2.1 Synthesis and Structure-Activity Relationships of 1, 6,7-Trisubstituted 1,4-Dihydro-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic Acids, Including Enoxacin, a New Antibacterial Agent2. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 292-301, 1984.

MATSUMOTO, Y. et al. Evaluation of multidrug efflux pump inhibitors by a new method using microfluidic channels. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. e18547, 2011.

MAZMANIAN, S. K. et al. *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. **Science**, v. 285, n. 5428, p. 760-763, 1999.

MCALEESE, F. et al. 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.

MCGUIRE, E.; BOYD, A.; WOODS, K. *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 10, p. 2765-2766, 2020.

MCMURRY, L.; PETRUCCI, R. E.; LEVY, S. B. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 7, p. 3974-3977, 1980.

MICHIELS, J. E. et al. Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. **Drug Resistance Updates**, v. 29, p. 76-89, 2016.

MILLER, W. R.; MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 12, n. 10, p. 1221-1236, 2014.

MILLS, D. A.; FEKRAZAD, H. M.; VERSCHRAEGEN, C. F. SNS-595, a naphthyridine cell cycle inhibitor and stimulator of apoptosis for the treatment of cancers, **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 9, n. 6, p. 647-657, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano de ação nacional de prevenção e controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única 2018-2022 (PAN-BR). **Diário da República**, 1.<sup>a</sup> série - N.º 96, maio de 2018.

MIRZA, Z. M. et al. Piperine as an inhibitor of the MdeA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 1472-1478, 2011.

MIYAMAE, S. et al. Active efflux of norfloxacin by *Bacteroides fragilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 8, p. 2119-2121, 1998.

MOHAMED, Y. F. et al. Membrane permeabilization of colistin toward pan-drug resistant gram-negative isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 381-388, 2016.

MONECKE, S. et al. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. e17936, 2011.

MONTEIRO, K. L. C.; DE AQUINO, T. M.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. An Update on *Staphylococcus aureus* NorA Efflux Pump Inhibitors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 2020.

MOREIRA, M. A. S. et al. Multidrug efflux systems in *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* obtained from wholesome broiler carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 241-247, 2009.

MORENS, D. M.; FOLKERS, G. K.; FAUCI, A. S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases, **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 242-249, 2004.

MORITA, Y. et al. NorM, 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.

MORITA, Y. et al. NorM of *Vibrio parahaemolyticus* is an Na<sup>+</sup>-driven multidrug efflux pump. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 23, p. 6694-6697, 2000.

MORITA, Y. et al. Construction of a series of mutants lacking all of the four major mex operons for multidrug efflux pumps or possessing each one of the operons from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: MexCD-OprJ is an inducible pump. **FEMS Microbiology Letters**, v. 202, n. 1, p. 139-143, 2001.

MORIYAMA, Y. et al. Multidrug and toxic compound extrusion (MATE)-type proteins as anchor transporters for the excretion of metabolic waste products and xenobiotics. **Xenobiotica**, v. 38, n. 7-8, p. 1107-1118, 2008.

MORTIMER, P. G. S.; PIDDOCK, L. J. V. A comparison of methods used for measuring the accumulation of quinolones by enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 28, n. 5, p. 639-653, 1991.

MÜLLER, R. T. et al. Switch Loop Flexibility Affects Substrate Transport of the AcrB Efflux Pump. **Journal of Molecular Biology**, v. 429, n. 24, p. 3863-3874, 2017.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Virulence mechanisms of bacterial pathogens**, p. 481-511, 2016.

MURAKAMI, S. et al. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. **Nature**, v. 419, n. 6907, p. 587-593, 2002.

MURAKAMI, S. Structures and Transport Mechanisms of RND Efflux Pumps. In: **Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria**. Adis, Cham, 2016. p. 3-28.

NAKAE, T. et al. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the MexAB-OprM efflux pump and  $\beta$ -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 5, p. 1301-1303, 1999.

NAKAJIMA, A. et al. High-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay of the MexAB-OprM efflux pump and the DNA gyrase mutation. **Microbiology and Immunology**, v. 46, n. 6, p. 391-395, 2002.

NAKAKIDO, M. et al. The staphylococcal elastin-binding protein regulates zinc-dependent growth/biofilm formation. **Journal of Biochemistry**, v. 156, n. 3, p. 155-162, 2014.

NAKAMURA, S. et al. Activity of AT-2266 compared with those of norfloxacin, pipemidic acid, nalidixic acid, and gentamicin against various experimental infections in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 23, n. 5, p. 742-749, 1983a.

NAKAMURA, S. et al. *In vitro* antibacterial properties of AT-2266 a new pyridonecarboxylic acid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 23, n. 5, p. 641-648, 1983b.

NAKASHIMA, R. et al. Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters. **Nature**, v. 500, n. 7460, p. 102-106, 2013.

NASIE, I.; STEINER-MORDOCH, S.; SCHULDINER, S. New substrates on the block: Clinically relevant resistances for EmrE and homologues. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 24, p. 6766-6770, 2012.

NASR, T.; BONDOCK, S.; EID, S. Design, synthesis, antimicrobial evaluation and molecular docking studies of some new 2,3-dihydrothiazoles and 4-thiazolidinones containing sulfisoxazole. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 236-246, 2016.

NAVARRE, W. W.; SCHNEEWIND, O. Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in Gram-positive bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 115-121, 1994.

NEEDHAM, C. et al. An investigation of plasmids from *Staphylococcus aureus* that mediate resistance to mupirocin and tetracycline. **Microbiology**, v. 140, n. 10, p. 2577-2583, 1994.

NEUBERGER, A.; DU, D.; LUISI, B. F. Structure and mechanism of bacterial tripartite efflux pumps. **Research in Microbiology**, v. 169, n. 7-8, p. 401-413, 2018.

NEYFAKH, A. A.; BIDNENKO, V. E.; LAN BO CHEN. Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: Similarities and dissimilarities with the mammalian system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88,

n. 11, p. 4781-4785, 1991.

NEYFAKH, A. A.; BORSCH, C. M.; KAATZ, G. W. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 1, p. 128-129, 1993.

NG, E. Y. W.; TRUCKSIS, M.; HOOPER, D. C. Quinolone resistance mediated by *norA*: Physiologic characterization and relationship to *flqB*, a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus aureus* chromosome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 6, p. 1345-1355, 1994.

NGUYEN, S. T. et al. Structure-activity relationships of a novel pyranopyridine series of Gram-negative bacterial efflux pump inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 9, p. 2024-2034, 2015.

NI, W. et al. Effects of efflux pump inhibitors on colistin resistance in multidrug-resistant gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 3215-3218, 2016.

NICHOLS, R. J. et al. Phenotypic landscape of a bacterial cell. **Cell**, v. 144, n. 1, p. 143-156, 2011.

NICOLSEN, N. C.; STANG, A. New Antimicrobials: Where They Fit Within the Armamentarium. **Infectious Disease Special Edition**, 2019.

NIES, D. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2-3, p. 313-339, 2003.

NIKAIDO, E. et al. Regulation of the AcrAB multidrug efflux pump in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in response to indole and paraquat. **Microbiology**, v. 157, n. 3, p. 648-655, 2011.

NIKAIDO, E. et al. Effects of indole on drug resistance and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium revealed by genome-wide analyses. **Gut Pathogens**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2012.

NIKAIDO, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 593-656, 2003.

NIKAIDO, H. Multidrug Resistance in Bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 119-146, 2009.

NIKAIDO, H. Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 77, p. 1, 2010.

NIKAIDO, H.; TAKATSUKA, Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 5, p. 769-781, 2009.

NISHINO, K.; LATIFI, T.; GROISMAN, E. A. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Molecular**

**Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 126-141, 2006.

NISSINK, J. W. M. Simple size-independent measure of ligand efficiency. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 6, p. 1617-1622, 2009.

NOGUCHI, N. et al. Comparison of the nucleotide sequence and expression of *norA* genes and microbial susceptibility in 21 strains of *Staphylococcus aureus*. **Microbial Drug Resistance**, v. 10, n. 3, p. 197-203, 2004.

NORAVYAN, A. S.; PARONIKYAN, E. G.; VARTANYAN, S. A. Synthesis and pharmacological properties of naphthyridines (review). **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 19, n. 7, p. 439-448, 1985.

NORRIS, A. L.; SERPERSU, E. H. Ligand promiscuity through the eyes of the aminoglycoside N3 acetyltransferase IIa. **Protein Science**, v. 22, n. 7, p. 916-928, 2013.

NOVAIS, Â. et al. Spread of an OmpK36-modified ST15 *Klebsiella pneumoniae* variant during an outbreak involving multiple carbapenem-resistant Enterobacteriaceae species and clones. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 11, p. 3057-3063, 2012.

NOVOTNA, G. et al. Prevalence of resistance mechanisms against macrolides and lincosamides in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the Czech Republic and occurrence of an undefined mechanism of resistance to lincosamides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3586-3589, 2005.

O'NEILL, J. Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations. **Review on Antimicrobial Resistance**, p. 1-20, 2014.

O'RIORDAN, K.; LEE, J. C. *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 218-234, 2004.

OH, Y. S.; CHO, S. H. Syntheses of New Pyridonecarboxylic Acid Derivatives Containing 1- or 2-Naohthyl Substituents at N-1 and their Anti-HIV-RT Activities. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 17-23, 1998.

OKADA, U. et al. Crystal structure of tripartite-type ABC transporter MacB from *Acinetobacter baumannii*. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2017.

OLAVARRIETA, L. et al. Supercoiling, knotting and replication fork reversal in partially replicated plasmids. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 3, p. 656-666, 2002.

OLIVEIRA, G. A. et al. Avaliação da tolerância à vancomicina em 395 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 37, n. 4, p. 239-246, 2001.

OLLIVER, A. et al. Role of an *acrR* mutation in multidrug resistance of *in vitro*-selected fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **FEMS Microbiology Letters**, v. 238, n. 1, p. 267-272, 2004.

- OLMSTED, J.; KEARNS, D. R. Mechanism of Ethidium Bromide Fluorescence Enhancement on Binding to Nucleic Acids. **Biochemistry**, v. 16, n. 16, p. 3647-3654, 1977.
- OMOTE, H. et al. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 11, p. 587-593, 2006.
- ONAWOLE, A. T. et al. Structural, spectroscopic and docking properties of resorcinol, its -OD isotopomer and dianion derivative: a comparative study. **Structural Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 403-414, 2018.
- ONDUSKO, D. S.; NOLT, D. *Staphylococcus aureus*. **Pediatrics in Review**, 2018.
- OPPERMAN, T. J. et al. 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.
- OPPERMAN, T. J.; NGUYEN, S. T. Recent advances toward a molecular mechanism of efflux pump inhibition. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 421, 2015.
- OZAKI, M. et al. Structure-antibacterial activity and cytotoxicity relationships of thiazolo and thiazetoquinolone derivatives. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, n. 11, p. 1457-1462, 1996.
- PAGES, J.-M.; AMARAL, L.; FANNING, S. An Original Deal for New Molecule: Reversal of Efflux Pump Activity, A Rational Strategy to Combat Gram-Negative Resistant Bacteria. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 19, p. 2969-2980, 2011.
- PAGÈS, J. M.; AMARAL, L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 5, p. 826-833, 2009.
- PAGÈS, J. M.; MASI, M.; BARBE, J. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. **Trends in Molecular Medicine**, v. 11, n. 8, p. 382-389, 2005.
- PAIXÃO, L. et al. Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Engineering**, v. 3, n. 1, p. 1-13, 2009.
- PALAZZOTTI, D. et al. Deciphering the molecular recognition mechanism of multidrug resistance *Staphylococcus aureus* nra efflux pump using a supervised molecular dynamics approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, p. 4041, 2019.
- PARLET, C. P.; BROWN, M. M.; HORSWILL, A. R. Commensal staphylococci influence *Staphylococcus aureus* skin colonization and disease. **Trends in microbiology**, v. 27, n. 6, p. 497-507, 2019.
- PARK, Y. K.; KO, K. S. Effect of carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) on killing *Acinetobacter baumannii* by colistin. **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 53-59, 2015.

PASQUINA-LEMONCHE, L. et al. The architecture of the Gram-positive bacterial cell wall. **Nature**, v. 582, n. 7811, p. 294-297, 2020.

PATTI, J. M. et al. MSCRAMM-Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues. **Annual Review of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 585-617, 1994.

PAULSEN, I. T. et al. Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: Membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 8, p. 3630-3635, 1996a.

PAULSEN, I. T. et al. The SMR family: A novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. **Molecular Microbiology**, v. 19, n. 6, p. 1167-1175, 1996b.

PAULSEN, I. T.; BROWN, M. H.; SKURRAY, R. A. Proton-dependent multidrug efflux systems. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 4, p. 575-608, 1996.

PEREIRA-FRANCHI, E. P. L. et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Brazilian primary health care system. **Tropical Medicine and International Health**, v. 24, n. 3, p. 339-347, 2019.

PERLAND, E. et al. Characteristics of 29 novel atypical solute carriers of major facilitator superfamily type: Evolutionary conservation, predicted structure and neuronal co-expression. **Open Biology**, v. 7, n. 9, p. 170142, 2017.

PETERSON, E.; KAUR, P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2928, 2018.

PIDDOCK, L. J. V. et al. Quinolone accumulation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n. 1, p. 61-70, 1999.

PIDDOCK, L. J. V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 382-402, 2006a.

PIDDOCK, L. J. V. Multidrug-resistance efflux pumps - Not just for resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 629-636, 2006b.

PITOUT, J. D. D.; DEVINNEY, R. *Escherichia coli* ST131: A multidrug-resistant clone primed for global domination. **F1000Research**, v. 6, 2017.

POLLITT, E. J. G. et al. *Staphylococcus aureus* infection dynamics. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 6, p. e1007112, 2018.

PONTES, D. S. et al. Genetic Mechanisms of Antibiotic Resistance and the Role of Antibiotic Adjuvants. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 42-74, 2018.

POOLE, K. et al. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for



involvement of an efflux operon. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 22, p. 7363-7372, 1993.

POOLE, K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2233-2241, 2000.

POOLE, K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 255-264, 2001.

POOLE, K. **Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms** **Annals of Medicine**, v. 39, n. 3, p. 162-176, 2007.

POOLE, K. Bacterial multidrug efflux pumps serve other functions. **Microbe**, v. 3, n. 4, p. 179-185, 2008.

POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. In: **Antibiotic Discovery and Development**. Springer, Boston, MA, 2012. p. 349-395.

POOLE, K.; LOMOVSKAYA, O. Can efflux inhibitors really counter resistance? **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 3, n. 2, p. 145-152, 2006.

POOLE, K.; SRIKUMAR, R. Multidrug Efflux in *Pseudomonas aeruginosa* Components, Mechanisms and Clinical Significance. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 59-71, 2001.

POOLMAN, B.; KONINGS, W. N. **Secondary solute transport in bacteria** **BBA - Bioenergetics**, v. 1183, n. 1, p. 5-39, 1993.

PRANDOTA, J. Furosemide: progress in understanding its diuretic, anti-inflammatory, and bronchodilating mechanism of action, and use in the treatment of respiratory tract diseases. **American journal of therapeutics**, v. 9, n. 4, p. 317-328, 2002.

PROJAN, S. J.; NOVICK, R. Comparative analysis of five related staphylococcal plasmids. **Plasmid**, v. 19, n. 3, p. 203-221, 1988.

PROUTY, A. M. et al. Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella typhimurium*. **Microbiology**, v. 150, n. 4, p. 775-783, 2004.

PU, Y. et al. Enhanced Efflux Activity Facilitates Drug Tolerance in Dormant Bacterial Cells. **Molecular Cell**, v. 62, n. 2, p. 284-294, 2016.

PU, Y.; KE, Y.; BAI, F. Active efflux in dormant bacterial cells – New insights into antibiotic persistence. **Drug Resistance Updates**, v. 30, p. 7-14, 2017.

PURSSELL, A.; POOLE, K. The NfxB repressor of the mexCD-oprJ multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 159, n. Pt\_10, p. 2058-2073, 2013.

PUTMAN, M.; VAN VEEN, H. W.; KONINGS, W. N. Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 672-

693, 2000.

RABOISSON, P. et al. Identification of novel short chain 4-substituted indoles as potent  $\alpha\beta 3$  antagonist using structure-based drug design. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 334-343, 2007.

RAHMAN, T.; YARNALL, B.; DOYLE, D. A. Efflux drug transporters at the forefront of antimicrobial resistance. **European Biophysics Journal**, v. 46, n. 7, p. 647-653, 2017.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 6, p. 151-171, 2010.

RAMOS, J. L. et al. Mechanisms of Solvent Tolerance in Gram-Negative Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 743-768, 2002.

RASIGADE, J. P.; VANDENESCH, F. *Staphylococcus aureus*: A pathogen with still unresolved issues. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 510-514, 2014.

RASMUSSEN, G. et al. Long term molecular epidemiology of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia isolates in Sweden. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e114276, 2014.

RATHI, E.; KUMAR, A.; KINI, S. G. Computational approaches in efflux pump inhibitors: current status and prospects. **Drug Discovery Today**, 2020.

REAGAN, D. R. et al. Elimination of coincident *Staphylococcus aureus* nasal and hand carriage with intranasal application of mupirocin calcium ointment. **Annals of Internal Medicine**, v. 114, n. 2, p. 101-106, 1991.

RECSEI, P. et al. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agr. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 202, n. 1, p. 58-61, 1986.

REDDY, V. S. et al. The major facilitator superfamily (MFS) revisited. **FEBS Journal**, v. 279, n. 11, p. 2022-2035, 2012.

REES, D. C.; JOHNSON, E.; LEWINSON, O. ABC transporters: The power to change. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 3, p. 218-227, 2009.

REISSERT, A. Ueber Di-( $\gamma$  - amidopropyl) essigsäure (Diamino.1.7.heptanmethylsäure.4) und ihr inneres Condensationsproduct, das Octohydro.1.8.naphtyridin. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 26, n. 2, p. 2137-2144, 1893.

RELMAN, D. A.; LIPSITCH, M. Microbiome as a tool and a target in the effort to address antimicrobial resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 51, p. 12902-12910, 2018.

RENAU, T. E. et al. Inhibitors of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* potentiate the activity of the fluoroquinolone antibacterial levofloxacin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 24, p. 4928-4931, 1999.

RENAU, T. E. et al. Conformationally-restricted analogues of efflux pump inhibitors that potentiate the activity of levofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 16, p. 2755-2758, 2003.

REYNOLDS, E.; ROSS, J. I.; COVE, J. H. Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: Incomplete transporters? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 3, p. 228-236, 2003.

RICE, A. et al. Chemical modification of paclitaxel (taxol) reduces P-glycoprotein interactions and increases permeation across the blood-brain barrier *in vitro* and *in situ*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 832-838, 2005.

ROBERTS, M. C. Tetracycline resistance determinants: Mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 1-24, 1996.

ROBERTS, M. C. et al. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 12, p. 2823-2830, 1999.

ROBERTS, M. C. Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, n. 2, p. 195-203, 2005.

ROBERTS, S.; CHAMBERS, S. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue. **Internal Medicine Journal**, v. 35, p. S97-105, 2005.

ROCCARO, A. S. et al. Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 1968-1973, 2004.

RODANICHE, E. C.; KIRSNER, J. B. The Effect of Sulfonamide Compounds on the Growth of *Endamoeba histolytica* in Culture. **The Journal of Parasitology**, v. 28, n. 6, p. 441-449, 1942.

ROLAND, S. et al. The characteristics and significance of sulfonamides as substrates for *Escherichia coli* dihydropteroate synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 20, p. 10337-10345, 1979.

ROMA, G. et al. 1,8-Naphthyridines VII. New substituted 5-amino[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,8]naphthyridine-6-carboxamides and their isosteric analogues, exhibiting notable anti-inflammatory and/or analgesic activities, but no acute gastrolesivity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 8, p. 1665-1680, 2008.

ROSS, J. I. et al. Characterisation and molecular cloning of the novel macrolide-streptogramin b resistance determinant from *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 24, n. 6, p. 851-862, 1989.

ROSS, J. I. et al. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 1207-1214, 1990.

ROSS, J. I. et al. Identification of a chromosomally encoded ABC-transport system with which the staphylococcal erythromycin exporter MsrA may interact. **Gene**, v. 153, n. 1, p. 93-98, 1995.

ROSS, J. I. et al. Minimal functional system required for expression of erythromycin resistance by *msrA* in *Staphylococcus aureus* RN4220. **Gene**, v. 183, n. 1-2, p. 143-148, 1996.

ROUQUETTE-LOUGHLIN, C. et al. The NorM efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* recognizes antimicrobial cationic compounds. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 3, p. 1101-1106, 2003.

RUGGERONE, P. et al. RND Efflux Pumps: Structural Information Translated into Function and Inhibition Mechanisms. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 24, p. 3079-3100, 2013.

SABATINI, S. et al. Pyrazolo[4,3-c ][1,2]benzothiazines 5,5-dioxide: A promising new class of *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 3568-3572, 2012.

SABIN, A. B.; WARREN, J. Therapeutic Effectiveness of Certain Sulfonamides on Infection by an Intracellular Protozoon (*Toxoplasma*). **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 51, n. 1, p. 19-23, 1942.

SABNIS, R. W. **Handbook of Biological Dyes and Stains: Synthesis and Industrial Applications**. John Wiley & Sons, 2010.

SAIER, M. H.; PAULSEN, I. T. Phylogeny of multidrug transporters. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, Academic Press, 2001. p. 205-213.

SAMOSORN, S. et al. Synthesis of functionalised 2-aryl-5-nitro-1H-indoles and their activity as bacterial NorA efflux pump inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 3, p. 857-865, 2006.

SANCHEZ, E.; DORON, S. Bacterial Infections: Overview. In: **International Encyclopedia of Public Health**. 2016.

SÁNCHEZ, P.; LE, U.; MARTÍNEZ, J. L. The efflux pump inhibitor Phe-Arg- $\beta$ -naphthylamide does not abolish the activity of the *Stenotrophomonas maltophilia* SmeDEF multidrug efflux pump. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1042-1045, 2003.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. **Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens** **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

SANTILLI, A. A. et al. 2-Oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic Acid Derivatives with Potent Gastric Antisecretory Properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 12, p. 2270-2277, 1987.

SAUPE, T. B.; KLEBE, G.; SCHIRMER, U.; PAUL G.; KOBER, R.; WUERZER, B.; BERGHAUS, R.; MEYER, N.; WESTPHALEN, K. O. Heterocyclic sulfonamides. United States Patent. n° 4,999,045. mar, 1991, USA.

SAURIN, W.; HOFNUNG, M.; DASSA, E. Getting in or out: Early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. **Journal of Molecular Evolution**, v. 48, n. 1, p. 22-41, 1999.

SAVIC, M. et al. Determination of the target nucleosides for members of two families of 16s rRNA methyltransferases that confer resistance to partially overlapping groups of aminoglycoside antibiotics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 16, p. 5420-5431, 2009.

SCHINDLER, B. D. et al. Mutagenesis and modeling to predict structural and functional characteristics of the *Staphylococcus aureus* MepA multidrug efflux pump. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 3, p. 523-533, 2013.

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.

SCHLÜNZEN, F. et al. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. **Nature**, v. 413, n. 6858, p. 814-821, 2001.

SCHMITZ, F. J. et al. Relationship between mutations in the coding and promoter regions of the *norA* genes in 42 unrelated clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and the MICs of norfloxacin for these strains. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, n. 4, p. 561-563, 1998a.

SCHMITZ, F. J. et al. Relationship between ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin (BAY 12-8039) MICs and mutations in *grlA*, *grlB*, *gyrA* and *gyrB* in 116 unrelated clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 41, n. 4, p. 481-484, 1998b.

SCHULDINER, S.; LEBENDIKER, M.; YERUSHALMI, H. EmrE, the smallest ion-coupled transporter, provides a unique paradigm for structure-function studies. **Journal of Experimental Biology**, v. 200, n. 2, p. 335-341, 1997.

SCHWARZ-LINEK, U.; HÖÖK, M.; POTTS, J. R. Fibronectin-binding proteins of Gram-positive cocci. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 8, p. 2291-2298, 2006.

SCHWARZ, S. et al. Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic animals. **Veterinary Microbiology**, v. 63, n. 2-4, p. 217-227, 1998.

SCOZZAFAVA, A. et al. Anticancer and Antiviral Sulfonamides. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 11, p. 925-953, 2003.

SEAS, C. et al. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in Latin America: Results of a multinational prospective cohort study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 1, p. 212-222, 2018.

SEEGER, M. et al. The AcrB Efflux Pump: Conformational Cycling and Peristalsis Lead to Multidrug Resistance. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 9, p. 729-749, 2008.

SEKYERE, J. O.; AMOAKO, D. G. Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine (CCCP) reverses resistance to colistin, but not to Carbapenems and tigecycline in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 228, 2017.

SENEKJI, H. A. The effect of sulfanilamide and tryptaflavin on cultures of leishmania tropica. **Journal of Infectious Diseases**, v. 66, n. 2, p. 111-112, 1940.

SENNHAUSER, G. et al. Crystal Structure of the Multidrug Exporter MexB from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Molecular Biology**, v. 389, n. 1, p. 134-145, 2009.

SEYDEL, J. K. Sulfonamides, structure-activity relationship, and mode of action. Structural problems of the antibacterial action of 4-aminobenzoic acid (PABA) antagonists. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, n. 9, p. 1455-1478, 1968.

SHAKIL, S. et al. Aminoglycosides versus bacteria - A description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. **Journal of Biomedical Science**, v. 15, n. 1, p. 5-14, 2008.

SHARPLES, D.; BROWN, J. R. Correlation of the base specificity of DNA - intercalating ligands with their physico-chemical properties. **FEBS Letters**, v. 69, n. 1-2, p. 37-40, 1976.

SHERLOCK, M. H. et al. Antiallergy Agents. 1. Substituted 1,8-Naphthyridin-2(1H)-ones as Inhibitors of SRS-a Release. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 11, p. 2108-2121, 1988.

SHOAB AHMAD SHAH, S.; RIVERA, G.; ASHFAQ, M. Recent Advances in Medicinal Chemistry of Sulfonamides. Rational Design as Anti-Tumoral, Anti-Bacterial and Anti-Inflammatory Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 70-86, 2012.

SHOCKMAN, G. D.; BARREN, J. F. Structure, Function, and Assembly of Cell Walls of Gram-Positive Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 37, p. 501-527, 1983.

SIERRA, J. M. et al. Prevalence of two different genes encoding NorA in 23 clinical strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 145-146, 2000.

SILBERGELD, E. K.; GRAHAM, J.; PRICE, L. B. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. **Annual Review of Public Health**, v. 29, p. 151-169, 2008.

SINGH, K. V.; WEINSTOCK, G. M.; MURRAY, B. E. An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1845-1850, 2002.

SJUTS, H. et al. Molecular basis for inhibition of AcrB multidrug efflux pump by novel and powerful pyranopyridine derivatives. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 13, p. 3509-3514, 2016.

SMITH, H. J. et al. Dual activity of fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae*: The facts behind the claims. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 893-895, 2002.

SOMMER, M. O. A. et al. Prediction of antibiotic resistance: Time for a new preclinical paradigm? **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 689-696, 2017.

SPEER, B. S.; SHOEMAKER, N. B.; SALYERS, A. A. Bacterial resistance to tetracycline: Mechanisms, transfer, and clinical significance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, n. 4, p. 387-399, 1992.

SPINDLER, E. C. et al. Deciphering the mode of action of the synthetic antimicrobial peptide bac8c. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1706-1716, 2011.

SRIVASTAVA, S. et al. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Potent Antitumor Active Quinoline and Naphthyridine Derivatives. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 685-709, 2007a.

SRIVASTAVA, S. K. et al. Anticancer and anti-inflammatory activities of 1,8-naphthyridine-3-carboxamide derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 23, p. 6660-6664, 2007b.

STONE, B. J.; MILLER, V. L. *Salmonella enteritidis* has a homologue of *tolC* that is required for virulence in BALB/c mice. **Molecular Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 701-712, 1995.

STRYJEWSKI, M. E.; COREY, G. R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An evolving pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. suppl\_1, p. S10-S19, 2014.

SUM, P. E.; PETERSEN, P. Synthesis and structure-activity relationship of novel glycylicycline derivatives leading to the discovery of GAR-936. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 10, p. 1459-1462, 1999.

SUN, J.; DENG, Z.; YAN, A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, n. 2, p. 254-267, 2014.

SUPURAN, C. T. **Carbonic anhydrase inhibition and the management of hypoxic tumors** *Metabolites*, v. 7, n. 3, p. 48, 2017.

SUZUKI, F. et al. New Bronchodilators. 3. Imidazo[4,5-c][1,8]naphthyridin-4(5H)-ones. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 26, p. 4866-4874, 1992.

SUZUKI, N. Synthesis of Antimicrobial Agents. V. Synthesis and Antimicrobial Activities of Some Heterocyclic Condensed 1,8-Naphthyridine Derivatives. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 3, p. 761-768, 1980.

SUZUKI, N.; TANAKA, Y.; DOHMORI, R. Synthesis of Antimicrobial Agents. IV. Synthesis and Antimicrobial Activities of Imidazo[4,5-b][1,8]naphthyridine Derivatives. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 1, p. 235-244, 1980.

SZAKÁCS, G. et al. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 9-10, p. 379-393, 2008.

TAL, N.; SCHULDINER, S. A coordinated network of transporters with overlapping specificities provides a robust survival strategy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 22, p. 9051-9056, 2009.

TALAN, D. A. et al. Comparison of *Staphylococcus aureus* from skin and soft-tissue infections in us emergency Department patients, 2004 and 2008. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 2, p. 144-149, 2011.

TAM, K.; TORRES, V. J. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. **Microbiology Spectrum**, p. 640-668, 2019.

TAMBER, S.; HANCOCK, R. E. W. On the mechanism of solute uptake in *Pseudomonas*. **Frontiers in Bioscience**, v. 8, p. s472-s483, 2003.

TAMURA, N. et al. Complete Cysteine-scanning Mutagenesis and Site-directed Chemical Modification of the Tn10-encoded Metal-Tetracycline/H<sup>+</sup> Antiporter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 23, p. 20330-20339, 2001.

TÄNGDÉN, T. et al. Frequent emergence of porin-deficient subpopulations with reduced carbapenem susceptibility in ESBL-producing *Escherichia coli* during exposure to ertapenem in an *in vitro* pharmacokinetic model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 6, p. 1319-1326, 2013.

TANI, J.; MUSHIKA, Y.; YAMAGUCHI, T. Studies on biologically Active Halogenated Compounds. IV. Synthesis and Antibacterial Activity of Fluorinated Quinoline Derivatives. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 10, p. 3530-3543, 1982.

TENNENT, J. M. et al. Physical and biochemical characterization of the *qacA* gene encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of General Microbiology**, v. 135, n. 1, p. 1-10, 1989.

TENSON, T.; LOVMAR, M.; EHRENBERG, M. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. **Journal of Molecular Biology**, v. 330, n. 5, p. 1005-1014, 2003.

TESTA, R. T. et al. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of the glycylycylines, a new class of semisynthetic tetracyclines. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 11, p. 2270-2277, 1993.

THAKKER, M. et al. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 11, p. 5183-5189, 1998.

WOODS, D.D. The Relation of p-aminobenzoic Acid to the Mechanism of the Action of Sulphanilamide. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 21, n. 2, p. 74, 1940.



THOMPSON, R. E. M.; RAE, J. NEGRAM (1-ethyl-7-methyl-1, 8-naphthyridine-4-one-3-carboxylic acid): A new antibacterial agent for the treatment of urinary infection Report of a Trial in General Practice. **British Journal of Urology**, v. 36, n. 1, p. 42-47, 1964.

TIKHONOVA, E. B.; YAMADA, Y.; ZGURSKAYA, H. I. Sequential mechanism of assembly of multidrug efflux pump AcrAB-TolC. **Chemistry and Biology**, v. 18, n. 4, p. 454-463, 2011.

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

TINTINO, S. R. et al. Tannic acid affects the phenotype of *Staphylococcus aureus* resistant to tetracycline and erythromycin by inhibition of efflux pumps. **Bioorganic Chemistry**, v. 74, p. 197-200, 2017.

TINTINO, S. R. et al. Vitamin K enhances the effect of antibiotics inhibiting the efflux pumps of *Staphylococcus aureus* strains. **Medicinal Chemistry Research**, v. 27, n. 1, p. 261-267, 2018.

TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia 10ª Edição**. [s.l.: s.n.].

TRAMPUZ, A. et al. Molecular and antibiofilm approaches to prosthetic joint infection. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. v. 414, p. 69-88, 2003.

TREFOUEL, J.; NITTI, F.; BOVET, D. Action of p-aminophenylsulfamide in experimental streptococcus infections of mice and rabbits. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales**, v. 120, p. 756-758, 1935.

TSENG, T. T. et al. The RND permease superfamily: An ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 107-125, 1999.

TSUKAGOSHI, N.; AONO, R. Entry into and release of solvents by *Escherichia coli* in an organic-aqueous two-liquid-phase system and substrate specificity of the AcrAB-TolC solvent-extruding pump. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 17, p. 4803-4810, 2000.

TSUZUKI, Y. et al. Synthesis and structure-activity relationships of 3-substituted 1,4-dihydro-4-oxo-1-(2-thiazolyl)-1,8-naphthyridines as novel antitumor agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 12, p. 3189-3193, 2004.

TURNER, N. A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 203-218, 2019.

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.

VAN BAMBEKE, F.; BALZI, E.; TULKENS, P. M. Antibiotic efflux pumps. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 457-470, 2000.

VAN BAMBEKE, F.; MICHOT, J. M.; TULKENS, P. M. Antibiotic efflux pumps in eukaryotic cells: Occurrence and impact on antibiotic cellular pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicodynamics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 5, p. 1067-1077, 2003.

VAN BAMBEKE, F.; PAGÈS, J.-M.; LEE, V. J. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 1, n. 2, p. 157-175, 2006.

VAN HOEK, A. H. A. M. et al. Acquired antibiotic resistance genes: An overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 203, 2011.

VAN VEEN, H. W. et al. Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 20, p. 10668-10672, 1996.

VARALDO, P. E.; MONTANARI, M. P.; GIOVANETTI, E. Genetic elements responsible for erythromycin resistance in streptococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 343-353, 2009.

VARGIU, A. V. et al. Molecular mechanism of MBX2319 inhibition of *Escherichia coli* AcrB multidrug efflux pump and comparison with other inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 6224-6234, 2014.

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

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. **Salud Publica de Mexico**, v. 47, n. 5, p. 381-387, 2005.

VESTER, B.; DOUTHWAITE, S. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 1-12, 2001.

VETTING, M. W. et al. Structure of QnrB1, a plasmid-mediated fluoroquinolone resistance factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 28, p. 25265-25273, 2011.

VISHWAKARMA, P. et al. Phylogenetic and conservation analyses of MFS transporters. **3 Biotech**, v. 8, n. 11, p. 1-14, 2018.

VIVEIROS, M. et al. Inducement and reversal of tetracycline resistance in *Escherichia coli* K-12 and expression of proton gradient-dependent multidrug efflux pump genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3578-3582, 2005.

VIVEIROS, M. et al. Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*.

**PLoS ONE**, v. 2, n. 4, p. e365, 2007.

VIVEIROS, M. et al. New Methods for the Identification of Efflux Mediated MDR Bacteria, Genetic Assessment of Regulators and Efflux Pump Constituents, Characterization of Efflux Systems and Screening for Inhibitors of Efflux Pumps. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 9, p. 760-778, 2008a.

VIVEIROS, M. et al. Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, n. 5, p. 458-462, 2008b.

VOGWILL, T. et al. Persistence and resistance as complementary bacterial adaptations to antibiotics. **Journal of evolutionary biology**, v. 29, n. 6, p. 1223-1233, 2016.

VON EIFF, C. et al. Nasal Carriage as a Source of *Staphylococcus aureus* Bacteremia . **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 1, p. 11-16, 2001.

WANG, B.; MUIR, T. W. Regulation of Virulence in *Staphylococcus aureus*: Molecular Mechanisms and Remaining Puzzles. **Cell Chemical Biology**, v. 23, n. 2, p. 214-224, 2016.

WANG, H. et al. Discovery of Imidazo[1,2- $\alpha$ ][1,8]naphthyridine Derivatives as Potential HCV Entry Inhibitor. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, n. 9, p. 977-981, 2015.

WANG, J. Analysis of macrolide antibiotics, using liquid chromatography-mass spectrometry, in food, biological and environmental matrices. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 28, n. 1, p. 50-92, 2009.

WANG, J. C. Variation of the average rotation angle of the DNA helix and the superhelical turns of covalently closed cyclic  $\lambda$  DNA. **Journal of Molecular Biology**, v. 43, n. 1, p. 25-39, 1969.

WANG, J. C. DNA topoisomerases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, n. 1, p. 635-692, 1996.

WANG, K. et al. The expression of ABC efflux pump, Rv1217c-Rv1218c, and its association with multidrug resistance of mycobacterium tuberculosis in China. **Current Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 222-226, 2013.

WANG, Z. et al. An allosteric transport mechanism for the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. **eLife**, v. 6, p. e24905, 2017.

WARING, M. J. Structural requirements for the binding of ethidium to nucleic acids. **BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis**, v. 114, n. 2, p. 234-244, 1966.

WARNER, D. M.; SHAFER, W. M.; JERSE, A. E. Clinically relevant mutations that cause derepression of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrC-MtrD-MtrE Efflux pump system confer different levels of antimicrobial resistance and *in vivo* fitness. **Molecular Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 462-478, 2008.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. Absence of mutations in *marRAB* or *soxRS* in *acrB*-

overexpressing fluoroquinolone-resistant clinical and veterinary isolates of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 5, p. 1550-1552, 2001.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 9-11, 2003.

WEIDENMAIER, C. et al. Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. **Nature Medicine**, v. 10, n. 3, p. 243-245, 2004.

WEISBLUM, B. Erythromycin resistance by ribosome modification. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 3, p. 577, 1995.

WHITE, D. G. et al. Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 19, p. 6122-6126, 1997.

WHO. Who Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed. 2017.

WIEDEMANN, B. et al.  $\beta$ -Lactamase induction and cell wall recycling in gram-negative bacteria. **Drug Resistance Updates**, v. 1, n. 4, p. 223-226, 1998.

WILLIAMS, P. D. et al. Potent and selective HIV-1 ribonuclease H inhibitors based on a 1-hydroxy-1,8-naphthyridin-2(1H)-one scaffold. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 22, p. 6754-6757, 2010.

WILSON, J. W. et al. Mechanisms of bacterial pathogenicity. **Postgraduate Medical Journal**, v. 78, n. 918, p. 216-224, 2002.

WINSTEL, V. et al. Wall teichoic acid glycosylation governs *Staphylococcus aureus* nasal colonization. **MBio**, v. 6, n. 4, 2015.

WITEK, K. et al. Phenylpiperazine 5,5-Dimethylhydantoin Derivatives as First Synthetic Inhibitors of Msr(A) Efflux Pump in *Staphylococcus epidermidis*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 17, p. 3788, 2020.

WRIGHT, G. D. Resisting resistance: New chemical strategies for battling superbugs. **Chemistry and Biology**, v. 7, n. 6, p. R127-R132, 2000.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1451-1470, 2005.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: The nexus of chemical and genetic diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 175-186, 2007.

WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance in the environment: A link to the clinic? **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 589-594, 2010a.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 5, n. 8, p.

779-788, 2010b.

WRIGHT, G. D. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Chemical Communications**, v. 47, n. 14, p. 4055-4061, 2011.

Y. MAHMOOD, H. et al. Current Advances in Developing Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 10, p. 1062-1081, 2016.

YAMAGUCHI, A.; NAKASHIMA, R.; SAKURAI, K. Structural basis of RND-type multidrug exporters. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 327, 2015.

YAMAGUCHI, A.; UDAGAWA, T.; SAWAI, T. Transport of divalent cations with tetracycline as mediated by the transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 9, p. 4809-4813, 1990.

YAMASAKI, S. et al. The crystal structure of multidrug-resistance regulator RamR with multiple drugs. **Nature Communications**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2013.

YAN, N. Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. **Annual Review of Biophysics**, v. 44, p. 257-283, 2015.

YANG, S.; CLAYTON, S. R.; ZECHIEDRICH, E. L. Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 545-556, 2003.

YERUSHALMI, H.; LEBENDIKER, M.; SCHULDINER, S. EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H<sup>+</sup> and is soluble in organic solvents. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 12, p. 6856-6863, 1995.

CHUNG, Y. J.; SAIER, J. SMR-type multidrug resistance pumps. **Current Opinion in Drug Discovery and Development**, v. 4, n. 2, p. 237-245, 2001.

YOSHIDA, H. et al. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* norA gene, which confers resistance to quinolones. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 12, p. 6942-6949, 1990.

YU, Z. et al. Polymyxin e induces rapid paenibacillus polymyxa death by damaging cell membrane while Ca<sup>2+</sup> can protect cells from damage. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0135198, 2015.

YUN, H. J. et al. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of DW286, a new fluoronaphthyridone antibiotic. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 9, p. 3071-3074, 2002.

ZAKAI, S. A. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization among medical students in Jeddah, Saudi Arabia. **Saudi Medical Journal**, v. 36, n. 7, p. 807, 2015.

ZALUCKI, Y. M.; DHULIPALA, V.; SHAFER, W. M. Dueling regulatory properties of a transcriptional activator (MtrA) and repressor (MtrR) that control efflux pump gene

expression in neisseria gonorrhoeae. **MBio**, v. 3, n. 6, 2012.

ZECHIEDRICH, E. L.; COZZARELLI, N. R. Roles of topoisomerase IV and during replication in *Escherichia coli*. **Genes and Development**, v. 9, n. 22, p. 2859-2869, 1995.

ZECHINI, B.; VERSACE, I. Inhibitors of Multidrug Resistant Efflux Systems in Bacteria. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 4, n. 1, p. 37-50, 2009.

ZENG, B. et al. Evaluation and target validation of indole derivatives as inhibitors of the AcrAB-TolC efflux pump. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 74, n. 11, p. 2237-2241, 2010.

ZGURSKAYA, H. I. et al. Structural and functional diversity of bacterial membrane fusion proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 5, p. 794-807, 2009.

ZGURSKAYA, H. I.; NIKAIDO, H. Multidrug resistance mechanisms: Drug efflux across two membranes. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 219-225, 2000.

ZHOU, K. et al. A review on nanosystems as an effective approach against infections of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 7333, 2018.

ZLOH, M.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S. Inhibitors of multidrug resistance (MDR) have affinity for MDR substrates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 4, p. 881-885, 2004.

## APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA MICROBIAL PATHOGENESIS

### Do 1,8-naphthyridine sulfonamides possess an inhibitory action against Tet(K) and MsrA efflux pumps in multiresistant *Staphylococcus aureus* strains?

Microbial Pathogenesis 147 (2020) 104268



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/micpath](http://www.elsevier.com/locate/micpath)



### Do 1,8-naphthyridine sulfonamides possess an inhibitory action against Tet (K) and MsrA efflux pumps in multiresistant *Staphylococcus aureus* strains?



Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino<sup>a,\*</sup>, Saulo Relison Tintino<sup>b</sup>, Débora Feitosa Muniz<sup>b</sup>, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>b</sup>, Raimundo Luiz Silva Pereira<sup>b</sup>, Iêda Maria Begnini<sup>c</sup>, Ricardo Andrade Rebelo<sup>c</sup>, Luiz Everson da Silva<sup>d</sup>, Sandro Lucio Mireski<sup>c</sup>, Michele Caroline Nasato<sup>c</sup>, Maria Isabel Lacowicz Krautler<sup>c</sup>, Pedro Silvano Pereira<sup>a</sup>, Alexandre Magno Rodrigues Teixeira<sup>e</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>f</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>b</sup>, Teresinha Gonçalves da Silva<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Pharmacotoxicological Prospecting of Bioactive Products, Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, UFPE, Recife, PE, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

<sup>c</sup> Department of Chemistry, Regional University of Blumenau, FURB, Itaipava Seca, 89030-903, Blumenau, SC, Brazil

<sup>d</sup> Postgraduate Program in Sustainable Territorial Development, Coastal Sector, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

<sup>e</sup> Laboratory of Simulations and Molecular Spectroscopy, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

<sup>f</sup> Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Antibacterial agent  
Bacterial resistance  
Efflux pump  
Ethidium bromide  
Synergism

#### ABSTRACT

Naphthyridines represent a class of heterocyclic compounds formed by two condensed aromatic rings. This study aimed to evaluate the antibacterial activity and *in vitro* inhibition of efflux resistance mechanisms of a series of 1,8-naphthyridine sulfonamides against strains carrying Tet(K) and MsrA efflux pumps. The efflux pump inhibitory capacity was evaluated by analyzing synergistic effects between 1,8-naphthyridine sulfonamides and standard antibiotics, as well as ethidium bromide. The following 1,8-naphthyridines were used: 4-methyl-N-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Naph 1); 2,5-Dichloro-N-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Naph 2); 2,3,4-trifluoro-N-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)benzenesulfonamide (Naph 7); 3-trifluoromethyl-N-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Naph 9). The 1,8-naphthyridine sulfonamide derivatives possessed a potential Tet(K) and MsrA efflux pump inhibitory action.

## APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA JOURNAL OF GLOBAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE (JAGAR)

### The 1,8-naphthyridines sulfonamides are NorA efflux pump inhibitors

Journal of Global Antimicrobial Resistance 24 (2021) 233–240



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Global Antimicrobial Resistance

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jgar](http://www.elsevier.com/locate/jgar)



### The 1,8-naphthyridines sulfonamides are NorA efflux pump inhibitors



Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino<sup>a,\*</sup>, Débora Feitosa Muniz<sup>b</sup>,  
Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>b</sup>, Raimundo Luiz Silva Pereira<sup>b</sup>,  
Iêda Maria Begnini<sup>c</sup>, Ricardo Andrade Rebelo<sup>c</sup>, Luiz Everson da Silva<sup>d</sup>,  
Sandro Lucio Mireski<sup>e</sup>, Michele Caroline Nasato<sup>f</sup>, Maria Isabel Lacowicz Krautler<sup>c</sup>,  
Pedro Silvino Pereira<sup>g</sup>, José Galberto Martins da Costa<sup>e</sup>,  
Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues<sup>e</sup>, Alexandre Magno Rodrigues Teixeira<sup>f</sup>,  
Jaime Ribeiro-Filho<sup>h</sup>, Saulo Relison Tintino<sup>b</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>h</sup>,  
Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>b</sup>, Teresinha Gonçalves da Silva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Pharmacotoxicological Prospecting of Bioactive Products, Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, UFPE, Recife, PE, Brazil

<sup>b</sup>Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

<sup>c</sup>Department of Chemistry, Regional University of Blumenau, FURB, Itaipava Soca, 89030-903, Blumenau, SC, Brazil

<sup>d</sup>Postgraduate Program in Sustainable Territorial Development, Coastal Sector, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

<sup>e</sup>Laboratory of Natural Products, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

<sup>f</sup>Laboratory of simulations and molecular spectroscopy, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

<sup>g</sup>Gonçalo Moutz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, IGM-Fiocruz, Salvador, BA, Brazil

<sup>h</sup>Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 21 April 2020

Received in revised form 24 October 2020

Accepted 30 November 2020

Available online 29 December 2020

##### Keywords:

Antibacterial agents  
Ethidium bromide fluorescence  
Molecular docking  
NorA efflux pump  
1,8-naphthyridines

#### ABSTRACT

**Objective:** Efflux pumps are transmembrane proteins associated with bacterial resistance mechanisms. Bacteria use these proteins to actively transport antibiotics to the extracellular medium, preventing the pharmacological action of these drugs. This study aimed to evaluate in vitro the antibacterial activity of 1,8-naphthyridines sulfonamides, as well as their ability to inhibit efflux systems of *Staphylococcus aureus* strains expressing different levels of the NorA efflux pump.

**Methods:** The broth microdilution test was performed to assess antibacterial activity. Efflux pump inhibition was evaluated in silico by molecular docking and in vitro by fluorometric tests, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined. The MIC was determined in the association between 1,8-naphthyridine and norfloxacin or ethidium bromide.

**Results:** The 1,8-naphthyridines did not show direct antibacterial activity. However, they effectively reduced the MIC of multidrug-resistant bacteria by associating with norfloxacin and ethidium bromide, in addition to increasing the fluorescence emission. In silico analysis addressing the binding between NorA and 1,8-naphthyridines suggests that hydrogen bonds and hydrophilic interactions represent the interactions with the most favourable binding energy, corroborating the experimental data.

**Conclusion:** Our data suggest that 1,8-naphthyridines sulfonamides inhibit bacterial resistance through molecular mechanisms associated with inhibition of the NorA efflux pump in *S. aureus* strains.

© 2020 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Antimicrobial Chemotherapy. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



## APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES

### Chemical synthesis, molecular docking and MepA efflux pump inhibitory effect by 1,8-naphthyridines sulfonamide

European Journal of Pharmaceutical Sciences 160 (2021) 105753



### Chemical synthesis, molecular docking and MepA efflux pump inhibitory effect by 1,8-naphthyridines sulfonamides

Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino<sup>a</sup>, Saulo Relison Tintino<sup>b</sup>, Débora Feitosa Muniz<sup>b</sup>, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>b</sup>, Raimundo Luiz Silva Pereira<sup>b</sup>, Iêda Maria Begnini<sup>c</sup>, Ricardo Andrade Rebelo<sup>c</sup>, Luiz Everson da Silva<sup>d</sup>, Sandro Lucio Mireski<sup>c</sup>, Michele Caroline Nasato<sup>c</sup>, Maria Isabel Lacowicz Krautler<sup>c</sup>, Pedro Silvino Pereira<sup>a</sup>, Tereza Cristina Leal Balbino<sup>e</sup>, José Galberto Martins da Costa<sup>f</sup>, Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues<sup>c</sup>, Alexandre Magno Rodrigues Teixeira<sup>g</sup>, Humberto Medeiros Barreto<sup>h</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>i</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>b,\*</sup>, Teresinha Gonçalves da Silva<sup>h</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Pharmacotoxicological Prospecting of Bioactive Products, Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, UFPE, Recife, PE, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

<sup>c</sup> Department of Chemistry, Regional University of Blumenau, FURB, Itaipava Sica, 89030-900, Blumenau, SC, Brazil

<sup>d</sup> Postgraduate Program in Sustainable Territorial Development, Coastal Sector, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

<sup>e</sup> Department of Microbiology, Oswaldo Cruz Foundation, Aggeu Magalhães Research Center, CPqAM/Facma, UFPE Campus, Recife, PE, Brazil

<sup>f</sup> Laboratory of Natural Products, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

<sup>g</sup> Laboratory of Simulations and Molecular Spectroscopy, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

<sup>h</sup> Laboratory of Microbiology, Federal University of Piauí, UFPI, Teresina, PI, Brazil

<sup>i</sup> Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Antibacterial agent  
Bacterial resistance  
Ethidium bromide  
Fluorescence  
SA-K2068  
MepA efflux pump

#### ABSTRACT

This study aimed to evaluate the antibacterial activity and to verify, *in silico* and *in vitro*, the inhibition of efflux mechanisms using a series of synthesized 1,8-naphthyridines sulfonamides against *Staphylococcus aureus* strains carrying MepA efflux pumps. The chemical synthesis occurred through the thermalolysis of the Meldrum's acid adduct. The sulfonamide derivatives were obtained by the sulfonylation of 2-amino-5-chloro-1,8-naphthyridine with commercial benzenesulfonyl chloride. Antibacterial activity was assessed by the broth microdilution test. Efflux pump inhibitory capacity was evaluated *in silico* by molecular docking and *in vitro* by analyzing synergistic effects on ciprofloxacin and ethidium bromide (EtBr) and by EtBr fluorescence emission assays. The following 1,8-naphthyridines were synthesized: 4-methyl-N-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Compound 10a); 2,5-dichloro-N-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Compound 10b); 4-fluoro-N-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Compound 10c); 2,3,4-trifluoro-N-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Compound 10d); 3-trifluoromethyl-N-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Compound 10e); 4-bromo-2,5-difluoro-N-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Compound 10f). The 1,8-naphthyridines derivatives associated with sulfonamides did not show antibacterial activity. However, they showed a favorable pharmacokinetic profile with possible MepA efflux pump inhibitory action, demonstrated in molecular docking. In addition to the promising results in reducing the concentration of intracellular EtBr, 1,8-naphthyridines act as putative agents in the inhibitory action of the MepA efflux pump.

**APÊNDICE D – PRODUÇÃO CIENTÍFICA OBTIDA DURANTE O PERÍODO DE  
DESENVOLVIMENTO DA TESE**

**ARTIGOS PUBLICADOS**

TINTINO, S. R.; **OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.**; CAMPINA, F. F.; COSTA, M. S.; MENEZES, I. R. A.; MATOS, Y. M. L. S.; CALIXTO-JUNIOR, J. T.; PEREIRA, P. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; LEAL-BALBINO, T. C.; COUTINHO, H. D.; BALBINO, V. Q. Tannic acid affects the phenotype of *Staphylococcus aureus* resistant to tetracycline and erythromycin by inhibition of efflux pumps. *BIOORGANIC CHEMISTRY*, v. 12, p. 197-200, 2017.

TINTINO, S. R.; **OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M.**; CAMPINA, F. F.; WESLEY LIMAVERDE, P.; PEREIRA, P. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; COUTINHO, H. D. M.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; DA SILVA, T. G.; LEAL-BALBINO, T. C.; BALBINO, V. Q. Vitamin K enhances the effect of antibiotics inhibiting the efflux pumps of *Staphylococcus aureus* strains. *MEDICINAL CHEMISTRY RESEARCH*, v. 27, p. 261-267, 2017.

LIMAVERDE, P. W.; CAMPINA, F. F.; DA CUNHA, F.A.B.; CRISPIM, F. D.; FIGUEREDO, F. G.; LIMA, L. F.; **OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M.**; DE MATOS, Y.M.L. S.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; MENEZES, I. R.A.; BALBINO, V. Q.; COUTINHO, H.D.M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; ALMEIDA, J.R.G.S.; TINTINO, S. R. Inhibition of the TetK efflux-pump by the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. and  $\alpha$ -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58. *FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY*, v. 109, p. 957-961, 2017.

PEREIRA, P S.; MAIA, A. J.; TINTINO, S. R.; **OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M.**; RAULINO, I. S. S.; VEGA, M. C.; ROLÓN, M.; CORONEL, C.; BARROS, L.M.; DUARTE, A. E.; MENEZES, I. R.A.; COUTINHO, H. D.M.; DA SILVA, T.G. Trypanocide, antileishmania and cytotoxic activities of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* L *in vitro*. *INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS*, v. 109, p. 724-729, 2017.

**OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.**; COUTINHO, H. D.; TINTINO, S. R.; SILVA, R. L. P.; FREITAS, T. S.; SILVA, M. A. P.; FRANCO, J. L.; CUNHA, F. A. B.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A.; BOLIGON, A. A.; ROCHA, J. B. T.; ROCHA, M. I.; SANTOS, J. F. S. Toxicity against *Drosophila melanogaster* and antiedematogenic and antimicrobial activities of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae). *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, p. 10353-10361, 2017.

BARBOSA, A.G.R.; **OLIVEIRA, C.D.M.**; LACERDA-NETO, L. J.; VIDAL, C.S.; SARAIVA, R.A.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H. D.M.; GALVAO, H. B.F.; MENEZES, I. R.A. Evaluation of chemical composition and antiedematogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 24, p. 355-361, 2017.

Anti-edematogenic and anti-inflammatory activity of the essential oil from *Croton rhamnifolioides* leaves and its major constituent 1,8-cineole (eucalyptol). *BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY*, v. 96, p. 384-395, 2017.

TINTINO, S.R.; **OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.**; CAMPINA, F.F.; COSTA, M.S.; CRUZ, R.P.; PEREIRA, R.L.S.; ANDRADE, J.C.; SOUSA, E.O.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; COUTINHO, H.D.M.; LEAL-BALBINO, T.C.; BALBINO, V.Q. Cholesterol and ergosterol affect the activity of *Staphylococcus aureus* antibiotic efflux pumps. *Microbial Pathogenesis*, v. 104, p. 133-136, 2017.

NASCIMENTO, E; AQUINO, P. E. A.; PEREIRA, N. L. F.; ANDRADE, J. C.; **OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.**; GUEDES, T. T. A. M.; DE SOUSA JUNIOR, D. L.; COUTINHO, H. D.M.; MENEZES, I. R. A.; VERAS, H. N. H. Estudo fitoquímico e potencial antibacteriano do látex de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. *BIOTA AMAZÔNIA*, v. 8, p. 28-32, 2018.

PEREIRA, P S.; MAIA, A. J.; DUARTE, A. E.; **OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.**; TINTINO, S.R.; BARROS, L M.; VEGA-GOMEZ, M C.; ROLÓN, M.; CORONEL, C.; COUTINHO, H.D.M.; DA SILVA, T. G. Cytotoxic and anti-kinetoplastid potential of the essential oil of *Alpinia speciosa* K. Schum. *FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY*, v. 119, p. 387-391, 2018.

QUEIROZ DIAS, D; SALES, DL; ANDRADE, JC; DA SILVA, ARP; TINTINO, SR; **OLIVEIRA-TINTINO, CDM**; ARAÚJO DELMONDES, G; GADELHA ROCHA, MF; DA COSTA, JGM; DA NÓBREGA ALVES, RR; SILVA FERREIRA, F; COUTINHO, HDM; ALMEIDA, WO. Body fat modulated activity of *Gallus gallus* domesticus Linnaeus (1758) and *Meleagris gallopavo* Linnaeus (1758) in association with antibiotics against bacteria of veterinary interest. MICROBIAL PATHOGENESIS, v. 124, p. 163-169, 2018.

**OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.**; TINTINO, SR; LIMAVERDE, P W.; FIGUEREDO, FG.; CAMPINA, F F.; DA CUNHA, F.A.B.; DA COSTA, R. H.S.; PEREIRA, PS; LIMA, L. F.; DE MATOS, Y.M.L.S.; COUTINHO, HDM; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; BALBINO, V. Q.; DA SILVA, TG. Inhibition of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L. and  $\alpha$ -terpinene on the NorA efflux-pump of *Staphylococcus aureus*. FOOD CHEMISTRY, v. 262, p. 72-77, 2018.

**OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.**; PESSOA, RT; FERNANDES, MNM; ALCÂNTARA, IS; DA SILVA, BAF; DE OLIVEIRA, MRC; MARTINS, AOBPB; DA SILVA, MS; TINTINO, SR; RODRIGUES, FFG; DA COSTA, JGM; DE LIMA, SG; KERNTOPF, MR; DA SILVA, TG; DE MENEZES, IRA. Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the *Croton campestris* A. St.-Hil (Euphorbiaceae) essential oil and the compound  $\beta$ -caryophyllene in *in vivo* models. PHYTOMEDICINE, v. 41, p. 82-95, 2018.

MARTINS, AOBPB.; SIEBRA, A. L. A.; **OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.**; LEITE, G. O.; COUTINHO, H. D.; ATHAYDE, M. L.; BOLIGON, A.; ANDRADE, J. C.; KERNTOPF, M. R.; BARBOSA, R.; SANTANA, F. R. A.; COUTINHO, T. S.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; MENEZES, I. R. A. Effect Antimicrobial, Gastroprotective and Healing of Hydroalcoholic Extract of *Astronium fraxinifolium*. Letters in Drug Design & Discovery, v. 14, p. 325-334, 2018.

PEREIRA, PS; DO CARMO ALVES DE LIMA, M; NETO, PP MARCELINO; **OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.**; TINTINO, SR; ALENCAR MENEZES, IR; OLIVEIRA, JF; MARCHAND, P; COUTINHO, HDM; DO DESTERRO RODRIGUES, M; SILVA, TG. Thiazolidinedione and thiazole derivatives potentiate norfloxacin activity against NorA efflux

pump over expression in *Staphylococcus aureus* 1199B strains. *BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY*, v. 1, p. 1, 2019.

REGUEIRA-NETO, M. S.; **OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.**; TINTINO, S R.; BALBINO, V. Q.; COUTINHO, H. D. Comparative analysis of the antibacterial activity and HPLC phytochemical screening of the Brazilian red propolis and the resin of *Dalbergia ecastaphyllum*. *Chemistry & Biodiversity*, 2019.

OLIVEIRA, MRC; BARROS, LM; DUARTE, AE; SILVA, MGL; DA SILVA, BAF; BEZERRA, AOBP; **OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.**; OLIVEIRA, VAP; BOLIGON, AA; KAMDEM, JP; COUTINHO, HDM; DE MENEZES, IRA. GC-MS Chemical Characterization and *In Vitro* Evaluation of Antioxidant and Toxic Effects Using *Drosophila melanogaster* Model of the Essential Oil of *Lantana montevidensis* (Spreng) Briq. *Medicina-Lithuania*, v. 55, p. 194, 2019.

SANTOS, E. S.; MENEZES, I. R. A.; NASCIMENTO, E. P.; CORREIA, D. B.; ALENCAR, C. D. C.; SOUSA, M. F.; LIMA, C. N. F.; MONTEIRO, A. B.; SOUZA, C. P. E.; DELMONDES, G. A.; BEZERRA, D. S.; GARCIA, F. A. O.; BOLIGON, A. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; FELIPE, C. F. B.; KERNTOPF, M. R.; **OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.** Anti-inflammatory activity of herb products from *Licania rigida* Benth.. *COMPLEMENTARY THERAPIES IN MEDICINE*, v. 45, p. 254-261, 2019.

QUEIROZ DIAS, D; SALES, DL; ANDRADE, JC; DA SILVA, ARP; TINTINO, SR; **OLIVEIRA-TINTINO, CDM**; ARAÚJO DELMONDES, G; GADELHA ROCHA, MF; DA COSTA, JGM; DA NÓBREGA ALVES, RR; SILVA FERREIRA, F; COUTINHO, HDM; ALMEIDA, WO. GC-MS analysis of the fixed oil from *Sus scrofa domesticus* Linneaus (1758) and antimicrobial activity against bacteria with veterinary interest. *CHEMISTRY AND PHYSICS OF LIPIDS*, v. 219, p. 23-27, 2019.

QUEIROZ DIAS, D; SALES, DL; ANDRADE, JC; DA SILVA, ARP; TINTINO, SR; **OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.**; ARAÚJO DELMONDES, G; DE OLIVEIRA BARBOSA, M; COUTINHO, HDM; FERREIRA, FS; ROCHA, MFG; NAVARRO, DMAF; DA ROCHA, SKL; DA COSTA, JGM; ALVES, RRN; ALMEIDA, WO. Antibacterial and

antibiotic modifying activity evaluation of ruminants' body fat used as zoonotherapeutics in ethnoveterinary practices in Northeast Brazil. *JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY*, v. 233, p. 87-93, 2019.

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

DA SILVA, M. M., DE ARAÚJO-NETO, J. B., DE ARAÚJO, A. C., FREITAS, P. R., **OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M.**, BEGNINI, I. M., REBELO, RICARDO A.; SILVA, LUIZ E. DA; MIRESKI, S. L.; NASATO, M. C.; KRAUTLER, M. I. L.; RIBEIRO FILHO, J.; COUTINHO, H. D. M.; TINTINO, S. R. Potentiation of Antibiotic Activity by a Meldrum's Acid Arylamino Methylene Derivative against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. *INDIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY*, p. 1-4, 2020.

FIGUEREDO, FG; RAMOS, I T.L.; PAZ, J A.; SILVA, T M.S.; CÂMARA, C A.; **OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.**; TINTINO, SR; DE FARIAS, PAM; MENEZES, IRA; COUTINHO, HDM; FONTELES, MMF. Effect of hydroxyamines derived from lapachol and norlachol against *Staphylococcus aureus* strains carrying the NorA efflux pump. *INFECTION GENETICS AND EVOLUTION*, v. 84, p. 104370, 2020.

**OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.**; TINTINO, SR; MUNIZ, DF; BARBOSA, CRS; PEREIRA, RLS; BEGNINI, IM; REBELO, RA; SILVA, LE; MIRESKI, SL; NASATO, MC; LACOWICZ KRAUTLER, MI; PEREIRA, PS; TEIXEIRA, AMR; MENEZES, IRA; COUTINHO, HDM; SILVA, TG. Do 1,8-naphthyridine sulfonamides possess an inhibitory action against Tet(K) and MsrA efflux pumps in multiresistant *Staphylococcus aureus* strains? *MICROBIAL PATHOGENESIS*, v. 147, p. 104268, 2020.

FIGUEREDO, F. G., RAMOS, I. T., PAZ, J. A., SILVA, T. M., CAMARA, C. A., **OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.**, TINTINO, SR ... FONTELES, M. M. D. F. *In silico*

evaluation of the antibacterial and modulatory activity of lapachol and nor-lapachol derivatives. MICROBIAL PATHOGENESIS, v. 144, p. 104181, 2020.

FREITAS, PR; ARAÚJO, ACJ; BARBOSA, CRS; MUNIZ, DF; DA SILVA, ACA; ROCHA, JE; **OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.**; RIBEIRO-FILHO, J; DA SILVA, LE; CONFORTIN, C; DO AMARAL, W; DESCHAMPS, C; BARBOSA-FILHO, JM; DE LIMA, NTR; TINTINO, SR; COUTINHO, HDM. GC-MS-FID and potentiation of the antibiotic activity of the essential oil of *Baccharis reticulata* (ruiz & pav.) pers. and  $\alpha$ -pinene. INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS, v. 145, p. 112106, 2020.

JUSTINO DE ARAÚJO, AC; FREITAS, PR; BARBOSA, CRS; MUNIZ, DF; ROCHA, JE; SILVA, ACA; **OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.**; RIBEIRO-FILHO, J; SILVA, LE; CONFORTIN, C; AMARAL, W; DESCHAMPS, C.; BARBOSA-FILHO, J.M; RAMOS DE LIMA, NT; TINTINO, SR; COUTINHO, HDM. GC-MS-FID characterization and antibacterial activity of the *Mikania cordifolia* essential oil and limonene against MDR strains. FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY, v. 136, p. 111023, 2020.

**ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO**

SANTOS JÚNIOR, J.G.A; FREITAS, P.R.; ROCHA, JE; SILVA PEREIRA, RL; **OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.**; GONÇALVES, VP; VIANA RODRIGUES, JP; COUTINHO, HDM; NICOLETE, R. Intrinsic modifying-antibiotic activity of a liposomal structure against MRSA and other MDR bactéria. **BIOCATALYSIS AND AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY**, 2020.



## RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS DURANTE O PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO DA TESE

TINTINO, S. R.; SILVA, M. R. P.; MARCELINO-NETO, P. P.; PEREIRA, P. S.; LIMAVERDE, P. W.; **OLIVEIRA, C. D. M.**; CUNHA, F. A. B.; COUTINHO, H. D. Avaliação do efeito do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. e do  $\alpha$ -terpineno sobre a cepa portadora da bomba de efluxo *Staphylococcus aureus* RN4220. In: VI Simpósio de Plantas Mediciniais do Vale do São Francisco, 2017, Juazeiro da Bahia. VI Simpósio de Plantas Mediciniais do Vale do São Francisco, 2017.

**OLIVEIRA, C. D. M.** Mechanism of anti-inflammatory action of *Croton campetris* essential oil and  $\beta$ -caryophyllene constituent. In: 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2017, Ribeirão Preto. 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2017.

MARTINS, A. O. B. P. B.; RODRIGUES, L. B.; **OLIVEIRA, C. D. M.**; ALCÂNTARA, ISABEL SOUSA; SILVA, M. S. A.; ALBUQUERQUE, T. R.; MENEZES, I. R. A.; QUINTANS-JUNIUR, L. J.; WANDERLEY, A. G. EFEITO ANTIEDEMATOGÊNICO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Croton rhamnifolioides* (QUEBRA-FACA). In: VI Simpósio de Plantas Mediciniais do Vale do São Francisco, 2017, Juazeiro da Bahia. VI Simpósio de Plantas Mediciniais do Vale do São Francisco, 2017.

**OLIVEIRA, C. D. M.**; TINTINO, S. R.; LIMAVERDE, P. W.; PEREIRA, P. S.; SILVA, M. R. P.; MARCELINO-NETO, P. P.; COUTINHO, H. D.; MENEZES, I. R. A.; DA SILVA, T. G. Ação do óleo essencial de folhas de *Chenopodium ambrosioides* l. e do  $\alpha$ -terpineno frente à cepa de *Staphylococcus aureus* portadora de bomba de efluxo NorA. In: VI Simpósio de Plantas Mediciniais do Vale do São Francisco, 2017, Juazeiro da Bahia. VI Simpósio de Plantas Mediciniais do Vale do São Francisco, 2017.

PAIVA, A. S. M.; **OLIVEIRA, C. D. M.** Estadiamento do câncer de colo do útero: Uma revisão de literatura. In: XXVIII Congresso brasileiro de anatomia, XXXIX Congresso chileno de anatomia e IV Encontro de ligas estudantis, 2018.

ARAUJO, L. C.; **OLIVEIRA, C. D. M.** Estenose Craniofacial e suas particularidades anatômicas no caso de intervenções cirúrgicas. In: XXVIII Congresso brasileiro de anatomia, XXXIX Congresso chileno de anatomia e IV Encontro de ligas estudantis, 2018, João Pessoa.

**OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.** Antibacterial activity and potentialization of the antibiotic action of fruits of *Agave tequilana* FRONT TO *Pseudomonas aeruginosa* CEPAS. In: 1 st Brazil-France Symposium on Medicinal Chemistry. Drugs for Infectious Diseases and Cancer, 2019. 1 st Brazil-France Symposium on Medicinal Chemistry. Drugs for Infectious Diseases and Cancer.

**OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.** Evaluation of antibacterial and modifying activity of antibiotic action of fructans of *Agave tequilana* WEBER VAR. blue FRONT MULTIRESISTENT *Escherichia coli* STRAINS. In: 1 st Brazil-France Symposium on Medicinal Chemistry. Drugs for Infectious Diseases and Cancer, 2019. 1 st Brazil-France Symposium on Medicinal Chemistry. Drugs for Infectious Diseases and Cancer, 2019.

**OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.** Evaluation of antibacterial activity and action inhibitor of efflux pumps in *Staphylococcus aureus* strains by methanolic extracts obtained from fermentation of *Streptomyces* sp. In: 1 st Brazil-France Symposium on Medicinal Chemistry. Drugs for Infectious Diseases and Cancer, 2019. 1 st Brazil-France Symposium on Medicinal Chemistry. Drugs for Infectious Diseases and Cancer.

**OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.** Evaluation of the potential modifier of the action of aminoglycoside of a product obtained from the leaves of *Spondias tuberosa* associated with led. In: 1 st Brazil-France Symposium on Medicinal Chemistry. Drugs for Infectious Diseases and Cancer, 2019, Recife. 1 st Brazil-France Symposium on Medicinal Chemistry. Drugs for Infectious Diseases and Cancer, 2019.

**OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.** Avaliação da atividade anti-inflamatória do óleo essencial das folhas de *Lantana montevidensis* (SPRENG) BRIQ. no modelo de permeabilidade vascular. In: IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA. XXII Semana de Iniciação Científica da URCA e VII Semana de Extensão,, 2019. IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA. XXII Semana de Iniciação Científica da URCA e VII Semana de Extensão.

**OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.** Mechanism of chronic anti-inflammatory action of the essential oil of the leaves of *Lantana montevidensis* (Spreng) Briq. evaluated by granulomatous tissue formation. In: 51st Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2019. 51st Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2019.

**OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.** Avaliação dos possíveis mecanismos de ação da atividade antiedematogênica do óleo essencial das folhas de *Lantana montevidensis* (Spreng) Briq. In: VII Simpósio Plantas Medicinais do Vale do São Francisco e 1st France-Brazil Meeting on Natural Products, 2019, Petrolina. VII Simpósio Plantas Medicinais do Vale do São Francisco e 1st France-Brazil Meeting on Natural Products, 2019.