



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



JOSÉ BEZERRA DE ARAÚJO NETO

**CUMARINAS 3-SUBSTITUÍDAS COMO ADJUVANTES DE ANTIBIÓTICOS:  
AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN SILICO* COM BOMBAS DE EFLUXO E  $\beta$ -  
LACTAMASE DE *Staphylococcus aureus***

Recife

2024

JOSÉ BEZERRA DE ARAÚJO NETO

**CUMARINAS 3-SUBSTITUÍDAS COMO ADJUVANTES DE ANTIBIÓTICOS:  
AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN SILICO* COM BOMBAS DE EFLUXO E  $\beta$ -  
LACTAMASE DE *Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas

Área de concentração: Sistemas Biológicos

Orientador: Prof. Dr. Augusto Schrank

Coorientador: Prof. Dr. Saulo Relison Tintino

Recife

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Araújo Neto, José Bezerra de.

Cumarinas 3-substituídas como adjuvantes de antibióticos: avaliação in vitro e in silico com bombas de efluxo e b-lactamase de staphylococcus aureus / José Bezerra de Araújo Neto. - Recife, 2024.

99f.: il.

Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2024.

Orientação: Augusto Schrank.

Coorientação: Saulo Relison Tintino.

1. Derivados cumarínicos; 2. Resistência a antibióticos; 3. Sinergismo farmacológico; 4. Docagem molecular; 5. ADMET. I. Schrank, Augusto. II. Tintino, Saulo Relison. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

CDD 570

JOSÉ BEZERRA DE ARAÚJO NETO

**CUMARINAS 3-SUBSTITUÍDAS COMO ADJUVANTES DE ANTIBIÓTICOS:  
AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN SILICO* COM BOMBAS DE EFLUXO E  $\beta$ -  
LACTAMASE DE *Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Sistemas Biológicos

Aprovada em: 26/07/2024

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Augusto Schrank (Orientador)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Dra. Cícera Datiane de Moraes Oliveira Tintino (Examinadora Externa)

Universidade Regional do Cariri

---

Dra. Janaína Esmeraldo Rocha (Examinadora Externa)

Universidade Estadual do Ceará

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, à minha família e aos meus amigos por toda a ajuda, cada um à sua maneira, que me fez chegar à conclusão de mais uma etapa da minha formação acadêmica.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Augusto Schrank, por suas valiosas contribuições no desenvolvimento deste estudo, e ao meu coorientador, Prof. Dr. Saulo Relison Tintino, por todo suporte prestado durante o mestrado (e até mesmo antes de ele iniciar). Agradeço também ao Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino, pela receptividade e orientação no início do curso.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Cícera Datiane de Moraes Oliveira Tintino e Dra. Janaína Esmeraldo Rocha, pela disponibilidade em participar desse importante momento e pelas sugestões dadas com vistas à melhoria deste trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA), em especial ao Prof. Dr. Henrique Douglas Coutinho, pela colaboração fundamental para a realização desta pesquisa, e a Daniel Sampaio Alves e Gildênia Alves de Araújo, pelo auxílio na execução dos experimentos.

Ao Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (LQFar) da Universidade Federal de Alfnas (UNIFAL), na pessoa do seu coordenador, Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho, e dos pesquisadores Fernanda Reis Ribeiro e Guilherme Andrade Brancaglioni, pelo fornecimento das cumarinas avaliadas neste estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa.

## RESUMO

A resistência a antibióticos mediada por bombas de efluxo e  $\beta$ -lactamase contribui para a elevação dos riscos associados às infecções causadas por linhagens de *Staphylococcus aureus*. Pela inibição de tais mecanismos, cumarinas restauram o efeito das drogas contra esse patógeno Gram-positivo. Além disso, há evidências de que substituições no carbono 3 (C-3) tornam os derivados cumarínicos mais eficazes no controle de bactérias. O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* e *in silico* o potencial de cumarinas 3-substituídas como adjuvantes de antibióticos a partir de experimentos com *S. aureus*. Avaliaram-se as cumarinas 3-benzoil-8-metoxi-6-(prop-2-en-1-il)-2H-cromen-2-ona (C1), 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-(prop-2-en-1-il)-2H-cromen-2-ona (C2), 3-(4-aminobenzoil)-8-metoxi-6-(prop-2-en-1-il)-2H-cromen-2-ona (C3) e ácido 8-metoxi-2-oxo-6-(prop-2-en-1-il)-2H-cromen-3-carboxílico (C4). Para os ensaios *in vitro*, foram utilizadas as linhagens 1199B (transportador NorA), K2068 (transportador MepA), K4100 e K4414 ( $\beta$ -lactamase) de *S. aureus*. A partir da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das cumarinas, esses compostos foram associados, em concentração subinibitória (CIM/8), com os antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina e ampicilina e com o brometo de etídio (EtBr). Ensaios de emissão de fluorescência do EtBr e de permeabilidade de membrana também foram realizados com as cepas portadoras de bombas de efluxo NorA e MepA. As análises *in silico* compreenderam experimentos de docagem molecular com modelos dos transportadores NorA e MepA e da  $\beta$ -lactamase PC1 de *S. aureus* e a predição dos perfis de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) das cumarinas. Com  $CIM \geq 1.024 \mu\text{g/mL}$ , todas as cumarinas foram ineficazes no controle das linhagens de *S. aureus* por ação direta, porém, potencializaram o efeito dos antibióticos e do EtBr. Em *S. aureus* 1199B, as cumarinas reduziram a CIM da norfloxacin em 50% a 87,5% e do EtBr, em 50% a 75%. Taxas de redução de CIM de 50% a 75% também ocorreram na associação das cumarinas com ciprofloxacina e EtBr nos testes com *S. aureus* K2068. A redução da CIM da ampicilina variou de 50% a 87,5% e 87,5% a 93,75% nos ensaios com as linhagens K4100 e K4414 de *S. aureus*, respectivamente. A cumarina C1 apresentou os resultados mais significativos em todos os ensaios, além de elevar a emissão de fluorescência do EtBr em 40% (linhagem 1199B) e 20% (linhagem K2068) e não exercer ação sobre a permeabilidade da membrana. Os resultados da docagem

corroboraram os dados *in vitro*, pois, além de demonstrar afinidade com todos os modelos proteicos, as cumarinas interagiram com resíduos-chave para a inibição das bombas de efluxo NorA e MepA e da  $\beta$ -lactamase PC1. As predições farmacocinéticas revelaram que os compostos atendem aos critérios de *drug-likeness*, têm alta absorção intestinal, permeabilidade cutânea e baixa permeabilidade na barreira hematoencefálica e que a cumarina C4 não é substrato nem inibidor da glicoproteína-P e das isoenzimas do citocromo P450. Esse derivado também registrou o menor número de alertas de toxicidade. Os resultados deste trabalho evidenciam o potencial das cumarinas 3-substituídas avaliadas como inibidoras de bombas de efluxo e  $\beta$ -lactamase de *S. aureus*, as quais apresentam efeitos esperados para compostos utilizados como adjuvantes de antibióticos.

**Palavras-chave:** Derivados cumarínicos; Resistência a antibióticos; Sinergismo farmacológico; Docagem molecular; ADMET.

## ABSTRACT

Antibiotic resistance mediated by efflux pumps and  $\beta$ -lactamase contributes to increased risks associated with infections caused by strains of *Staphylococcus aureus*. By inhibiting such mechanisms, coumarins restore the effect of drugs against this Gram-positive pathogen. Furthermore, there is evidence that substitutions at carbon 3 (C-3) make coumarin derivatives more effective against bacteria. The objective of the present study was to evaluate *in vitro* and *in silico* the potential of 3-substituted coumarins as antibiotic adjuvants based on experiments with *S. aureus*. The coumarins 3-benzoyl-8-methoxy-6-(prop-2-en-1-yl)-2H-chromen-2-one (C1), 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-(prop-2-en-1-yl)-2H-chromen-2-one (C2), 3-(4-aminobenzoyl)-8-methoxy-6-(prop-2-en-1-yl)-2H-chromen-2-one (C3) and 8-methoxy-2-oxo-6-(prop-2-en-1-yl)-2H-chromene-3-carboxylic acid (C4) were evaluated. For *in vitro* assays, *S. aureus* strains 1199B (NorA transporter), K2068 (MepA transporter), K4100 and K4414 ( $\beta$ -lactamase) were used. From the determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of coumarins, these compounds were associated, in subinhibitory concentration (MIC/8), with the antibiotics norfloxacin, ciprofloxacin, and ampicillin and ethidium bromide (EtBr). EtBr fluorescence emission and membrane permeability assays were also performed with strains carrying NorA and MepA efflux pumps. The *in silico* analyses included molecular docking experiments with models of the NorA and MepA transporters and the  $\beta$ -lactamase PC1 from *S. aureus* and prediction of the absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADMET) profiles of coumarins. With MIC  $\geq$  1,024  $\mu\text{g/mL}$ , all coumarins were ineffective in controlling *S. aureus* strains by direct action. However, these compounds potentiated the effect of antibiotics and EtBr. Regarding *S. aureus* 1199B, coumarins reduced the MIC of norfloxacin by 50% to 87.5% and EtBr by 50% to 75%. MIC reduction rates of 50% to 75% also occurred in the association of coumarins with ciprofloxacin and EtBr in tests with *S. aureus* K2068. The reduction in ampicillin MIC ranged from 50% to 87.5% and 87.5% to 93.75% in tests with *S. aureus* strains K4100 and K4414, respectively. Coumarin C1 presented the most significant results in all tests, in addition to increasing the fluorescence emission of EtBr by 40% (strain 1199B) and 20% (strain K2068) and having no effect on membrane permeability. The docking results corroborated the *in vitro* data, as, in addition to demonstrating affinity with all protein models, the coumarins interacted with crucial residues for the inhibition of the NorA

and MepA efflux pumps and the PC1  $\beta$ -lactamase. Pharmacokinetic predictions revealed that the compounds meet the drug-likeness criteria, have high intestinal absorption, skin permeability, and low blood-brain barrier permeability, and that C4 coumarin is neither a substrate nor an inhibitor of P-glycoprotein and cytochrome P450 isoenzymes. This derivative also recorded the lowest number of toxicity alerts. The results of this study highlight the potential of 3-substituted coumarins evaluated as inhibitors of efflux pumps and  $\beta$ -lactamase of *S. aureus*, which present expected effects for compounds used as antibiotic adjuvants.

**Keywords:** Coumarin derivatives; Antibiotic resistance; Drug synergism; Molecular docking; ADMET.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
2.1	GERAL .....	13
2.2	ESPECÍFICOS .....	13
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	14
3.1	<i>Staphylococcus aureus</i> COMO AGENTE INFECCIOSO .....	14
3.2	RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS .....	16
<b>3.2.1</b>	<b>Bombas de efluxo</b> .....	16
3.2.1.1	Superfamília MFS e proteína NorA .....	18
3.2.1.2	Superfamília MATE e proteína MepA.....	20
<b>3.2.2</b>	<b><math>\beta</math>-lactamases</b> .....	21
3.2.2.1	$\beta$ -lactamase PC1 .....	23
3.3	INIBIDORES COMO ADJUVANTES DE ANTIBIÓTICOS .....	25
<b>3.3.1</b>	<b>Inibidores de bombas de efluxo</b> .....	26
<b>3.3.2</b>	<b>Inibidores de <math>\beta</math>-lactamases</b> .....	28
3.4	DERIVADOS CUMARÍNICOS COMO COMPOSTOS BIOATIVOS .....	29
<b>3.4.1</b>	<b>Propriedades antibacterianas de cumarinas 3-substituídas</b> .....	32
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
4.1	ARTIGO 1.....	35
4.2	ARTIGO 2.....	55
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	82
<b>6</b>	<b>SÚMULA CURRICULAR</b> .....	83
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	85

## 1 INTRODUÇÃO

As bactérias desempenham importantes papéis ecológicos, inclusive sendo benéficas aos seres humanos. Todavia, existem espécies capazes de causar danos aos hospedeiros (patógenos), o que envolve uma relação complexa entre as características do microrganismo, a susceptibilidade do hospedeiro, o seu microbioma e as condições ambientais (Bernardo-Cravo *et al.*, 2020). Ademais, o desequilíbrio dessas interações é intensificado pelas mudanças climáticas, resultando no aumento da incidência de doenças infecciosas (Mora *et al.*, 2022).

Os estudos iniciais sobre agentes antibacterianos ocorreram ainda no século XIX, mas a revolução da medicina proporcionada pelos antibióticos se estabeleceu somente após a descoberta da penicilina, utilizada desde 1940 (Spagnolo; Trujillo; Dennehy, 2021). A introdução dos antibióticos prolongou a expectativa de vida da população mundial, não apenas pela cura das infecções bacterianas até então letais, mas também por viabilizar a realização de procedimentos médicos como cirurgias complexas, inclusive de transplante de órgãos (Cook; Wright, 2022).

O uso indiscriminado de antibióticos contribuiu para a rápida perda de eficácia de muitos dos medicamentos, ao ponto de a resistência de bactérias patogênicas ser um dos maiores problemas de saúde pública do século XXI (Ding *et al.*, 2023). As estimativas mais recentes atribuem cerca de 1,27 milhões de mortes anuais à resistência a antibióticos e, em menos de três décadas, esse número pode chegar a 10 milhões por ano (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022).

Responsáveis por parcelas significativas dos índices de morbidade e mortalidade, os patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.) estão entre as principais ameaças à saúde humana (Aloke; Achilonu, 2023). Especialmente associadas a infecções hospitalares e capazes de evadir-se da ação de múltiplos antibióticos, essas espécies Gram-positivas e Gram-negativas são prioritárias na pesquisa e desenvolvimento de fármacos efetivos no combate de doenças causadas por bactérias resistentes (Denissen *et al.*, 2022).

*Staphylococcus aureus* se destaca no grupo ESKAPE devido à alta virulência e capacidade adaptativa, o que faz com que as defesas do hospedeiro não sejam eficientes na proteção de infecções de maior ou menor gravidade (Giulieri *et al.*, 2022; Sheppard, 2022). Além disso, o tratamento dessas infecções é dificultado pela

resistência de linhagens de *S. aureus* a antibióticos das classes dos glicopeptídeos, macrolídeos, aminoglicosídeos, oxazolidinonas, lincosamidas, cetolídeos, estreptograminas, lipopeptídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas e  $\beta$ -lactâmicos (Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2022).

Fluoroquinolonas são drogas de amplo espectro que exercem ação bactericida pela inibição de enzimas topoisomerase II, envolvidas na síntese de ácidos nucleicos (Bhatt; Chatterjee, 2022). O efeito desses antibióticos no controle de *S. aureus* é drasticamente reduzido pela superexpressão de bombas de efluxo, proteínas transmembranares que diminuem a concentração intracelular do fármaco a partir da sua extrusão (Sodhi; Singh, 2021). Pela atuação, frequência de detecção e número de estudos, NorA e MepA são dois dos transportadores mais relevantes de cepas de *S. aureus* (Lade; Joo; Kim, 2022; López *et al.*, 2020; Oliveira-Tintino *et al.*, 2023b).

Os  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos), inibidores da síntese da parede celular bacteriana, formam a classe mais utilizada na história da antibioticoterapia e o principal alvo da resistência de *S. aureus* (Alexander *et al.*, 2023; Turner *et al.*, 2022). Entre os mecanismos descritos para linhagens dessa bactéria Gram-positiva, está a atividade da  $\beta$ -lactamase PC1, que inativa os antibióticos através da hidrólise da ligação amida presente em seu núcleo característico, o anel  $\beta$ -lactâmico (Elfaky *et al.*, 2023).

Diante da ineficácia dos antibióticos no controle de linhagens bacterianas multirresistentes, o uso de adjuvantes surge como uma estratégia promissora (Kumar *et al.*, 2023). Esses compostos, comumente desprovidos de efeitos antibacterianos significativos, potencializam a atividade dos antibióticos por meio de aumento da permeabilidade (mediado por danos à membrana ou parede celular), inibição de enzimas envolvidas em diferentes processos metabólicos, modulação do sistema imunológico do hospedeiro ou interferência direta sobre mecanismos de resistência, como bombas de efluxo e  $\beta$ -lactamases (Dhanda; Acharya; Haldar, 2023).

Relevantes nesse contexto, cumarinas são compostos de origem natural ou sintética com potencial na restauração da sensibilidade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas a antibióticos (Liu *et al.*, 2023; Phougat *et al.*, 2016). Em estudos *in vitro* e *in silico* com linhagens resistentes de *S. aureus*, as cumarinas promovem a inibição de bombas de efluxo, inclusive NorA e MepA (Madeiro *et al.*, 2017; Martin *et al.*, 2023; Martin *et al.*, 2024), e modulação da resistência a  $\beta$ -lactâmicos, com evidência de atividade na  $\beta$ -lactamase PC1 (Manjunath *et al.*, 2024; Zuo *et al.*, 2016).

Desde que foi reconhecida a capacidade das cumarinas em controlar o desenvolvimento de bactérias patogênicas, de forma direta ou associadas a antibióticos, empreenderam-se esforços na busca por derivados cumarínicos de maior potência ou espectro de ação (Cheke *et al.*, 2022). De acordo com Ranjan Sahoo *et al.* (2021), entre as cumarinas sintéticas ou semissintéticas avaliadas em testes com linhagens bacterianas multirresistentes, resultados significativos foram obtidos com aquelas que possuíam substituições na posição C-3 do esqueleto cumarínico.

Apesar de estudos relatarem que cumarinas e seus derivados interferem na resistência de *S. aureus* mediada por bombas de efluxo e  $\beta$ -lactamase e que os compostos com modificações C-3 são mais eficazes no controle de bactérias resistentes a múltiplas drogas, não há trabalhos reunindo esses dois pontos. Portanto, a presente pesquisa é a primeira a reportar os efeitos de cumarinas 3-substituídas em bombas de efluxo e  $\beta$ -lactamase de *S. aureus*, explorando novas possibilidades estruturais no âmbito das investigações sobre adjuvantes de antibióticos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar *in vitro* e *in silico* o potencial de cumarinas 3-substituídas como adjuvantes de antibióticos a partir de experimentos com *S. aureus*.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar *in vitro* o efeito inibitório de cumarinas 3-substituídas sobre bombas de efluxo NorA e MepA e  $\beta$ -lactamase de *S. aureus*;
- Avaliar a especificidade do mecanismo de potencialização da atividade antibiótica por cumarinas 3-substituídas em linhagens portadoras de bombas de efluxo;
- Confrontar os dados obtidos por ensaios *in vitro* com os resultados de experimentos de docagem molecular;
- Determinar *in silico* os perfis farmacocinéticos e de toxicidade de cumarinas 3-substituídas.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 *Staphylococcus aureus* COMO AGENTE INFECCIOSO

O primeiro registro de *S. aureus* como agente infeccioso data de 1880, quando o cirurgião escocês Alexander Ogston isolou a bactéria do pus de um abscesso cirúrgico e a nomeou *Staphylococcus* pelo arranjo semelhante a cachos de uvas (do grego *staphyle*) e por sua morfologia esférica (cocos) (Milani *et al.*, 2023). Contudo, o registro formal da espécie ocorreu apenas em 1884 por Friedrich Rosenbach, que utilizou o epíteto específico “*aureus*” em alusão à coloração dourada das colônias (Adhikari, 2021).

Pertencente à família Staphylococcaceae, *S. aureus* é caracterizado como um microrganismo imóvel, não formador de esporos, anaeróbio facultativo, catalase-positivo e coagulase-positivo, característica que o difere de outros estafilococos (Toltzis, 2023). Essa espécie compõe a microbiota de cerca de 30% da população mundial, como comensal e colonizando principalmente a pele e o trato respiratório superior, mas com a possibilidade de colonizar quase todos os tecidos do hospedeiro devido à capacidade de obter nutrientes essenciais à sua sobrevivência (Ford; Hurford; Cassat, 2021; Potter *et al.*, 2020).

*Staphylococcus aureus* é também um dos principais patógenos humanos, o que torna a sua presença um fator de risco para o desenvolvimento de infecções (Howden *et al.*, 2023). As patologias mais leves causadas por essa bactéria são infecções de pele, como furúnculos, carbúnculos, impetigo, foliculite e erisipela. Entretanto, estas podem ser fontes de bacteremia (presença da bactéria na corrente sanguínea), responsável por elevar em 25% o risco de morte dos pacientes (Lam; Stokes, 2023). Endocardite, pneumonia, osteomielite, artrite séptica, intoxicação alimentar e síndrome do choque tóxico são outras enfermidades associadas a *S. aureus* (Pal *et al.*, 2023).

Toxinas, adesinas, proteínas de superfície e enzimas degradadoras são alguns dos fatores de virulência que contribuem para o êxito de *S. aureus* como patógeno, o qual tem a evasão das defesas do hospedeiro como etapa crucial para o estabelecimento da infecção (Vinodhini; Kavitha, 2024). Nesse contexto, *S. aureus* evita a morte por células de defesa através de diferentes mecanismos e fatores (Cheung; Bae; Otto, 2021; Pidwill *et al.*, 2021):

- i) Inibição do extravasamento, ativação e quimiotaxia de leucócitos: proteínas estafilocócicas semelhantes a superantígenos (SSL), toxina estafilocócica X (SeIX), proteína inibidora de quimiotaxia de *Staphylococcus* (CHIPS), estafopaina (protease) e lipase Geh.
- ii) Inibição da fagocitose por estruturas superficiais protetoras, agregação e formação de biofilme: adesina intercelular polissacarídica (PIA), coagulase, proteína de ligação ao fator de von Willebrand (vWbp), estafilotrombina, fator *clumping* A (ClfA) e proteínas de ligação à fibronectina (FnBPs).
- iii) Inibição da opsonização: proteína de superfície A (SpA), proteína estafilocócica de ligação à imunoglobulina (Sbi), inibidores estafilocócicos do complemento (SCIN), proteína extracelular de ligação ao fibrinogênio (Efb), adesina Cna e protease V8.
- iv) Inibição dos mecanismos de morte de leucócitos: estafiloxantina, catalase (KatA), alquil hidroperóxido redutase C (AhpC), inibidor estafilocócico de peroxidase (SPIN), fator de resistência a múltiplos peptídeos (MprF), proteína de adesão extracelular (Eap) e enzima AdsA.
- v) Eliminação direta de leucócitos por toxinas:  $\alpha$ -toxina, leucocidinas PVL, LukDE, LukAB, HlgAB e HlgCB, e modulinas solúveis em fenol (PSMs).

Os fatores de virulência mencionados ainda auxiliam a bactéria na invasão tecidual e nos processos de manutenção, internalização, persistência e distribuição da infecção (Cheung; Bae; Otto, 2021). Devido à matriz polimérica extracelular, os biofilmes, além de protegerem o microrganismo das defesas do hospedeiro e garantirem a manutenção da infecção, são preocupantes por dificultarem o tratamento com antibióticos (Idrees *et al.*, 2021). A invasão e sobrevivência de *S. aureus* em células do hospedeiro também são motivos de alerta, pois são eventos diretamente relacionados à cronicidade da infecção (Li *et al.*, 2022).

Ademais, *S. aureus* se tornou uma ameaça ainda mais significativa à saúde pública pela resistência a antibióticos adquirida por inúmeras cepas (Pal *et al.*, 2020a). O surgimento de linhagens resistentes é o maior desafio no controle dessa bactéria, pois até os mais novos antibióticos têm a eficácia reduzida em um curto espaço de tempo. Esse foi o caso da vancomicina, eficaz no tratamento de infecções por *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), mas logo teve o potencial diminuído pela ocorrência de *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA) (Cong; Yang; Rao, 2020).

## 3.2 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Espécies ou grupos bacterianos são naturalmente resistentes a determinadas classes de antibióticos, o que se conhece como resistência intrínseca/inata, resultado da incompatibilidade de propriedades físico-químicas ou mecanismo de ação das drogas com características estruturais ou funcionais das bactérias (Hasan; Dutta; Nguyen, 2022). O caso mais evidente é o de bactérias Gram-negativas, que impedem a entrada de antibióticos na célula, como os glicopeptídeos, devido à presença de uma membrana externa na constituição da sua parede celular (Impey *et al.*, 2020).

A resistência adquirida difere da anterior por ser uma propriedade de cepas específicas e ter a exposição aos antibióticos como um fator determinante (Harris *et al.*, 2023). Essa resistência decorre de mutações ou da transferência horizontal de genes (THG), que envolve elementos genéticos móveis como transposons, integrons e, sobretudo, plasmídeos (Urban-Chmiel *et al.*, 2022). Além dos mecanismos clássicos de conjugação, transdução e transformação, a THG também ocorre por meio de vesículas extracelulares, processo chamado de vesidução (Soler; Forterre, 2020).

Os mecanismos de resistência podem ser divididos em três grupos principais: os que reduzem a concentração intracelular dos antibióticos, como bombas de efluxo e alterações em porinas; os que inativam os antibióticos, por modificação química ou degradação enzimática; os que interferem nos sítios de ligação, por modificações estruturais ou proteção do alvo (Darby *et al.*, 2023; Pulingam *et al.*, 2022). Bombas de efluxo e  $\beta$ -lactamases têm destaque entre os mecanismos identificados em linhagens resistentes de diferentes patógenos (Kakoullis *et al.*, 2021).

### 3.2.1 Bombas de efluxo

Bombas de efluxo bacterianas desempenham importantes funções fisiológicas, como a proteção contra ácidos biliares, sais e hormônios de mamíferos, toxinas derivadas de vegetais e estresse oxidativo e nitrosativo, tolerância a hidrocarbonetos aromáticos, ao pH e à salinidade, exportação de ácidos graxos, secreção de moléculas envolvidas em interações bacterianas competitivas, sinalização celular, aquisição de íons metálicos, resistência a metais pesados, formação de biofilmes e efluxo de poliaminas, guanidina e metabólitos primários (Henderson *et al.*, 2021).

Apesar da relevância de tais funções para a sobrevivência bacteriana, as bombas de efluxo são amplamente estudadas pela extrusão de antibióticos e consequente progressão para altos níveis de resistência (Nishino *et al.*, 2021). A superexpressão dessas proteínas, que reduz significativamente a sensibilidade às drogas, tem um custo para os microrganismos, pois ao elevar o gasto energético e afetar a capacidade reprodutiva, demanda mecanismos reparatórios, onde são citados a aquisição de mutações compensatórias e o aumento da respiração celular (Ebbensgaard; Løbner-Olesen; Frimodt-Møller, 2020).

A regulação genética dos transportadores tem duas vias principais de ocorrência: a regulação mediada por ativadores ou repressores transcricionais com domínios de ligação ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e aos ligantes, os quais estão inseridos nos grupos AraC, MarR, MerR e TetR; a ativação de sistemas regulatórios de dois componentes formados por um sensor histidina quinase que, ao ser ativado, sofre autofosforilação e transfere o grupo fosforilado para um regulador de resposta com domínio de ligação ao DNA (De Gaetano *et al.*, 2023). Além da concentração de antibióticos, a regulação é ativada, por exemplo, por espécies reativas de oxigênio, biocidas, solventes orgânicos e variações de pH (Huang *et al.*, 2022).

As bombas de efluxo são agrupadas nas seguintes famílias: Superfamília de cassetes de ligação de adenosina trifosfato (ATP) (ABC), Superfamília de resistência-nodulação-divisão celular (RND), Família de pequena resistência a múltiplas drogas (SMR), Superfamília de efluxo de compostos antimicrobianos proteobacterianos (PACE), Superfamília dos facilitadores principais (MFS) e Superfamília de extrusão de múltiplas drogas e compostos tóxicos (MATE) (Gaurav *et al.*, 2023).

A classificação dos transportadores baseia-se em aspectos estruturais e formas de obtenção de energia (Brindangnanam *et al.*, 2022). A superfamília RND é a que possui a base estrutural mais característica, a qual se trata de um complexo tripartite formado por uma proteína de membrana externa, uma proteína de membrana interna e uma proteína acopladora periplasmática que une as anteriores (Colclough *et al.*, 2020). Em termos energéticos, a superfamília ABC é a única constituída por transportadores primários, ou seja, que obtêm energia a partir da hidrólise do ATP, todas as demais utilizam a força próton-motriz fornecida por H<sup>+</sup> ou pelo gradiente eletroquímico de Na<sup>+</sup> (transportadores secundários) (Sreekantan *et al.*, 2022).

Embora as bombas de efluxo estejam presentes na maioria das bactérias, existem diferenças quanto à distribuição e às características dessas proteínas entre

espécies Gram-positivas e Gram-negativas (Garcia *et al.*, 2022). Enquanto a superfamília RND é a principal contribuinte para a multirresistência de patógenos Gram-negativos, MFS é especialmente caracterizada em Gram-positivos. Ademais, transportadores ABC, com estrutura tripartite em Gram-negativos, consistem em proteínas únicas no grupo oposto (Huang *et al.*, 2022).

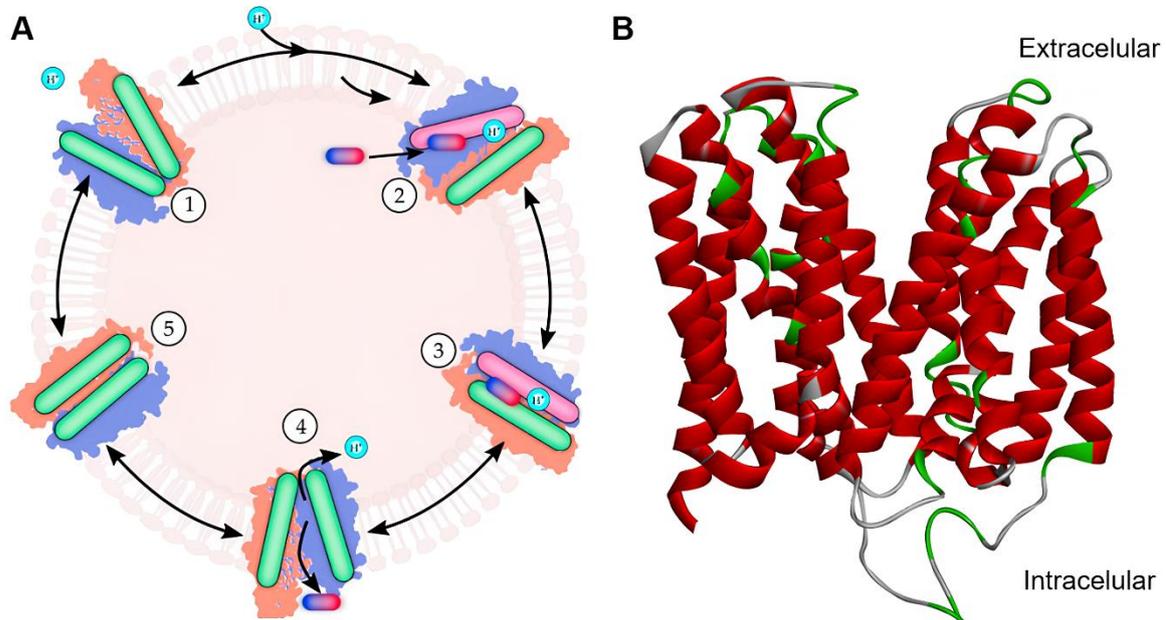
Com exceção da superfamília PACE, linhagens de *S. aureus* possuem transportadores de todos os demais grupos, cabendo a ressalva de que a bomba de efluxo FarE, única integrante de RND nessa espécie, não age sobre antibióticos (Schindler; Kaatz, 2016).  $\beta$ -Lactâmicos, estreptograminas, fenicóis, lincosamidas, macrolídeos, oxazolidinonas e tetraciclina são expelidos por bombas de efluxo de *S. aureus*, mas fluoroquinolonas predominam entre substratos, o que se deve aos membros das famílias MFS e MATE, que têm como principais representantes as proteínas NorA e MepA, respectivamente (Dashtbani-Roozbehani; Brown, 2021).

### 3.2.1.1 Superfamília MFS e proteína NorA

Transportadores MFS, ainda que considerados apenas aqueles presentes em bactérias, apresentam muitas diferenças entre si, a exemplo de características estruturais (p. ex., estrutura única em Gram-positivos e tripartite em Gram-negativos), substratos (p. ex., açúcares, aminoácidos, metabólitos intermediários, íons e agentes antimicrobianos) e as formas como estes são translocados (uniporte, simporte ou antiporte) (Henderson; Fendler; Poolman, 2019; Pasqua *et al.*, 2019). Contudo, a identificação dos membros dessa superfamília é possível devido às sequências de aminoácidos altamente conservadas, dentre as quais têm destaque os motivos A e C, sendo este último crucial para o efluxo de antibióticos (Varela *et al.*, 2023).

As bombas de efluxo envolvidas na resistência a múltiplas drogas compartilham a composição por 12 a 14 domínios transmembranares em  $\alpha$ -hélice (divididos em feixes N- e C-terminais com seis ou sete segmentos cada), a relevância dos resíduos hidrofóbicos no transporte e o funcionamento como antiportadores (Drew *et al.*, 2021). O processo de antiporte inicia com a ligação do íon (principalmente  $H^+$ ) no lado externo da proteína, o que aumenta a afinidade com o antibiótico no lado citoplasmático (Figura 1A). Íon e antibiótico são transportados simultaneamente e, finalizada a translocação, o transportador retorna à conformação inicial (Stephen *et al.*, 2023).

Figura 1 – A) Mecanismo de antiporte de MFS: 1 – Transportador na configuração “aberto para fora”, 2 - ligação do íon  $H^+$  na face externa aumenta a afinidade com o antibiótico no interior, 3 – estágio intermediário da translocação, 4 – liberação da droga e do íon, 5 – transportador vazio retornando à conformação inicial; B) Estrutura secundária da proteína NorA.



Fonte: Stephen *et al.* (2023, p. 347), O autor (2024).

NorA, uma das bombas de efluxo mais estudadas entre todas as superfamílias, é codificada pelo gene cromossômico *norA*, composta por 388 aminoácidos, 12 segmentos transmembranares (com uma grande alça citoplasmática) (Figura 1B) e utiliza o gradiente de prótons como fonte de energia (Ferreira *et al.*, 2022). Além das regiões conservadas típicas de MFS, esse transportador tem outras duas sequências denominadas Motivo-1 e Motivo-2, que fornecem estabilidade à proteína (Shang *et al.*, 2022).

A princípio, Brawley *et al.* (2022) identificaram 11 resíduos importantes para a atividade de NorA, foram eles: Phe16, Gly20 e Ile23 no segmento 1; Asn137 e Phe140 no segmento 5; Glu222 no segmento 7; Gln255 no segmento 8; Phe303, Phe306 e Asp307 no segmento 10; Thr336 no segmento 11. Analisadas as mutações nas respectivas posições, Glu222 e Asp307 foram considerados resíduos-chave para o transportador, com possível atuação no transporte de prótons.

Sob o controle dos reguladores MgrA, NorR e NorG, a bomba de efluxo NorA tem fluoroquinolonas como seus substratos entre os antibióticos, onde são identificadas norfloxacina, ciprofloxacina, enoxacina, ofloxacina, lomefloxacina e esparfloxacina (Hassanzadeh *et al.*, 2020; Schindler; Kaatz, 2016). Corantes, como

brometo de etídio e laranja de acridina, e biocidas, a exemplo do cloreto de benzalcônio, ceftrimida, acriflavina e brometo de tetrafenilfosfônio, também são expelidos por NorA (Shamkhi; Saadedin; Jassim, 2019; Stephen *et al.*, 2023).

### 3.2.1.2 Superfamília MATE e proteína MepA

As bombas de efluxo MATE são formadas por 12 segmentos transmembranares em  $\alpha$ -hélice divididos em uma porção N-terminal (segmentos 1 a 6) e outra C-terminal (segmentos 7 a 12) e são responsáveis pela extrusão de compostos xenobióticos e resíduos metabólicos, onde resíduos hidrofóbicos e ácidos desempenham importante papel no transporte dos substratos e íons (Brindangnanam *et al.*, 2022).

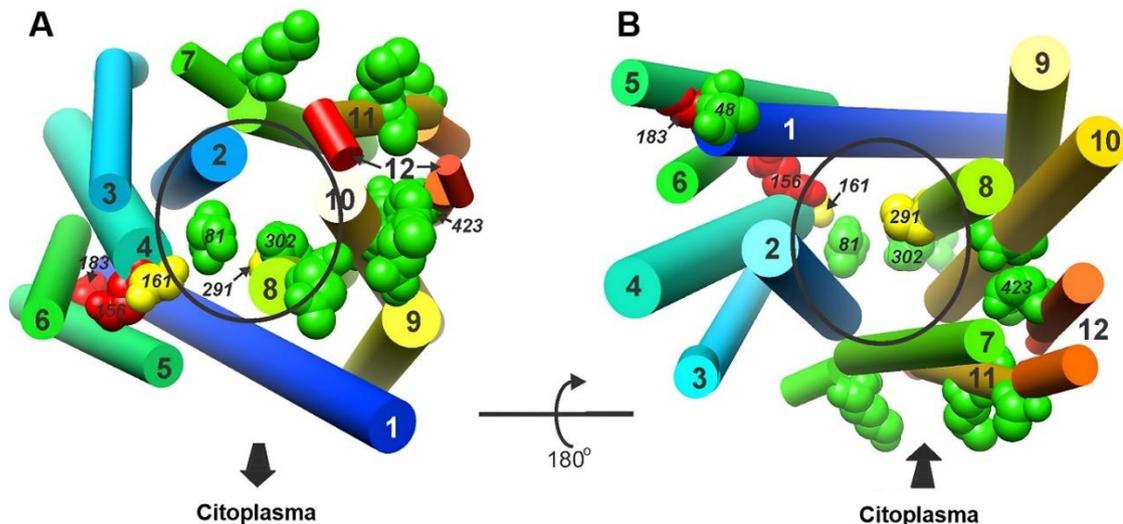
Medicamentos hidrofóbicos e catiônicos, como cimetidina, metformina, procainamida, aciclovir, cefalexina, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, estão entre os principais compostos sobre os quais essa superfamília atua (Kuroda; Tsuchiya, 2009; Kusakizako *et al.*, 2020). Assim como em MFS, essas bombas de efluxo funcionam como antiportadores, e a energia para a translocação dos substratos provém de íons  $\text{Na}^+$  ou  $\text{H}^+$  (Kim *et al.*, 2021).

Transportadores MATE são agrupados em três subfamílias: NorM, DinF e eMATE. As proteínas presentes em bactérias são encontradas nos dois primeiros grupos, DinF também abrange transportadores de arqueas e eMATE contém as proteínas de organismos eucarióticos (animais, vegetais, fungos e protozoários) (Miyachi *et al.*, 2017). Apesar de possuírem cerca de 40% de homologia em suas sequências, os integrantes da superfamília não possuem regiões conservadas universais, indício de que têm origens distintas (Nair; Lee; van Veen, 2016).

Composta por 451 aminoácidos, energizada pelo antiporte de  $\text{Na}^+$ , codificada pelo gene cromossômico *mepA* e regulada pelo repressor MepR, MepA é a única bomba de efluxo da superfamília MATE em *S. aureus* (Huang *et al.*, 2023; Kaatz; McAleese; Seo, 2005). Contra antibióticos, sua atividade é desempenhada sobre a tigeciclina, pertencente às gliciliclinas, e fluoroquinolonas, como ciprofloxacina, norfloxacina, moxifloxacina e esparfloxacina (Dabul *et al.*, 2018; Hassanzadeh *et al.*, 2020). Biocidas e corantes também são substratos de MepA, dentre eles: rodamina, acriflavina, pentamidina, cloreto de benzalcônio, dequalínio, tetrafenilfosfônio, cristal violeta, 4',6-diamidino-2-fenilindol e brometo de etídio (Banchs *et al.*, 2014).

O estudo de Schindler *et al.* (2013) fornece evidências sobre o funcionamento do transportador em questão. Dois resíduos, Glu156 e Asp183 (Figura 2), demonstraram-se cruciais para a atividade de MepA, uma vez que mutações nessas posições resultaram em perda de função. Outros resíduos, como Asp48, Ser81, Ala161, Met291, Ala302 e Glu423, também se destacaram nas análises, mas a proteína manteve a capacidade de efluir os substratos mesmo com trocas de aminoácidos nessas posições. A maneira exata como tais resíduos contribuem para o funcionamento da bomba de efluxo permanece incerta.

Figura 2 – Representação dos segmentos transmembranares de MepA, com a face citoplasmática voltada para a frente (A) e para trás (B), com resíduos-chave destacados em vermelho (cruciais), amarelo (relevância intermediária) e verde (menor grau de relevância)



Fonte: Schindler *et al.* (2013, p. 531)

### 3.2.2 $\beta$ -lactamases

Com cerca de 2.800 tipos descritos e estando entre as enzimas mais bem estudadas, as  $\beta$ -lactamases foram originadas muito antes do advento da antibioticoterapia, com ancestrais que datam de bilhões de anos (Egorov; Ulyashova; Rubtsova, 2020; Fröhlich *et al.*, 2021). As evidências apontam que essas enzimas surgiram em bactérias ambientais como forma de proteção contra compostos tóxicos produzidos por outros microrganismos, compostos estes que viriam a compor a classe de antibióticos conhecidos como  $\beta$ -lactâmicos (Bush, 2018).

Apesar do extenso histórico evolutivo, as  $\beta$ -lactamases começaram a ser investigadas apenas após a identificação de resistência em linhagens de bactérias patogênicas. No início, essas enzimas eram detectadas somente naquelas associadas a infecções nosocomiais, mas, progressivamente, tornaram-se comuns em casos de infecções comunitárias, ressaltando o avanço alarmante da resistência a antibióticos (Bush; Bradford, 2020).

Dois principais sistemas são utilizados para classificar  $\beta$ -lactamases: um é baseado em estrutura e outro, em critérios funcionais (Boyd *et al.*, 2020). O primeiro iniciou com Ambler (1980), que dividiu as enzimas, a partir das sequências de aminoácidos conhecidas, em classe A, com serina no sítio ativo, e classe B, com presença de cisteína e histidina e dependência de cofatores (íons metálicos – p. ex.,  $Zn^{2+}$ ). Posteriormente, descobriram-se novas serino- $\beta$ -lactamases, tipos AmpC e OXA, cujas disparidades com a classe A fizeram surgir as classes C e D, respectivamente (Huovinen; Huovinen; Jacoby, 1988; Jaurin; Grundström, 1981).

A classificação funcional de Bush, Jacoby e Medeiros (1995), atualizada por Bush e Jacoby (2010), considera os substratos e os inibidores das  $\beta$ -lactamases e, geralmente, tem correlação com o sistema anterior. O grupo 1 inclui as enzimas da classe C, que são mais ativas contra cefalosporinas e resistentes à inibição por ácido clavulânico e tazobactam. O grupo 3 abrange as metalo- $\beta$ -lactamases da classe B e é subdividido em 3a (inatividade apenas contra monobactâmicos) e 3b (hidrólise de carbapenêmicos), ambos inibidos por tazobactam e resistentes ao ácido clavulânico. Pela falta de consistência nos dados, o grupo 4 foi omitido no esquema mais recente.

O grupo 2 (classes A e D) possui a divisão mais complexa. As enzimas da classe A estão nos seguintes subgrupos (substratos entre parênteses): 2a (penicilinas), 2b (penicilinas e cefalosporinas de primeira geração), 2be (cefalosporinas e monobactâmicos), 2br (penicilinas), 2ber (cefalosporinas e monobactâmicos), 2c (carbenicilina), 2ce (carbenicilina e cefepima), 2e (cefalosporinas) e 2f (carbapenêmicos). A classe D está distribuída nos subgrupos 2d (cloxacilina e oxacilina), 2de (cefalosporinas) e 2df (carbapenêmicos). A resistência à inibição por tazobactam ocorre em todos os subgrupos, os quais, com exceção de 2br e 2ber, são sensíveis ao ácido clavulânico (Bush; Jacoby, 2010).

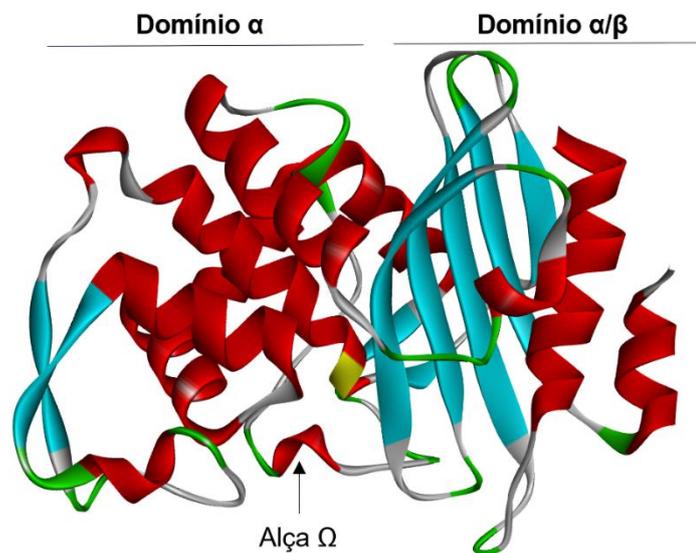
As enzimas produzidas por bactérias Gram-positivas correspondem às serino- $\beta$ -lactamases das classes A e D, e às metalo- $\beta$ -lactamases da classe B, com a vasta maioria pertencendo à primeira classe citada (Toth *et al.*, 2016). Presente em

linhagens de *S. aureus*, a enzima PC1 (ou BlaZ), codificada pelo gene *blaZ* (plasmidial ou cromossômico), é integrante da classe A ou grupo 2a (Bush; Bradford, 2020; Rocha *et al.*, 2022).

### 3.2.2.1 $\beta$ -lactamase PC1

A enzima PC1 tem estrutura dividida em um domínio  $\alpha$ , majoritariamente em  $\alpha$ -hélice, e um domínio  $\alpha/\beta$ , com porções em  $\alpha$ -hélice e folha- $\beta$  (cinco fitas). Em uma fenda entre os domínios está localizado o sítio ativo, que conta com a presença do resíduo catalítico Ser70 (Figura 3) (Philippon *et al.*, 2016). Dentre os 281 aminoácidos que a constituem, destacam-se resíduos conservados da classe A e relevantes para sua atividade: a tétrede iniciada por Ser70 e terminada por Lys73, as tríades Ser130-Asp131-Asn132 e Lys234-Thr/Ser-Gly236 e a alça  $\Omega$ , que conta com Glu166 e Asn170 (Biswal *et al.*, 2023; Carvajal *et al.*, 2020; Pereira *et al.*, 2018).

Figura 3 – Estrutura da enzima PC1 de *S. aureus* com o resíduo catalítico Ser70 destacado em amarelo



Fonte: O autor (2024).

Mesmo com registros em *Streptococcus* spp., *Enterococcus faecalis* e na espécie Gram-negativa *E. coli* (Ceci *et al.*, 2015; Kaczorek *et al.*; 2017; Lungu; Hutu; Barrow, 2023), essa  $\beta$ -lactamase é identificada principalmente em *Staphylococcus* spp. De 1946 a 1953, a detecção da penicilinase em estafilococos saltou de 14% para 80% (Barber; Whitehead, 1949; Medeiros, 1997). Em 2013, nos Estados Unidos, encontrou-se o gene *blaZ* em 86,5% dos isolados de *S. aureus* analisados por Richter

*et al.* (2016). Na mesma espécie, taxas semelhantes foram obtidas em países como Kuwait e China (Vali *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017).

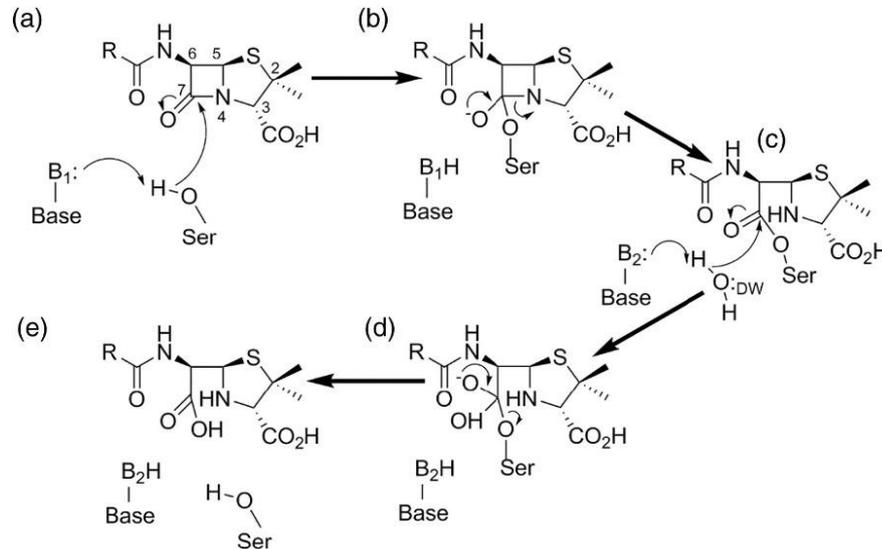
Ainda sobre *S. aureus*, é comum a detecção de PC1 em cepas MRSA, as quais, devido à presença do gene *mecA*, são resistentes a  $\beta$ -lactâmicos pela produção de proteínas de ligação à penicilina modificadas (Ali; Abdel Aziz, 2024; Arêde; Ministro; Oliveira, 2013). Além de atuarem contra a mesma classe de antibióticos, esses mecanismos apresentam similaridades estruturais e funcionais em seus sistemas regulatórios, o que permite que o sistema de *blaZ* seja um corregulador de *mecA* (Ersoy *et al.*, 2021; Kirmusaoğlu; Gareayaghi; Kocazeybek, 2019).

A regulação de PC1 envolve o operon *bla*, que inclui os genes *blaZ*, *blaR1* e *blaI* (Ivanovic *et al.*, 2023). O sensor transmembranar BlaR1, a partir da ligação do antibiótico na sua porção externa, ativa a metaloprotease de zinco presente em seu domínio intracelular. Essa enzima é responsável pela clivagem do repressor transcricional Blal, o que possibilita a expressão de *blaZ* (Masimen *et al.*, 2022). Após sua síntese, a  $\beta$ -lactamase é liberada no meio extracelular, como ocorre em enzimas típicas de Gram-positivos (Pimenta *et al.*, 2023).

Como mencionado anteriormente, as penicilinas são os principais substratos do grupo no qual PC1 é classificada. Dentre os antibióticos inseridos nessa subdivisão dos  $\beta$ -lactâmicos, as penicilinas naturais (p. ex., benzilpenicilina) e as aminopenicilinas (p. ex., ampicilina) são os principais alvos (Bush; Jacoby, 2010; Fisher; Mobashery, 2021; Lima *et al.*, 2020). Essa enzima possui atividade hidrolítica reduzida contra meticilina e oxacilina (penicilinas resistentes às penicilinases), cefalosporinas de primeira geração e carbapenêmicos (Lade; Kim, 2023; Nomura *et al.*, 2020).

O mecanismo de PC1 segue o padrão das serino- $\beta$ -lactamases, que possui fases de acilação e desacilação (Figura 4). Na primeira fase, o resíduo Ser70 é ativado e realiza o ataque nucleofílico ao carbono carbonílico do anel  $\beta$ -lactâmico, formando uma acil-enzima. Na etapa de desacilação, o ataque é efetuado por uma molécula de água previamente ativada, a qual promove a quebra da ligação amida estabelecida pelo átomo de carbono citado e a liberação do antibiótico do sítio ativo. A ativação de Ser70 e da molécula de água é atribuída a Lys73 e Glu166, respectivamente, mas ainda existem discussões sobre o papel exato desses resíduos (He *et al.*, 2020; Tooke *et al.*, 2019).

Figura 4 – Mecanismo hidrolítico de serino- $\beta$ -lactamases: (a) ativação de Ser70 pela base B1 e ataque nucleofílico ao carbono carbonílico, (b) formação da acil-enzima, (c) ativação da molécula de água pela base B2 e quebra da ligação amida do anel  $\beta$ -lactâmico, (d) estado de transição, (e) liberação do antibiótico degradado do sítio ativo



Fonte: Tooke *et al.* (2019, p. 3476).

### 3.3 INIBIDORES COMO ADJUVANTES DE ANTIBIÓTICOS

O desenvolvimento de drogas antibacterianas tradicionais, mesmo sem a repercussão observada no século XX, continua sendo uma estratégia de combate a bactérias multirresistentes (Dutescu; Hillier, 2021). Entre os anos de 2000 e 2021, foram lançados 44 antibióticos, a maioria classificada como quinolonas, todavia, não houve impacto significativo frente ao cenário crítico da saúde pública (Shi *et al.*, 2023). Diante disso, há a necessidade de formas mais eficazes de realizar o enfrentamento à resistência bacteriana (Chernov *et al.*, 2019).

Produção de drogas de espectro ultraestrito com o auxílio de técnicas moleculares, terapias alternativas (fagoterapia, uso de anticorpos e agentes imunomoduladores), ligação a alvos não convencionais, restauração da atividade antibiótica por terapia combinada (antibiótico + antibiótico ou antibiótico + adjuvante), sistemas de entrega de medicamentos e emprego de peptídeos antimicrobianos, nanomateriais metálicos, materiais fotossensíveis e polímeros catiônicos são meios estudados para aperfeiçoar o tratamento de doenças causadas por linhagens resistentes (Konwar *et al.*, 2022; Yao *et al.*, 2023).

No âmbito da busca por adjuvantes, sobressaem-se as substâncias que inibem mecanismos de resistência, as quais têm dois alvos principais: bombas de efluxo e enzimas degradadoras ou modificadoras (Chawla *et al.*, 2022). Não obstante o avanço das pesquisas no século XXI, os inibidores de bombas de efluxo permanecem restritos aos laboratórios (Verma; Tiwari; Tiwari, 2021). Em contraposição, os inibidores de  $\beta$ -lactamases são utilizados desde 1988. Contudo, a sua eficácia também é afetada pelo aparecimento de estirpes resistentes, de modo que o desenvolvimento de novos fármacos permanece necessário (Coelho; Mainardi, 2021; Papp-Wallace *et al.*, 2020).

### 3.3.1 Inibidores de bombas de efluxo

De acordo com Bhardwaj e Mohanty (2012), a resistência mediada por bombas de efluxo pode ser combatida através de: produção de novos antibióticos ou alteração da estrutura dos antibióticos existentes, a fim de que estes não sejam reconhecidos pelas proteínas; interferência na montagem dos transportadores, no caso dos que são tripartidos; inibição da expressão gênica; bloqueio da energia necessária para o funcionamento da bomba de efluxo; impedimento da ligação dos substratos à proteína, de modo competitivo (o sítio de ligação do inibidor é o mesmo do substrato) ou não competitivo (inibidor e substrato têm sítios de ligação diferentes).

Em experimentos laboratoriais, diferentes produtos se mostraram eficazes na inibição dos transportadores e são utilizados como compostos de referência em estudos afins. Esse é o caso de carbonil cianeto *m*-clorofenil hidrazona (CCCP), reconhecido como um forte desacoplador de energia (disruptor da força próton-motriz), da fenilalanina-arginina  $\beta$ -naftilamida (PA $\beta$ N), um inibidor competitivo, e de fármacos já aprovados para outros fins, como clorpromazina, reserpina, verapamil, proclorperazina, omeprazol e paroxetina (AlMatar *et al.*, 2021; Schindler; Kaatz, 2016; Sreekantan *et al.*, 2022; Zoaiter *et al.*, 2023).

A ausência de aprovação para esses e outros compostos ocorre porque, além de potencializar o efeito de antibióticos, um inibidor, seja ele natural, sintético ou semissintético, somente é considerado ideal se preencher determinados requisitos, a exemplo de: não exercer atividade antibacteriana direta, para que não haja seleção de linhagens resistentes; ser seletivo e não atuar sobre transportadores eucarióticos; possuir características farmacológicas ideais, como não ser tóxico, ter altos índices

terapêuticos e de segurança, perfil farmacocinético favorável e estabilidade sérica; apresentar produção economicamente viável (Sharma; Gupta; Pathania, 2019).

O potencial de candidatos a inibidores da atividade de bombas de efluxo pode ser avaliado de diferentes formas, dentre as quais predominam os métodos *in vitro*. Um dos mais aplicados consiste na associação dos antibióticos (substratos específicos) e do brometo de etídio (substrato universal) às substâncias de interesse, comumente testadas em concentrações subinibitórias para eliminar a possibilidade de efeitos antibacterianos intrínsecos. Espera-se que na presença de tais substâncias os substratos sejam mais ativos, o que é observado a partir da redução da sua concentração inibitória mínima (CIM) (Dias *et al.*, 2022; Kumar; Tudu, 2023).

Os estudos de De Araújo *et al.* (2016), Siqueira *et al.* (2021) e Oliveira-Tintino *et al.* (2023c) empregaram o método supracitado para demonstrar a capacidade inibitória de cumarinas, chalconas e terpenos sobre a bomba de efluxo NorA de *S. aureus* 1199B, com a norfloxacin utilizada como substrato específico. O mesmo ocorreu com a proteína MepA de *S. aureus* K2068 em pesquisas sobre produtos naturais e sintéticos, substituindo-se o antibiótico anterior por ciprofloxacina (Freitas *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2022). Clorpromazina e CCCP, previamente citados, foram usados como controles positivos nessas análises.

A inibição dos transportadores bacterianos também pode ser verificada pelo impacto dos compostos sobre a emissão de fluorescência do brometo de etídio, como realizado por De Oliveira *et al.* (2023) e Santana *et al.* (2024). Sabe-se que a intensidade da fluorescência aumenta quando o corante está no citoplasma ou periplasma, devido à intercalação com componentes celulares (p. ex., DNA), e que este, em doses subletais, é removido apenas por meio de efluxo ativo (Pal *et al.*, 2020b). Portanto, em caso de inibição de bombas de efluxo, a emissão de fluorescência é superior à registrada no controle negativo (Fujiwara *et al.*, 2022).

A docagem molecular é o método *in silico* aplicado para obter informações sobre a afinidade entre os possíveis inibidores e as proteínas, além de prover dados sobre as interações estabelecidas entre eles, levando em conta os parâmetros definidos (Samreen; Ahmad, 2023). A docagem pode ser livre ou “cega”, quando é considerado o transportador por completo (Muniz *et al.*, 2021), mas é desejável que as análises utilizem um sítio de ligação específico, para garantir a obtenção de resultados mais seguros (De Sousa *et al.*, 2024). Entretanto, a falta de conhecimento

sobre os papéis desempenhados pelos resíduos que constituem as bombas de efluxo inviabiliza o aperfeiçoamento de muitas das investigações (Reading *et al.*, 2020).

### 3.3.2 Inibidores de $\beta$ -lactamases

O ácido clavulânico, isolado de *Streptomyces clavuligerus*, e as sulfonas semissintéticas do ácido penicilânico, sulbactam e tazobactam, iniciaram a era de restauração da atividade dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Arer; Kar, 2023). Com efeitos sobre enzimas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, esses inibidores são mais eficazes contra serino- $\beta$ -lactamases, sobretudo as da classe A. Amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina/sulbactam e piperacilina/tazobactam são as combinações clássicas, contudo, os inibidores também são associados a ticarcilina, cefoperazona e ceftolozana, respectivamente (Carcione *et al.*, 2021).

O sucesso das associações ocorreu, em parte, pelo fato de os integrantes da primeira geração também serem  $\beta$ -lactâmicos (Chawla *et al.*, 2022). Todavia, para reduzir a probabilidade de degradação enzimática, o ideal é que os inibidores possuam estruturas diferentes dos substratos (Egorov; Ulyashova; Rubtsova, 2020). Nesse sentido, os membros das gerações mais recentes são baseados em diazabiciclooctano (p. ex., avibactam, relebactam e durlobactam) e derivados de ácidos borônicos (p. ex., vaborbactam e taniborbactam), os quais têm alvos e combinações diferentes dos supracitados (Luci *et al.*, 2021).

Embora os fármacos disponíveis atuem sobre  $\beta$ -lactamases de patógenos prioritários, como *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, o seu número é baixo, dada a velocidade do avanço da resistência bacteriana, evidenciando a necessidade de novos inibidores (Alfej; Zuccari, 2022). Os critérios para definir um inibidor não são claros, mas sabe-se que este não deve possuir atividade antibacteriana intrínseca, deve inibir as enzimas responsáveis pela hidrólise do antibiótico com o qual está associado e ter perfil farmacocinético semelhante a este *in vivo* (Yahav *et al.*, 2020).

As pesquisas realizadas para identificar novos inibidores de  $\beta$ -lactamases utilizam métodos semelhantes aos descritos para os inibidores de efluxo. Oliveira-Tintino *et al.* (2023a) e Silva *et al.* (2024) indicaram que os produtos testados inibem a atividade enzimática em *S. aureus* K4100 e K4414 a partir da potencialização obtida pela associação destes, em concentrações subinibitórias, ao antibiótico ampicilina. Os

autores empregaram a combinação ampicilina/sulbactam como controle positivo, a fim de comparar a eficácia dos seus compostos com a do inibidor convencional.

Esse método *in vitro* também é aplicado na detecção de compostos ativos contra linhagens Gram-negativas produtoras de enzimas como SHV, TEM, KPC, NDM e OXA, com as devidas adaptações quanto aos substratos (p. ex., cefepima, ceftazidima, ceftolozana, imipenem, piperacilina e tebipenem) e inibidores de referência (avibactam, relebactam e vaborbactam) (Lomovskaya *et al.*, 2020; Zalacain *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022).

A associação de possíveis inibidores aos substratos de  $\beta$ -lactamases também é realizada em análises com enzimas purificadas, com a substituição do parâmetro de redução da CIM pela redução da concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>), mensurada a partir da absorbância das soluções. Comumente, o substrato escolhido é a nitrocefina, um composto cromogênico utilizado para detectar a produção de  $\beta$ -lactamases em amostras bacterianas, porém, também é possível utilizar os próprios antibióticos (Le Terrier; Nordmann; Poirel, 2023; Miller *et al.*, 2020; Safdari *et al.*, 2014).

A avaliação *in silico* dos compostos é conduzida sem as limitações descritas na seção anterior, uma vez que a estrutura e o funcionamento de  $\beta$ -lactamases são bem conhecidos, o que torna possível as análises por docagem sítio-específica (Bush, 2023; Palacios *et al.*, 2020). Além de verificar a afinidade com os alvos, os estudos objetivam identificar a relação dos ligantes com resíduos-chave do sítio ativo das enzimas, pois esse é o mecanismo pelo qual os fármacos aprovados interferem na atividade enzimática, através de inibição competitiva (Bush; Bradford, 2019; Jiamboonsri, Eurtivong, Wanwong, 2023; Manjunath *et al.*, 2024).

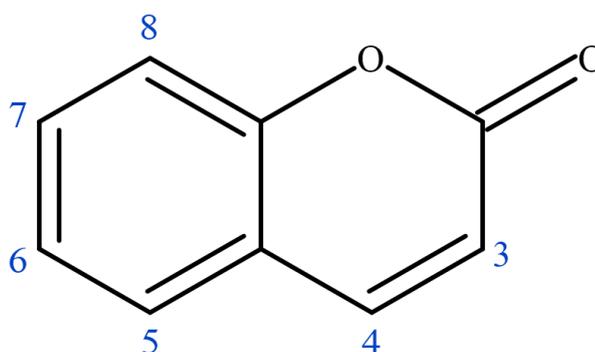
### 3.4 DERIVADOS CUMARÍNICOS COMO COMPOSTOS BIOATIVOS

Descobertas por Vogel em 1820, as cumarinas foram inicialmente isoladas de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Forsyth f., espécie conhecida como cumaru, denominação que inspirou a nomenclatura desses compostos orgânicos (Gouda *et al.*, 2020a). Também chamadas de 1,2-benzopironas ou 2H-1-benzopiran-2-onas, cumarinas são heterociclos com núcleo formado pela união do anel benzênico ao anel pirona, sendo encontradas na natureza na forma livre, em maior proporção, ou conjugadas em glicosídeos (Lončar; Gašo-Sokač; Molnar, 2023). Quando isoladas, apresentam-se na

forma de pó ou flocos incolores ou amarelo-claros, com propriedades aromáticas e maior solubilidade em solventes orgânicos, em comparação à água (Garg *et al.*, 2020).

A classificação inicial das cumarinas dividiu os compostos em quatro grupos: cumarinas simples - compostos com substituições nas posições C-3 a C-8 do esqueleto cumarínico (Figura 5); furanocumarinas - compostos com anel furânico fundido ao esqueleto cumarínico (entre C-6 e C-7 ou C-7 e C-8); piranocumarinas - compostos com anel pirânico fundido ao esqueleto cumarínico (entre C-6 e C-7 ou C-7 e C-8); cumarinas pirona-substituídas - compostos diversos com substituições no anel pirona (Küpeli Akkol *et al.*, 2020).

Figura 5 – Esqueleto cumarínico com numeração IUPAC dos átomos de carbono onde podem ser adicionadas substituições



Fonte: O autor (2024).

Posteriormente, o quarto grupo foi desmembrado, sendo propostas novas divisões, dentre as quais apenas as biscumarinas ou dicumarinas são consenso. Compostos dessa classe apresentam dois núcleos cumarínicos ligados entre si. Os demais grupos cumarínicos são: dihidrofuranocumarinas - presença de anel dihidrofurano fundido ao núcleo cumarínico; fenilcumarinas - radical fenil ligado ao núcleo cumarínico; benzocumarinas - anel benzênico fundido ao núcleo cumarínico; coumestans - benzofurano fundido ao núcleo cumarínico (Önder, 2020; Venugopala; Rashmi; Odhav, 2013).

Apesar de serem sintetizadas por fungos, bactérias e organismos marinhos, as cumarinas de origem natural são principalmente relacionadas às plantas, sobretudo famílias de Angiospermas, como Apiaceae, Clusiaceae, Fabaceae, Oleaceae e Rutaceae (Fernández-Peña; Matos; López, 2023; Tsvileva; Koftin; Evseeva, 2022). Em vegetais, onde os papéis desempenhados por esses compostos são mais bem

descritos, as cumarinas atuam como antioxidantes, inibidores enzimáticos, precursores de substâncias tóxicas, reguladores da atividade hormonal e na proteção contra microrganismos (Lončar *et al.*, 2020).

A partir de pesquisas conduzidas com cumarinas naturais, descobriu-se que essas substâncias possuem uma estrutura versátil e promissora em diferentes âmbitos (Carneiro *et al.*, 2021). Sua aplicação pode ocorrer, por exemplo, na indústria de cosméticos, na perfumaria, como aditivos alimentares e sondas fluorescentes, existindo também um alto potencial de utilização na indústria farmacêutica devido às atividades biológicas comprovadas (Annunziata *et al.*, 2020; Chaudhary *et al.*, 2022). Enquanto fármacos, são relevantes pela baixa toxicidade, baixo peso molecular, alta biodisponibilidade, esqueleto simples, de fácil síntese e com várias possibilidades de modificação estrutural (Jin *et al.*, 2023).

Diante das potencialidades identificadas, despertou-se o interesse pela obtenção de cumarinas por síntese química, especialmente com o intuito de desenvolver compostos com eficácia superior aos fármacos em uso clínico (Dorababu, 2022). A descoberta de substâncias como varfarina, acenocumarol e femprocumona, que figuram entre os anticoagulantes mais utilizados no mundo, ilustra os resultados positivos da busca por derivados cumarínicos bioativos (Kasperkiewicz *et al.*, 2020; Montinari; Minelli; De Caterina, 2021).

Diferentes métodos são empregados na síntese química de cumarinas, como as reações de Pechmann, Perkin, Wittig, Heck e Reformatsky, o rearranjo de Claisen e a condensação de Knoevenagel, que é a rota sintética mais adequada para produzir cumarinas 3-substituídas (Gouda; Salem; Helal, 2020; Mustafa, 2021). As bases para a síntese também são variáveis, contudo, aldeídos, cetonas, fenóis e ácidos carboxílicos são as predominantes (Lončarić *et al.*, 2020). Ademais, visando reduzir os impactos ecológicos envolvidos na produção, novas estratégias são avaliadas, como a síntese promovida por microondas e ultrassom e reações livres de solventes (Kumari; Sharma; Yadav, 2023).

Além da ação anticoagulante supracitada, derivados cumarínicos apresentam outras bioatividades, dentre as quais são identificadas atividades antioxidante (Bensalah *et al.*, 2020), antifúngica (Xu *et al.*, 2022), antiviral (Zhao *et al.*, 2022), antiparasitária (Pattanayak; Rout, 2024), analgésica e antipirética (El-Sharkawy; Albratty; Alhazmi, 2019), anti-inflamatória (Wang *et al.*, 2020), anticonvulsivante (Al-Humaidi *et al.*, 2023), antidepressiva (Wang *et al.*, 2021), antidiabética (Gupta; Kumar;

Chaudhary, 2020), vasorrelaxante (Matos *et al.*, 2022), neuroprotetora (Mishra *et al.*, 2024) e inibitória enzimática (Pisani *et al.*, 2022).

Embora anteriormente tenham sido descritos vários efeitos das cumarinas sintéticas, atualmente há exploração e resultados de efeitos mais significativos em relação às propriedades antibacterianas, contra patógenos Gram-positivos e Gram-negativos, e atividade anticâncer (p. ex., câncer de pulmão, de mama, de próstata e leucemia) (Khursheed; Jain, 2020; Qin *et al.*, 2020). Um fator considerado fundamental para a eficácia de cumarinas sintéticas, enquanto compostos bioativos, é o estabelecimento de interações não covalentes entre os compostos e seus respectivos alvos farmacológicos (Sepay *et al.*, 2022; Xia *et al.*, 2022).

Esse potencial de bioatividade, além de ter a contribuição do esqueleto cumarínico, está diretamente relacionado às modificações estruturais realizadas, pois a adição de novos grupos químicos impacta as propriedades físico-químicas dos compostos, sua afinidade com os alvos e, conseqüentemente, seus efeitos farmacológicos (Baruah *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2022). Como mencionado anteriormente, no controle de bactérias, substituições na posição C-3 estão entre as principais responsáveis pelo aumento da eficácia dos derivados cumarínicos (Flores-Morales *et al.*, 2023).

### 3.4.1 Propriedades antibacterianas de cumarinas 3-substituídas

A ação direta, por efeito bactericida ou bacteriostático, é a propriedade antibacteriana mais estudada de cumarinas 3-substituídas, onde *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* predominam entre as espécies testadas. Todavia, derivados também foram ativos contra *Bacillus cereus*, *Bacillus cirroflagellosus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloaceae*, *Erwinia carotovora*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella aerogenes*, *K. pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas glycinea*, *Rhizobium radiobacter*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* (Al-Hazmy *et al.*, 2022; Gouda *et al.*, 2020b).

Desde a comprovação de que cumarinas naturais, a exemplo da novobiocina, reconhecida como um potente antibiótico, inibem enzimas topoisomerase II (p. ex., DNA girase), esse mecanismo característico de fluoroquinolonas se tornou o mais

avaliado em estudos sobre a atividade antibacteriana de derivados cumarínicos (Dighe; Collet, 2020). Nesse sentido, cumarinas com radicais C-3 heterocíclicos, além de eficazes contra bactérias Gram-negativas (CIM: 0,125-128 µg/mL), inibiram *in vitro* a atividade da DNA girase de *E. coli* e apresentaram afinidade com o sítio ativo da enzima por meio de docagem molecular (Fayed *et al.*, 2024).

Do mesmo modo, Liu *et al.* (2018) demonstraram que derivados com substituições C-3 baseadas em pirazol possuem efeito inibitório *in vitro* sobre topoisomerase II superior à novobiocina e à ciprofloxacina, e estabelecem interações hidrofóbicas e eletrostáticas *in silico* com a DNA girase de *S. aureus*. A partir de análises *in silico*, More *et al.* (2023), utilizando compostos 3-substituídos com grupos peptidomiméticos, reforçam a evidência de atividade antibacteriana em decorrência da inibição da DNA girase.

Aurangzeb *et al.* (2022) destacam outro possível mecanismo envolvido no efeito antibacteriano de cumarinas 3-substituídas: a superativação da protease HslV. Esse novo alvo compõe, junto com a ATPase HslU, o complexo enzimático HslVU, responsável pela manutenção da proteostase microbiana. No estudo, os derivados exibiram afinidade com resíduos do sítio ativo e aumentaram a atividade enzimática. Hamid *et al.* (2023) exploraram o mesmo alvo e demonstraram *in vitro* e *in silico* que derivados 3-substituídos também causam a morte das bactérias por meio da inibição da protease HslV, com destaque para os detentores do radical benzoil.

Em pesquisa sobre derivados cumarínicos contendo 3-(3-oxobutanoil), Benazzouz-Touami *et al.* (2021) identificaram que os compostos estabelecem ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas com resíduos da proteína FtsZ de *S. aureus*, homóloga à tubulina de células eucarióticas e crucial para o processo de divisão celular bacteriana. Os autores associaram a inibição do crescimento bacteriano à interação com FtsZ. Sahoo *et al.* (2020) também utilizaram os resultados da docagem para justificar a ação das cumarinas contra *E. coli* e *S. aureus*. Para os pesquisadores, os alvos foram enzimas tirosina quinases.

As 3-amidocumarinas avaliadas por Sharma *et al.* (2023) demonstraram outra propriedade de derivados com esse padrão de substituição: a inibição da formação de biofilmes de *P. aeruginosa* PAO1. Forezi *et al.* (2018) constataram que a adição de radicais na posição C-3, além de contribuir para o controle da formação de biofilmes de *P. aeruginosa*, gera redução da motilidade bacteriana e da produção de piocianina, um fator de virulência relacionado a efeitos citotóxicos.

Cumarinas 3-substituídas derivadas do eugenol e do dihidroeugenol com radicais carboxila, benzoil, 4-aminobenzoil e 4-nitrobenzoil, apesar de não possuírem efeitos diretos contra *E. coli* e *S. aureus*, potencializaram a atividade de antibióticos contra linhagens multirresistentes dessas espécies (De Sousa *et al.*, 2022; De Sousa *et al.*, 2023). Nesses estudos, destacaram-se as cumarinas com radicais nitrogenados e seus efeitos sobre a resistência à norfloxacina e à gentamicina, porém, não foi possível identificar os mecanismos de ação desses compostos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa dissertação estão apresentados na forma de artigos.

### 4.1 ARTIGO 1

O artigo “3-Substituted Coumarins Inhibit NorA and MepA Efflux Pumps of *Staphylococcus aureus*” foi publicado no periódico *Antibiotics*, volume 12, artigo 1739, 2023, link para acesso: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12121739>

Article

## 3-Substituted Coumarins Inhibit NorA and MepA Efflux Pumps of *Staphylococcus aureus*

José B. de Araújo-Neto <sup>1</sup>, Cícera D. de M. Oliveira-Tintino <sup>2</sup>, Gildênia A. de Araújo <sup>2</sup>, Daniel S. Alves <sup>2</sup>, Fernanda R. Ribeiro <sup>3</sup>, Guilherme A. Brancaglioni <sup>3</sup>, Diogo T. Carvalho <sup>3</sup>, Clara Mariana Gonçalves Lima <sup>4,\*</sup>, Hani S. H. Mohammed Ali <sup>5</sup>, Irfan A. Rather <sup>5</sup>, Mohmmad Y. Wani <sup>6</sup>, Talha B. Emran <sup>7,8,9</sup>, Henrique D. M. Coutinho <sup>2,\*</sup>, Valdir de Q. Balbino <sup>1</sup> and Saulo R. Tintino <sup>2</sup>

- <sup>1</sup> Postgraduate Program in Biological Sciences, Biosciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife 50740-570, PE, Brazil; jose.bezerra456@gmail.com (J.B.d.A.-N.); valdir.balbino@ufpe.br (V.d.Q.B.)
- <sup>2</sup> Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato 63105-000, CE, Brazil; datianemorais@hotmail.com (C.D.d.M.O.-T.); gildenia.araujo@urca.br (G.A.d.A.); daniel.sampaio10@urca.br (D.S.A.); saulorelison@gmail.com (S.R.T.)
- <sup>3</sup> Pharmaceutical Chemistry Research Laboratory, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas, Alfenas 37130-001, MG, Brazil; fernandareis.r@hotmail.com (F.R.R.); guiabrancaglioni@gmail.com (G.A.B.); diogo.carvalho@unifal-mg.edu.br (D.T.C.)
- <sup>4</sup> Department of Food Science, Federal University of Lavras, Lavras 37203-202, MG, Brazil
- <sup>5</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science, King Abdulaziz University, Jeddah 21589, Saudi Arabia; hmohammedali@kau.edu.sa (H.S.H.M.A.); ammm@kau.edu.sa (I.A.R.)
- <sup>6</sup> Department of Chemistry, College of Science, University of Jeddah, Jeddah 21589, Saudi Arabia; mwani@uj.edu.sa
- <sup>7</sup> Department of Pathology and Laboratory Medicine, Warren Alpert Medical School, Brown University, Providence, RI 02912, USA; talha\_bin\_emran@brown.edu
- <sup>8</sup> Legorreta Cancer Center, Brown University, Providence, RI 02912, USA
- <sup>9</sup> Department of Pharmacy, Faculty of Allied Health Sciences, Daffodil International University, Dhaka 1207, Bangladesh
- \* Correspondence: claramarianalima@gmail.com (C.M.G.L.); hdmcoutinho@urca.br (H.D.M.C.)



**Citation:** Araújo-Neto, J.B.d.; Oliveira-Tintino, C.D.d.M.; de Araújo, G.A.; Alves, D.S.; Ribeiro, F.R.; Brancaglioni, G.A.; Carvalho, D.T.; Lima, C.M.G.; Mohammed Ali, H.S.H.; Rather, I.A.; et al. 3-Substituted Coumarins Inhibit NorA and MepA Efflux Pumps of *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics* **2023**, *12*, 1739. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12121739>

Academic Editors: Luis G. Alves and Fatima Cerqueira

Received: 11 November 2023  
Revised: 2 December 2023  
Accepted: 11 December 2023  
Published: 15 December 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Coumarins are compounds with scientifically proven antibacterial properties, and modifications to the chemical structure are known to improve their effects. This information is even more relevant with the unbridled advances of antibiotic resistance, where *Staphylococcus aureus* and its efflux pumps play a prominent role. The study's objective was to evaluate the potential of synthetic coumarins with different substitutions in the C-3 position as possible inhibitors of the NorA and MepA efflux pumps of *S. aureus*. For this evaluation, the following steps took place: (i) the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC); (ii) the association of coumarins with fluoroquinolones and ethidium bromide (EtBr); (iii) the assessment of the effect on EtBr fluorescence emission; (iv) molecular docking; and (v) an analysis of the effect on membrane permeability. Coumarins reduced the MICs of fluoroquinolones and EtBr between 50% and 87.5%. Coumarin C1 increased EtBr fluorescence emission between 20 and 40% by reinforcing the evidence of efflux inhibition. The molecular docking results demonstrated that coumarins have an affinity with efflux pumps and establish mainly hydrogen bonds and hydrophobic interactions. Furthermore, C1 did not change the permeability of the membrane. Therefore, we conclude that these 3-substituted coumarins act as inhibitors of the NorA and MepA efflux pumps of *S. aureus*.

**Keywords:** antibiotic resistance; fluoroquinolones; synergism; benzoyl; structure–activity relationship

### 1. Introduction

*Staphylococcus aureus* is a Gram-positive bacterium described as one of the most worrying pathogens for human health, contributing to increased morbidity and mortality rates [1]. This microorganism can cause anything from mild skin infections to invasive

infections, such as endocarditis, bacteremia, pneumonia, and osteomyelitis [2]. In addition to pathogenicity, *S. aureus* is also relevant for the multidrug resistance acquired by its strains, which has made it a high-priority species for the development of new drugs, according to the World Health Organization [3].

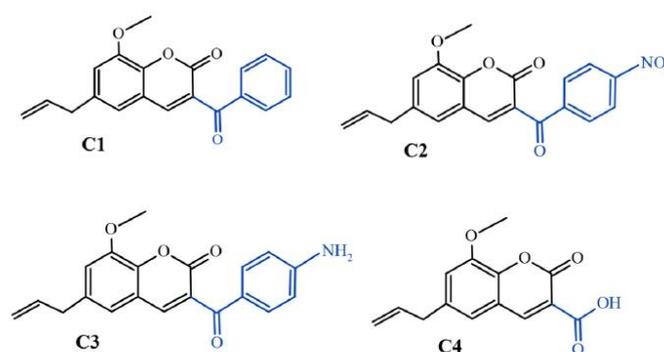
Efflux pumps are proteins responsible for expelling compounds toxic to bacteria, and in strains of *S. aureus*, they are among the main mechanisms of resistance to fluoroquinolone antibiotics [4]. Relevant in this context, the efflux pumps NorA and MepA are chromosome-encoded transporters belonging to the major facilitator superfamily (MFS) and multidrug and toxic compound extrusion pumps family (MATE), respectively [5,6]. These efflux pumps, in addition to having fluoroquinolones (e.g., norfloxacin and ciprofloxacin) as substrates, also extrude quaternary ammonium compounds (e.g., benzalkonium chloride), ethidium bromide (EtBr), pentamidine, acriflavine, and cetrime, for example [7,8].

Given the impact of antibiotic resistance on public health (around 1.3 million deaths/year), the development of efflux pump inhibitors (EPIs) is one of the strategies used to combat bacteria resistant to multiple drugs (MDRs) [9,10]. The ability of EPIs to restore the effectiveness of existing antibiotics against MDR strains is even more prominent given the current context of the pharmaceutical industry, where investment in antibiotic research and development is decreasing despite the advancement of bacterial resistance [11–13].

Coumarins are compounds synthesized by plants, fungi, and bacteria and obtained via chemical synthesis [14]. Among its bioactivities, antimicrobial, anti-inflammatory, anticonvulsant, anticancer, and antioxidant activities can be mentioned [15,16]. Studies such as that by De Araújo et al. [17] and Šimunović et al. [18] provide evidence that coumarins and their derivatives can act as EPIs, including against *S. aureus* efflux pumps, such as the Nora protein.

Analysis of the structure–activity relationship of coumarins indicates that certain modifications made to the chemical structure can improve their pharmacological effects. Against bacteria, the best substitution patterns include radicals linked to carbons 3, 4, 6, 7, and 8; however, studies associate the C-3 position with the most significant results [19–21].

Therefore, this study aims to evaluate the potential of synthetic coumarins with different substitutions at the C-3 position (Figure 1) as possible inhibitors of the NorA and MepA efflux pumps of *S. aureus*. Given the results obtained, we conclude that these coumarins act as EPIs in strains of *S. aureus* and coumarin with a benzoyl radical is the most promising derivative.



**Figure 1.** Chemical structures of coumarins. C1: 3-benzoyl-8-methoxy-6-(prop-2-en-1-yl)-2H-chromen-2-one; C2: 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-(prop-2-en-1-yl)-2H-chromen-2-one; C3: 3-(4-aminobenzoyl)-8-methoxy-6-(prop-2-en-1-yl)-2H-chromen-2-one; C4: 8-methoxy-2-oxo-6-(prop-2-en-1-yl)-2H-chromene-3-carboxylic acid. Substitutions at the C-3 position are highlighted in blue.

## 2. Results

### 2.1. Antibacterial Activity

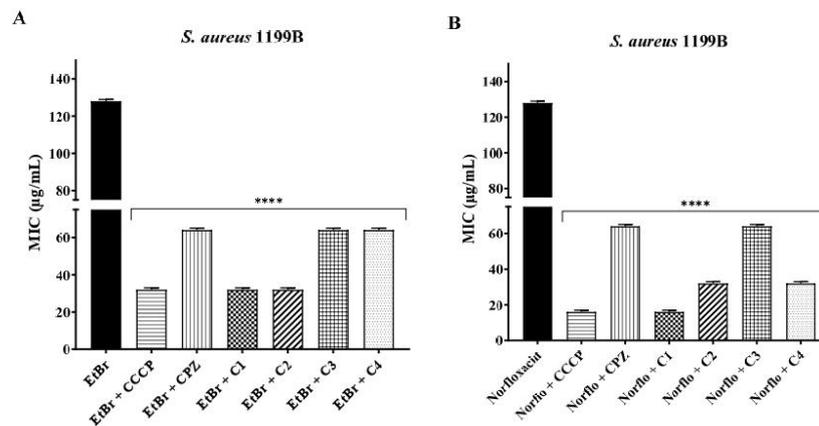
The evaluation of intrinsic antibacterial activity showed that the coumarins tested did not have significant effects against strains 1199B and K2068 of *S. aureus*, as well as chlorpromazine (CPZ). However, carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) demonstrated a direct effect against the strains (Table 1).

**Table 1.** Minimum inhibitory concentration (MIC), in  $\mu\text{g/mL}$ , of compounds tested against *S. aureus* strains.

Compounds	SA 1199B	SA K2068
C1	$\geq 1024$	$\geq 1024$
C2	$\geq 1024$	$\geq 1024$
C3	$\geq 1024$	$\geq 1024$
C4	$\geq 1024$	$\geq 1024$
CCCP	64	64
CPZ	$\geq 1024$	$\geq 1024$

### 2.2. Association with Antibiotics and Ethidium Bromide

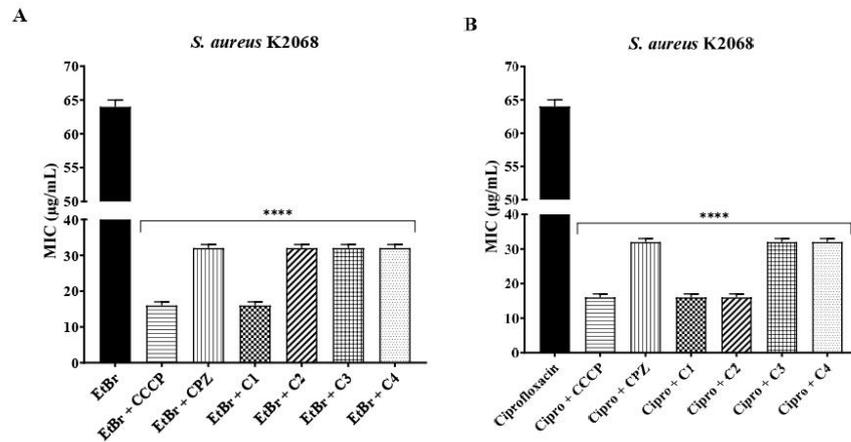
Against *S. aureus* 1199B, the association of coumarins in subinhibitory concentrations with EtBr resulted in synergism, with reductions of 50% (C3 and C4) and 75% (C1 and C2) in the compound's MIC. In association with norfloxacin, coumarins also enhanced the effect of the antibiotic, reducing its MIC by 50% (C3), 75% (C2 and C4), and 87.5% (C1). In both associations, the effect of coumarins was comparable to the positive control, including CCCP, which was the most effective standard inhibitor (Figure 2).



**Figure 2.** Potentiation of the effect of ethidium bromide (A) and norfloxacin (B) by 3-substituted coumarins against *S. aureus* 1199B. \*\*\*\*: statistical significance— $p < 0.0001$ .

Against *S. aureus* K2068, coumarins reduced the MIC of EtBr by 50% (C2, C3, and C4) and 75% (C1). Coumarins also showed MIC reductions of 50% (C3 and C4) and 75% (C1 and C2) associated with ciprofloxacin. Again, the reductions were equivalent to those observed in the positive control with CCCP and CPZ (Figure 3).

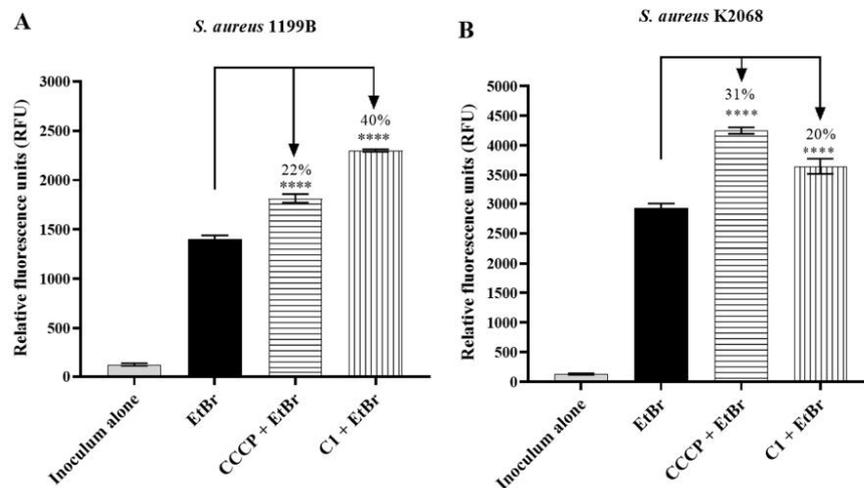
These results indicate the possibility that the enhancement of antibiotic activity by coumarins occurred through efflux pump inhibition. Furthermore, we noticed that the most effective coumarin in all associations was C1, so it was selected for the other in vitro tests.



**Figure 3.** Potentiation of the effect of ethidium bromide (A) and ciprofloxacin (B) by 3-substituted coumarins against *S. aureus* K2068. \*\*\*\*: statistical significance— $p < 0.0001$ .

### 2.3. Fluorescence Emission

Fluorescence emission assays reinforced the evidence of efflux inhibition by the tested coumarins. In strain 1199B, we identified that C1 at a concentration of 10 µg/mL increased the fluorescence emission of EtBr by 40%, being more effective than CCCP, which was tested at a concentration five times higher (Figure 4A). C1 increased EtBr fluorescence by 20% at the same concentration in strain K2068; however, it was less effective than CCCP at 50 µg/mL (Figure 4B).



**Figure 4.** Increased ethidium bromide fluorescence emission by C1 coumarin in *S. aureus* strains 1199B (A) and K2068 (B). \*\*\*\*: statistical significance— $p < 0.0001$ .

### 2.4. Molecular Docking

Molecular docking of coumarins with the NorA efflux pump homology model resulted in interaction energies that ranged from  $-99.1264$  to  $-138.965$  and MolDock scores from

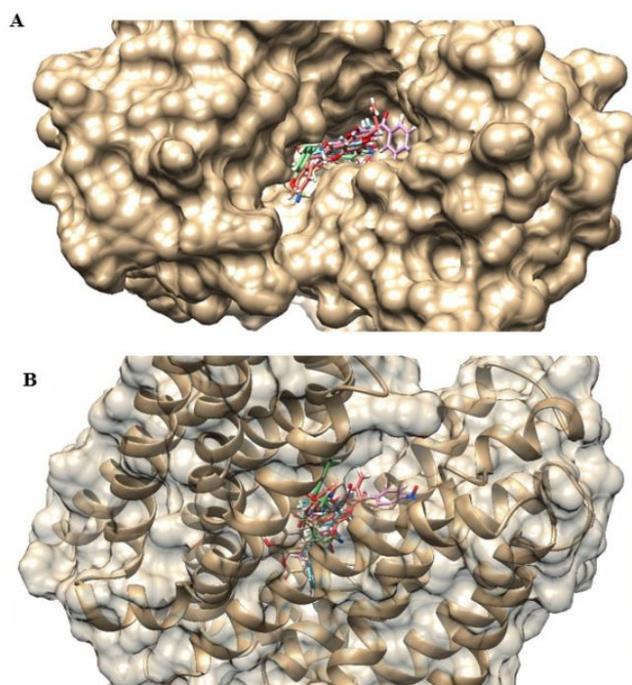
−89.4395 to −125.394, such that the affinity with the efflux pump followed the following order: C2 > C1 > C3 > C4. However, when calculating ligand efficiency, C4 (neutral) presented the best result, followed by C1 (Table 2).

**Table 2.** Energies resulting from molecular docking between coumarins and the NorA efflux pump.

Coumarins	MolDock Score	Interaction	HBond	LE1
C1	−117.214	−129.417	−5.43272	−4.88392
C2	−125.394	−138.965	−10.5218	−4.64422
C3	−116.749	−126.418	−7.49231	−4.66997
	(−108.295)	(−117.185)	(−0.38884)	(−4.33179)
C4	−99.4964	−109.64	−14.7348	−5.23665
	(−89.4395)	(−99.1264)	(−5.6347)	(−4.70734)

HBond: hydrogen bond energy; LE1: efficiency of ligand 1 (MolDock score divided by the number of heavy atoms). Values in parentheses correspond to ionized species.

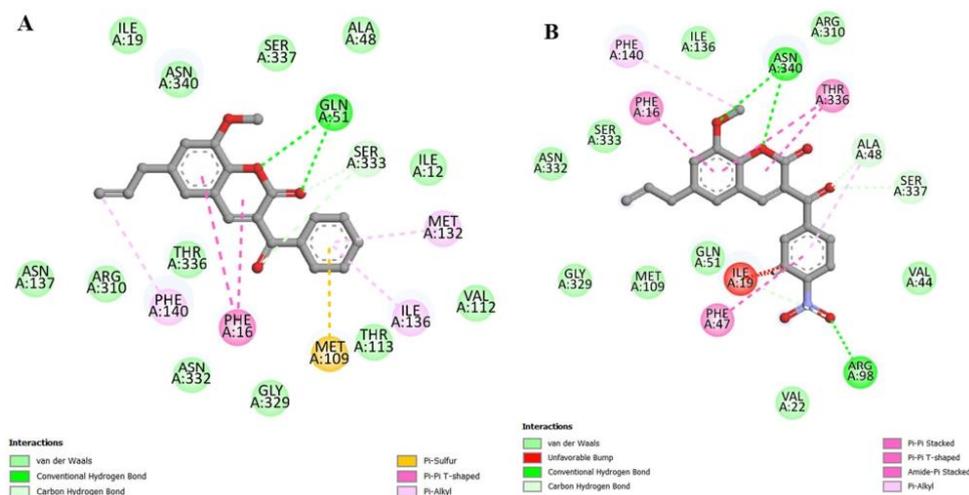
Figure 5 shows the location, in 3D, of the best pose of each coumarin in the efflux pump model. From this, it is clear that the different substitutions in the C-3 position influence the binding to the target, which results in differences in docking calculations. The common structures occupied similar positions, while C-3 substitutions followed different orientations. For example, we have C1 and C2, the compounds with the best interaction energies: while the benzoyl radical of C1 (in blue) is on the left, the 4-nitrobenzoyl of C2 (in pink) is facing the right.



**Figure 5.** 3D representation of the location of the best poses of coumarins in the NorA efflux pump binding site: (A) superior view; (B) side view. C1—blue; C2—pink; C3 (neutral)—green; C3 (ionized)—red; C4 (neutral)—beige; C4 (ionized)—white.

In the *in vitro* results shown in Figure 3, coumarin C1 showed the best effects, followed by C2, but in the docking results, the order was the opposite. Analyzing the interactions

of C1, we have the following information: (i) van der Waals interactions (around 5 Å); (ii) hydrogen bonds with Gln51 (2.23 and 2.49 Å, respectively); (iii) carbon–hydrogen bonds with Ser333 (3.19 Å with the coumarin nucleus and 2.79 Å with the benzoyl radical); (iv)  $\pi$ -sulfur with Met109 (4.33 Å); (v)  $\pi$ - $\pi$  T-shaped with Phe16 (5.31 and 5.25 Å, respectively); and (vi)  $\pi$ -alkyl with Phe140 (4.74 Å), Ile136 (5.30 Å), and Met132 (5.37 Å) (Figure 6A). All of these interactions are considered favorable.



**Figure 6.** Maps of interactions, in 2D, between coumarins and the NorA efflux pump: (A) coumarin C1; (B) coumarin C2.

Coumarin C2 has favorable interactions similar to those described for the previous derivative, with the following results being obtained: (i) van der Waals interactions (around 5 Å); (ii) hydrogen bonds with Asn340 (2.35 Å with the methoxy group and 2.32 Å with the coumarin nucleus) and Arg98 (2.20 Å); (iii) carbon–hydrogen bonds with Ala48 (3.19 Å), Ser337 (2.47 Å) and Ile19 (2.60 Å); (iv)  $\pi$ - $\pi$  stacked with Phe47 (4.32 Å); (v)  $\pi$ - $\pi$  T-shaped with Phe16 (5.46 Å); (vi) amide- $\pi$  stacked with Thr336 (5.05 and 4.69 Å, respectively); (vii)  $\pi$ -alkyl with Phe140 (5.09 Å) and Ala48 (5.36 Å). However, we identified two unfavorable interactions classified as steric bumps with Ile19 (2.22 Å with the hydrogen atom and 3.10 Å with the carbon atom) (Figure 6B). These unfavorable interactions represent the primary evidence that justifies the fact that C1 had better effects *in vitro* than C2.

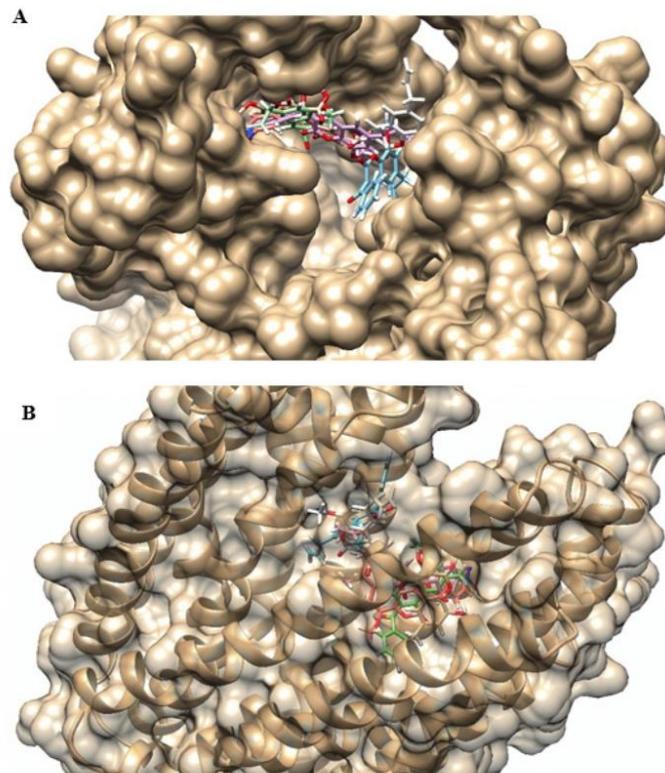
We also verified the affinity of coumarins with the MepA model, with interaction energies from  $-92.5696$  to  $-121.81$  and MolDock scores ranging from  $-83.2516$  to  $-111.936$ . C1 and C4 demonstrated the highest and lowest affinity, respectively, while C2 and C3 showed similar values. Regarding ligand efficiency, C4 (ionized) and C1 were the derivatives with the best results (Table 3). As described in the NorA efflux pump, despite being close, the coumarin derivatives occupied different locations in the MepA efflux pump binding site because of their structural differences (Figure 7).

Coumarin C1, which had the best *in silico* and *in vitro* results, showed similar interactions to those exposed to the NorA efflux pump. Existing interactions are classified as (i) van der Waals interactions (about 5 Å); (ii) hydrogen bond with Tyr276 (2.25 Å); (iii) carbon–hydrogen bond with Gly258 (2.62 Å); (iv)  $\pi$ -sulfur with Met254 (5.42 Å with the coumarin nucleus and 4.91 Å with the benzoyl); (v)  $\pi$ - $\pi$  stacked with Phe280 (with the coumarin nucleus, 4.33 and 4.01, respectively); (vi)  $\pi$ - $\pi$  T-shaped with Phe280 (5.87 Å, with the benzoyl radical); and (vii)  $\pi$ -alkyl with Tyr276 (4.70 Å), Phe280 (3.94 Å), and Ile399 (5.42 Å) (Figure 8).

**Table 3.** Energies resulting from molecular docking between coumarins and the MepA efflux pump.

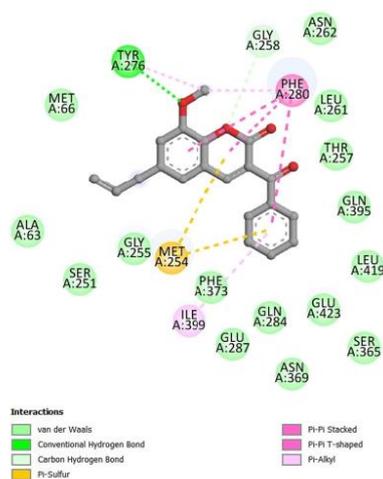
Coumarins	MolDock Score	Interaction	HBond	LE1
C1	−111.936	−121.81	−5	−4.66402
C2	−107.692	−119.787	−7.4925	−3.98861
C3	−109.268	−118.995	−2.5	−4.37073
	(−108.887)	(−119.946)	(−4.59915)	(−4.35547)
C4	−83.2516	−92.5696	−8.88168	−4.38167
	(−98.6581)	(−107.365)	(−7.5)	(−5.19253)

HBond: hydrogen bond energy; LE1: efficiency of ligand 1 (MolDock score divided by the number of heavy atoms). Values in parentheses correspond to ionized species.



**Figure 7.** 3D representation of the location of the best poses of coumarins in the MepA efflux pump binding site: (A) superior view; (B) side view. C1—blue; C2—pink; C3 (neutral)—green; C3 (ionized)—red; C4 (neutral)—beige; C4 (ionized)—white.

The results of molecular docking with the NorA and MepA models, in addition to demonstrating the differences between the four coumarins, which have the C-3 substitutions as a differential, illustrated how the same compound interacts with different proteins. With the NorA efflux pump, the propenyl group (C6 substitution) of C1 showed interaction with the amino acid, and the methoxy (C8 substitution) did not (Figure 6A). In contrast, the opposite occurred with the MepA efflux pump, with the methoxy radical interacting with different residues of the protein (Figure 8).



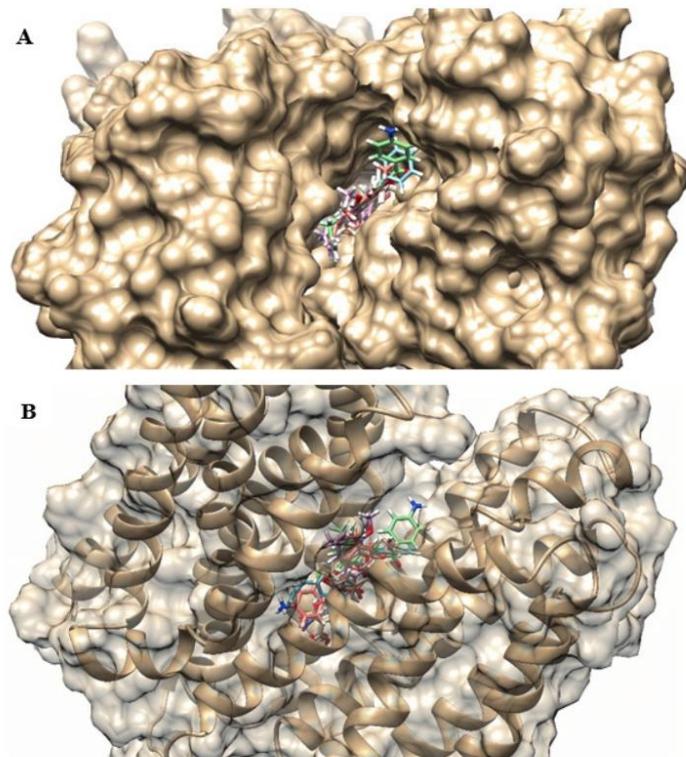
**Figure 8.** Map of interactions in 2D between coumarin C1 and the MepA efflux pump.

From molecular docking with ligands and receptor (NorA efflux pump), both flexible, the following binding energies were recorded:  $-8.6$  Kcal/mol for C1,  $-8.7$  Kcal/mol for C2,  $-8.5$  Kcal/mol for C3 (neutral and ionized),  $-7.7$  Kcal/mol for neutral C4, and  $-7.6$  Kcal/mol for ionized C4. Although there is a similarity with docking only with flexible ligands in descending order of affinity, the position of coumarins in the binding site was different from the first evaluation, as demonstrated in Figure 9. For example, while C2 was in the most superior position in the first docking analysis, in this second docking, neutral C3 occupied a similar position.

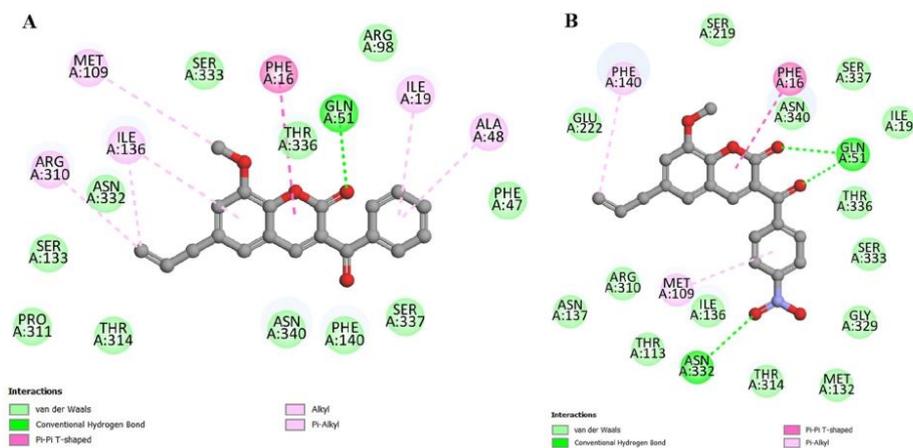
With coumarin C1, the following interactions occurred: (i) van der Waals interactions (around  $5$  Å); (ii) hydrogen bond with Gln51 ( $2.14$  Å); (iii)  $\pi$ - $\pi$  T-shaped with Phe16 ( $4.93$  Å); (iv) alkyl with Arg310 ( $3.99$  Å), Ile136 ( $4.96$  Å with the propenyl radical), and Met109 ( $5.00$  Å); (v)  $\pi$ -alkyl with Ile136 ( $5.37$  Å with the coumarin nucleus), Ile19 ( $4.88$  Å) and Ala48 ( $4.94$  Å) (Figure 10A). Coumarin C2 has established the following interactions: (i) van der Waals interactions (around  $5$  Å); (ii) hydrogen bonds with Gln51 ( $2.84$  Å with the coumarin nucleus and  $1.85$  Å with the benzoyl radical) and Asn332 ( $2.83$  Å); (iii)  $\pi$ - $\pi$  T-shaped with Phe16 ( $5.07$  Å); (iv)  $\pi$ -alkyl with Phe140 ( $4.17$  Å) and Met109 ( $5.12$  Å) (Figure 10B).

The binding energies recorded in the second molecular docking with the MepA model (ligands and receptor, both flexible) demonstrated a similar order of affinity to the docking with the non-flexible receptor, with the following values being recorded:  $-8.5$  Kcal/mol for C1 and C2,  $-8.2$  Kcal/mol for C3 (neutral and ionized),  $-6.7$  Kcal/mol for neutral C4 and  $-6.5$  Kcal/mol for ionized C4. In this case, coumarins C1 and C2 presented the same binding energies, unlike the previous analysis. The position of the coumarins in the binding site also showed differences, with the compounds occupying more similar positions in the efflux pump cavity (Figure 11).

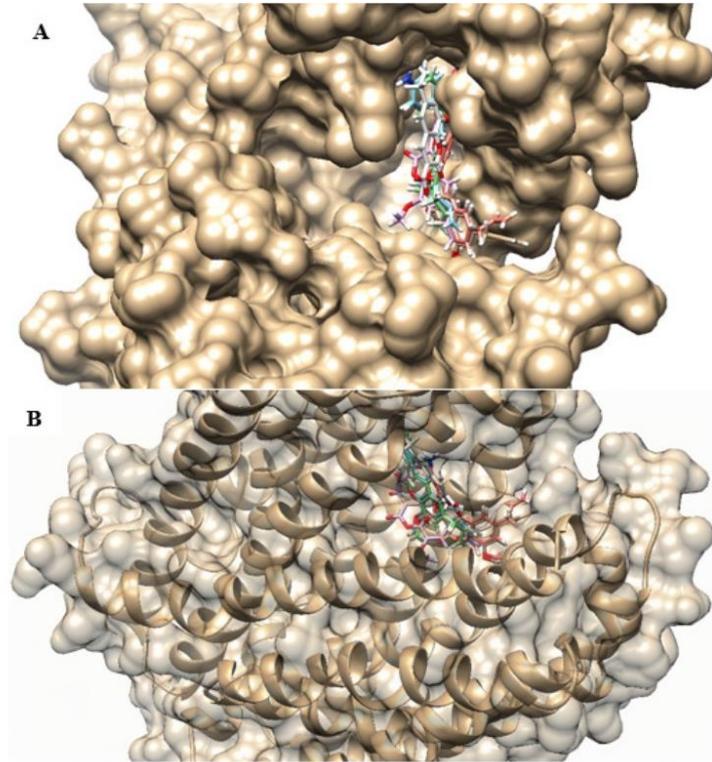
Coumarin C1 performed the following interactions with the MepA model: (i) van der Waals interactions (around  $5$  Å); (ii) hydrogen bond with Tyr35 ( $2.88$  Å); (iii)  $\pi$ - $\pi$  stacked with Phe62 ( $3.97$  Å); (iv)  $\pi$ - $\pi$  T-shaped with Tyr35 ( $5.13$  Å); (v) alkyl with Arg281 ( $4.02$  Å), Ile37 ( $4.79$  Å) and Val33 ( $4.91$  Å); and (vi)  $\pi$ -alkyl with Ile55 ( $5.33$  Å) (Figure 12A). With coumarin C2, the following was recorded: (i) van der Waals interactions (around  $5$  Å); (ii) hydrogen bonds with Tyr138 ( $3.00$  Å and  $2.90$  Å) and Thr201 ( $3.00$  Å); (iii)  $\pi$ -donor hydrogen bond with Tyr35 ( $3.92$  Å); and (iv) alkyl with Arg281 ( $4.33$  Å), Ile37 ( $4.67$  Å), and Val33 ( $4.30$  Å with the propenyl radical and  $5.06$  Å with the methoxy radical) (Figure 12B).



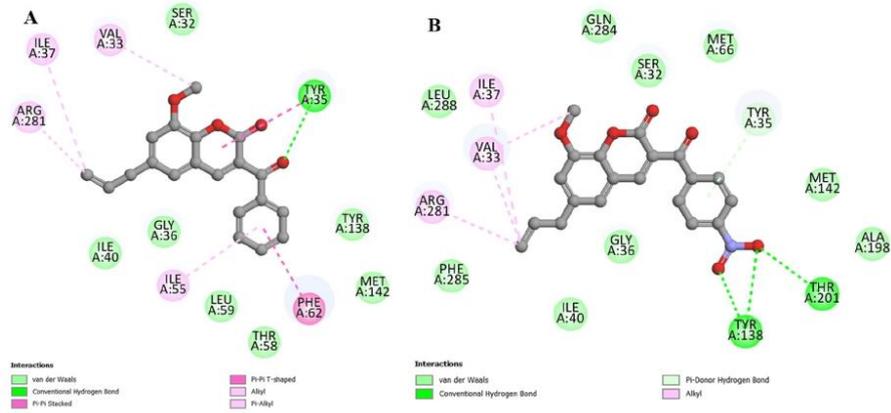
**Figure 9.** 3D representation of the location of the best poses of coumarins in the NorA efflux pump binding site: (A) Superior view; (B) Side view. C1—blue; C2—pink; C3 (neutral)—green; C3 (ionized)—red; C4 (neutral)—beige; C4 (ionized)—white.



**Figure 10.** Maps of interactions, in 2D, between coumarins and the NorA efflux pump: (A) coumarin C1; (B) coumarin C2.



**Figure 11.** 3D representation of the location of the best poses of coumarins in the MepA efflux pump binding site: (A) superior view; (B) side view. C1—blue; C2—pink; C3 (neutral)—green; C3 (ionized)—red; C4 (neutral)—beige; C4 (ionized)—white.

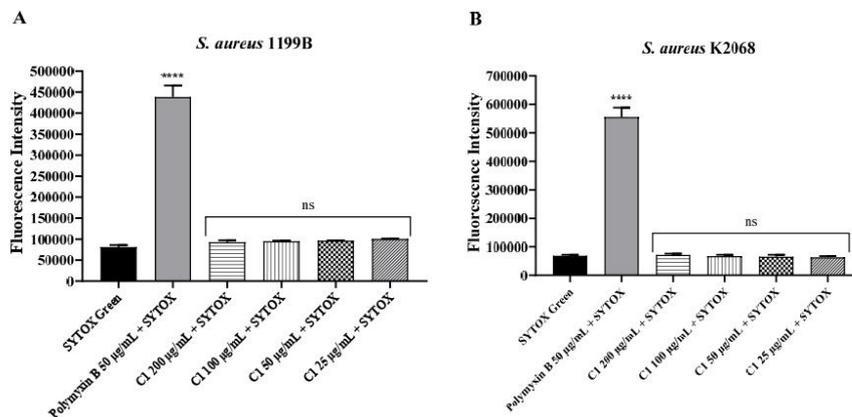


**Figure 12.** Maps of interactions in 2D between coumarins and the MepA efflux pump: (A) coumarin C1; (B) coumarin C2.

After carrying out a second analysis via molecular docking, applying flexibility to the ligands and receptors, we noticed similarities among the compounds that demonstrated the best results in terms of energy/interaction but differences in other aspects, as demonstrated in the figures (2D and 3D): the position of the coumarins in their respective binding sites, the residues with which the coumarins established interactions, and different types of interactions with the same residue in the comparison between the first and second molecular docking. These similarities and differences apply to both the NorA and MepA models, and even with the differences, these results still corroborate what was obtained in in vitro assays.

### 2.5. Effects on Membrane Permeability

Coumarin C1, tested at concentrations of 25 to 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , did not increase the fluorescence emission of SYTOX Green in *S. aureus* 1199B and K2068 compared to the negative control, indicating that it did not alter membrane permeability in both strains. Conversely, polymyxin B at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  altered the fluorescence intensity significantly (Figure 13). These results eliminate the hypothesis that coumarins enhanced antibiotic activity by increasing drug influx.



**Figure 13.** Evaluation of the effect of C1 coumarin on the fluorescence intensity of SYTOX Green in *S. aureus* 1199B (A) and K2068 (B) strains. \*\*\*\*: statistical significance— $p < 0.0001$ ; ns: not significant.

### 3. Discussion

Coumarin derivatives with different substitutions, such as methoxy, tolyl, benzyl, and chlorine, in strategic positions (C-3, C-6, and C-7), presented MICs significantly lower than those obtained in our study, especially against Gram-positive bacteria, such as *S. aureus*, against which an MIC of just 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was recorded [22]. The study by Tiwari et al. [23], who evaluated the antibacterial activity of synthetic coumarins with a hydroxyl at C-4 and different C-3 substitutions, also reported the potential of these substances, which inhibited *S. aureus* at concentrations of 50 to 78  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

There are coumarins with relevant antibacterial effects, and examples of this are the antibiotics novobiocin, chlorobiocin, and coumermycin A1, which are naturally synthesized by *Streptomyces* spp. and have action, for example, against resistant *S. aureus* [24]. Like fluoroquinolones, these substances prevent the synthesis of nucleic acids by inhibiting the enzyme DNA gyrase [25]. Furthermore, coumarins inhibit protein synthesis and bacterial metabolism [26].

As mentioned, specific substitution patterns increase the activity of coumarins against bacteria; however, this parameter is not absolute, as the added radicals also impact the activity, and the magnitude of the effect varies according to the target species [27]. As in

our study, research by Sovari et al. [28] and Ge et al. [29] found that 3- and 7-substituted coumarins did not inhibit the growth of Gram-negative and Gram-positive bacteria, including *S. aureus*. For this research, the absence of intrinsic effects was positive, as EPIs should not have antibacterial activity to avoid selecting resistant strains [30].

Despite not having direct action against bacteria, certain coumarins enhance the effect of antibiotics against MDR strains. Coumarin derivatives evaluated by Martin et al. [31], with MICs  $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ , increased fluoroquinolone and aminoglycoside activity against *S. aureus* and *Escherichia coli*. Coumarins with the same C-3 substitutions as the compounds evaluated in the present study showed synergism with antibiotics. Against *S. aureus*, coumarins with benzoyl and 4-nitrobenzoyl radicals caused the most significant potentiation of norfloxacin, corroborating our results [32].

Against strains of *S. aureus* carrying the NorA, TetK, and MsrA efflux pumps, coumarins isolated from Rutaceae species increased the activity of the antibiotics norfloxacin, tetracycline, and erythromycin, respectively, and imperatorin, the most effective compound, reduced the MIC of EtBr against strain 1199B (NorA) [33]. In the study by Martin et al. [34], 4-, 7- and 8-substituted coumarins reduced the MICs of ciprofloxacin and EtBr against *S. aureus* K2068, a carrier of the MepA efflux pump. The effect of coumarins was equal to or greater than the chlorpromazine control in both studies.

As described in the results (Section 2.2) and the research mentioned above, the joint potentiation of antibiotics and EtBr is considered evidence of the inhibition of efflux pumps. However, more than this, synergism is needed to state that coumarins acted as EPIs, making it necessary to use other methods. The fluorescence emission or accumulation test used in the present research is one of the primary methods for investigating EPIs. The increase in fluorescence occurs because of the more significant intracellular accumulation of EtBr caused by the inhibition of efflux [35].

Coumarins from *Mesua ferrea*, evaluated by Roy et al. [36], in addition to enhancing the activity of norfloxacin and EtBr against *S. aureus* 1199B, increased the accumulation of EtBr, but with lower efficacy than the verapamil control. Galbanic acid showed synergism in association with ciprofloxacin and EtBr in resistant isolates of *S. aureus* and increased the intensity of EtBr fluorescence more significantly than the same EPI [37]. These results reinforce the potential of coumarins as EPIs and the effects arising from structural differences and target microorganisms.

Molecular docking analyses showed that the most abundant interactions between coumarins and efflux pump models were hydrogen bonds (conventional or carbon-hydrogen bonds), hydrophobic and van der Waals interactions, and  $\pi$ -sulfur interactions to a lesser extent. Despite the scarcity of *in silico* studies between coumarins and efflux pumps, it is possible to see similarities in the interactions established by these compounds.

With the NorA efflux pump, osthol potentiated the antibiotic activity against *S. aureus* 1199B and had *in silico* affinity with the protein, highlighting the hydrophobic interactions and hydrogen bonds, for example, with Arg98, as occurred with coumarin C2 [38]. Furanochromones are compounds structurally similar to coumarins, and the study by Rodrigues et al. [39] showed that khellin, like C1, interacts with the NorA model through hydrophobic interactions with Phe16 and Ile136. The amino acids Arg310, Asn340, Gln51, Met109, Ser333, and Ser337 also appear in both studies but are involved in different types of interactions.

Martin et al. [34] obtained interaction energies ranging from  $-92.3$  to  $-124.6$  Kcal/mol in the analysis of coumarin derivatives with the MepA model. 7-( $\alpha$ -D-Galactopyranosyloxy)-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-one interacted with the efflux pump from conventional hydrogen bonds with Thr201, Ser175, and Asn205; hydrophobic  $\pi$ -alkyl interaction with Ile55 and Ile40; and van der Waals interaction with several amino acids. As in our results with the NorA model, this coumarin, which presented the best result *in silico*, was not the most effective *in vitro*.

The types of interactions mentioned are relevant because they occur from structurally similar compounds and because conventional EPIs establish them. Verapamil, reserpine,

piperine, CCCP, and CPZ interact with the NorA model, mainly through hydrophobic interactions (e.g.,  $\pi$ -alkyl and  $\pi$ - $\pi$  stacked), including with the same amino acids as C1 and C2, such as Phe16, Phe140, and Ile136.  $\pi$ -sulfur interaction (CPZ), carbon–hydrogen bonds (including with serine), and van der Waals interactions were also identified. Other amino acids, such as Ala48, Arg310, and Asn340, for example, are targets of EPIs and coumarins, but with different interactions [39,40].

The potential of coumarins as efflux inhibitors based on docking analyses with compounds known as EPIs is also related to the MepA efflux pump, considering that CCCP and CPZ establish conventional hydrogen bonds, carbon–hydrogen bonds, hydrophobic and van der Waals interactions with this model. Both EPIs establish  $\pi$ -sulfur interaction with the MepA model in the amino acid methionine, as identified with coumarin C1 [34,41].

According to the study by Chen, Li, and Li [42], the favorable interactions identified in molecular docking with coumarins make the binding of the molecules to the protein effective and increase the stability of the ligand–target complex. Despite the differences obtained between docking with the flexible and non-flexible receptors, the favorable interactions identified were similar, corroborating the potential of coumarins in inhibiting efflux pumps. Conversely, the steric bumps identified between C2 and the NorA model generate repulsion and instability in interactions, impairing the effect of the compounds [43]. This information corroborates our hypothesis about the slight difference between in vitro and in silico results.

In addition to the evidence that supports the hypothesis that the coumarins evaluated act as EPIs, we also demonstrated that C1 cannot alter the permeability of the cell membrane in strains 1199B and K2068, which reinforces the specificity of the mechanisms of these coumarins. This was confirmed by no change in the fluorescence intensity of SYTOX Green, which is an impermeable dye in living cells [44]. The opposite result was demonstrated by polymyxin B, an antibiotic known for its affinity to membrane components, such as phospholipids [45].

Zhong et al. [46] synthesized amphiphilic coumarins with hydrophobic and cationic chains linked to C-6 and C-7, respectively, and demonstrated that these compounds are active against standard and resistant strains of *S. aureus*, which occurs through effects on the cell membrane evidenced by the increase in SYTOX Green fluorescence. Similar results were obtained with coumarin aminophosphonates, using propidium iodide as the fluorescent compound [47]. The findings of these studies differ from our results due to the types of chemical groups added to the coumarin structure, which have properties related to the cell membrane [48,49].

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Obtaining and Preparing Substances

The coumarins used were obtained through semi-synthesis from eugenol and supplied by the Pharmaceutical Chemistry Research Laboratory of the Federal University of Alfenas, located in Minas Gerais (Brazil). Details about the synthesis and characterization of the compounds are described in the study by Govêa et al. [50]. The coumarins evaluated were 3-benzoyl-8-methoxy-6-(prop-2-en-1-yl)-2H-chromen-2-one (C1), 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-(prop-2-en-1-yl)-2H-chromen-2-one (C2), 3-(4-aminobenzoyl)-8-methoxy-6-(prop-2-en-1-yl)-2H-chromen-2-one (C3) and 8-methoxy-2-oxo-6-(prop-2-en-1-yl)-2H-chromene-3-carboxylic acid (C4) (Figure 1).

Antibiotics (norfloxacin and ciprofloxacin), ethidium bromide (EtBr), and efflux inhibitors: chlorpromazine (CPZ) and carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) were obtained from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). We diluted all compounds so that their solutions reached a concentration of 1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in the following ways: EtBr and CPZ diluted only in sterile distilled water, CCCP diluted in a solution (1:1) of sterile distilled water and methanol, and the others diluted in dimethyl sulfoxide (10%) and sterile distilled water [51,52].

#### 4.2. Bacterial Strains and Inoculum Preparation

*Staphylococcus aureus* strains 1199B (overexpresses the NorA efflux pump) and K2068 (overexpresses MepA), provided by Prof. S. Gibbons (University of London, London, UK) and kept in stock at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in the Microbiology and Molecular Biology Laboratory of the Regional University of Cariri, were subcultured in Mueller Hinton Agar and incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 24 h before testing. The preparation of the inocula for use in antibacterial activity tests and association with antibiotics and EtBr occurred using McFarland's 0.5 scale as a reference, following CLSI standards [53]. We prepared the inocula with phosphate-buffered saline (PBS) for the other assays.

#### 4.3. Assessment of Antibacterial Activity

The evaluation of the antibacterial activity of coumarins and efflux inhibitors (CPZ and CCCP) occurred through broth microdilution (in Brain Heart Infusion Broth—BHI), determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the compounds against *S. aureus* 1199B and K2068, according to Javadpour et al. [54]. The solutions prepared with 900  $\mu\text{L}$  of BHI and 100  $\mu\text{L}$  of inoculum were distributed in 96-well microplates (100  $\mu\text{L}$  per well) and then microdiluted with the mentioned compounds (100  $\mu\text{L}$ ). Compound concentrations in the 96-well plates ranged from 512 to 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . We performed the assays in triplicate, and after 24 h of incubation ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), the results were read using the colorimetric variation of sodium resazurin [55].

#### 4.4. Association with Antibiotics and Ethidium Bromide

Coumarins, in subinhibitory concentration (MIC/8), were associated with antibiotics and EtBr against strains 1199B and K2068 of *S. aureus* following the methodology of Coutinho et al. [56]. EtBr (nonspecific substrate) was used against both strains to verify the activity of efflux pumps, while antibiotics (specific substrates) were used as follows: norfloxacin against *S. aureus* 1199B (NorA) and ciprofloxacin against *S. aureus* K2068 (MepA). The inhibitors CPZ and CCCP, also in subinhibitory concentrations, were used as a positive control. The tests took place in triplicate, and the reading followed the process described in the previous section.

#### 4.5. Fluorescence Emission Test

According to the methodology of Da Silva et al. [57], we evaluated the effect of coumarin C1 on the fluorescence emission of EtBr by preparing the following solutions (in triplicate): (i) growth control: inoculum + PBS, (ii) negative control: inoculum + PBS + EtBr (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), (iii) positive control: inoculum + PBS + CCCP (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + EtBr (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), (iv) C1 test: inoculum + PBS + C1 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + EtBr (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). After incubation for 1h30min, the solutions were centrifuged (10,000 rpm for 2 min), with the supernatant subsequently discarded. We then washed the material with PBS, centrifuging it again and discarding the supernatant. Finally, PBS was added to the pellets, and the solutions were distributed in microplates. We read the results from the BioTek<sup>®</sup> Cytation 1 reader (Gen5<sup>™</sup> 3.11 software), with wavelengths of 530 nm of excitation and 590 nm of emission.

#### 4.6. Molecular Docking

Following the methods of Oliveira et al. [58] and Freitas et al. [59], the sequences of the NorA efflux pump from *S. aureus* 1199 (code Q03325) and MepA from *S. aureus* NCTC 8325 (code Q2G140), obtained from the UniProt database, were selected to build the three-dimensional models (3D) of proteins by homology, using the SWISS-MODEL server [60]. From the 50 templates available for each efflux pump, we chose the best model for each: PDB identifiers 7lo8 and 3wbn, respectively.

The ligand structures were prepared in the MarvinSketch<sup>®</sup> software (Chemaxon<sup>®</sup>), version 23.11, and saved in 3D in the SDF format (Standard Database Format). Using the same software, we identified that two coumarins have ionized species: C3 (with  $\text{NH}_3^+$

replacing the amino radical) and C4 (with O<sup>-</sup> replacing the hydroxyl of the carboxyl radical), and these ionized forms were also evaluated.

The search for interactions between coumarins and efflux pump models by molecular docking took place in Molegro Virtual Docker, version 2019.7.0.0 [61]. The MolDock Score (score function) and the MolDock Optimizer (search algorithm) were used, keeping the other parameters as defaults, as described by De Lima Silva et al. [62]. We selected the central cavity of the efflux pump as the binding site. A radius of 15 Å was defined for the grid, using the center of the binding site as a reference (NorA coordinates: x: 140.37, y: 137.26, z: 150.16; MepA coordinates: x: 327.55, y: -10.16, z: 30.37). The best pose of each compound was selected based on the best values of interaction energy and MolDock Score.

In addition to carrying out molecular docking with flexible ligands, we also conducted evaluations with both flexible ligands and receptors, as carried out by De Araújo et al. [63]. To do this, we used the same coordinates mentioned in the previous paragraph and a grid box with dimensions of 30 Å × 30 Å × 30 Å. The analysis took place using AutoDock Vina tools (version 1.2.4), and we chose the poses corresponding to the best binding energies. The two-dimensional (2D) visualization of interactions took place in the BIOVIA Discovery Studio visualizer (Dassault Systèmes®), version 21.1.0. 20298, and in 3D in UCSF Chimera [64], version 1.17.3.

#### 4.7. Effects on Membrane Permeability

The dye SYTOX Green (a DNA intercalator) was used for this test, as performed by Yuen et al. [65]. Initially, the inocula of *S. aureus* 1199B and K2068 were distributed in the 96-well black plate, and then, we added C1 coumarin until final concentrations of 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, and 25 µg/mL were obtained. Polymyxin B, at a concentration of 50 µg/mL, was used as a positive control, and the negative control contained only PBS. The plates were incubated for 1 h, and then, we added 100 µL of SYTOX Green at a final concentration of 1 µM. After another incubation for 1 h, a reading was performed with the same microplate reader and software mentioned above but with 485 nm excitation and 528 nm emission. We also performed the tests in triplicate.

#### 4.8. Statistical Analysis

Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism (version 8.0.1). The means of triplicates underwent analysis of variance (one-way ANOVA) and Bonferroni's post-hoc test. Differences between the groups were significant when  $p < 0.05$ .

## 5. Conclusions

Given the potentiation of the activity of fluoroquinolones and EtBr, the increase in intracellular accumulation and fluorescence emission of EtBr, and the favorable interactions established *in silico*, it is concluded that the 3-substituted coumarins evaluated in the present research act as EPIs against NorA and MepA transporters of *S. aureus*. Among the compounds analyzed, coumarin C1 is the most promising, highlighting the impact of the benzoyl radical in the C-3 position on its effectiveness.

The absence of direct antibacterial effects against *S. aureus* 1199B and K2068, in addition to the lack of change in the permeability of the cell membrane, highlights the specificity of the mechanisms of these coumarins and their relevance as possible allies of antibiotic therapy in combating MDR strains through inhibition of efflux. Despite the positive results presented in this study, analyses are necessary to elucidate the potential and limitations of these coumarins. The results of this study imply more knowledge about the potential of coumarins, especially synthetic ones, against bacteria and antibiotic resistance, providing new information about structures/radicals/positions that can generate greater effectiveness in this type of biological activity so that this can be implemented in studies aimed at developing drugs capable of combating multiresistant bacterial strains carrying efflux pumps.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.B.d.A.-N., V.d.Q.B. and S.R.T.; methodology, C.D.d.M.O.-T., G.A.d.A., D.S.A., F.R.R., G.A.B., H.S.H.M.A. and D.T.C.; software, T.B.E., M.Y.W. and J.B.d.A.-N.; validation, J.B.d.A.-N., S.R.T. and H.D.M.C.; formal analysis, J.B.d.A.-N., M.Y.W., F.R.R., G.A.B., D.T.C. and C.D.d.M.O.-T.; investigation, J.B.d.A.-N., C.D.d.M.O.-T., C.M.G.L., G.A.d.A. and D.S.A.; resources, M.Y.W.; data curation, I.A.R. and H.S.H.M.A.; writing—original draft preparation, J.B.d.A.-N., I.A.R. and C.M.G.L.; writing—review and editing, S.R.T., C.M.G.L., D.S.A. and H.D.M.C.; visualization, C.M.G.L., T.B.E. and I.A.R.; supervision, H.D.M.C., V.d.Q.B. and S.R.T.; project administration, S.R.T. and H.D.M.C.; funding acquisition, T.B.E., V.d.Q.B., H.S.H.M.A. and M.Y.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research work was funded by Institutional Fund Projects under grant number (IFPIP:742-130-1443). The authors gratefully acknowledge the technical and financial support provided by the Ministry of Education and King Abdulaziz University, DSR, Jeddah, Saudi Arabia.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All data related to the study are included in the article.

**Acknowledgments:** The authors are thankful to Ahmad Firoz for his guidance. The authors also thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq Scholarship-Brazil).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Cheung, G.Y.C.; Bae, J.S.; Otto, M. Pathogenicity and Virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence* **2021**, *12*, 547–569. [\[CrossRef\]](#)
- Howden, B.P.; Giulieri, S.G.; Wong Fok Lung, T.; Baines, S.L.; Sharkey, L.K.; Lee, J.Y.H.; Hachani, A.; Monk, I.R.; Stinear, T.P. *Staphylococcus aureus* Host Interactions and Adaptation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2023**, *21*, 380–395. [\[CrossRef\]](#)
- Jadimurthy, R.; Mayegowda, S.B.; Nayak, S.C.; Mohan, C.D.; Rangappa, K.S. Escaping Mechanisms of ESKAPE Pathogens from Antibiotics and Their Targeting by Natural Compounds. *Biotechnol. Rep.* **2022**, *34*, e00728. [\[CrossRef\]](#)
- Mlynarczyk-Bonikowska, B.; Kowalewski, C.; Krolak-Ulinska, A.; Marusza, W. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8088. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Huang, L.; Wu, C.; Gao, H.; Xu, C.; Dai, M.; Huang, L.; Hao, H.; Wang, X.; Cheng, G. Bacterial Multidrug Efflux Pumps at the Frontline of Antimicrobial Resistance: An Overview. *Antibiotics* **2022**, *11*, 520. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gaurav, A.; Bakht, P.; Saini, M.; Pandey, S.; Pathania, R. Role of Bacterial Efflux Pumps in Antibiotic Resistance, Virulence, and Strategies to Discover Novel Efflux Pump Inhibitors. *Microbiology* **2023**, *169*, 001333. [\[CrossRef\]](#)
- Stephen, J.; Salam, F.; Lekshmi, M.; Kumar, S.H.; Varela, M.F. The Major Facilitator Superfamily and Antimicrobial Resistance Efflux Pumps of the ESKAPEE Pathogen *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics* **2023**, *12*, 343. [\[CrossRef\]](#)
- Hassanzadeh, S.; Ganjloo, S.; Pourmand, M.R.; Mashhadi, R.; Ghazvini, K. Epidemiology of Efflux Pumps Genes Mediating Resistance among *Staphylococcus aureus*; A Systematic Review. *Microb. Pathog.* **2020**, *139*, 103850. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Murray, C.J.L.; Ikuta, K.S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; et al. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *Lancet* **2022**, *399*, 629–655. [\[CrossRef\]](#)
- Kumar, G.; Kiran Tudu, A. Tackling Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* by Natural Products and Their Analogues Acting as NorA Efflux Pump Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2023**, *80*, 117187. [\[CrossRef\]](#)
- Zhang, S.; Wang, J.; Ahn, J. Advances in the Discovery of Efflux Pump Inhibitors as Novel Potentiators to Control Antimicrobial-Resistant Pathogens. *Antibiotics* **2023**, *12*, 1417. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- AlMatar, M.; Albarri, O.; Makky, E.A.; Köksal, F. Efflux Pump Inhibitors: New Updates. *Pharmacol. Rep.* **2021**, *73*, 1–16. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Cook, M.A.; Wright, G.D. The Past, Present, and Future of Antibiotics. *Sci. Transl. Med.* **2022**, *14*, eabo7793. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Tsivileva, O.M.; Koftin, O.V.; Evseeva, N.V. Coumarins as Fungal Metabolites with Potential Medicinal Properties. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1156. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sinha, S.; Singh, K.; Ved, A.; Hasan, S.M.; Mujeeb, S. Therapeutic Journey and Recent Advances in the Synthesis of Coumarin Derivatives. *Mini Rev. Med. Chem.* **2022**, *22*, 1314–1330. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sharifi-Rad, J.; Cruz-Martins, N.; López-Jornet, P.; Lopez, E.P.-F.; Harun, N.; Yeskalyeva, B.; Beyatli, A.; Sytar, O.; Shaheen, S.; Sharopov, F.; et al. Natural Coumarins: Exploring the Pharmacological Complexity and Underlying Molecular Mechanisms. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**, *2021*, 6492346. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- de Araújo, R.S.A.; Barbosa-Filho, J.M.; Scotti, M.T.; Scotti, L.; da Cruz, R.M.D.; dos Falcão-Silva, V.S.; de Siqueira-Júnior, J.P.; Mendonça-Junior, F.J.B. Modulation of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus* with Coumarin Derivatives. *Scientifica* **2016**, *2016*, 6894758. [\[CrossRef\]](#)

18. Šimunović, K.; Solnier, J.; Alperth, F.; Kunert, O.; Smole Možina, S.S.; Bucar, F. Efflux Pump Inhibition and Resistance Modulation in *Mycobacterium smegmatis* by *Peucedanum ostruthium* and Its Coumarins. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1075. [\[CrossRef\]](#)
19. Flores-Morales, V.; Villasana-Ruiz, A.P.; Garza-Veloz, I.; González-Delgado, S.; Martínez-Fierro, M.L. Therapeutic Effects of Coumarins with Different Substitution Patterns. *Molecules* **2023**, *28*, 2413. [\[CrossRef\]](#)
20. Ranjan Sahoo, C.; Sahoo, J.; Mahapatra, M.; Lenka, D.; Kumar Sahu, P.; Dehury, B.; Nath Padhy, R.; Kumar Paidesetty, S. Coumarin Derivatives as Promising Antibacterial Agent(s). *Arab. J. Chem.* **2021**, *14*, 102922. [\[CrossRef\]](#)
21. Qin, H.-L.; Zhang, Z.-W.; Ravindar, L.; Rakesh, K.P. Antibacterial Activities with the Structure-Activity Relationship of Coumarin Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *207*, 112832. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Prabhala, P.; Sutar, S.M.; Savanur, H.M.; Joshi, S.D.; Kalkhambkar, R.G. In Vitro Antimicrobial Combat, Molecular Modelling and Structure Activity Relationship Studies of Novel Class of Aryl-Ethyne Tethered Coumarin Analogues and Some 3-Aryl Coumarin Derivatives. *Eur. J. Med. Chem. Rep.* **2022**, *5*, 100048. [\[CrossRef\]](#)
23. Tiwari, S.; Seijas, J.; Vazquez-Tato, M.; Sarkate, A.; Karnik, K.; Nikalje, A. Facile Synthesis of Novel Coumarin Derivatives, Antimicrobial Analysis, Enzyme Assay, Docking Study, ADMET Prediction and Toxicity Study. *Molecules* **2017**, *22*, 1172. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Salwan, R.; Sharma, V. Bioactive Compounds of Streptomyces: Biosynthesis to Applications. In *Studies in Natural Products Chemistry*, 1st ed.; Rahman, A., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020; Volume 64, pp. 467–491. [\[CrossRef\]](#)
25. Bhatt, S.; Chatterjee, S. Fluoroquinolone Antibiotics: Occurrence, Mode of Action, Resistance, Environmental Detection, and Remediation—A Comprehensive Review. *Environ. Pollut.* **2022**, *315*, 120440. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Melliou, E.; Magiatis, P.; Mitaku, S.; Skaltsounis, A.-L.; Chinou, E.; Chinou, I. Natural and Synthetic 2,2-Dimethylpyranocoumarins with Antibacterial Activity. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 78–82. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Baruah, P.; Basumatary, G.; Yesylevskyy, S.O.; Aguan, K.; Bez, G.; Mitra, S. Novel Coumarin Derivatives as Potent Acetylcholinesterase Inhibitors: Insight into Efficacy, Mode and Site of Inhibition. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2019**, *37*, 1750–1765. [\[CrossRef\]](#)
28. Sovari, S.N.; Vojnovic, S.; Bogojevic, S.S.; Crochet, A.; Pavic, A.; Nikodinovic-Runic, J.; Zobi, F. Design, Synthesis and in Vivo Evaluation of 3-Arylcoumarin Derivatives of Rhenium(II) Tricarbonyl Complexes as Potent Antibacterial Agents against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *205*, 112533. [\[CrossRef\]](#)
29. Ge, Z.; Ji, Q.; Chen, C.; Liao, Q.; Wu, H.; Liu, X.; Huang, Y.; Yuan, L.; Liao, F. Synthesis and Biological Evaluation of Novel 3-Substituted Amino-4-Hydroxycoumarin Derivatives as Chitin Synthase Inhibitors and Antifungal Agents. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 219–228. [\[CrossRef\]](#)
30. Sharma, A.; Gupta, V.; Pathania, R. Efflux Pump Inhibitors for Bacterial Pathogens: From Bench to Bedside. *Indian J. Med. Res.* **2019**, *149*, 129. [\[CrossRef\]](#)
31. Martin, A.L.A.R.; De Menezes, I.R.A.; Sousa, A.K.; Farias, P.A.M.; dos Santos, F.A.V.; Freitas, T.S.; Figueredo, F.G.; Ribeiro-Filho, J.; Carvalho, D.T.; Coutinho, H.D.M.; et al. In Vitro and in Silico Antibacterial Evaluation of Coumarin Derivatives against MDR Strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* **2023**, *177*, 106058. [\[CrossRef\]](#)
32. de Sousa, A.K.; Rocha, J.E.; de Freitas, T.S.; Freitas, P.R.; Pereira, R.L.S.; Júnior, F.N.P.; Brancaglioni, G.A.; de Paulo, D.C.; Carvalho, D.T.; de Menezes, I.R.A.; et al. Photobiological Effect of Eugenol-derived 3-benzoylcoumarin Associated with Led Lights against MDR Microorganisms. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2023**, *37*, 316–323. [\[CrossRef\]](#)
33. Madeiro, S.A.L.; Borges, N.H.P.B.; Souto, A.L.; de Figueiredo, P.T.R.; Siqueira-Junior, J.P.; Tavares, J.F. Modulation of the Antibiotic Activity against Multidrug Resistant Strains of Coumarins Isolated from Rutaceae Species. *Microb. Pathog.* **2017**, *104*, 151–154. [\[CrossRef\]](#)
34. Martin, A.L.A.R.; Pereira, R.L.S.; Rocha, J.E.; Farias, P.A.M.; Freitas, T.S.; de Lemos Caldas, F.R.; Figueredo, F.G.; Sampaio, N.F.L.; Ribeiro-Filho, J.; Menezes, I.R. de A.; et al. In Vitro and in Silico Evidences about the Inhibition of MepA Efflux Pump by Coumarin Derivatives. *Microb. Pathog.* **2023**, *182*, 106246. [\[CrossRef\]](#)
35. Verma, P.; Tiwari, M.; Tiwari, V. Strategies to Combat Bacterial Antimicrobial Resistance: A Focus on Mechanism of the Efflux Pumps Inhibitors. *SN Compr. Clin. Med.* **2021**, *3*, 510–527. [\[CrossRef\]](#)
36. Roy, S.K.; Kumari, N.; Pahwa, S.; Agrahari, U.C.; Bhutani, K.K.; Jachak, S.M.; Nandanwar, H. NorA Efflux Pump Inhibitory Activity of Coumarins from *Mesua ferrea*. *Fitoterapia* **2013**, *90*, 140–150. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Bazzaz, B.S.F.; Memariani, Z.; Khashiarmanesh, Z.; Iranshahi, M.; Naderinasab, M. Effect of Galbanic Acid, a Sesquiterpene Coumarin from *Ferula szowitsiana*, as an Inhibitor of Efflux Mechanism in Resistant Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Braz. J. Microbiol.* **2010**, *41*, 574–580. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Joshi, P.; Singh, S.; Wani, A.; Sharma, S.; Jain, S.K.; Singh, B.; Gupta, B.D.; Satti, N.K.; Koul, S.; Khan, I.A.; et al. Osthonol and Curcumin as Inhibitors of Human Pgp and Multidrug Efflux Pumps of *Staphylococcus aureus*: Reversing the Resistance against Frontline Antibacterial Drugs. *Med. Chem. Commun.* **2014**, *5*, 1540–1547. [\[CrossRef\]](#)
39. Rodrigues, D.F.; Borges, N.H.P.B.; Nogueira, C.E.S.; Tavares, J.F.; Arcanjo, D.D.R.; Barreto, H.M.; Siqueira-Junior, J.P. Modulation of Drug Resistance by Furanochromones in NorA Overexpressing *Staphylococcus aureus*. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2022**, *2022*, 9244500. [\[CrossRef\]](#)
40. dos Santos Barbosa, C.R.; Scherf, J.R.; de Freitas, T.S.; de Menezes, I.R.A.; Pereira, R.L.S.; dos Santos, J.F.S.; de Jesus, S.S.P.; Lopes, T.P.; de Sousa Silveira, Z.; de Moraes Oliveira-Tintino, C.D.; et al. Effect of Carvacrol and Thymol on NorA Efflux Pump Inhibition in Multidrug-Resistant (MDR) *Staphylococcus aureus* Strains. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2021**, *53*, 489–498. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

41. de Oliveira-Tintino, C.D.M.; Tintino, S.R.; Muniz, D.F.; Rodrigues dos Santos Barbosa, C.; Pereira, R.L.S.; Beghini, I.M.; Rebelo, R.A.; da Silva, L.E.; Mireski, S.L.; Nasato, M.C.; et al. Chemical Synthesis, Molecular Docking and MepA Efflux Pump Inhibitory Effect by 1,8-Naphthyridines Sulfonamides. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2021**, *160*, 105753. [\[CrossRef\]](#)
42. Chen, X.; Li, X.; Li, Y. Toxicity Inhibition Strategy of Microplastics to Aquatic Organisms through Molecular Docking, Molecular Dynamics Simulation and Molecular Modification. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2021**, *226*, 112870. [\[CrossRef\]](#)
43. Catherine Tomy, P.; Mohan, C.G. Chemical Space Navigation by Machine Learning Models for Discovering Selective MAO-B Enzyme Inhibitors for Parkinson's Disease. *Artif. Intell. Chem.* **2023**, *1*, 100012. [\[CrossRef\]](#)
44. Coursier, D.; Coulette, D.; Leman, H.; Grenier, E.; Ichim, G. Live-Cell Imaging and Mathematical Analysis of the "Community Effect" in Apoptosis. *Apoptosis* **2023**, *28*, 326–334. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Ledger, E.V.K.; Sabnis, A.; Edwards, A.M. Polymyxin and Lipopeptide Antibiotics: Membrane-Targeting Drugs of Last Resort. *Microbiology* **2022**, *168*, 001136. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Zhong, R.; Li, H.; Li, H.; Fang, S.; Liu, J.; Chen, Y.; Liu, S.; Lin, S. Development of Amphiphilic Coumarin Derivatives as Membrane-Active Antimicrobial Agents with Potent In Vivo Efficacy against Gram-Positive Pathogenic Bacteria. *ACS Infect. Dis.* **2021**, *7*, 2864–2875. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Yang, X.-C.; Zeng, C.-M.; Avula, S.R.; Peng, X.-M.; Geng, R.-X.; Zhou, C.-H. Novel Coumarin Aminophosphonates as Potential Multitargeting Antibacterial Agents against *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *245*, 114891. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Mehta, D.; Saini, V.; Aggarwal, B.; Khan, A.; Bajaj, A. Unlocking the Bacterial Membrane as a Therapeutic Target for Next-Generation Antimicrobial Amphiphiles. *Mol. Asp. Med.* **2021**, *81*, 100999. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Koszelewski, D.; Kowalczyk, P.; Brodzka, A.; Hrunyk, A.; Kramkowski, K.; Ostaszewski, R. Enzymatic Synthesis of a Novel Coumarin Aminophosphonates: Antibacterial Effects and Oxidative Stress Modulation on Selected *E. coli* Strains. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 7609. [\[CrossRef\]](#)
50. Govêa, K.P.; Pereira, R.S.T.; de Assis, M.D.O.; Alves, P.I.; Brancaglioni, G.A.; Toyota, A.E.; Machado, J.V.C.; Carvalho, D.T.; de Souza, T.C.; Beijo, L.A.; et al. Allelochemical Activity of Eugenol-Derived Coumarins on *Lactuca sativa* L. *Plants* **2020**, *9*, 533. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. da Silva, M.M.C.; de Araújo-Neto, J.B.; de Araújo, A.C.J.; Freitas, P.R.; de Oliveira-Tintino, C.D.M.; Beghini, I.M.; Rebelo, R.A.; da Silva, L.E.; Mireski, S.L.; Nasato, M.C.; et al. Potentiation of Antibiotic Activity by a Meldrum's Acid Arylamino Methylene Derivative against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. *Indian J. Microbiol.* **2021**, *61*, 100–103. [\[CrossRef\]](#)
52. Rocha, J.E.; de Freitas, T.S.; da Cunha Xavier, J.; Pereira, R.L.S.; Junior, F.N.P.; Nogueira, C.E.S.; Marinho, M.M.; Bandeira, P.N.; de Oliveira, M.R.; Marinho, E.S.; et al. Antibacterial and Antibiotic Modifying Activity, ADMET Study and Molecular Docking of Synthetic Chalcone (E)-1-(2-Hydroxyphenyl)-3-(2,4-Dimethoxy-3-Methylphenyl)Prop-2-En-1-One in Strains of *Staphylococcus aureus* Carrying NorA and MepA Efflux Pumps. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *140*, 111768. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. CLSI. *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 30th ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, NJ, USA, 2020; pp. 58–66.
54. Javadpour, M.M.; Juban, M.M.; Lo, W.-C.J.; Bishop, S.M.; Alberty, J.B.; Cowell, S.M.; Becker, C.L.; McLaughlin, M.L. De Novo Antimicrobial Peptides with Low Mammalian Cell Toxicity. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3107–3113. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. dos Santos, A.T.L.; de Araújo-Neto, J.B.; Costa da Silva, M.M.; Paulino da Silva, M.E.; Carneiro, J.N.P.; Fonseca, V.J.A.; Coutinho, H.D.M.; Bandeira, P.N.; dos Santos, H.S.; da Silva Mendes, F.R.; et al. Synthesis of Chalcones and Their Antimicrobial and Drug Potentiating Activities. *Microb. Pathog.* **2023**, *180*, 106129. [\[CrossRef\]](#)
56. Coutinho, H.D.M.; Costa, J.G.M.; Lima, E.O.; Falcão-Silva, V.S.; Siqueira-Júnior, J.P. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* and Chlorpromazine. *Chemotherapy* **2008**, *54*, 328–330. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. da Silva, L.Y.S.; Paulo, C.L.R.; Moura, T.F.; Alves, D.S.; Pessoa, R.T.; Araújo, I.M.; de Moraes Oliveira-Tintino, C.D.; Tintino, S.R.; de Nonato, C.F.A.; da Costa, J.G.M.; et al. Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Piper tuberculatum* Jacq. Fruits against Multidrug-Resistant Strains: Inhibition of Efflux Pumps and  $\beta$ -Lactamase. *Plants* **2023**, *12*, 2377. [\[CrossRef\]](#)
58. Oliveira, M.M.; Santos, H.S.; Coutinho, H.D.M.; Bandeira, P.N.; da Silva, P.T.; Freitas, T.S.; Rocha, J.E.; Xavier, J.C.; Campina, F.F.; Barbosa, C.R.S.; et al. Spectroscopic Characterization and Efflux Pump Modulation of a Thiophene Curcumin Derivative. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1215*, 128291. [\[CrossRef\]](#)
59. Freitas, T.S.; Xavier, J.C.; Pereira, R.L.S.; Rocha, J.E.; Campina, F.F.; de Araújo Neto, J.B.; Silva, M.M.C.; Barbosa, C.R.S.; Marinho, E.S.; Nogueira, C.E.S.; et al. In Vitro and in Silico Studies of Chalcones Derived from Natural Acetophenone Inhibitors of NorA and MepA Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*. *Microb. Pathog.* **2021**, *161*, 105286. [\[CrossRef\]](#)
60. Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F.T.; de Beer, T.A.P.; Rempfer, C.; Bordoli, L.; et al. SWISS-MODEL: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W296–W303. [\[CrossRef\]](#)
61. Bitencourt-Ferreira, G.; de Azevedo, W.F. Molegro Virtual Docker for Docking. In *Docking Screens for Drug Discovery. Methods in Molecular Biology*, 1st ed.; de Azevedo, W.F., Ed.; Humana: New York, NY, USA, 2019; Volume 2053, pp. 149–167. [\[CrossRef\]](#)
62. de Lima Silva, M.G.; da Silva, L.Y.S.; de Freitas, T.S.; Rocha, J.E.; Pereira, R.L.S.; Tintino, S.R.; de Oliveira, M.R.C.; Bezerra Martins, A.O.B.P.; Lima, M.C.P.; Alverni da Hora, G.C.; et al. Antibacterial Effect and Evaluation of the Inhibitory Effect against Efflux Pump in *Staphylococcus aureus* by Abietic Acid: In Vitro and in Silico Assays. *Process Biochem.* **2022**, *122*, 363–372. [\[CrossRef\]](#)

63. de Araújo, A.C.J.; Freitas, P.R.; dos Santos Barbosa, C.R.; Muniz, D.F.; de Almeida, R.S.; Alencar de Menezes, I.R.; Ribeiro-Filho, J.; Tintino, S.R.; Coutinho, H.D.M. In Vitro and In Silico Inhibition of *Staphylococcus aureus* Efflux Pump NorA by  $\alpha$ -Pinene and Limonene. *Curr. Microbiol.* **2021**, *78*, 3388–3393. [[CrossRef](#)]
64. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera—A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Yuen, H.L.; Chan, S.Y.; Ding, Y.E.; Lim, S.; Tan, G.C.; Kho, C.L. Development of a Novel Antibacterial Peptide, PAM-5, via Combination of Phage Display Selection and Computer-Assisted Modification. *Biomolecules* **2023**, *13*, 466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

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

## 4.2 ARTIGO 2

### **Avaliação *in vitro* e *in silico* de cumarinas 3-substituídas: Evidências de inibição de $\beta$ -lactamase**

José B. de Araújo-Neto<sup>1</sup>, Daniel S. Alves<sup>2</sup>, Gildênia A. de Araújo<sup>2</sup>, Fernanda R. Ribeiro<sup>3</sup>, Guilherme A. Brancaglioni<sup>3</sup>, Diogo T. Carvalho<sup>3</sup>, Henrique D. M. Coutinho<sup>2</sup>, Augusto Schrank<sup>1,4</sup>, Saulo R. Tintino<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>*Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 50740-570, Brasil.*

<sup>2</sup>*Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato – CE, 63105-000, Brasil.*

<sup>3</sup>*Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas – MG, 37130-001, Brasil.*

<sup>4</sup>*Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 91501-970, Brasil.*

### **Resumo**

A resistência aos medicamentos é uma questão fundamental no tratamento de infecções bacterianas, de modo que é necessário descobrir fármacos alternativos para controlar bactérias resistentes a antibióticos, como *Staphylococcus aureus* produtor de  $\beta$ -lactamase. Diante disso, as cumarinas com modificações C-3 têm diferentes efeitos inibitórios sobre as bactérias, inclusive as multirresistentes. Aqui, avaliou-se o potencial *in vitro* e *in silico* de cumarinas 3-substituídas na inibição de  $\beta$ -lactamase de *S. aureus*. Este estudo envolveu ensaios de atividade antibacteriana e associação com ampicilina para controle de cepas produtoras de  $\beta$ -lactamase, docagem molecular com a  $\beta$ -lactamase codificada por *blaZ* e a análise de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) das cumarinas 3-substituídas. Os derivados não inibiram o crescimento bacteriano. Contudo, potencializaram a atividade da ampicilina, reduzindo a concentração inibitória em até 93,75%. A docagem revelou a afinidade dos compostos com o modelo de  $\beta$ -lactamase e mostrou que as cumarinas interagem com aminoácidos cruciais para a atividade enzimática,

como o resíduo Ser70. Os perfis ADMET apresentaram predições positivas, mas também limitações dos derivados, como na distribuição e maior número de alertas de toxicidade para as cumarinas C2 e C3. Portanto, nosso estudo evidencia a capacidade de cumarinas 3-substituídas em inibir  $\beta$ -lactamase de *S. aureus* e a contribuição dos substituintes C-3 para a modulação da resistência e perfil ADMET.

**Palavras-chave:** Derivados Cumarínicos. Resistência  $\beta$ -Lactâmica. Docagem Molecular. Sinergismo Farmacológico. *Staphylococcus aureus*.

## Introdução

A resistência aos antibióticos está entre as maiores ameaças à saúde mundial no século XXI. Além de decorrer de processos naturais das bactérias, a automedicação, a prescrição inadequada de medicamentos e o uso excessivo na agricultura e na produção animal aumentam a pressão para a resistência [1, 2]. Mecanismos como a redução da permeabilidade celular, bombas de efluxo, modificações do alvo e inativação enzimática são responsáveis pela perda da eficácia dos antibióticos e dificultam o tratamento de doenças infecciosas [3].

A hidrólise mediada por  $\beta$ -lactamase é um mecanismo de resistência que contribui para o fracasso dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos no controle de cepas de *Staphylococcus aureus*, um patógeno oportunista considerado um dos agentes infecciosos mais críticos [4, 5]. Nessa espécie Gram-positiva, a enzima codificada pelo gene *blaZ*, denominada PC1 ou BlaZ, inativa as drogas do grupo das penicilinas e possui altos e crescentes níveis de detecção em isolados clínicos ao redor do mundo [6].

De acordo com Alfei e Zuccari [7], a associação de  $\beta$ -lactâmicos a inibidores de  $\beta$ -lactamases representa a principal estratégia para restaurar a atividade desses antibióticos contra linhagens resistentes. Os primeiros inibidores utilizados foram ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, combinados com amoxicilina, ampicilina e piperacilina, respectivamente, e sucedidos por diversos outros, como avibactam, nacubactam e zidebactam [8, 9]. Embora esses produtos estejam em uso clínico, a existência de cepas resistentes a antigos ou novos inibidores sinaliza a importância do desenvolvimento de compostos alternativos com atividade inibitória sobre  $\beta$ -lactamases [10].

Cumarinas sintéticas possuem significativo potencial bioativo devido à presença do esqueleto cumarínico e à possibilidade de adicionar novos grupos químicos à sua estrutura [11]. Derivados com grupos ligados à posição C-3 apresentaram propriedades antitumorais [12], anti-Alzheimer [13], antifúngicas [14], antiparasitárias [15] e antivirais [16]. Ademais, foram reportados vários efeitos no controle de bactérias, como inibição do crescimento [17], interferência na produção de fator de virulência [18], inibição da formação de biofilme [19] e inibição de atividade enzimática [20].

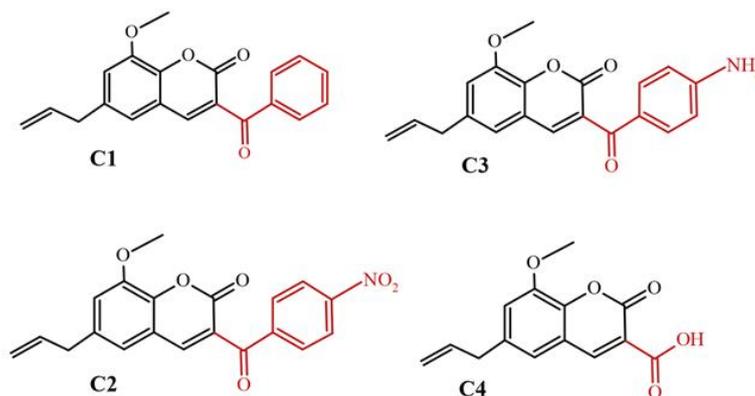
Em trabalho anterior, apresentamos os efeitos de cumarinas 3-substituídas na modulação da resistência de *S. aureus* através da inibição de bombas de efluxo [21]. Diante dos resultados positivos demonstrados contra esse patógeno e a resistência a antibióticos, a presente pesquisa foi conduzida para avaliar o potencial *in vitro* e *in silico* de cumarinas 3-substituídas na inibição de  $\beta$ -lactamase de *S. aureus*.

## **Materiais e Métodos**

### Preparação de substâncias para testes *in vitro*

Foram avaliadas as seguintes cumarinas: C1: 3-benzoil-8-metoxi-6-(prop-2-en-1-il)-2H-cromen-2-ona, C2: 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-(prop-2-en-1-il)-2H-cromen-2-ona, C3: 3-(4-aminobenzoil)-8-metoxi-6-(prop-2-en-1-il)-2H-cromen-2-ona e C4: ácido 8-metoxi-2-oxo-6-(prop-2-en-1-il)-2H-cromen-3-carboxílico (Figura 1). Esses compostos foram fornecidos pelo Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (Universidade Federal de Alfenas, Brasil) [22]. A preparação das soluções das cumarinas e dos antibióticos ampicilina e ampicilina + sulbactam (Sigma-Aldrich Co., USA) para os ensaios *in vitro* seguiu o método empregado por Da Silva *et al.* [23], obtendo-se soluções com concentração de 1.024  $\mu\text{g/mL}$  em água destilada e dimetilsulfóxido.

Figura 1 – Estruturas químicas das cumarinas 3-substituídas (substituições C-3 em vermelho).



Fonte: O autor (2024).

### Linhagens Bacterianas

As linhagens utilizadas nesse estudo foram *S. aureus* K4100 e *S. aureus* K4414 [24]. Para os testes *in vitro*, ressuspenderam-se amostras das colônias (24 horas de crescimento em Mueller Hinton Agar a 37 °C) em solução NaCl 0,9% para obter inóculos com turbidez equivalente à escala 0,5 de McFarland, como recomendado pela CLSI [25].

### Avaliação da Atividade Antibacteriana

A microdiluição em *Brain Heart Infusion Broth* (BHI) foi empregada para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das cumarinas nos ensaios com as linhagens de *S. aureus* [26]. A microdiluição (1:1) com 100 µL das soluções das cumarinas em microplacas de 96 poços preenchidas pela solução contendo BHI (a 10%) e inóculo bacteriano resultou na variação da concentração dos compostos testados de 512 a 8 µg/mL. Foram realizadas triplicatas. Após a incubação (24 horas, 37 °C), foi adicionada resazurina sódica (0,4 mg/mL) aos poços para determinar desenvolvimento bacteriano [27].

### Associação das Cumarinas com Ampicilina

Para avaliar o efeito das cumarinas sobre linhagens resistentes a β-lactâmicos, foram organizados os seguintes grupos (em triplicata): i) Grupo-Teste: cumarinas em

concentração subinibitória (CIM/8) + meio de cultura (BHI 10%) + inóculo; ii) Controle negativo e Controle de inibição: meio de cultura + inóculo. Com os poços das microplacas preenchidos com 100  $\mu$ L das soluções descritas, foi realizada a microdiluição (1:1) com 100  $\mu$ L de ampicilina (grupo-teste e controle negativo) e ampicilina + sulbactam (controle de inibição). Este ensaio seguiu o método empregado por Coutinho *et al.* [28]. Após a incubação (24 horas, 37 °C), a leitura dos resultados ocorreu como descrito acima.

### Docagem Molecular

Para realizar um docking sítio-específico, foi utilizado o modelo da  $\beta$ -lactamase PC1 de *S. aureus* disponível no Protein Data Bank (PDB) sob o identificador 1BLC e as coordenadas do sítio ativo (x: 4,08, y: -8,31, z: -12,31), como descrito por Safdari *et al.* [29]. As moléculas de água, ligantes e cofatores foram excluídas do modelo da proteína. As estruturas tridimensionais (3D) das cumarinas e do sulbactam foram desenhadas no MarvinSketch® 23.14 (Chemaxon©) e otimizadas no Open Babel 2.4.1 com o campo de força MMFF94. As formas ionizadas de C3 (NH<sub>3</sub><sup>+</sup> substituindo NH<sub>2</sub>) e C4 (O<sup>-</sup> substituindo OH) também foram construídas.

O Molegro Virtual Docker (versão 2019.7.0.0) foi o software utilizado para a realização da docagem molecular com ligantes flexíveis [30]. A grade (raio: 15 Å) foi posicionada de acordo com as coordenadas citadas e utilizou-se o MolDock Score [GRID] e o MolDock Optimizer como função de pontuação e algoritmo de busca, respectivamente. Os demais parâmetros, incluindo a preparação de proteínas e ligantes (p. ex., adição de hidrogênios e cargas), foram mantidos como padrões.

A docagem com ligantes e receptor flexíveis ocorreu no AutoDock (versão 4.2.6) [31], com *grid box* de 30 Å x 30 Å x 30 Å posicionada no centro do sítio de ligação e utilizando algoritmo genético Lamarckiano (corridas: 100, tamanho da população: 150, número de avaliações: 2.500.000). Para a preparação dos componentes no AutoDockTools 1.5.7, foram adicionados átomos de hidrogênio (misturando os apolares) e cargas parciais de Gasteiger, além de definir as estruturas dos ligantes e resíduos do receptor (até 10,0 Å do sítio ativo) como flexíveis. Em ambas as análises, o limite da raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSD) foi de 2,0 Å e foram escolhidas as conformações dos ligantes com as melhores energias de interação.

## Análise ADMET

O cálculo das propriedades físico-químicas das cumarinas foi realizado pelo software MarvinSketch® 23.14, pelo método ChemAxon. Os servidores virtuais pkCSM [32], Pred-hERG 5.0 [33] e ProTox-II [34] foram utilizados nas predições de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) dos compostos, enquanto o SwissADME foi o servidor empregado na identificação dos parâmetros de *drug-likeness* (semelhança com drogas) e química medicinal [35].

## Análise Estatística

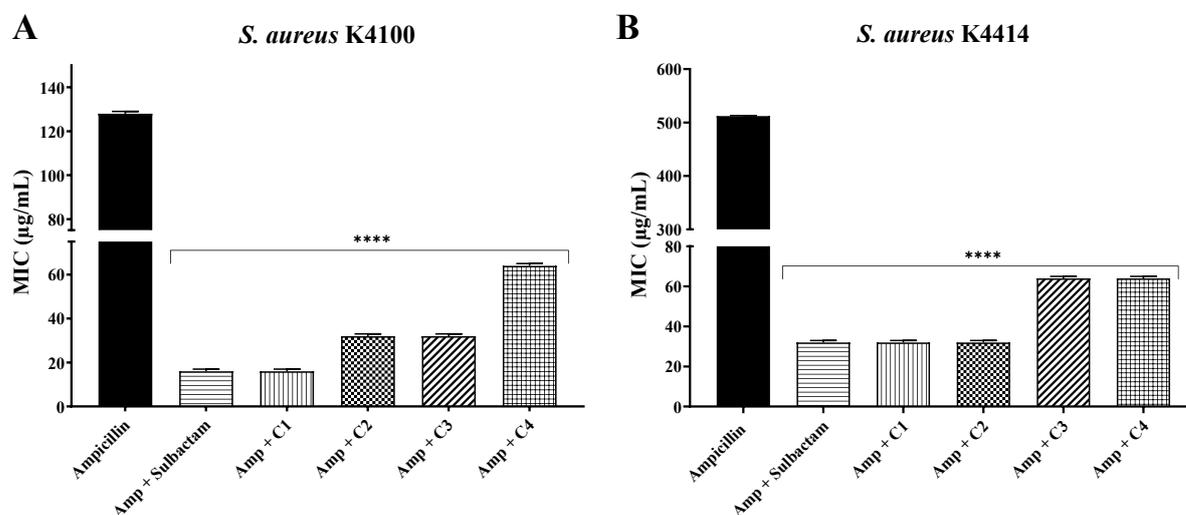
A análise estatística dos resultados dos testes *in vitro* foi realizada no GraphPad Prism 8.0.1, utilizando análise de variância (ANOVA) de duas vias e teste *post-hoc* de Bonferroni. Foi aplicado  $p < 0.05$ .

## Resultados

### Atividades Antibacteriana e Potencializadora

O ensaio de atividade antibacteriana revelou que todas as cumarinas avaliadas apresentaram CIM  $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$  contra as linhagens K4100 e K4414 de *S. aureus*. Apesar de esses compostos não terem controlado o crescimento das cepas testadas, o efeito da ampicilina foi potencializado pela adição das cumarinas. No teste com a linhagem K4100, a CIM da ampicilina ( $128 \mu\text{g/mL}$ ) foi reduzida em 50% pelas cumarinas C2 a C4 e em 87,5% pela cumarina C1, que apresentou a mesma eficácia do controle de inibição de ampicilina + sulbactam (Figura 2A).

Figura 2 – Potencialização da atividade da ampicilina por cumarinas 3-substituídas contra *S. aureus* K4100 (A) e *S. aureus* K4414 (B). \*\*\*\* -  $p < 0.0001$  (significância estatística).



Fonte: O autor (2024).

Para *S. aureus* K4414, que apresentou maior resistência à ampicilina (CIM = 512 µg/mL), todas as associações também resultaram em efeito sinérgico, com 87,5% de redução da CIM do antibiótico pelas cumarinas C3 e C4 e de 93,75% pelas cumarinas C1 e C2, mesma taxa de redução do controle de inibição (Figura 2B). Analisados juntos, os resultados com as duas cepas revelam que a cumarina C1 foi a mais eficiente.

#### Docagem das cumarinas com a $\beta$ -lactamase PC1

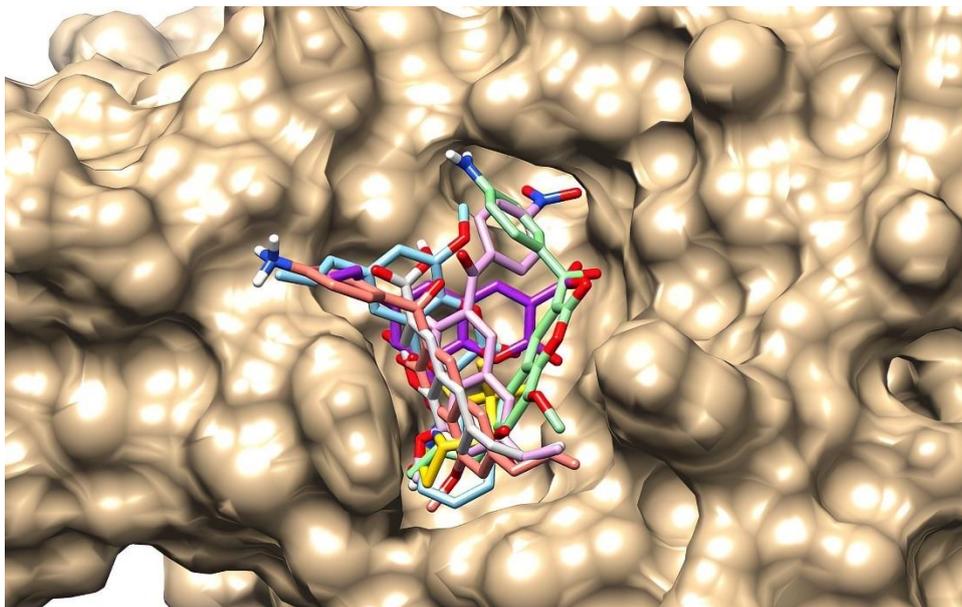
A docagem com ligantes flexíveis demonstrou que o maior nível de afinidade com o modelo da  $\beta$ -lactamase PC1 ocorreu com a cumarina C2, seguida pelas cumarinas C1 > C3 > C4. O MolDock Score desses compostos variou de -87,1426 a -115,8330, e as energias de interação de -94,3317 a -130,8900. Em ambos os parâmetros, o sulbactam apresentou valores menos expressivos (-80.0620 e -82.6379, respectivamente), apesar de ser o composto com o melhor resultado na eficiência do ligante (Tabela 1). Ao analisar a localização dos ligantes no sítio de ligação, percebe-se que as cumarinas e o sulbactam ocupam uma região semelhante na enzima, com exceção da espécie neutra da cumarina C3 (Figura 3).

Tabela 1 – Resultados da docagem com ligantes flexíveis no modelo de  $\beta$ -lactamase PC1

Compostos	MolDock Score	Interação	HBond	LE1
<b>C1</b>	-112,4820	-123,4120	-8,94534	-4,68674
<b>C2</b>	-115,8330	-130,8900	-9,45997	-4,29010
<b>C3</b>	-110,5490	-122,9260	-10,7876	-4,42195
	(-108,9050)	(-117,8380)	(-7,05663)	(-4,35621)
<b>C4</b>	-87,1426	-94,3317	-9,97778	-4,58645
	(-99,9472)	(-109,0330)	(-11,3077)	(-5,26038)
<b>Sulbactam</b>	-80,0620	-82,6379	-17,1179	-5,33746

Legenda: HBond – ligações de hidrogênio; LE1 – eficiência do ligante (MolDock Score dividido pelo total de átomos pesados). Os resultados das espécies ionizadas estão entre parênteses. Os valores das energias calculadas pelo Molegro Virtual Docker são apresentados em unidades arbitrárias. Fonte: O autor (2024).

Figura 3 – Conformação dos ligantes no sítio ativo da  $\beta$ -lactamase PC1: C1 – azul; C2 – rosa; C3 (neutra) – verde; C3 (ionizada) – vermelho; C4 (neutra) – branco; C4 (ionizada) – roxo; Sulbactam - amarelo.



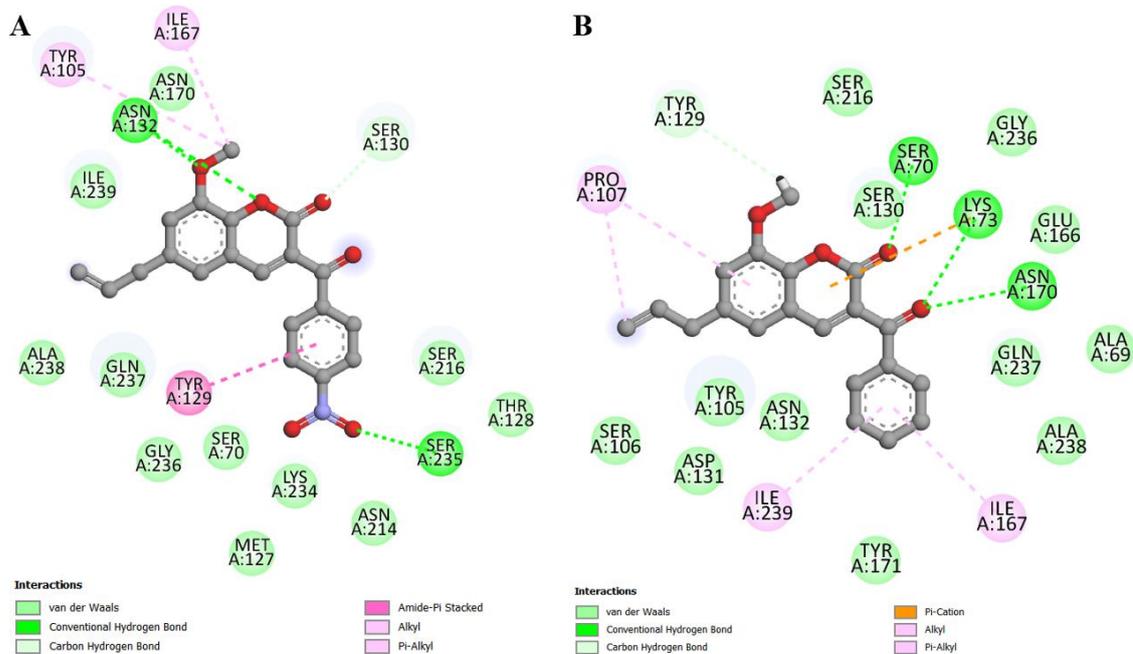
Fonte: O autor (2024).

As interações detectadas para a cumarina C2, que apresentou a maior afinidade no modelo de  $\beta$ -lactamase, foram as seguintes: i) interações de van der Waals (limite: 5 Å); ii) ligações de hidrogênio: ligações de hidrogênio convencionais com Asn132 (1,84 Å com o radical metoxi e 3,03 Å com o núcleo cumarínico) e Ser235 (2,24 Å), e ligação de carbono-hidrogênio com Ser130 (2,53 Å); iii) interações

hidrofóbicas: empilhamento amida- $\pi$  com Tyr129 (4,57 Å), alquil com Ile167 (3,63 Å) e  $\pi$ -alquil com Tyr105 (4,54 Å) (Figura 4A).

Com os melhores resultados *in vitro*, a cumarina C1 interagiu com o modelo de PC1 das seguintes formas: i) interações de van der Waals (limite: 5 Å); ii) ligações de hidrogênio: ligações de hidrogênio convencionais com Ser70 (1,93 Å), Lys73 (2,84 Å) e Asn170 (2,89 Å), e ligação de carbono-hidrogênio com Tyr129 (3,07 Å); iii) interação eletrostática:  $\pi$ -cátion com Lys73 (4,79 Å); iv) interações hidrofóbicas: alquil com Pro107 (3,76 Å com o radical propenil),  $\pi$ -alquil com Pro107 (5,47 Å com o núcleo cumarínico), Ile239 (5,41 Å) e Ile167 (4,99 Å) (Figura 4B).

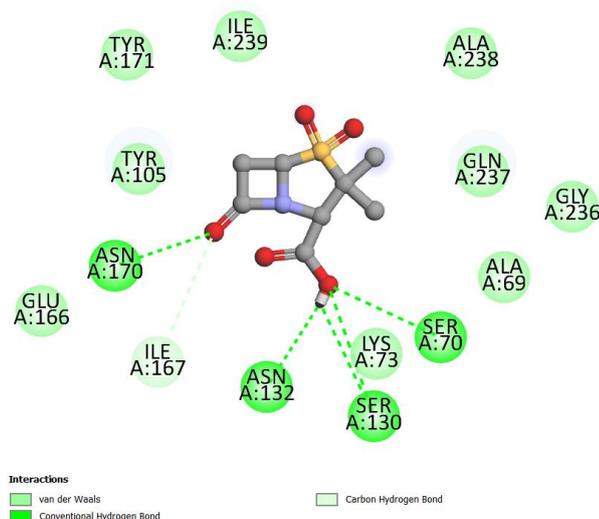
Figura 4 – Interações da cumarina C2 (A) e da cumarina C1 (B) com o modelo de PC1 na docagem com ligantes flexíveis.



Fonte: O autor (2024).

O sulbactam apresentou apenas duas classes de interação com a  $\beta$ -lactamase PC1: i) interações de van der Waals (limite: 5 Å); ii) ligações de hidrogênio: ligações de hidrogênio convencionais com Asn170 (2,29 Å), Asn132 (1,96 Å), Ser130 (3,00 Å e 2,86 Å, respectivamente) e Ser70 (2,65 Å), e ligação carbono-hidrogênio com Ile167 (2,90 Å) (Figura 5).

Figura 5 – Interações do sulbactam com o modelo de PC1 na docagem com ligantes flexíveis.



Fonte: O autor (2024).

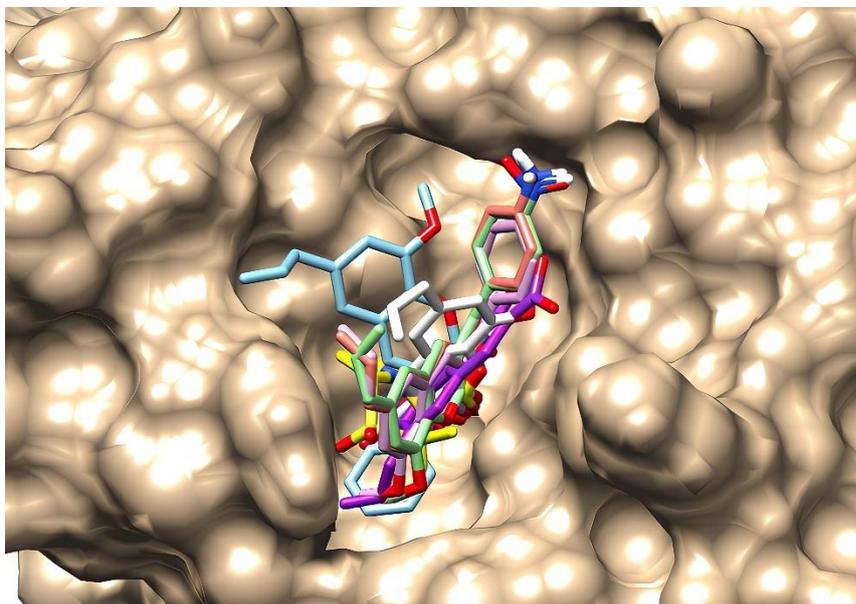
A partir da docagem com ligantes e receptor flexíveis, identificou-se que a cumarina C1 apresentou a maior afinidade com o modelo de  $\beta$ -lactamase, com as demais cumarinas apresentando níveis de afinidade numericamente semelhantes, com exceção da espécie ionizada de C4. As energias de ligação variaram de -7,31 a -8,92 Kcal/mol e as constantes de inibição de 2,14 a 4,95  $\mu$ M. Nessa análise, o sulbactam registou a terceira melhor energia de ligação e o melhor resultado na eficiência do ligante (Tabela 2). A aplicação de flexibilidade nos resíduos da proteína resultou em mudanças na localização dos ligantes no sítio de ligação, sobretudo em relação às cumarinas C2 a C4 (Figura 6).

Tabela 2 – Resultados da docagem com ligantes e receptor flexíveis

Compostos	Energia de ligação	Constante de inibição	Eficiência do Ligante
<b>C1</b>	-8,92	2,14	-0,37
<b>C2</b>	-7,58	2,76	-0,28
<b>C3</b>	-7,85	2,77	-0,31
	(-7,31)	(4,36)	(-0,29)
<b>C4</b>	-7,35	4,09	-0,39
	(-8,68)	(4,95)	(-0,46)
<b>Sulbactam</b>	-8,60	4,77	-0,57

Legenda: Energia de ligação em Kcal/mol, Constante de inibição em  $\mu$ M, LE – eficiência do ligante (energia de ligação dividida pelo número de átomos pesados). Os resultados das espécies ionizadas estão entre parênteses. Fonte: O autor (2024).

Figura 6 – Conformação dos ligantes no sítio ativo da  $\beta$ -lactamase PC1. C1 – azul; C2 – rosa; C3 (neutra) – verde; C3 (ionizada) – vermelho; C4 (neutra) – branco; C4 (ionizada) – roxo; Sulbactam - amarelo.

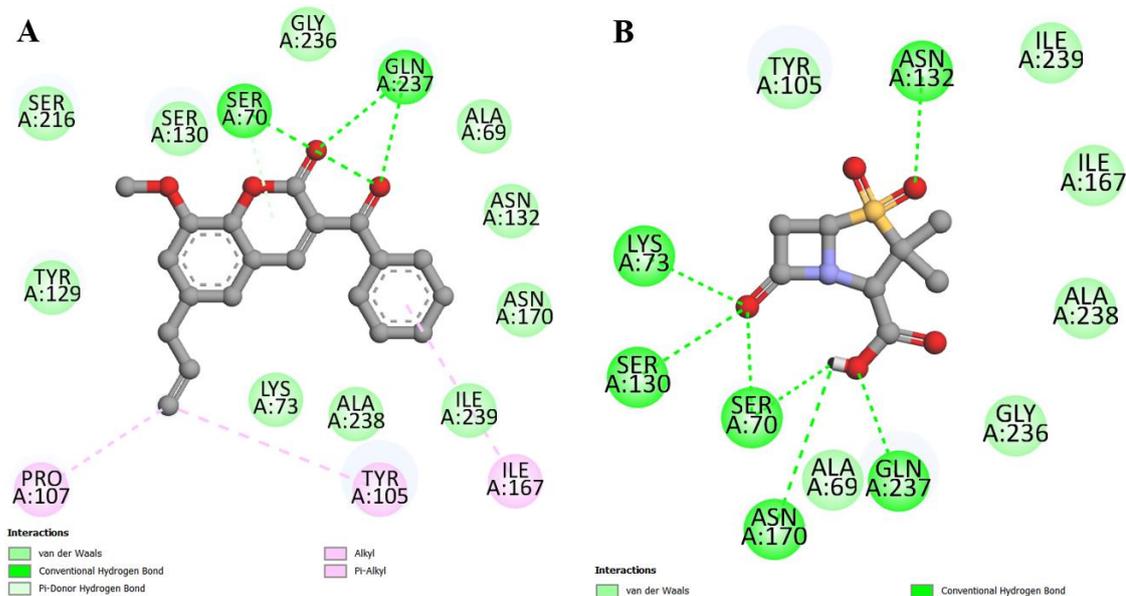


Fonte: O autor (2024).

Com a maior eficácia, comparada aos demais derivados, a cumarina C1 interagiu com o modelo de PC1 com os seguintes parâmetros: i) interações de van der Waals (limite: 5 Å); ii) ligações de hidrogênio: ligações de hidrogênio convencionais com Ser70 (2,55 Å), Gln237 (2,30 Å com o núcleo cumarínico e 2,58 Å com o radical benzoil), e ligação de hidrogênio do doador  $\pi$  com Ser70 (4,84 Å); iii) interações hidrofóbicas: alquil com Pro107 (3,65 Å) e  $\pi$ -alquil com Tyr105 (5,47 Å) e Ile167 (5,36 Å) (Figura 7A).

As interações registradas a partir do sulbactam foram as seguintes: i) interações de van der Waals (limite: 5 Å); ii) ligações de hidrogênio: ligações de hidrogênio convencionais com Lys73 (1,84 Å), Ser130 (2,39 Å), Ser70 (3,91 Å e 2,50 Å, respectivamente), Asn170 (3,02 Å), Gln237 (2,00 Å) e Asn132 (1,97 Å) (Figura 7B).

Figura 7 – Interações da cumarina C1 (A) e do sulbactam (B) com o modelo de PC1 na docagem com ligantes e receptor flexíveis



Fonte: O autor (2024).

## Análise ADMET

Das quatro cumarinas testadas, C4 e C2 têm o menor e o maior peso molecular, respectivamente, e C1 e C2 têm a menor e a maior área de superfície polar, respectivamente. Quanto à solubilidade em água, a C4 foi a cumarina com o maior valor, pois quanto maior o log S, maior a solubilidade. Contudo, como todos os log S são negativos, as cumarinas não possuem alta hidrofiliicidade. Além de solubilidade em água, pelo cálculo do log P, as cumarinas também demonstraram lipofiliicidade, na ordem C1 > C2 > C3 > C4 (Tabela 3).

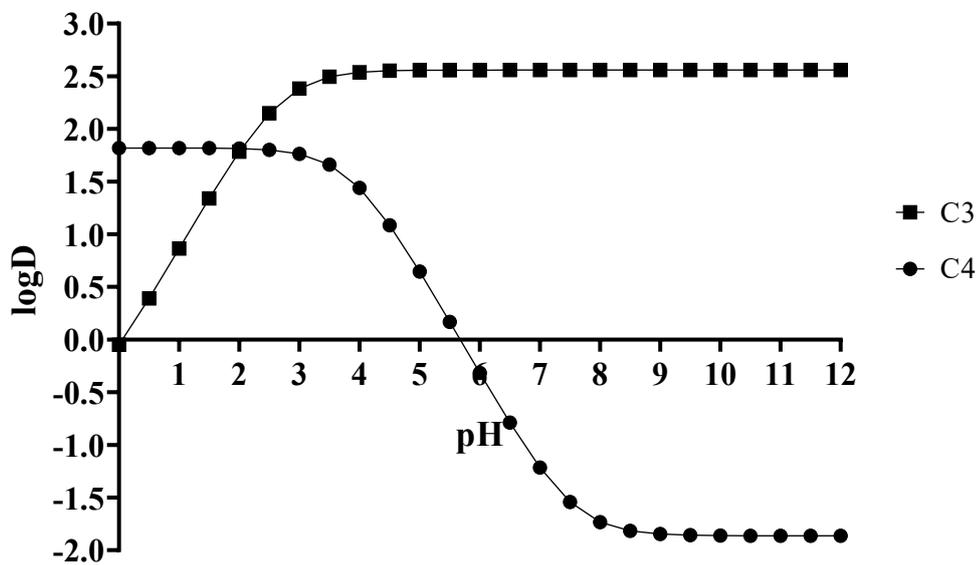
Como mencionado anteriormente, apenas as cumarinas C3 e C4 possuem espécies ionizadas e, relacionado a esse aspecto, somente esses dois derivados apresentaram constantes de dissociação (pKa) e a C4 tem o log D alterado pelo pH (Tabela 3). A Figura 8 mostra as variações do log D com o aumento do pH e percebe-se que, apesar de sofrer interferência, a cumarina C3 mantém seu nível de distribuição em pH fisiológico (aproximadamente 7,4), diferentemente da C4. A Figura 9 mostra que a espécie neutra da cumarina C3 é a mais bem distribuída, enquanto da C4 é a espécie ionizada.

Tabela 3 – Propriedades físico-químicas das cumarinas testadas

Propriedades Físico-Químicas	C1	C2	C3	C4
Peso molecular (g/mol)	320,344	365,341	335,359	260,245
Área de superfície polar (Å <sup>2</sup> )	52,60	95,74	78,62	72,83
Solubilidade em água (log S)	-6,13	-6,77	-5,93	-3,98
Lipofilicidade (log P)	3,342	3,295	2,559	1,819
Distribuição em pH 7,4 (log D)	3,342	3,295	2,559	-1,488
Constante de dissociação (pKa)	*	*	2,696	3,855

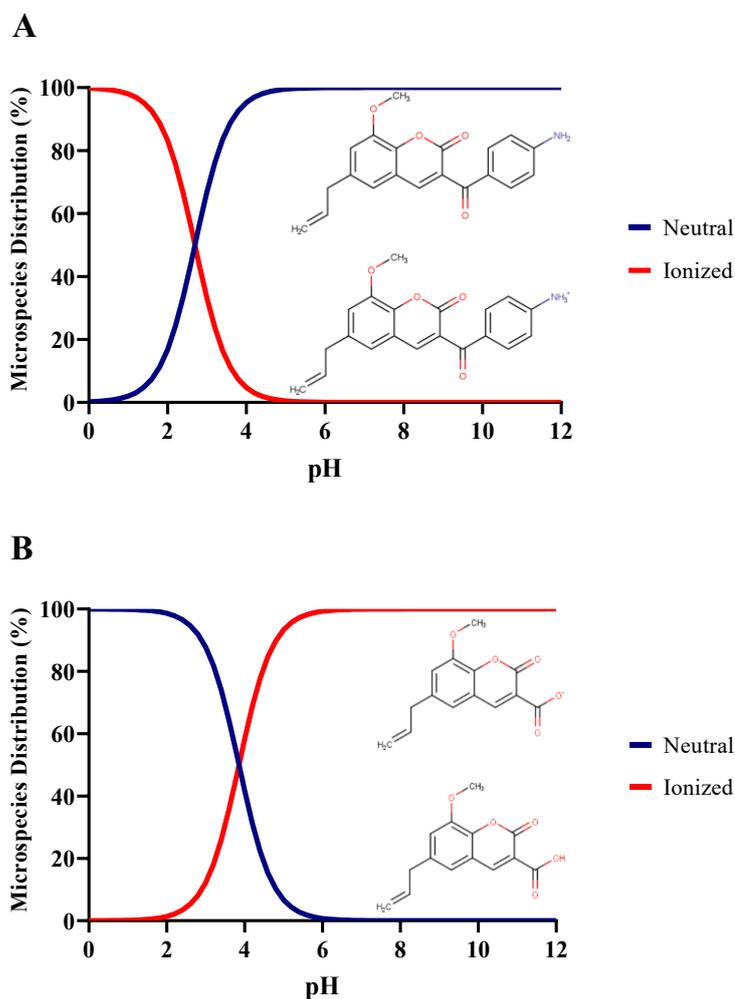
\*Não foram encontrados átomos ionizáveis. Fonte: O autor (2024).

Figura 8 – Variação do log D das cumarinas C3 e C4 conforme alterações do pH



Fonte: O autor (2024).

Figura 9 – Variação na distribuição das microespécies (neutra e ionizada) diante da mudança de pH: A) cumarina C3; B) cumarina C4.



Fonte: O autor (2024).

Devido às suas propriedades físico-químicas, todas as cumarinas mostram resultados positivos na avaliação de *drug-likeness* (Tabela 4), inclusive de acordo com a regra de Lipinski, o parâmetro mais utilizado nesse tipo de avaliação, que considera os seguintes aspectos para boa biodisponibilidade oral: peso molecular  $\leq 500$  g/mol,  $\log P \leq 5$ , número de N ou O (aceptores de hidrogênio)  $\leq 10$  e número de NH ou OH (doadores de hidrogênio)  $\leq 5$ .

Não houve alertas sobre o *Pan-Assay Interference Compounds* (PAINS), utilizado para detectar compostos capazes de causar resultados falsos positivos em experimentos, e todas as cumarinas mostraram boa pontuação de acessibilidade sintética (escala 1 a 10 de dificuldade). Contudo, detectaram-se alertas estruturais

para todos os derivados, os quais podem causar eventuais efeitos tóxicos. Em todos os casos, o núcleo cumarínico e o radical propenil foram motivos de alerta, além do radical NO<sub>2</sub> (em C2) e a estrutura formada pelo anel aromático ligado a NH<sub>2</sub>, chamada de anilina (em C3) (Tabela 4).

Tabela 4 – Parâmetros de *drug-likeness* e química medicinal das cumarinas testadas

Parâmetros		C1	C2	C3	C4
<b>Drug-likeness</b>	Lipinski	Yes	Yes	Yes	Yes
	Ghose	Yes	Yes	Yes	Yes
	Veber	Yes	Yes	Yes	Yes
	Egan	Yes	Yes	Yes	Yes
	Muegge	Yes	Yes	Yes	Yes
	PAINS	No	No	No	No
<b>Química Medicinal</b>	Alerta estrutural (Brenk)	2 alertas	3 alertas	3 alertas	2 alertas
	Acessibilidade sintética	3,37	3,37	3,33	2,91

Fonte: O autor (2024).

Por meio das predições farmacocinéticas (Tabela 5), percebeu-se que todas as cumarinas podem ser bem absorvidas pelo corpo humano, com mais de 96% de absorção intestinal, permeabilidade em células de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2) com log Papp a partir de 1,122 (alta permeabilidade: log Papp > 0,90) e permeabilidade cutânea com logKp de -2,609 a -2,777 (boa permeabilidade: logKp ≤ 2,5). Relacionado à glicoproteína-P, as cumarinas C1 a C3 são descritas como inibidores e apenas a C3 como substrato.

Com log BB entre -0,111 e -0,839 e log PS entre -2,06 e -2,465, as cumarinas avaliadas não penetram com facilidade a barreira hematoencefálica (BBB) e o sistema nervoso central (CNS), pois os valores de referência para alta penetração são > 0.3 e > -2,0, respectivamente. O volume de distribuição (VDss) é utilizado para identificar o volume necessário para uma droga ser distribuída uniformemente, e quanto mais alto ele for, maior é a distribuição tecidual em comparação ao plasma (log VDss: alto > 0,45 / baixo < -0,15). Desse modo, enquanto as cumarinas C1 e C3 têm distribuição mais uniforme entre tecidos e circulação, C2 e C4 se concentram na circulação sanguínea. Outra informação sobre os compostos são os valores da fração não ligada

das cumarinas no plasma, que revelam a tendência de ligação a proteínas plasmáticas, o que pode comprometer a sua distribuição (Tabela 5).

Tabela 5 – Predição dos parâmetros farmacocinéticos das cumarinas testadas

Parâmetros		C1	C2	C3	C4
<b>Absorção</b>	HIA	99,07%	98,20%	97,20%	96,85%
	Caco-2	1,363	1,243	1,122	1,211
	Permeabilidade cutânea	-2,609	-2,727	-2,777	-2,723
	Pgp (i)	Sim	Sim	Sim	Não
	Pgp (s)	Não	Não	Sim	Não
<b>Distribuição</b>	Permeabilidade BBB	-0,111	-0,839	-0,314	-0,345
	Permeabilidade CNS	-2,06	-2,233	-2,183	-2,465
	VDss	0,103	-0,348	0,217	-1,028
	Fração não ligada	0,143	0,114	0,121	0,293
<b>Metabolismo</b>	CYP2D6 (s)	Não	Não	Não	Não
	CYP3A4 (s)	Sim	Sim	Não	Não
	CYP1A2 (i)	Sim	Sim	Sim	Não
	CYP2C19 (i)	Sim	Sim	Sim	Não
	CYP2C9 (i)	Sim	Sim	Sim	Não
	CYP2D6 (i)	Não	Não	Não	Não
	CYP3A4 (i)	Sim	Não	Sim	Não
<b>Excreção</b>	Depuração total	0,869	0,830	0,721	0,927
	OCT2 (s)	Não	Não	Não	Não

Legenda: HIA: Absorção Intestinal Humana; Caco-2: Células de adenocarcinoma colorretal humano (expresso como log Papp); Permeabilidade cutânea: expresso como logKp; Pgp: glicoproteína-P (inibidor (i) e substrato (s)); Permeabilidade BBB: Permeabilidade na barreira hematoencefálica (expresso como log BB); Permeabilidade CNS: Permeabilidade no Sistema Nervoso Central (expresso como log PS); VDss: Volume de distribuição (expresso como log VDss); Fração não ligada: fração das moléculas livres no plasma; CYP: Isoenzimas do citocromo P450 (substrato (s) e inibidor (i)); Depuração total: expresso como log(mL/min/kg); OCT2 (s): substrato do transportador de cátions orgânicos 2. Fonte: O autor (2024).

Em relação às isoenzimas do citocromo P450, que participam do metabolismo dos fármacos, identificou-se que apenas as cumarinas C1 e C2 podem ser substratos

(CYP3A4), enquanto a atuação como inibidor é mais comum entre as cumarinas analisadas, com atividade nas isoenzimas CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9 e CYP3A4. A cumarina C4 é a única que não possui potencial inibitório sobre as isoenzimas (Tabela 5).

A depuração total de um composto envolve a depuração hepática e renal e estima a sua eliminação pelo organismo, elemento necessário para estabelecer a frequência da administração dos fármacos. Assim, a C4 é a cumarina com o maior nível de depuração e, conseqüentemente, com menor tempo de atividade no organismo, seguida pelas cumarinas C1, C2 e C3. Ainda sobre a excreção dos compostos, as cumarinas avaliadas não foram identificadas como substratos do transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2), envolvido na eliminação de drogas pelos rins (Tabela 5).

Acerca das predições sobre a toxicidade das cumarinas testadas, os resultados demonstram que a C4 possui a dose máxima tolerada mais alta em humanos e C2 causa efeitos adversos em menor dose. Em ratos, a cumarina C4 é a que possui toxicidade aguda na menor dose, enquanto na toxicidade crônica, é a cumarina C2 que pode causar efeitos adversos em menor dose. A cumarina C3 apresentou os melhores resultados (maiores doses) em ambos os parâmetros. Usando o protozoário *Tetrahymena pyriformis*, todos os compostos se mostraram tóxicos (toxicidade:  $\log \mu\text{g/L} > -0,5$ ), e as cumarinas C1 e C2 também apresentaram potencial de toxicidade sobre o peixe *Pimephales promelas* (minnow) (toxicidade aguda:  $\log \text{mM} < -0,3$ ) (Tabela 6).

Foi registrada ausência de toxicidade, para todas as cumarinas, em relação à sensibilização da pele, à inibição do gene humano relacionado ao ether-a-go-go (hERG), utilizado para avaliar toxicidade cardíaca, e às vias de sinalização do receptor nuclear Tox21 (Tabela 6). Em relação aos outros parâmetros de toxicidade, as cumarinas C2 e C3 foram os compostos com mais alertas, apresentando-se como mutagênicos (teste de AMES), hepatotóxicos, carcinogênicos, imunotóxicos (incluindo C1) e citotóxicos (apenas C3). Nas vias de resposta ao estresse Tox21, o único alerta é para as cumarinas C2 e C3 sobre o potencial de membrana mitocondrial (MMP).

Tabela 6 – Predição dos parâmetros de toxicidade das cumarinas testadas

Parâmetros	C1	C2	C3	C4
Dose Máxima Tolerada <sup>a</sup>	0,435	0,23	0,675	0,966
Toxicidade Oral Aguda em Ratos (LD50) <sup>a</sup>	2,289	2,365	2,71	2,161
Toxicidade Oral Crônica em Ratos <sup>a</sup>	1,99	1,103	2,179	2,093
Toxicidade em <i>T. pyriformis</i> <sup>a</sup>	0,55	0,32	0,489	0,362
Toxicidade em Minnow <sup>a</sup>	-0,786	-1,794	1,377	1,373
Sensibilização cutânea <sup>a</sup>	Não	Não	Não	Não
Toxicidade AMES <sup>a</sup>	Não	Sim	Sim	Não
Bloqueadores hERG <sup>b</sup>	Não	Não	Não	Não
Hepatotoxicidade <sup>c</sup>	Não	Sim	Sim	Não
Carcinogenicidade <sup>c</sup>	Não	Sim	Sim	Não
Imunotoxicidade <sup>c</sup>	Sim	Sim	Sim	Não
Citotoxicidade <sup>c</sup>	Não	Não	Sim	Não
Vias de sinalização do receptor nuclear Tox21 <sup>c</sup>	Não	Não	Não	Não
Vias de resposta ao estresse Tox21 <sup>c</sup>	Não	Não*	Não*	Não

Legenda: Dose Máxima Tolerada: expresso como log mg/kg/dia; LD<sub>50</sub>: dose que causa a morte de 50% dos ratos em testes (expresso em mol/kg); Toxicidade Oral Crônica em Ratos: expresso em log(mg/kg\_bw/dia); Toxicidade em *T. pyriformis*: expresso em log µg/L; Toxicidade em Minnow: expresso em log mM; hERG: gene humano relacionado ao ether-a-go-go. <sup>a</sup> Predito pelo pkCSM. <sup>b</sup> Predito pelo Pred-hERG. <sup>c</sup> Predito pelo Pro|Tox-II. \*As cumarinas C2 e C3 são ativas sobre o Potencial de Membrana Mitocondrial (MMP). Fonte: O autor (2024).

## Discussão

Apesar do potencial demonstrado pelos resultados sobre a resistência mediada por  $\beta$ -lactamase, as cumarinas testadas no presente estudo não exerceram efeitos antibacterianos diretos sobre cepas de *S. aureus*. Fayed *et al.* [36] avaliaram por meio de difusão em disco a atividade de 17 cumarinas 3-substituídas sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os autores demonstraram que a maioria dos compostos não exerceu atividade antibacteriana, e os que inibiram o crescimento de *S. aureus* foram menos eficazes que o controle de amoxicilina.

Os estudos de Al-Hazmy *et al.* [37] e Sadi *et al.* [38] também relataram a baixa atividade de cumarinas com substituições C-3 na inibição de bactérias patogênicas. Esses trabalhos mostram a influência que diferentes grupos químicos têm sobre o efeito antibacteriano de cumarinas sintéticas, tendo em vista o potencial de outros

derivados 3-substituídos [39, 40]. Resultados como estes são negativos quando o objetivo é desenvolver fármacos com efeitos diretos, mas no nosso estudo eles reforçam a especificidade dos mecanismos dos compostos testados sobre a resistência a  $\beta$ -lactâmicos.

Assim como observado na associação com ampicilina, outras cumarinas também potencializaram a atividade de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos contra cepas resistentes. Isolada de *Zanthoxylum nitidum*, a 5-geraniloxi-7-metoxicumarina, quando associada a piperacilina + tazobactam, aumentou o efeito antibiótico em até oito vezes contra cepas de *S. aureus* [41]. Estudos sobre o ácido galbânico identificaram a alta capacidade dessa cumarina em elevar a atividade de  $\beta$ -lactâmicos (cefalexina, meticilina e penicilina G) contra *S. aureus* resistente, reduzindo a CIM de até 128  $\mu\text{g/mL}$  para cerca de 1,0  $\mu\text{g/mL}$  [42, 43].

Cumarinas derivadas do dihidroeuugenol com radicais adicionados às posições C-3 (4-aminobenzoil ou 4-nitrobenzoil), C-6 (propil) e C-8 (metoxi ou hidroxila) potencializaram a atividade da ampicilina contra *S. aureus* multirresistente [44]. Em testes com *Escherichia coli*, a presença da estrutura cumarínica em um complexo de cobre com ligante de glicose contribuiu para a inibição de metalo-carbapenemases [45].

A docagem das cumarinas umbeliprenina, aurapteno, ácido galbânico e 7-isopenteniloxicumarina à  $\beta$ -lactamase PC1 resultou em interações semelhantes às obtidas em nosso estudo, como ligações de hidrogênio com resíduos Ser70 e Ser130 e interações hidrofóbicas com Ile167, Ile239 e Tyr105 [29]. Manjunath *et al.* [46] também utilizaram o aurapteno e a  $\beta$ -lactamase PC1 e identificaram a ocorrência de ligações de hidrogênio (Gln237 e Ser70), interação hidrofóbica (Ile239), interação  $\pi$ -cátion (Lys73) e interações de van der Waals (Asn132, Asn170, Gly236, Ile167 e Ser130), corroborando nossos resultados.

Identificou-se que as cumarinas 3-substituídas e o sulbactam interagem através de ligações de hidrogênio com os resíduos Asn132, Asn170, Gln237, Lys73, Ser70 e Ser130, o que reforça a evidência *in vitro* de que esses derivados são capazes de inibir a  $\beta$ -lactamase. Semelhanças também são notadas nas interações realizadas por outro inibidor em uso clínico, o ácido clavulânico, com a mesma enzima, a exemplo de ligações de hidrogênio com Asn132, Gln237 e Ser70 [47, 48].

A  $\beta$ -lactamase PC1 pertence à classe A, de acordo com o sistema de Ambler, e ao grupo 2 (subgrupo 2a), de acordo com o grupo Bush-Jacoby-Medeiros, e enzimas

como essa são conhecidas como serino- $\beta$ -lactamases devido à importância desse aminoácido para a reação de hidrólise [49]. O resíduo Ser70 ocupa a região central do sítio ativo e é responsável por atacar o antibiótico  $\beta$ -lactâmico, participando do processo de acilação-desacilação da hidrólise [50]. Resíduos como Glu166, Lys73 e Ser130 também contribuem para a atividade hidrolítica [51]. Essas informações ressaltam o caráter favorável das interações realizadas pelas cumarinas e que a inibição deve ocorrer através da competição pelo sítio ativo.

Além de avaliar o potencial contra a resistência a  $\beta$ -lactâmicos, foram analisados os perfis ADMET das cumarinas 3-substituídas. Nas predições de absorção, os compostos apresentaram resultados favoráveis, contudo, um dos parâmetros deve ser ressaltado: a relação com a glicoproteína-P. Esse transportador, por bombeamento ativo, regula a concentração intracelular dos seus substratos e protege o organismo contra xenobióticos, mas ao mesmo tempo pode limitar os efeitos terapêuticos dos fármacos, como ocorreria com a cumarina C3 [52]. Ademais, identificar inibidores e substratos é importante para a coadministração segura de fármacos, garantindo a eficácia e prevenindo efeitos tóxicos [53].

A permeabilidade das cumarinas na BBB e no CNS é baixa, um fato comum no desenvolvimento de drogas, visto que a alta proteção dessa região corporal, necessária para a manutenção do seu equilíbrio, dificulta a entrada de substâncias [54, 55]. Todavia, essa permeabilidade reduzida não é necessariamente um fator negativo, uma vez que elas poderiam ser utilizadas no tratamento de infecções em outros componentes corporais, e essa limitação na distribuição seria inclusive uma vantagem, pois evitaria a ocorrência de efeitos adversos envolvendo o CNS [56].

Outro aspecto sobre a distribuição das cumarinas é a fração não ligada no plasma humano, cuja predição revelou valores baixos para todos os derivados. A baixa concentração de moléculas livres no plasma afeta a distribuição dos medicamentos e seus efeitos farmacológicos, pois as atividades desempenhadas só são possíveis se elas não estiverem ligadas a proteínas plasmáticas, além de interferir em outros eventos farmacocinéticos, como a excreção das substâncias [57, 58]. Essa informação corrobora a relação entre a fração não ligada e a depuração total das cumarinas, onde, por exemplo, a C4 apresentou a maior fração não ligada e a maior taxa de depuração total.

De acordo com Zhao *et al.* [59], certos compostos são metabolizados pelas isoenzimas do citocromo P450 para se tornarem mais hidrofílicos e facilitarem a sua

eliminação, e isso relaciona o fato de as cumarinas C1 e C2, que apresentaram os menores valores para solubilidade em água (log S), serem substratos da CYP3A4. Além disso, como mencionado com a glicoproteína-P, é necessário identificar os inibidores dessas isoenzimas para evitar efeitos indesejados decorrentes de interações medicamentosas. A coadministração de substrato e inibidor de uma isoenzima resulta na não metabolização do primeiro, que permanecerá por mais tempo no organismo, podendo causar efeitos tóxicos [60]. Essa lógica é aplicável ao transportador OCT2, envolvido na excreção [61].

Na predição dos parâmetros de química medicinal, as cumarinas C2 e C3 apresentaram um alerta estrutural a mais que os outros derivados, relacionado aos radicais nitrogenados, e no perfil de toxicidade essas duas cumarinas também foram os compostos com mais alertas, reforçando a contribuição dos grupos contendo nitrogênio para a toxicidade dos compostos. Semelhante à nossa análise, Żołek e Maciejewska [62] detectaram mais efeitos tóxicos com o aumento de radicais nitrogenados em derivados cumarínicos. Krzyszczak e Czech [63] também indicaram que a ligação do nitrogênio ao anel aromático eleva a toxicidade de compostos orgânicos, contudo, em uma perspectiva ambiental.

A cumarina C4 demonstrou o menor número de casos de toxicidade, sendo a atividade contra *T. pyriformis* o único alerta. Além de não possuir grupos nitrogenados, a estrutura desse composto difere das demais pela ausência do anel benzênico, para o qual são descritos diferentes efeitos tóxicos, a exemplo de imunotoxicidade, identificada em todas as cumarinas com benzeno na estrutura dos radicais C-3 [64]. Corroborando essa evidência, no perfil ADMET de derivados de 7,8-dihidroxicumarina, a toxicidade também foi mais comum em compostos com anel aromático na estrutura dos radicais [65].

## Conclusão

Por meio de análises *in vitro* e *in silico*, constata-se que as cumarinas 3-substituídas testadas aumentam a atividade do antibiótico ampicilina no controle de cepas resistentes de *S. aureus* e têm afinidade com a  $\beta$ -lactamase da mesma espécie, interagindo com resíduos cruciais para a inibição da sua atividade hidrolítica tal qual drogas em uso clínico. Ademais, esses compostos não são eficazes na atividade

antibacteriana direta. Portanto, nossos achados evidenciam o potencial dos derivados como inibidores de  $\beta$ -lactamase de *S. aureus*.

Considerando as análises ADMET, apesar de os derivados possuírem avaliações favoráveis, são necessárias estratégias para melhorar o seu comportamento no organismo, por exemplo, sobre a baixa fração não ligada no plasma. Além disso, a presença de grupos nitrogenados e do anel aromático nas substituições C-3 deve ser analisada no desenvolvimento de novos derivados cumarínicos, pois ao mesmo tempo que contribui para a eficácia dos compostos, também eleva os riscos de toxicidade. Todavia, essas predições *in silico* não são definitivas, sendo necessária a confirmação em ensaios *in vivo*.

Essa pesquisa traz novos dados sobre derivados cumarínicos enquanto compostos bioativos, destacando as melhores modificações estruturais para a modulação da resistência bacteriana (radical benzoil, em C1) e para o perfil ADMET dos compostos (radical carboxila, em C4), e com isso, esperamos contribuir para o desenvolvimento de adjuvantes da antibioticoterapia em tempos de microrganismos resistentes a múltiplas drogas.

## Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Bolsista CNPq – Brasil).

## Referências

- [1] T.M. Uddin, A.J. Chakraborty, A. Khusro, B.R.M. Zidan, S. Mitra, T. Bin Emran, K. Dhama, Md.K.H. Ripon, M. Gajdács, M.U.K. Sahibzada, Md.J. Hossain, N. Koirala, Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects, *J Infect Public Health* 14 (2021) 1750–1766.
- [2] F. Akram, M. Imtiaz, I. ul Haq, Emergent crisis of antibiotic resistance: A silent pandemic threat to 21st century, *Microb Pathog* 174 (2023) 105923.
- [3] E.M. Darby, E. Trampani, P. Siasat, M.S. Gaya, I. Alav, M.A. Webber, J.M.A. Blair, Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited, *Nat Rev Microbiol* 21 (2023) 280–295.
- [4] G. Mancuso, A. Midiri, E. Gerace, C. Biondo, Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens, *Pathogens* 10 (2021) 1310.

- [5] G.D. Rocha, J.F. Nogueira, M.V. Gomes dos Santos, J.A. Boaventura, R.A. Nunes Soares, J. José de Simoni Gouveia, M. Matiuzzi da Costa, G.V. Gouveia, Impact of polymorphisms in *blaZ*, *blaR1* and *blaI* genes and their relationship with  $\beta$ -lactam resistance in *S. aureus* strains isolated from bovine mastitis, *Microb Pathog* 165 (2022) 105453.
- [6] K. Bush, P.A. Bradford, Epidemiology of  $\beta$ -Lactamase-Producing Pathogens, *Clin Microbiol Rev* 33 (2020) e00047-19.
- [7] S. Alfei, G. Zuccari, Recommendations to Synthesize Old and New  $\beta$ -Lactamases Inhibitors: A Review to Encourage Further Production, *Pharmaceuticals* 15 (2022) 384.
- [8] D. Yahav, C.G. Giske, A. Grāmatniece, H. Abodakpi, V.H. Tam, L. Leibovici, New  $\beta$ -Lactam- $\beta$ -Lactamase Inhibitor Combinations, *Clin Microbiol Rev* 34 (2020) e00115-20.
- [9] D. Carcione, C. Siracusa, A. Sulejmani, V. Leoni, J. Intra, Old and New Beta-Lactamase Inhibitors: Molecular Structure, Mechanism of Action, and Clinical Use, *Antibiotics* 10 (2021) 995.
- [10] K.M. Papp-Wallace, A.R. Mack, M.A. Taracila, R.A. Bonomo, Resistance to Novel  $\beta$ -Lactam- $\beta$ -Lactamase Inhibitor Combinations, *Infect Dis Clin North Am* 34 (2020) 773–819.
- [11] A. Bouhaoui, M. Eddahmi, M. Dib, M. Khouili, A. Aires, M. Catto, L. Bouissane, Synthesis and Biological Properties of Coumarin Derivatives. A Review, *ChemistrySelect* 6 (2021) 5848–5870.
- [12] S. Mahammad Ghouse, K. Bahatam, A. Angeli, G. Pawar, K.K. Chinchilli, V.M. Yaddanapudi, A. Mohammed, C.T. Supuran, S. Nanduri, Synthesis and biological evaluation of new 3-substituted coumarin derivatives as selective inhibitors of human carbonic anhydrase IX and XII, *J Enzyme Inhib Med Chem* 38 (2023) 2185760.
- [13] S.C. Mzezewa, S.I. Omoruyi, L.S. Zondagh, S.F. Malan, O.E. Ekpo, J. Joubert, Design, synthesis, and evaluation of 3,7-substituted coumarin derivatives as multifunctional Alzheimer's disease agents, *J Enzyme Inhib Med Chem* 36 (2021) 1606–1620.
- [14] C.L. Lopez Cisneros, M.E. Cazar Ramírez, N. Bailon-Moscoso, E. Guardado, F. Borges, E. Uriarte, M.J. Matos, Study of a Selected Series of 3- and 4-Arylcoumarins as Antifungal Agents against Dermatophytic Fungi: *T. rubrum* and *T. mentagrophytes*, *ChemistrySelect* 6 (2021) 9981–9989.
- [15] G.A. Brancaglioni, A.E. Toyota, J.V. Cardoso Machado, A.Á. Fernandes Júnior, A.T. Silveira, D.F. Vilas Boas, E.G. dos Santos, I.S. Caldas, D.T. Carvalho, *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activities of 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-cromen-2-one, a new synthetic coumarin of low cytotoxicity against mammalian cells, *Chem Biol Drug Des* 92 (2018) 1888–1898.
- [16] Z. Li, D. Kong, Y. Liu, M. Li, Pharmacological perspectives and molecular mechanisms of coumarin derivatives against virus disease, *Genes Dis* 9 (2022) 80–94.

- [17] U. Salar, K.M. Khan, H. Muhammad, M.I. Fakhri, Sanallah, S. Perveen, M.I. Choudhary, Anti-MRSA (Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus*) Activity of 3-Substituted Coumarins, *Lett Drug Des Discov* 15 (2018) 353–362.
- [18] L. da S.M. Forezi, T.Q. Froes, M.F.C. Cardoso, C.A. de Oliveira Maciel, G.G. Nicastro, R.L. Baldini, D.C.S. Costa, V.F. Ferreira, M.S. Castilho, F. de C. da Silva, Synthesis and Biological Evaluation of Coumarins Derivatives as Potential Inhibitors of the Production of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factor Pyocyanin, *Curr Top Med Chem* 18 (2018) 149–156.
- [19] R.K. Sharma, V. Singh, V. Raghuvanshi, D. Katiyar, Design, Synthesis and *In vitro* Studies of 3-Amidocoumarins as Novel Antibiofilm Agents, *Drugs and Drug Candidates* 2 (2023) 279–294.
- [20] M. Hamid, U. Salar, Y. Rashid, M.K. Azim, K.M. Khan, S. Naz, T. Aziz, M. Alharbi, A. Alshammari, A.F. Alasmari, Determining the 3-substituted Coumarins inhibitory potential against the HslV protease of *E. coli*, *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 27 (2023) 9169–9182.
- [21] J.B. de Araújo-Neto, C.D. de M. Oliveira-Tintino, G.A. de Araújo, D.S. Alves, F.R. Ribeiro, G.A. Brancaglioni, D.T. Carvalho, C.M.G. Lima, H.S.H. Mohammed Ali, I.A. Rather, M.Y. Wani, T.B. Emran, H.D.M. Coutinho, V. de Q. Balbino, S.R. Tintino, 3-Substituted Coumarins Inhibit NorA and MepA Efflux Pumps of *Staphylococcus aureus*, *Antibiotics* 12 (2023) 1739.
- [22] K.P. Govêa, R.S.T. Pereira, M.D.O. de Assis, P.I. Alves, G.A. Brancaglioni, A.E. Toyota, J.V.C. Machado, D.T. Carvalho, T.C. de Souza, L.A. Beijo, L. de O.R. Trindade, S. Barbosa, Allelochemical Activity of Eugenol-Derived Coumarins on *Lactuca sativa* L., *Plants* 9 (2020) 533.
- [23] M.M. Costa da Silva, J. Bezerra de Araújo Neto, A.T. Lucas dos Santos, C.D. de Moraes Oliveira-Tintino, A.C.J. de Araújo, P.R. Freitas, L.E. da Silva, W. do Amaral, C. Deschamps, F.R. de Azevedo, C.M. Gonçalves Lima, N. Golubkina, J.T. Calixto-Júnior, J. Ribeiro-Filho, H.D.M. Coutinho, G. Caruso, S.R. Tintino, Antibiotic-Potentiating Activity of the *Schinus terebinthifolius* Raddi Essential Oil against MDR Bacterial Strains, *Plants* 12 (2023) 1587.
- [24] C.D. de M. Oliveira-Tintino, S.R. Tintino, A.C. Justino de Araújo, C.R. dos Santos Barbosa, P. Ramos Freitas, J.B. de Araújo Neto, I.M. Beghini, R.A. Rebelo, L.E. da Silva, S.L. Mireski, M.C. Nasato, M.I.L. Krautler, H.M. Barreto, J. Ribeiro-Filho, I.R.A. de Menezes, H.D.M. Coutinho, Efflux Pump (QacA, QacB, and QacC) and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors? An Evaluation of 1,8-Naphthyridines against *Staphylococcus aureus* Strains, *Molecules* 28 (2023) 1819.
- [25] CLSI. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, NJ, USA, 2020; pp. 58–66.
- [26] M.M. Javadpour, M.M. Juban, W.-C.J. Lo, S.M. Bishop, J.B. Albery, S.M. Cowell, C.L. Becker, M.L. McLaughlin, De Novo Antimicrobial Peptides with Low Mammalian Cell Toxicity, *J Med Chem* 39 (1996) 3107–3113.
- [27] F. de Sousa Ferreira, J.B. de Araújo Neto, C.D. de Moraes Oliveira-Tintino, A.C.J. de Araújo, J. Ribeiro-Filho, P.R. Freitas, I.M. Araújo, M.A. Lima, F.R. de

Azevedo, S.R. Tintino, H.D.M. Coutinho, D.M. do A.F. Navarro, Chemical composition and antibacterial effects of *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith against *Staphylococcus aureus* efflux pumps, *Chem Biol Interact* 386 (2023) 110751.

[28] H.D.M. Coutinho, J.G.M. Costa, E.O. Lima, V.S. Falcão-Silva, J.P. Siqueira-Júnior, Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* and Chlorpromazine, *Chemotherapy* 54 (2008) 328–330.

[29] H. Safdari, A. Neshani, A. Sadeghian, M. Ebrahimi, M. Iranshahi, H. Sadeghian, Potent and selective inhibitors of class A  $\beta$ -lactamase: 7-prenyloxy coumarins, *J Antibiot (Tokyo)* 67 (2014) 373–377.

[30] R. Thomsen, M.H. Christensen, MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking, *J Med Chem* 49 (2006) 3315–3321.

[31] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *J Comput Chem* 30 (2009) 2785–2791.

[32] D.E. V. Pires, T.L. Blundell, D.B. Ascher, pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures, *J Med Chem* 58 (2015) 4066–4072.

[33] R.C. Braga, V.M. Alves, M.F.B. Silva, E. Muratov, D. Fourches, L.M. Lião, A. Tropsha, C.H. Andrade, Pred-hERG: A Novel web-Accessible Computational Tool for Predicting Cardiac Toxicity, *Mol Inform* 34 (2015) 698–701.

[34] P. Banerjee, A.O. Eckert, A.K. Schrey, R. Preissner, ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals, *Nucleic Acids Res* 46 (2018) W257–W263.

[35] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Sci Rep* 7 (2017) 42717.

[36] E.A. Fayed, E.S. Nousseir, A. Atef, S.A. El Kalyoubi, *In vitro* antimicrobial evaluation and *in silico* studies of coumarin derivatives tagged with pyrano-pyridine and pyrano-pyrimidine moieties as DNA gyrase inhibitors, *Mol Divers* 26 (2022) 341–363.

[37] S.M. Al-Hazmy, M.O. Zouaghi, J.N. Al-Johani, Y. Arfaoui, R. Al-Ashwal, B. Hammami, I.A. Alhagri, N.A. Alhemiary, N. Hamdi, Chemosensing Properties of Coumarin Derivatives: Promising Agents with Diverse Pharmacological Properties, Docking and DFT Investigation, *Molecules* 27 (2022) 5921.

[38] G. Sadi, H. Bora, M. Çiçek, K. Koran, A.O. Görgülü, İ. Yılmaz, Evaluation of Biological Activities and Enzyme Inhibitory Potential of 7,8-Dihydroxy-3-(4-methylphenyl) Coumarin, *Revista Brasileira de Farmacognosia* 32 (2022) 749–758.

[39] P. Kowalczyk, A. Madej, D. Paprocki, M. Szymczak, R. Ostaszewski, Coumarin Derivatives as New Toxic Compounds to Selected K12, R1–R4 *E. coli* Strains, *Materials* 13 (2020) 2499.

[40] I. Sokol, M. Toma, M. Krnić, A.M. Macan, D. Drenjančević, S. Liekens, S. Raić-Malić, T. Gazivoda Kraljević, Transition metal-catalyzed synthesis of new 3-substituted coumarin derivatives as antibacterial and cytostatic agents, *Future Med Chem* 13 (2021) 1865–1884.

- [41] G.-Y. Zuo, C.-J. Wang, J. Han, Y.-Q. Li, G.-C. Wang, Synergism of coumarins from the Chinese drug *Zanthoxylum nitidum* with antibacterial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Phytomedicine* 23 (2016) 1814–1820.
- [42] B.S.F. Bazzaz, A.R. Du, M. Iranshahi, M. Naderinasab, M.K. Karamodin, Evaluating the Potentiating Effect of Galbanic acid from *Ferula szowitsiana* on three common antibiotics against resistant hospital isolates of *Staphylococcus aureus*, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 8 (2009) 217–221.
- [43] A.R. Shahverdi, A. Fakhimi, G. Zarrini, G. Dehghan, M. Iranshahi, Galbanic Acid from *Ferula szowitsiana* Enhanced the Antibacterial Activity of Penicillin G and Cephalexin against *Staphylococcus aureus*, *Biol Pharm Bull* 30 (2007) 1805–1807.
- [44] A.K. de Sousa, J.E. Rocha, T.S. de Freitas, P.R. Freitas, R.L.S. Pereira, M.K. do N.S. Leandro, J.V.C. Machado, L.M. de Oliveira, E.J. Torres Sierra, F.N. Pereira Júnior, D.T. Carvalho, H.D.M. Coutinho, L.J. Quintans Júnior, Dihydroeugenol derivatives associated with blue LED light: A different form to face multidrug resistant (MDR) bacteria, *Microb Pathog* 173 (2022) 105827.
- [45] C. Chen, J. Li, H. Dan, J. He, D. Wang, P. Oelschlaeger, N. Wang, Y. Zhang, Y. Pei, K.-W. Yang, A self-reported inhibitor of metallo-carbapenemases for reversing carbapenem resistance, *Int J Biol Macromol* 252 (2023) 126441.
- [46] A. Manjunath, G.V.A. Chinmayi, S. Renganathan, V. Chandramohan, S. Sabat, Antimicrobial activity of Geranyl acetate against cell wall synthesis proteins of *P. aeruginosa* and *S. aureus* using molecular docking and simulation, *J Biomol Struct Dyn* 42 (2024) 3030-3050.
- [47] J.D. Gitirana de Santana, O.A. Santos-Mayorga, J.R. Florencio, M.C.C. de Oliveira, L.M.S. de Almeida, J.O. de L. Xavier, D.C. Zimmermann-Franco, G.C. Macedo, A.L.P. Ferreira, O.V. de Sousa, A.A. da Silva Filho, M.S. Alves, *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae Bercht. & Presl), a Natural Source of Bioactive Compounds with Antibiotic Effect against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Antibiotics* 12 (2023) 622.
- [48] P. Jiamboonsri, C. Eurtivong, S. Wanwong, Assessing the Potential of Gallic Acid and Methyl Gallate to Enhance the Efficacy of  $\beta$ -Lactam Antibiotics against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Targeting  $\beta$ -Lactamase: *In silico* and *In vitro* Studies, *Antibiotics* 12 (2023) 1622.
- [49] K. Bush, G.A. Jacoby, Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases, *Antimicrob Agents Chemother* 54 (2010) 969–976.
- [50] Q. Ma, G. Wang, N. Li, X. Wang, X. Kang, Y. Mao, G. Wang, Insights into the Effects and Mechanism of Andrographolide-Mediated Recovery of Susceptibility of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* to  $\beta$ -Lactam Antibiotics, *Microbiol Spectr* 11 (2023) e02978-22.
- [51] C.L. Tooke, P. Hinchliffe, E.C. Bragginton, C.K. Colenso, V.H.A. Hirvonen, Y. Takebayashi, J. Spencer,  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century, *J Mol Biol* 431 (2019) 3472–3500.

- [52] I.I. Ahmed Juvale, A.A. Abdul Hamid, K.B. Abd Halim, A.T. Che Has, P-glycoprotein: new insights into structure, physiological function, regulation and alterations in disease, *Heliyon* 8 (2022) e09777.
- [53] A. Gessner, J. König, M.F. Fromm, Clinical Aspects of Transporter-Mediated Drug–Drug Interactions, *Clin Pharmacol Ther* 105 (2019) 1386–1394.
- [54] E. Nance, S.H. Pun, R. Saigal, D.L. Sellers, Drug delivery to the central nervous system, *Nat Rev Mater* 7 (2022) 314–331.
- [55] Y. Zhao, L. Gan, L. Ren, Y. Lin, C. Ma, X. Lin, Factors influencing the blood-brain barrier permeability, *Brain Res* 1788 (2022) 147937.
- [56] T.S. Maliehe, P.H. Tsilo, J.S. Shandu, Computational Evaluation of ADMET Properties and Bioactive Score of Compounds from *Encephalartos ferox*, *Pharmacognosy Journal* 12 (2020) 1357–1362.
- [57] V. Mulpuru, N. Mishra, *In silico* Prediction of Fraction Unbound in Human Plasma from Chemical Fingerprint Using Automated Machine Learning, *ACS Omega* 6 (2021) 6791–6797.
- [58] Y.E. Yun, R. Tornero-Velez, S.T. Purucker, D.T. Chang, A.N. Edginton, Evaluation of quantitative structure property relationship algorithms for predicting plasma protein binding in humans, *Computational Toxicology* 17 (2021) 100142.
- [59] M. Zhao, J. Ma, M. Li, Y. Zhang, B. Jiang, X. Zhao, C. Huai, L. Shen, N. Zhang, L. He, S. Qin, Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans, *Int J Mol Sci* 22 (2021) 12808.
- [60] M. Deodhar, S.B. Al Rihani, M.J. Arwood, L. Darakjian, P. Dow, J. Turgeon, V. Michaud, Mechanisms of CYP450 Inhibition: Understanding Drug-Drug Interactions Due to Mechanism-Based Inhibition in Clinical Practice, *Pharmaceutics* 12 (2020) 846.
- [61] S. Krishnan, D. Ramsden, D. Ferguson, S.H. Stahl, J. Wang, D.F. McGinnity, N. Hariparsad, Challenges and Opportunities for Improved Drug–Drug Interaction Predictions for Renal OCT2 and MATE1/2-K Transporters, *Clin Pharmacol Ther* 112 (2022) 562–572.
- [62] T. Żółek, D. Maciejewska, Theoretical evaluation of ADMET properties for coumarin derivatives as compounds with therapeutic potential, *Eur J Pharm Sci* 109 (2017) 486–502.
- [63] A. Krzyszczyk, B. Czech, Occurrence and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons derivatives in environmental matrices, *Science of The Total Environment* 788 (2021) 147738.
- [64] D. Poli, P. Mozzoni, S. Pinelli, D. Cavallo, B. Papaleo, L. Caporossi, Sex Difference and Benzene Exposure: Does It Matter?, *Int J Environ Res Public Health* 19 (2022) 2339.
- [65] M. Özdemir, D. Taşkın, D. Ceyhan, B. Köksoy, T. Taşkın, M. Bulut, B. Yalçın, 7,8-Dihydroxycoumarin derivatives: *In silico* molecular docking and *in vitro* anticholinesterase activity, *J Mol Struct* 1274 (2023) 134535.

## 5 CONCLUSÕES

- As cumarinas 3-substituídas avaliadas não apresentam efeito antibacteriano direto em concentração clinicamente relevante sobre as linhagens 1199B, K2068, K4100 e K4414 de *S. aureus*.
- As cumarinas testadas potencializam a atividade do brometo de etídio e dos antibióticos norfloxacina e ciprofloxacina sobre as linhagens 1199B e K2068 de *S. aureus*, assim como a ampicilina em ensaios com as cepas K4100 e K4414.
- A cumarina C1 eleva a emissão de fluorescência do brometo de etídio nas linhagens de *S. aureus* portadoras de bombas de efluxo NorA e MepA.
- A permeabilidade de membrana das linhagens 1199B e K2068 de *S. aureus* não é afetada pela cumarina C1.
- As cumarinas 3-substituídas mostram afinidade com modelos das bombas de efluxo NorA e MepA e interagem de modo semelhante a inibidores de referência. Há afinidade também com o modelo da  $\beta$ -lactamase PC1, ocorrendo interações com resíduos cruciais para a sua atividade.
- Todas as cumarinas analisadas apresentam predições farmacocinéticas positivas, contudo, a cumarina C4 possui o melhor perfil. Nas predições de toxicidade, enquanto a cumarina C4 tem o menor número de alertas, as cumarinas C2 e C3 apresentam maior probabilidade de causar efeitos tóxicos, revelando a influência dos radicais C-3 nitrogenados nesse sentido. Análises posteriores poderão comprovar esses resultados.
- Os resultados *in vitro* e *in silico* evidenciam que as cumarinas 3-substituídas avaliadas têm potencial na inibição de bombas de efluxo e  $\beta$ -lactamase de *S. aureus*. Entre esses compostos, a cumarina C1, que possui um benzoil como radical C-3, é o mais eficaz.

## 6 SÚMULA CURRICULAR

- Artigo publicado: Evaluation of the inhibitory effect of isopulegol (ISO) and its  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex (ISO/ $\beta$ -CD) on the reversal of *Staphylococcus aureus* efflux pump activity. Link para acesso: <https://doi.org/10.1007/s00289-024-05191-3>
- Artigo publicado: Antibiotic-Potentiating Activity of the *Schinus terebinthifolius* Raddi Essential Oil against MDR Bacterial Strains. Link para acesso: <https://doi.org/10.3390/plants12081587>
- Artigo publicado: Terpenic profile of the essential oil of *Symphyopappus cuneatus* (DC.) Sch.Bip. ex Baker and its effects on antibiotic resistance *in vitro*. Link para acesso: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.04.021>
- Artigo publicado: Synthesis of chalcones and their antimicrobial and drug potentiating activities. Link para acesso: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106129>
- Artigo publicado: Chemical composition and antibacterial effects of *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith against *Staphylococcus aureus* efflux pumps. Link para acesso: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110751>
- Artigo publicado: Efflux Pump (QacA, QacB, and QacC) and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors? An Evaluation of 1,8-Naphthyridines against *Staphylococcus aureus* Strains. Link para acesso: <https://doi.org/10.3390/molecules28041819>
- Artigo publicado: Terpenes as bacterial efflux pump inhibitors: A systematic review. Link para acesso: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.953982>
- Artigo publicado: Modification of Antibiotic Activity by Fixed Oil of the *Artocarpus heterophyllus* Almond against Standard and Multidrug-Resistant Bacteria Strains. Link para acesso: <https://doi.org/10.3390/biology11121835>
- Resumo publicado em anais de evento: Derivados cumarínicos como agentes antibacterianos: uma revisão bibliográfica. Link para acesso: <https://doi.org/10.51189/conbracib2023/19604>
- Resumo publicado em anais de evento: Potencial anti-infeccioso de cumarinas sintéticas: uma breve revisão. Link para acesso: <https://doi.org/10.51189/bioesb2023/25053>

- Resumo publicado em anais de evento: Avaliação do efeito inibitório do isopulegol e seu complexo em  $\beta$ -ciclodextrina frente a cepa IS-58 de *Staphylococcus aureus* portadora da bomba de efluxo TetK. Link para acesso: [http://www.plamevasf.univasf.edu.br/arquivos\\_anais/Mic179.pdf](http://www.plamevasf.univasf.edu.br/arquivos_anais/Mic179.pdf)

## REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, R. P. Staphylococcal infections: Host and pathogenic factors. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 1080, 2021.
- ALEXANDER, J. A. N. *et al.* Structural basis of broad-spectrum  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. **Nature**, v. 613, n. 7943, p. 375-382, 2023.
- ALFEI, S.; ZUCCARI, G. Recommendations to Synthesize Old and New  $\beta$ -Lactamases Inhibitors: A Review to Encourage Further Production. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 3, p. 384, 2022.
- AL-HAZMY, S. M. *et al.* Chemosensing Properties of Coumarin Derivatives: Promising Agents with Diverse Pharmacological Properties, Docking and DFT Investigation. **Molecules**, v. 27, n. 18, p. 5921, 2022.
- AL-HUMAIDI, J. Y. *et al.* Synthesis and biological activity evaluation of some new coumarin derivatives as potent anticonvulsant and CNS-depressant agents. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 43, n. 3, p. 2680-2689, 2023.
- ALI, L.; ABDEL AZIZ, M. H. Crosstalk involving two-component systems in *Staphylococcus aureus* signaling networks. **Journal of Bacteriology**, v. 206, p. e00418-23, 2024.
- ALMATAR, M. *et al.* Efflux pump inhibitors: new updates. **Pharmacological Reports**, v. 73, p. 1-16, 2021.
- ALOKE, C.; ACHILONU, I. Coping with the ESKAPE pathogens: Evolving strategies, challenges and future prospects. **Microbial Pathogenesis**, v. 175, p. 105963, 2023.
- AMBLER, R. P. The structure of  $\beta$ -lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.
- ANNUNZIATA, F. *et al.* An overview of coumarin as a versatile and readily accessible scaffold with broad-ranging biological activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 13, p. 4618, 2020.
- Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022.
- ARÊDE, P.; MINISTRO, J.; OLIVEIRA, D. C. Redefining the role of the  $\beta$ -lactamase locus in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*:  $\beta$ -lactamase regulators disrupt the Mecl-mediated strong repression on *mecA* and optimize the phenotypic expression of resistance in strains with constitutive *mecA* expression. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3037-3045, 2013.
- ARER, V.; KAR, D. Biochemical exploration of  $\beta$ -lactamase inhibitors. **Frontiers in Genetics**, v. 13, p. 1060736, 2023.
- AURANGZEB, S. *et al.* 3-substituted coumarin derivatives over-activate the HsIV protease: A potential drug target for antibacterial activity. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 35, n. 4, p. 1342-1252, 2022.

- BANCHS, C. *et al.* Substrate binding to the multidrug transporter MepA. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1838, n. 10, p. 2539-2546, 2014.
- BARBER, M.; WHITEHEAD, J. E. M. Bacteriophage types in penicillin-resistant staphylococcal infection. **British Medical Journal**, v. 2, n. 4627, p. 565, 1949.
- BARUAH, P. *et al.* Novel coumarin derivatives as potent acetylcholinesterase inhibitors: insight into efficacy, mode and site of inhibition. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, n. 7, p. 1750-1765, 2019.
- BENZAOUZ-TOUAMI, A. *et al.* Synthesis, biological activities and molecular docking study of 3-(3-oxobutanoyl)-2H-chromen-2-one derivatives. **Chemical Data Collections**, v. 36, p. 100792, 2021.
- BENSALAH, D. *et al.* Synthesis and antioxidant properties of some new thiazolyl coumarin derivatives. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 13, n. 2, p. 155-163, 2020.
- BERNARDO-CRAVO, A. P. *et al.* Environmental factors and host microbiomes shape host–pathogen dynamics. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 7, p. 616-633, 2020.
- BHARDWAJ, A. K.; MOHANTY, P. Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: rejuvenating the antimicrobial chemotherapy. **Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery**, v. 7, n. 1, p. 73-89, 2012.
- BHATT, S.; CHATTERJEE, S. Fluoroquinolone antibiotics: Occurrence, mode of action, resistance, environmental detection, and remediation – A comprehensive review. **Environmental Pollution**, v. 315, p. 120440, 2022.
- BISWAL, S. *et al.* Antimicrobial Peptides Designed against the  $\Omega$ -Loop of Class A  $\beta$ -Lactamases to Potentiate the Efficacy of  $\beta$ -Lactam Antibiotics. **Antibiotics**, v. 12, n. 3, p. 553, 2023.
- BOYD, S. E. *et al.* Metallo- $\beta$ -lactamases: structure, function, epidemiology, treatment options, and the development pipeline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 10, p. e 00397-20, 2020.
- BRAWLEY, D. N. *et al.* Structural basis for inhibition of the drug efflux pump NorA from *Staphylococcus aureus*. **Nature Chemical Biology**, v. 18, n. 7, p. 706-712, 2022.
- BRINDANGNANAM, P. *et al.* Bacterial effluxome as a barrier against antimicrobial agents: structural biology aspects and drug targeting. **Tissue Barriers**, v. 10, n. 4, p. 2013695, 2022.
- BUSH, K. Classification for  $\beta$ -lactamases: historical perspectives. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 21, n. 5, p. 513-522, 2023.
- BUSH, K. Past and present perspectives on  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 10, p. e01076-18, 2018.
- BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Epidemiology of  $\beta$ -lactamase-producing pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 2, p. e00047-19, 2020.
- BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Interplay between  $\beta$ -lactamases and new  $\beta$ -lactamase inhibitors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 5, p. 295-306, 2019.

- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, 1995.
- CARCIONE, D. *et al.* Old and new beta-lactamase inhibitors: Molecular structure, mechanism of action, and clinical Use. **Antibiotics**, v. 10, n. 8, p. 995, 2021.
- CARNEIRO, A. *et al.* Trending topics on coumarin and its derivatives in 2020. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 501, 2021.
- CARVAJAL, L. P. *et al.* Novel insights into the classification of staphylococcal  $\beta$ -lactamases in relation to the cefazolin inoculum effect. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 5, p. e 02511-19, 2020.
- CECI, M. *et al.* Clinical and microbiological features of bacteremia caused by *Enterococcus faecalis*. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 11, p. 1195-1203, 2015.
- CHAUDHARY, D. *et al.* Synthesis and biological properties of coumarin analogue: A brief review. **Letters in Organic Chemistry**, v. 19, n. 5, p. 362-387, 2022.
- CHAWLA, M. *et al.* Antibiotic potentiators against multidrug-resistant bacteria: discovery, development, and clinical relevance. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 887251, 2022.
- CHEKE, R. S. *et al.* Molecular insights into coumarin analogues as antimicrobial agents: Recent developments in drug discovery. **Antibiotics**, v. 11, n. 5, p. 566, 2022.
- CHERNOV, V. M. *et al.* Omics of antimicrobials and antimicrobial resistance. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 5, p. 455-468, 2019.
- CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547-569, 2021.
- COELHO, F. S.; MAINARDI, J.-L. The multiple benefits of second-generation  $\beta$ -lactamase inhibitors in treatment of multidrug-resistant bacteria. **Infectious Diseases Now**, v. 51, n. 6, p. 510-517, 2021.
- COLCLOUGH, A. L. *et al.* RND efflux pumps in Gram-negative bacteria; regulation, structure and role in antibiotic resistance. **Future Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 143-157, 2020.
- CONG, Y.; YANG, S.; RAO, X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. **Journal of Advanced Research**, v. 21, p. 169-176, 2020.
- COOK, M. A.; WRIGHT, G. D. The past, present, and future of antibiotics. **Science Translational Medicine**, v. 14, n. 657, p. eabo7793, 2022.
- DABUL, A. N. G. *et al.* Resistance in *in vitro* selected tigecycline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 5 is driven by mutations in *mepR* and *mepA* genes. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 5, p. 519-526, 2018.

- DARBY, E. M. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 280-295, 2023.
- DASHTBANI-ROOZBEHANI, A.; BROWN, M. H. Efflux pump mediated antimicrobial resistance by staphylococci in health-related environments: challenges and the quest for inhibition. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, p. 1502, 2021.
- DE ARAÚJO, R. S. A. *et al.* Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* with coumarin derivatives. **Scientifica**, v. 2016, p. 6894758, 2016.
- DE GAETANO, G. V. *et al.* Antimicrobial resistance: two-component regulatory systems and multidrug efflux pumps. **Antibiotics**, v. 12, n. 6, p. 965, 2023.
- DE OLIVEIRA, M. R. C. *et al.* Antibacterial effect, efflux pump inhibitory (NorA, TetK and MepA) of *Staphylococcus aureus* and *in silico* prediction of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\delta$ -damascone compounds. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 104482, 2023.
- DE SOUSA, A. K. *et al.* Dihydroeugenol derivatives associated with blue LED light: A different form to face multidrug resistant (MDR) bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 173, p. 105827, 2022.
- DE SOUSA, A. K. *et al.* Photobiological effect of eugenol-derived 3-benzoylcoumarin associated with led lights against MDR microorganisms. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 316-323, 2023.
- DE SOUSA, J. N. *et al.* ADMET study and inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by a synthetic p-aminochalcone. **Results in Chemistry**, v. 7, p. 101449, 2024.
- DENISSEN, J. *et al.* Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 244, p. 114006, 2022.
- DHANDA, G.; ACHARYA, Y.; HALDAR, J. Antibiotic adjuvants: A versatile approach to combat antibiotic resistance. **ACS Omega**, v. 8, n. 12, p. 10757-10783, 2023.
- DIAS, K. J. S. O. *et al.* Terpenes as bacterial efflux pump inhibitors: A systematic review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 953982, 2022.
- DIGHE, S. N.; COLLET, T. A. Recent advances in DNA gyrase-targeted antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 199, p. 112326, 2020.
- DING, D. *et al.* The spread of antibiotic resistance to humans and potential protection strategies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 254, p. 114734, 2023.
- DORABABU, A. Pharmacological report of recently designed multifunctional coumarin and coumarin–heterocycle derivatives. **Archiv der Pharmazie**, v. 355, n. 2, p. 2100345, 2022.
- DREW, D. *et al.* Structures and general transport mechanisms by the major facilitator superfamily (MFS). **Chemical reviews**, v. 121, n. 9, p. 5289-5335, 2021.
- DUTESCU, I. A.; HILLIER, S. A. Encouraging the development of new antibiotics: are financial incentives the right way forward? A systematic review and case study. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 415-434, 2021.

EBBENSGAARD, A. E.; LØBNER-OLESEN, A.; FRIMODT-MØLLER, J. The role of efflux pumps in the transition from low-level to clinical antibiotic resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 12, p. 855, 2020.

EGOROV, A. M.; ULYASHOVA, M. M.; RUBTSOVA, M. Y. Inhibitors of  $\beta$ -lactamases. New life of  $\beta$ -lactam antibiotics. **Biochemistry (Moscow)**, v. 85, p. 1292-1309, 2020.

ELFAKY, M. A.; GHAITH, D. M.; ALSAAD, MARWA M.; ZAFER, MAIM. Antibiotic Resistance in Microorganisms—Current Status. *In*: MADDELA, N. R.; KONDAKINDI, V. R.; PABBATI, R. (eds.). **Quorum Quenching: A Chemical Biological Approach for Microbial Biofilm Mitigation and Drug Development**. United Kingdom: Royal Society of Chemistry, 2023. p. 175-201.

EL-SHARKAWY, K. A.; ALBRATTY, M. M.; ALHAZMI, H. A. Synthesis of some novel pyrimidine, thiophene, coumarin, pyridine and pyrrole derivatives and their biological evaluation as analgesic, antipyretic and anti-inflammatory agents. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, p. e00153, 2019.

ERSOY, S. C. *et al.* Impact of bicarbonate on PBP2a production, maturation, and functionality in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 5, p. e 02621-20, 2021.

FAYED, E. A. *et al.* Pyrano-coumarin hybrids as potential antimicrobial agents against MRSA strains: Design, synthesis, ADMET, molecular docking studies, as DNA gyrase inhibitors. **Journal of Molecular Structure**, v. 1295, p. 136663, 2024.

FERNÁNDEZ-PEÑA, L.; MATOS, M. J.; LÓPEZ, E. Recent advances in biologically active coumarins from marine sources: synthesis and evaluation. **Marine Drugs**, v. 21, n. 1, p. 37, 2023.

FERREIRA, C. *et al.* Occurrence and variability of the efflux pump gene *norA* across the *Staphylococcus* genus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 23, p. 15306, 2022.

FISHER, J. F.; MOBASHERY, S.  $\beta$ -Lactams against the Fortress of the Gram-Positive *Staphylococcus aureus* Bacterium. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 6, p. 3412-3463, 2021.

FLORES-MORALES, V. *et al.* Therapeutic effects of coumarins with different substitution patterns. **Molecules**, v. 28, n. 5, p. 2413, 2023.

FORD, C. A.; HURFORD, I. M.; CASSAT, J. E. Antivirulence strategies for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections: a mini review. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 632706, 2021.

FOREZI, L. S. M. *et al.* Synthesis and biological evaluation of coumarins derivatives as potential inhibitors of the production of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor pyocyanin. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 149-156, 2018.

FREITAS, T. S. *et al.* *In vitro* and *in silico* studies of chalcones derived from natural acetophenone inhibitors of NorA and MepA multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 161, p. 105286, 2021.

FRÖHLICH, C. *et al.* Evolution of  $\beta$ -lactamases and enzyme promiscuity. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 34, p. gzab013, 2021.

- FUJIWARA, M. *et al.* Evaluation of efflux pump inhibitors of MexAB-or MexXY-OprM in *Pseudomonas aeruginosa* using nucleic acid dyes. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 28, n. 5, p. 595-601, 2022.
- GARCIA, I. R. *et al.* Microbial resistance: The role of efflux pump superfamilies and their respective substrates. **Life Sciences**, v. 295, p. 120391, 2022.
- GARG, S. S. *et al.* An insight into the therapeutic applications of coumarin compounds and their mechanisms of action. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 152, p. 105424, 2020.
- GAURAV, A. *et al.* Role of bacterial efflux pumps in antibiotic resistance, virulence, and strategies to discover novel efflux pump inhibitors. **Microbiology**, v. 169, n. 5, p. 001333, 2023.
- GIULIERI, S. G. *et al.* Niche-specific genome degradation and convergent evolution shaping *Staphylococcus aureus* adaptation during severe infections. **Elife**, v. 11, p. e77195, 2022.
- GOUDA, M. A. *et al.* A review: Synthesis and medicinal importance of coumarins and their analogues (Part II). **Current Bioactive Compounds**, v. 16, n. 7, p. 993-1008, 2020a.
- GOUDA, M. A. *et al.* Recent progress on coumarin scaffold-based anti-microbial agents (Part III). **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 3784-3817, 2020b.
- GOUDA, M. A.; SALEM, M. A.; HELAL, M. H. A review on synthesis and pharmacological activity of coumarins and their analogs. **Current Bioactive Compounds**, v. 16, n. 6, p. 818-836, 2020.
- GUPTA, M. K.; KUMAR, S.; CHAUDHARY, S. Synthesis and Investigation of antidiabetic response of new coumarin derivatives against streptozotocin induced diabetes in experimental rats. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 53, p. 1122-1127, 2020.
- HAMID, M. *et al.* Determining the 3-substituted Coumarins inhibitory potential against the HsIV protease of *E. coli*. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 27, p. 9169-9182, 2023.
- HARRIS, M. *et al.* Genetic factors that contribute to antibiotic resistance through intrinsic and acquired bacterial genes in urinary tract infections. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1407, 2023.
- HASAN, C. M.; DUTTA, D.; NGUYEN, A. N. T. Revisiting antibiotic resistance: mechanistic foundations to evolutionary outlook. **Antibiotics**, v. 11, n. 1, p. 40, 2022.
- HASSANZADEH, S. *et al.* Epidemiology of efflux pumps genes mediating resistance among *Staphylococcus aureus*; A systematic review. **Microbial Pathogenesis**, v. 139, p. 103850, 2020.
- HE, Y. *et al.* The hydrolytic water molecule of Class A  $\beta$ -lactamase relies on the acyl-enzyme intermediate ES\* for proper coordination and catalysis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 10205, 2020.

- HENDERSON, P. J. F. *et al.* Physiological functions of bacterial “multidrug” efflux pumps. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 9, p. 5417-5478, 2021.
- HENDERSON, R. K.; FENDLER, K.; POOLMAN, B. Coupling efficiency of secondary active transporters. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 58, p. 62-71, 2019.
- HOWDEN, B. P. *et al.* *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, p. 380-395, 2023.
- HUANG, H. *et al.* Tigecycline Resistance-Associated Mutations in the MepA Efflux Pump in *Staphylococcus aureus*. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 4, p. e00634-23, 2023.
- HUANG, L. *et al.* Bacterial multidrug efflux pumps at the frontline of antimicrobial resistance: An overview. **Antibiotics**, v. 11, n. 4, p. 520, 2022.
- HUOVINEN, P.; HUOVINEN, S.; JACOBY, G. A. Sequence of PSE-2 beta-lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 1, p. 134-136, 1988.
- IDREES, M. *et al.* *Staphylococcus aureus* biofilm: Morphology, genetics, pathogenesis and treatment strategies. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 14, p. 7602, 2021.
- IMPEY, R. E. *et al.* Overcoming intrinsic and acquired resistance mechanisms associated with the cell wall of Gram-negative bacteria. **Antibiotics**, v. 9, n. 9, p. 623, 2020.
- IVANOVIC, I. *et al.* Penicillin resistance in bovine *Staphylococcus aureus*: genomic evaluation of the discrepancy between phenotypic and molecular test methods. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 1, p. 462-475, 2023.
- Jaurin, B.; Grundström, T. ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 8, p. 4897-4901, 1981.
- JIAMBOONSRI, P.; EURTIVONG, C.; WANWONG, S. Assessing the Potential of Gallic Acid and Methyl Gallate to Enhance the Efficacy of  $\beta$ -Lactam Antibiotics against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Targeting  $\beta$ -Lactamase: *In silico* and *In vitro* Studies. **Antibiotics**, v. 12, n. 11, p. 1622, 2023.
- JIN, J. *et al.* Pharmacological Advances of Coumarin and Its Derivatives. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 3, p. 565-580, 2023.
- 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.
- KACZOREK, E. *et al.* Phenotypic and genotypic antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus* spp. isolated from cases of clinical mastitis in dairy cattle in Poland. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6442-6453, 2017.

KAKOULLIS, L. *et al.* Mechanisms of antibiotic resistance in important gram-positive and gram-negative pathogens and novel antibiotic solutions. **Antibiotics**, v. 10, n. 4, p. 415, 2021.

KASPERKIEWICZ, K. *et al.* Antagonists of vitamin K—popular coumarin drugs and new synthetic and natural coumarin derivatives. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1465, 2020.

KHURSHEED, A.; JAIN, V. Medicinal research progress of natural coumarin and its derivatives. **The Natural Products Journal**, v. 11, n. 5, p. 648-662, 2021.

KIM, J. *et al.* Structural insights into transporter-mediated drug resistance in infectious diseases. **Journal of Molecular Biology**, v. 433, n. 16, p. 167005, 2021.

KIRMUSAOĞLU, S.; GAREAYAGHI, N.; KOCAZEYBEK, S.B. The Action Mechanisms of Antibiotics and Antibiotic Resistance. *In*: KIRMUSAOĞLU, S. (eds.). **Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods**. Hong Kong: IntechOpen, 2019. p. 1-9.

KONWAR, A. N. *et al.* Emerging non-traditional approaches to combat antibiotic resistance. **Current Microbiology**, v. 79, n. 11, p. 330, 2022.

KUMAR, G.; TUDU, A. K. Tackling multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by natural products and their analogues acting as NorA efflux pump inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 80, p. 117187, 2023.

KUMAR, V. *et al.* Antibiotic adjuvants: synergistic tool to combat multi-drug resistant pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1293633, 2023.

KUMARI, S.; SHARMA, A.; YADAV, S. Pharmacological Potential of Coumarin-Based Derivatives: A Comprehensive Brief Review. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 39, n. 3, p. 568-576, 2023.

KÜPELI AKKOL, E. *et al.* Coumarins and coumarin-related compounds in pharmacotherapy of cancer. **Cancers**, v. 12, n. 7, p. 1959, 2020.

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

KUSAKIZAKO, T. *et al.* Structural biology of the multidrug and toxic compound extrusion superfamily transporters. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-biomembranes**, v. 1862, n. 12, p. 183154, 2020.

LADE, H.; JOO, H.-S.; KIM, J.-S. Molecular basis of non- $\beta$ -lactam antibiotics resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**, v. 11, n. 10, p. 1378, 2022.

LADE, H.; KIM, J.-S. Molecular determinants of  $\beta$ -lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): an updated review. **Antibiotics**, v. 12, n. 9, p. 1362, 2023.

LAM, J. C.; STOKES, W. The golden grapes of wrath—*Staphylococcus aureus* bacteremia: a clinical review. **The American Journal of Medicine**, v. 136, n. 1, p. 19-26, 2023.

- LE TERRIER, C.; NORDMANN, P.; POIREL, L. *In vitro* activity of aztreonam in combination with newly developed  $\beta$ -lactamase inhibitors against MDR Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- $\beta$ -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 78, n. 1, p. 101-107, 2023.
- LI, J. *et al.* Non-antibiotic strategies for prevention and treatment of internalized *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 974984, 2022.
- LIMA, L. M. *et al.*  $\beta$ -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 208, p. 112829, 2020.
- LIU, H. *et al.* Novel coumarin-pyrazole carboxamide derivatives as potential topoisomerase II inhibitors: Design, synthesis and antibacterial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 81-87, 2018.
- LIU, J. *et al.* Novel Coumarin Derivatives Inhibit the Quorum Sensing System and Iron Homeostasis as Antibacterial Synergists against *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 66, n. 21, p. 14735-14754, 2023.
- LOMOVSKAYA, O. *et al.* Spectrum of beta-lactamase inhibition by the cyclic boronate QPX7728, an ultrabroad-spectrum beta-lactamase inhibitor of serine and metallo-beta-lactamases: enhancement of activity of multiple antibiotics against isogenic strains expressing single beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. e00212-20, 2020.
- LONČAR, M. *et al.* Coumarins in food and methods of their determination. **Foods**, v. 9, n. 5, p. 645, 2020.
- LONČAR, M.; GAŠO-SOKAČ, D.; MOLNAR, M. Coumarin derivatives as antifungal agents--A review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 41, n. 2, p. 79-91, 2023.
- LONČARIĆ, M. *et al.* Recent advances in the synthesis of coumarin derivatives from different starting materials. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, p. 151, 2020.
- LÓPEZ, Y. *et al.* Comparative activity of ozenoxacin and other quinolones in *Staphylococcus aureus* strains overexpressing the efflux pump-encoding genes *mepA* and *norA*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 56, n. 3, p. 106082, 2020.
- LUCI, G. *et al.* Pharmacokinetics of non- $\beta$ -lactam  $\beta$ -lactamase inhibitors. **Antibiotics**, v. 10, n. 7, p. 769, 2021.
- LUNGU, B. C.; HUTU, I.; BARROW, P. A. Molecular Characterisation of Antimicrobial Resistance in *E. coli* Isolates from Piglets in the West Region of Romania. **Antibiotics**, v. 12, n. 10, p. 1544, 2023.
- MADEIRO, S. A. L. *et al.* Modulation of the antibiotic activity against multidrug resistant strains of coumarins isolated from Rutaceae species. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 151-154, 2017.
- MANJUNATH, A. *et al.* Antimicrobial activity of Geranyl acetate against cell wall synthesis proteins of *P. aeruginosa* and *S. aureus* using molecular docking and simulation. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 42, n. 6, p. 3030-3050, 2024.

- MARTIN, A. L. A. R. *et al.* *In vitro* and *in silico* evidences about the inhibition of MepA efflux pump by coumarin derivatives. **Microbial Pathogenesis**, v. 182, p. 106246, 2023.
- MARTIN, A. L. A. R. *et al.* Unlocking bacterial defense: Exploring the potent inhibition of NorA efflux pump by coumarin derivatives in *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 190, p. 106608, 2024.
- MASIMEN, M. A. A. *et al.* Overcoming methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) using antimicrobial peptides-silver nanoparticles. **Antibiotics**, v. 11, n. 7, p. 951, 2022.
- MATOS, M. J. *et al.* Synthesis and Vasorelaxant Activity of Nitrate- Coumarin Derivatives. **ChemMedChem**, v. 17, n. 21, p. e202200476, 2022.
- MEDEIROS, A. A. Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactam antibiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p. S19-S45, 1997.
- MILANI, M. *et al.* *Staphylococcus aureus*. In: MILANI, M. *et al.* (eds.). **Bacterial Degradation of Organic and Inorganic Materials**. Switzerland: Springer, 2023. p. 03-20.
- MILLER, A. A. *et al.* *In vitro* characterization of ETX1317, a broad-spectrum  $\beta$ -lactamase inhibitor that restores and enhances  $\beta$ -lactam activity against multi-drug-resistant enterobacteriales, including carbapenem-resistant strains. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 6, p. 1389-1397, 2020.
- MISHRA, P. S. *et al.* Recent developments in coumarin derivatives as Neuroprotective agents. **Current Medicinal Chemistry**, 2024.
- MIYAUCHI, H. *et al.* Structural basis for xenobiotic extrusion by eukaryotic MATE transporter. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1633, 2017.
- MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, B. *et al.* Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8088, 2022.
- MONTINARI, M. R.; MINELLI, S.; DE CATERINA, R. Eighty years of oral anticoagulation: Learning from history. **Vascular Pharmacology**, v. 141, p. 106918, 2021.
- MORA, C. *et al.* Over half of known human pathogenic diseases can be aggravated by climate change. **Nature Climate Change**, v. 12, n. 9, p. 869-875, 2022.
- MORE, H. *et al.* Toxicity of 3 and 3,6-disubstituted coumarins: A computational approach. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 100, n. 12, p. 101110, 2023.
- MUNIZ, D. F. *et al.* *In vitro* and *in silico* inhibitory effects of synthetic and natural eugenol derivatives against the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus*. **Food Chemistry**, v. 337, p. 127776, 2021.
- MUSTAFA, Y. F. Classical approaches and their creative advances in the synthesis of coumarins: A brief review. **Journal of Medicinal and Chemical Sciences**, v. 4, n. 6, p. 612-625, 2021.

NAIR, A. V.; LEE, K. W.; VAN VEEN, H. W. Structural and Functional Landscape of MFS and MATE Efflux Pumps. *In*: LI, X. Z.; ELKINS, C.; ZGURSKAYA, H. (eds.). **Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria**. Switzerland: Adis Cham, 2016. p. 29-44.

NISHINO, K. *et al.* Function and inhibitory mechanisms of multidrug efflux pumps. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 737288, 2021.

NOMURA, R. *et al.* A class A  $\beta$ -lactamase produced by borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* hydrolyses oxacillin. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 244-247, 2020.

OLIVEIRA, R. C. *et al.* *In silico* and *in vitro* evaluation of efflux pumps inhibition of  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyryn. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 40, n. 23, p. 12785-12799, 2022.

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M. *et al.* Efflux pump (QacA, QacB, and QacC) and  $\beta$ -lactamase inhibitors? An evaluation of 1,8-naphthyridines against *Staphylococcus aureus* strains. **Molecules**, v. 28, n. 4, p. 1819, 2023a.

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M. *et al.* NorA, Tet (K), MepA, and MsrA efflux pumps in *Staphylococcus aureus*, their inhibitors and 1,8-naphthyridine sulfonamides. **Current Pharmaceutical Design**, v. 29, n. 5, p. 323-355, 2023b.

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M. *et al.* Valencene, Nootkatone and Their Liposomal Nanoformulations as Potential Inhibitors of NorA, Tet (K), MsrA, and MepA Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus* Strains. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 10, p. 2400, 2023c.

ÖNDER, A. Anticancer activity of natural coumarins for biological targets. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 64, p. 85-109, 2020.

PAL, M. *et al.* Epidemiology, pathogenicity, animal infections, antibiotic resistance, public health significance, and economic impact of *Staphylococcus aureus*: a comprehensive review. **American Journal of Public Health Research**, v. 8, n. 1, p. 14-21, 2020a.

PAL, M. *et al.* *Staphylococcus aureus* from a Commensal to Zoonotic Pathogen: A Critical Appraisal. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine Research**, v. 7, p. 220-228, 2023.

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

PALACIOS, A. R. *et al.* Metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors inspired on snapshots from the catalytic mechanism. **Biomolecules**, v. 10, n. 6, p. 854, 2020.

PAPP-WALLACE, Krisztina M. *et al.* Resistance to novel  $\beta$ -lactam- $\beta$ -lactamase inhibitor combinations: the "price of progress". **Infectious Disease Clinics**, v. 34, n. 4, p. 773-819, 2020.

PASQUA, M. *et al.* The varied role of efflux pumps of the MFS family in the interplay of bacteria with animal and plant cells. **Microorganisms**, v. 7, n. 9, p. 285, 2019.

- PATTANAYAK, P.; ROUT, S. S. Anthelmintic and anti-filarial coumarins of natural and synthetic origin: Chemical and biological intervention. **Results in Chemistry**, v. 7, p. 101327, 2024.
- PEREIRA, R. *et al.* Class A  $\beta$ -lactamases and inhibitors: *In silico* analysis of the binding mode and the relationship with resistance. **Journal of Biotechnology**, v. 279, p. 37-46, 2018.
- PHILIPPON, A. *et al.* A structure-based classification of class A  $\beta$ -lactamases, a broadly diverse family of enzymes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 29-57, 2016.
- PHOUGAT, N. *et al.* Coumarin derivatives as adjuvants: from *in silico* physicochemical characterization to *in vitro* evaluation against Gram positive bacteria. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 19, n. 6, p. 489-496, 2016.
- PIDWILL, G. R. *et al.* The role of macrophages in *Staphylococcus aureus* infection. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 3506, 2021.
- PIMENTA, L. K. L. *et al.* *Staphylococcus* spp. causatives of infections and carrier of *blaZ*, *femA*, and *mecA* genes associated with resistance. **Antibiotics**, v. 12, n. 4, p. 671, 2023.
- PISANI, L. *et al.* A twenty-year journey exploring coumarin-based derivatives as bioactive molecules. **Frontiers in Chemistry**, v. 10, p. 1002547, 2022.
- POTTER, A. D. *et al.* Host nutrient milieu drives an essential role for aspartate biosynthesis during invasive *Staphylococcus aureus* infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 22, p. 12394-12401, 2020.
- PULINGAM, T. *et al.* Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 170, p. 106103, 2022.
- QIN, H.-L. *et al.* Antibacterial activities with the structure-activity relationship of coumarin derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 207, p. 112832, 2020.
- RANJAN SAHOO, C. *et al.* Coumarin derivatives as promising antibacterial agent (s). **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 2, p. 102922, 2021.
- READING, E. *et al.* Perturbed structural dynamics underlie inhibition and altered efflux of the multidrug resistance pump AcrB. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 5565, 2020.
- RICHTER, S. S. *et al.* Detection and prevalence of penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in the United States in 2013. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 812-814, 2016.
- ROCHA, G. D. *et al.* Impact of polymorphisms in *blaZ*, *blaR1* and *blaI* genes and their relationship with  $\beta$ -lactam resistance in *S. aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Microbial Pathogenesis**, v. 165, p. 105453, 2022.
- SAFDARI, H. *et al.* Potent and selective inhibitors of class A  $\beta$ -lactamase: 7-prenyloxy coumarins. **The Journal of Antibiotics**, v. 67, n. 5, p. 373-377, 2014.

- SAHOO, C. R. *et al.* Molecular dynamics and computational study of Mannich-based coumarin derivatives: Potent tyrosine kinase inhibitor. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 38, n. 18, p. 5419-5428, 2020.
- SAMREEN, F. A. Q; AHMAD, I. *In silico* screening and *in vitro* validation of phytocompounds as multidrug efflux pump inhibitor against *E. coli*. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 41, n. 6, p. 2189-2201, 2023.
- SANTANA, J. E. G. *et al.* Liposomal nanoformulations with trans-caryophyllene and caryophyllene oxide: do they have an inhibitory action on the efflux pumps NorA, Tet (K), MsrA, and MepA?. **Chemico-Biological Interactions**, v. 393, p. 110945, 2024.
- 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.; KAATZ, G. W. Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. **Drug Resistance Updates**, v. 27, p. 1-13, 2016.
- SEPAY, N. *et al.* Crystallography-based exploration of non-covalent interactions for the design and synthesis of coumarin for stronger protein binding. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 24, n. 11, p. 6605-6615, 2022.
- SHAMKHI, G. J.; SAADEDIN, S. M. K.; JASSIM, K. A. Detection the prevalence of some chromosomal efflux pump genes in Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Iraqi patients. **Iraqi Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 33-42, 2019.
- SHANG, Y. *et al.* Evolutionary conservative analysis revealed novel functional sites in the efflux pump NorA of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 77, n. 3, p. 675-681, 2022.
- SHARMA, A.; GUPTA, V. K.; PATHANIA, R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. **Indian Journal of Medical Research**, v. 149, n. 2, p. 129-145, 2019.
- SHARMA, M. *et al.* Therapeutic potential of 4-substituted coumarins: A conspectus. **European Journal of Medicinal Chemistry Reports**, v. 6, p. 100086, 2022.
- SHARMA, R. K. *et al.* Design, Synthesis and *In vitro* Studies of 3-Amidocoumarins as Novel Antibiofilm Agents. **Drugs and Drug Candidates**, v. 2, n. 2, p. 279-294, 2023.
- SHEPPARD, S. K. Strain wars and the evolution of opportunistic pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 67, p. 102138, 2022.
- SHI, Z. *et al.* A comprehensive overview of the antibiotics approved in the last two decades: retrospects and prospects. **Molecules**, v. 28, n. 4, p. 1762, 2023.
- SILVA, J. C. *et al.* FTIR characterization and microbiological application of polyoxometalates molybdcic acid and potassium molybdate against MDR bacteria. **Results in Chemistry**, v. 7, p. 101466, 2024.
- SIQUEIRA, M. M. R. *et al.* Aminophenyl chalcones potentiating antibiotic activity and inhibiting bacterial efflux pump. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 158, p. 105695, 2021.

- SODHI, K. K.; SINGH, D. K. Insight into the fluoroquinolone resistance, sources, ecotoxicity, and degradation with special emphasis on ciprofloxacin. **Journal of Water Process Engineering**, v. 43, p. 102218, 2021.
- SOLER, N.; FORTERRE, P. Vesiduction: the fourth way of HGT. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 7, p. 2457-2460, 2020.
- SPAGNOLO, F.; TRUJILLO, M.; DENNEHY, J. J. Why do antibiotics exist?. **Mbio**, v. 12, n. 6, p. e01966-21, 2021.
- SREEKANTAN, A. P. *et al.* Multidrug Efflux Pumps in Bacteria and Efflux Pump Inhibitors. **Advancements of Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 105-114, 2022.
- STEPHEN, J. *et al.* The major facilitator superfamily and antimicrobial resistance efflux pumps of the ESKAPEE pathogen *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**, v. 12, n. 2, p. 343, 2023.
- TOLTZIS, P. Coagulase-Negative Staphylococci and Micrococcaceae. *In*: LONG, S. S. *et al.* (eds.). **Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier, 2023. p. 724-729.
- TOOKE, C. L. *et al.*  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 18, p. 3472-3500, 2019.
- TOTH, M. *et al.* Class D  $\beta$ -lactamases do exist in Gram-positive bacteria. **Nature Chemical Biology**, v. 12, n. 1, p. 9-14, 2016.
- TSIVILEVA, O. M.; KOFTIN, O. V.; EVSEEVA, N. V. Coumarins as fungal metabolites with potential medicinal properties. **Antibiotics**, v. 11, n. 9, p. 1156, 2022.
- TURNER, J. *et al.* The chemical relationship among beta-lactam antibiotics and potential impacts on reactivity and decomposition. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 807955, 2022.
- URBAN-CHMIEL, R. *et al.* Antibiotic resistance in bacteria—A review. **Antibiotics**, v. 11, n. 8, p. 1079, 2022.
- VALI, L. *et al.* Characterization of heterogeneous MRSA and MSSA with reduced susceptibility to chlorhexidine in Kuwaiti hospitals. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 237251, 2017.
- VARELA, M. F. *et al.* Functional Roles of the Conserved Amino Acid Sequence Motif C, the Antiporter Motif, in Membrane Transporters of the Major Facilitator Superfamily. **Biology**, v. 12, n. 10, p. 1336, 2023.
- VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 963248, 2013.
- VERMA, P.; TIWARI, M.; TIWARI, V. Efflux pumps in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: Current status and challenges in the discovery of efflux pumps inhibitors. **Microbial Pathogenesis**, v. 152, p. 104766, 2021.
- VINODHINI, V.; KAVITHA, M. Deciphering agr quorum sensing in *Staphylococcus aureus*: insights and therapeutic prospects. **Molecular Biology Reports**, v. 51, n. 1, p. 155, 2024.

- WANG, T. *et al.* Design, synthesis and evaluation of 3-substituted coumarin derivatives as anti-inflammatory agents. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 68, n. 5, p. 443-446, 2020.
- WANG, X. *et al.* Design, synthesis, and *in vivo* and *in silico* evaluation of coumarin derivatives with potential antidepressant effects. **Molecules**, v. 26, n. 18, p. 5556, 2021.
- XIA, D. *et al.* Recent developments of coumarin-based hybrids in drug discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 269-283, 2022.
- XU, L. *et al.* Design, synthesis, and antifungal activity of 4-amino coumarin based derivatives. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 2738, 2022.
- YAHAV, D. *et al.* New  $\beta$ -lactam- $\beta$ -lactamase inhibitor combinations. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. 1, p. e00115-20, 2020.
- YANG, Y. *et al.* Molecular and phenotypic characterization revealed high prevalence of multidrug-resistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in Chongqing, Southwestern China. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 2, p. 241-246, 2017.
- YAO, J. *et al.* Recent advances in strategies to combat bacterial drug resistance: antimicrobial materials and drug delivery systems. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 4, p. 1188, 2023.
- ZALACAIN, M. *et al.* Novel specific metallo- $\beta$ -lactamase inhibitor ANT2681 restores meropenem activity to clinically effective levels against NDM-positive Enterobacterales. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 6, p. e00203-21, 2021.
- ZHANG, Y. *et al.* Discovery of quercetin and its analogs as potent OXA-48 beta-lactamase inhibitors. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 926104, 2022.
- ZHAO, L. *et al.* Coumarin derivatives containing sulfonamide and dithioacetal moieties: Design, synthesis, antiviral activity, and mechanism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 19, p. 5773-5783, 2022.
- ZOAITER, M. *et al.* Carbonyl cyanide 3-Chloro phenyl hydrazone (CCCP) restores the colistin sensitivity in *Brucella intermedia*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2106, 2023.
- ZUO, G.-Y. *et al.* Synergism of coumarins from the Chinese drug *Zanthoxylum nitidum* with antibacterial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine**, v. 23, n. 14, p. 1814-1820, 2016.