



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



DAMARA FREITAS RODRIGUES

**MODULAÇÃO DA RESISTÊNCIA A DROGAS POR FUROCUMARINAS E
FUROCROMONAS EM *Staphylococcus aureus***

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

João Pessoa - PB

2022



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



DAMARA FREITAS RODRIGUES

**MODULAÇÃO DA RESISTÊNCIA A DROGAS POR FUROCUMARINAS E
FUROCROMONAS EM *Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Orientador: José Pinto de Siqueira Júnior

Coorientadora: Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel

João Pessoa - PB

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

R696m Rodrigues, Damara Freitas.

Modulação da resistência a drogas por furocumarinas e furocromonas em *Staphylococcus aureus* / Damara Freitas Rodrigues. - João Pessoa, 2022.
93 f. : il.

Orientação: José Pinto de Siqueira Júnior.

Coorientação: Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Resistência antibiótica. 2. Inibidores de bombas de efluxo. 3. NorA. 4. Docagem molecular. I. Siqueira Júnior, José Pinto de. II. Gurgel, Ana Pavla Almeida Diniz. III. Título.

UFPB/BC

CDU 543.645.7(043)

Damara Freitas Rodrigues

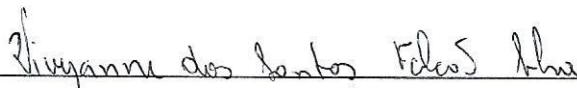
Dissertação de Mestrado avaliada em 07 / 10 / 22

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior

Departamento de Biologia Molecular/ Centro de Ciências Exatas e da Natureza– Universidade
Federal da Paraíba
Orientador



Prof.ª Dr.ª Vivyanne dos Santos Falcão Silva

Departamento de Morfologia/ Centro de Ciências da Saúde– Universidade Federal da Paraíba
Examinadora Externa



Prof.ª Dr.ª Krystyna Gorlach-Lira

Departamento de Biologia Molecular/ Centro de Ciências Exatas e da Natureza– Universidade
Federal da Paraíba
Examinadora Interna

Prof.ª Dr.ª Hilzeth de Luna Freire Pessôa

Departamento de Biologia Molecular/ Centro de Ciências Exatas e da Natureza Universidade
Federal da Paraíba
Suplente Externa

Prof. Dr. Augusto César Vasconcelos de Freitas Júnior

Departamento de Biologia Molecular/ Centro de Ciências Exatas e da Natureza– Universidade
Federal da Paraíba
Suplente Interno

Ao meu Deus e a todos que contribuíram
direta ou indiretamente com este trabalho,
DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar mais uma conquista e a realização deste sonho, pelas oportunidades concedidas a mim.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior, por me conceder a oportunidade de ser sua orientanda, por todo ensinamento, paciência, tempo e dedicação para comigo e em prol da construção desse trabalho, deixo a minha eterna gratidão.

À Dr^a. Nathalie Helen Paes Barreto Borges, que foi como minha segunda orientadora não tenho palavras para agradecer por todo conhecimento, além de sua disponibilidade, paciência e dedicação em me ensinar as técnicas de laboratório, todas as suas contribuições e correções neste trabalho, meu muito obrigado.

À Dr^a. Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel, por aceitar ser minha coorientadora, por sua atenção e correções que contribuíram com este trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Emídio Sampaio Nogueira do Departamento de Química Biológica da URCA, pela disponibilidade na realização das análises de docagem molecular que enriqueceram grandemente este trabalho.

Aos Profs. Drs. Humberto Medeiros Barreto e Daniel Dias Rufino Arcanjo da UFPI pela disponibilidade e contribuições com a escrita e submissão do artigo científico relacionado a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Josean Fachine Tavares e a sua aluna Nikole Durand Trigueiro, pelas substâncias gentilmente disponibilizadas, especialmente as furocumarinas preniladas que enriqueceram grandemente esta dissertação.

À Larissa Rodrigues dos Santos Silva, colega de Mestrado e do LGM, por me ajudar e me auxiliar nos primeiros testes de laboratório, pela atenção, disponibilidade e paciência em tirar alguma dúvida.

Ao Rodrigo Molina Martins que foi o primeiro a fazer a revisão da minha dissertação. A Silvia de Siqueira Martins que também contribuiu com a revisão e a tradução do artigo. Obrigada pela disponibilidade e suas contribuições com este trabalho.

Ao Sr. Bosco, técnico do LGM, pela atenção, cuidado e disposição na preparação e esterilização dos materiais utilizados nos experimentos.

Aos meus queridos pais, Josete e Wilson, por toda educação, cuidado, amor e incentivo para que eu alcançasse os meus objetivos.

Ao meu amado esposo, Willian Romário, por todo amor, apoio, paciência e compreensão nos momentos em que não pude lhe dar atenção.

Às minhas queridas irmãs, Deyse e Daniele, por todo carinho, incentivo e por sempre acreditarem no meu potencial.

À minha querida sogra, Valdiléia, por seu cuidado e carinho e por sempre me encorajar e torcer pelas minhas conquistas.

Aos meus colegas de turma do Mestrado, pelos momentos de descontração, troca de experiências e conhecimento e pelo companheirismo. Em especial, a minha amiga Jesarela que compartilhamos vivências desde os tempos de graduação, agradeço todo apoio e amizade.

Aos funcionários, técnicos e docentes que compõem o Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) pela dedicação e pelo conhecimento transmitido que foi fundamental para a minha formação profissional.

RESUMO

A resistência microbiana aos antibióticos se tornou um problema de crise mundial, sendo necessária a busca por inibidores dos mecanismos de resistência que possam reestabelecer a utilidade desses compostos. As furocumarinas e furocromonas são substâncias naturais com diversas propriedades biológicas importantes, tais como, antibacteriana, anti-inflamatória, antitumoral, entre outras. No presente trabalho, foram avaliadas substâncias da classe das furocumarinas e furocromonas como moduladoras da resistência a drogas por inibição de sistemas de efluxo bacteriano. A técnica da microdiluição em caldo BHI foi utilizada para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos contra a linhagem *Staphylococcus aureus* SA-1199B que superexpressa a proteína de efluxo NorA. Os compostos Ciprofloxacino, Norfloxacino, Brometo de etídio (EtBr) e Berberina foram utilizados como substratos da NorA para avaliar a ação moduladora das substâncias. Nenhuma furocumarina e furocromona testada apresentou atividade antibacteriana relevante (CIM ≥ 512 $\mu\text{g/mL}$) contra *S. aureus* SA-1199B. Contudo, todas demonstraram atividade de modulação da resistência a drogas. No ensaio de modulação as furocumarinas e furocromonas foram incorporadas ao meio de cultura na concentração subinibitória ($\frac{1}{4}$ da CIM). A furocumarina Isosaxalina apresentou o melhor resultado, reduzindo 8 vezes a CIM de Norfloxacino, o Heraclenol reduziu 4 vezes e as demais furocumarinas (Psoraleno, Angelicina e 3-Carbetoxipsoraleno) reduziram 2 vezes, ambos, a CIM de Norfloxacino e Ciprofloxacino. As furocromonas Quelina e Visnagina reduziram 2 vezes a CIM de Norfloxacino e Ciprofloxacino. O resultado de modulação foi semelhante com o EtBr e com a Berberina, indicando que essas substâncias são possíveis inibidoras de bombas de efluxo (EPIs). A fim de compreender as diferenças nas capacidades de atuar como EPIs, foi conduzido um estudo de docagem molecular das furocumarinas e furocromonas contra o modelo da bomba NorA. Por meio da docagem molecular foi possível verificar teoricamente a interação dessas substâncias com a bomba NorA, corroborando com o estudo microbiológico.

Palavras-chave: Resistência antibiótica. Inibidores de bombas de efluxo. NorA. Docagem Molecular.

ABSTRACT

Microbial resistance to antibiotics has become a worldwide crisis problem, requiring the search for inhibitors of resistance mechanisms that can re-establish the usefulness of these compounds. Furocoumarins and furochromones are natural substances with several important biological properties, such as antibacterial, anti-inflammatory, antitumor, and others. In the present work, substances from the class of furocoumarins and furochromones were evaluated as modulators of drug resistance by inhibition of bacterial efflux systems. The BHI broth microdilution technique was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the compounds against *Staphylococcus aureus* strain SA-1199B overexpressing the NorA efflux protein. The compounds Ciprofloxacin, Norfloxacin, Ethidium bromide (EtBr), and Berberine were used as NorA substrates to evaluate the modulating action of the substances. No furocoumarin and furochromone tested showed relevant antibacterial activity (MIC ≥ 512 $\mu\text{g/mL}$) against *S. aureus* SA-1199B. However, all showed drug resistance modulating activity. In the modulation assay, the furocoumarins and furochromones were incorporated into the culture medium at subinhibitory concentration ($\frac{1}{4}$ of the MIC). The furocoumarin Isosaxalin showed the best result, modulating 8-fold the minimum inhibitory concentration (MIC) of Norfloxacin, Heraclenol modulated 4-fold and the other furocoumarins (Psoralen, Angelicin, and 3-Carbethoxypsoralen) modulated 2-fold, both, for Norfloxacin and Ciprofloxacin. The furochromones Khellin and Visnagin modulated 2-fold the MIC of Norfloxacin and Ciprofloxacin. The modulation result was similar to EtBr and Berberine indicating that these substances are possible efflux pump inhibitors (EPIs). To understand the differences in their abilities to act as EPIs, a molecular docking study of the furocoumarins and furochromones against the NorA pump model was conducted. Through molecular docking it was possible to theoretically verify the interaction of these substances with the NorA pump, corroborating the microbiological study.

Keywords: Antibiotic resistance. Efflux Pump Inhibitors (EPIs). NorA. Molecular Docking

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Superfamília <i>ATP binding cassette</i>
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
BAB	<i>Blood Agar Base</i>
BHI	<i>Brain and Heart Infusion</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPI	<i>Efflux Pump Inhibitors</i>
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
Ile	Isoleucina
MDR	Resistência a múltipla drogas
Met	Metionina
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MSF	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MsrA	Proteína de efluxo para eritromicina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível a meticilina
NorA	Proteína de efluxo para fluoroquinolonas e outras substâncias
Phe	Fenilalanina
PMF	Força Motriz Protônica
RND	<i>Resistance/Nodulation/Division</i>
Ser	Serina
SMR	<i>Small Multidrug Resistance</i>
TetK	Proteína de efluxo para tetraciclina
Thr	Treonina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Mecanismos gerais de resistência bacteriana aos antibióticos.....	16
Figura 2 –	Representação dos sistemas de efluxo bacteriano.....	19
Figura 3 –	Funções das bombas de efluxo na formação de biofilme bacteriano.....	20
Figura 4 –	Representação estrutural da proteína NorA em 3D.....	21
Figura 5 –	Cumarina (1,2-Benzopirona).....	27
Figura 6 –	Estrutura química das furocromonas e das furocumarinas análogas.....	31
Figura 7 –	Furocumarinas.....	38
Figura 8 –	Furocromonas.....	39
Figura 9 –	Representação de leitura da Concentração Inibitória Mínima em microplaca de 96 poços utilizando o corante resazurina.....	40
Figura 10 –	Melhores posicionamentos da Isosaxalina, Heraclenol e Imperatorina no modelo da bomba de efluxo NorA.....	45
Figura 11 –	Diagrama 2D de interação Proteína-Ligante da Isosaxalina ancorado no local de ligação do modelo da bomba de efluxo NorA.....	46
Figura 12 –	Isosaxalina (rosa) acoplada no sítio de ligação do modelo da bomba de efluxo NorA juntamente com resíduos próximos e superfície molecular..	47
Figura 13 –	Melhores posicionamentos da Visnagina e do Bergapteno no modelo NorA.....	49
Figura 14 –	Melhores posicionamentos da Quelina e da Isopimpinellina no modelo NorA.....	49
Figura 15 –	Diagrama 2D de interação Proteína-Ligante da Visnagina no sítio de ligação do modelo da bomba de efluxo NorA.....	50
Figura 16 –	Posicionamento de EtBr, Visnagina e Bergapteno no sítio de ligação do modelo da bomba de efluxo NorA.....	51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos antibióticos, do EtBr e da Berberina na ausência/presença das furocumarinas testadas contra a cepa *S. aureus* SA-1199B..... 43
- Tabela 2** – Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos antibióticos, do EtBr e da Berberina na ausência/presença de Quelina, Visnagina e Imperatorina contra a cepa *S. aureus* SA-1199B..... 48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	14
1.2 ANTIBIÓTICOS E MECANISMOS DE AÇÃO	14
1.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA	16
1.4 BOMBAS DE EFLUXO	18
1.4.1 <i>Bomba NorA</i>	21
1.5 AGENTES MODIFICADORES DE ATIVIDADE ANTIBIÓTICA	22
1.6 CUMARINAS	27
1.7 FUROCUMARINAS	28
1.8 FUROCROMONAS.....	31
1.9 DOCAGEM MOLECULAR	32
2 OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 LOCAL DA PESQUISA	37
3.2 LINHAGEM	37
3.3 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS.....	37
3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MODULADORA DA RESISTÊNCIA A DROGAS	39
3.5 PROCEDIMENTO DE DOCAGEM MOLECULAR.....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 ATIVIDADE DE MODULAÇÃO DA RESISTÊNCIA A DROGAS.....	42
4.1.1 <i>Furocumarinas</i>	42
4.1.2 <i>Furocromonas</i>	47
5 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS	55

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A inserção dos antibióticos para quimioterapia das infecções bacterianas foi uma das mais importantes realizações da medicina nos últimos 60 anos. Entretanto, o aparecimento da resistência bacteriana minou a utilidade terapêutica dos agentes existentes, criando a necessidade, cada vez maior, da descoberta de novas drogas antibacterianas. Para tanto, diversas estratégias emergiram, incluindo alterações na estrutura de antibióticos existentes por manipulação química e a procura por novas substâncias antimicrobianas.

Os mecanismos de resistência aos antibióticos são diversos, tendo destaque a redução da permeabilidade da membrana das bactérias aos antimicrobianos, o efluxo de fármacos por bombas de efluxo, a modificação do alvo do antibiótico e a modificação ou degradação do antibiótico. Dentre esses mecanismos, as bombas de efluxo são um dos principais contribuintes da resistência a múltiplas drogas, as quais consistem em proteínas transmembranas que apresentam especificidade a substratos diferentes e, assim, possuem a capacidade de eliminar vários tipos de drogas do interior da célula para o meio extracelular. Desta forma, o efeito da droga é reduzido, permitindo a sobrevivência bacteriana (SEUKEP *et al.*, 2020).

Reconhecida a importância e os avanços da farmacognosia, a avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora da resistência de produtos naturais de origem vegetal são abordagens interessantes. Os inibidores de bombas de efluxo (EPIs – *Efflux Pump Inhibitors*) correspondem à substâncias de origem natural ou sintética que impedem o transporte de moléculas pelas proteínas de efluxo, assim o sinergismo da combinação do EPI com o antibiótico poderia restaurar a sua eficácia, modulando a resistência bacteriana (COWAN, 1999; LEWIS, 2001; SEUKEP *et al.*, 2020).

Estudos têm mostrado que diversos compostos naturais e (semi) sintéticos são capazes de potencializar a ação de antibióticos (LAMUT *et al.*, 2019; SABATINI *et al.*, 2012; SEUKEP *et al.*, 2020). A heterogeneidade estrutural desses compostos dificulta o desenho racional de novos candidatos, o que faz com que seja altamente relevante a contínua avaliação de diversas classes de compostos, particularmente entre aquelas entidades que já se mostraram alvos promissores no desenvolvimento de moléculas com bioatividade.

As furocumarinas e as furocromonas representam classes de substâncias naturais que são amplamente conhecidas por suas propriedades fotoativas, sendo aplicadas no tratamento de muitas doenças, entre elas a psoríase e o vitiligo (ABU-HASHEM *et al.*, 2015; THAKUR *et al.*, 2020). No escuro, diversas atividades biológicas também foram relatadas para essas

substâncias, incluindo a atividade antimicrobiana, antifúngica, antitumoral, entre outras, embora, até onde sabemos, poucos estudos abordem a atividade de furocumarinas como inibidoras de proteínas de efluxo (ABULROB *et al.*, 2004; JOSHI *et al.*, 2014; MADEIRO *et al.*, 2017) e até o momento para as furocromonas nenhum trabalho foi encontrado (para revisões, conferir: ABU-HASHEM *et al.*, 2015; MELOUGH *et al.*, 2018).

Considerando a escassez de inibidores de efluxo efetivos na prática clínica, torna-se necessária a constante procura pela identificação e desenvolvimento de novos inibidores, principalmente considerando a grave situação atual da resistência bacteriana a múltiplas drogas. Neste contexto, o presente estudo avaliou furocumarinas e furocromonas como modificadoras da resistência antibiótica, por inibição de bombas de efluxo, como potenciais adjuvantes de antibióticos.

1.1 *Staphylococcus aureus*

A *Staphylococcus aureus* foi isolada pela primeira vez (de uma ferida pós-operatória infectada) em 1880 por Alexander Ogston, sendo um dos primeiros patógenos descritos. É ainda hoje um dos principais causadores de infecções em humanos. Trata-se de uma espécie de bactéria patogênica, Gram-positiva e anaeróbia facultativa, pertencente à família Staphylococcaceae. Estas bactérias apresentam cerca de 1µm de diâmetro, têm forma esférica e, quando agregadas, assemelham-se a cachos de uvas (BHASKAR *et al.*, 2016).

S. aureus faz parte da microbiota humana, colonizando principalmente o epitélio humano, como a pele e membranas das mucosas. Contudo, ao penetrar nos tecidos internos ou na corrente sanguínea, pode causar infecções como meningite, endocardite, pneumonia, furúnculos, entre outras. Esta espécie bacteriana também pode causar intoxicação alimentar, devido à produção de enterotoxinas, desta forma, é considerada uma das maiores causadoras de doenças alimentares no Brasil (HANIF; HASSAN, 2019; VICTORIA, 2010).

Este microrganismo tem recebido bastante atenção devido à sua facilidade em adquirir resistência a antibióticos clinicamente relevantes, o que dificulta o tratamento dessas infecções, causando cerca de 19.000 mortes no mundo anualmente (BHASKAR *et al.*, 2016).

1.2 Antibióticos e mecanismos de ação

O termo antibiótico foi proposto por Selman Abraham Waksman, em 1942. Estes compostos podem ter ação bactericida ou bacteriostática (quando matam as bactérias ou

inibem o crescimento bacteriano, respectivamente), e apresentam diversos mecanismos de ação, principalmente interferindo na síntese da parede celular, na síntese de proteínas e no reparo e replicação do DNA (BLAIR *et al.*, 2015; WALSH, 2000).

Antes da descoberta da penicilina, feita por Alexander Fleming em 1928 (antibiótico que foi disponibilizado e amplamente utilizado a partir de 1945), outras substâncias foram usadas como antibióticos: a piocianase foi descoberta por Rudolf Emmerich e Oscar Löw a partir de culturas de *Pseudomonas aeruginosa*, e foi empregada no tratamento de infecções em humanos. Um composto químico à base de arsênio, salvarsan, descoberto em 1909 por Paul Ehrlich e sua equipe, mostrou-se um antimicrobiano eficaz contra a sífilis. Ehrlich também trabalhou com Robert Koch e Emil von Behring para melhorar antitoxinas diftéricas. As antitoxinas foram a base da terapia antibacteriana. Além disso, outros pesquisadores, como Burdon-Sanderson, Joseph Lister, Ernest Duchesne e outros entre 1870 e 1897, já haviam observado o efeito antibacteriano de fluidos de mofos, especialmente do gênero *Penicillium* (GOULD, 2016).

As décadas de 1940, 1950 e 1960 foram consideradas a “era de ouro”, pois muitos antibióticos foram descobertos nesse período – como a estreptomicina, em 1944, a vancomicina em 1952 e as cefalosporinas, na década de 1960. A utilização dos antibióticos na clínica causou o aumento da expectativa de vida e foi crucial para a realização de cirurgias invasivas, bem como no tratamento de quimioterapia. Porém não demorou muito para que as bactérias se tornassem resistentes a alguns antibióticos, e os cientistas dedicaram-se a melhorar os que haviam sido descobertos. Em 1961, por exemplo, a ampicilina foi desenvolvida para aumentar o espectro de atividade da penicilina original. Novas formas de cefalosporinas também foram desenvolvidas, de modo que até o fim da década de 1970 já eram divididas em três gerações, segundo o aumento de seu espectro de ação (BLAIR *et al.*, 2015; GOULD, 2016).

Nas últimas décadas, a descoberta de novos antibióticos tem declinado, pois requer um alto investimento das empresas farmacêuticas no desenvolvimento de drogas que podem durar pouco tempo no mercado devido à rápida capacidade que as bactérias apresentam em desenvolver e evoluir mecanismos de resistência (DODDS, 2017).

Com o grande aumento de cepas resistentes e em alto nível, atingiu-se uma era “pós-antibiótica”, na qual os antibióticos conhecidos não são mais capazes de tratar infecções que antes eram tratáveis. Atualmente existem bactérias resistentes a todos os antibióticos utilizados, onde mais de 90% das cepas de *S. aureus* são resistentes a antibióticos como

metecilina, penicilina, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosaminas, entre outros (SHRIRAM *et al.*, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2006).

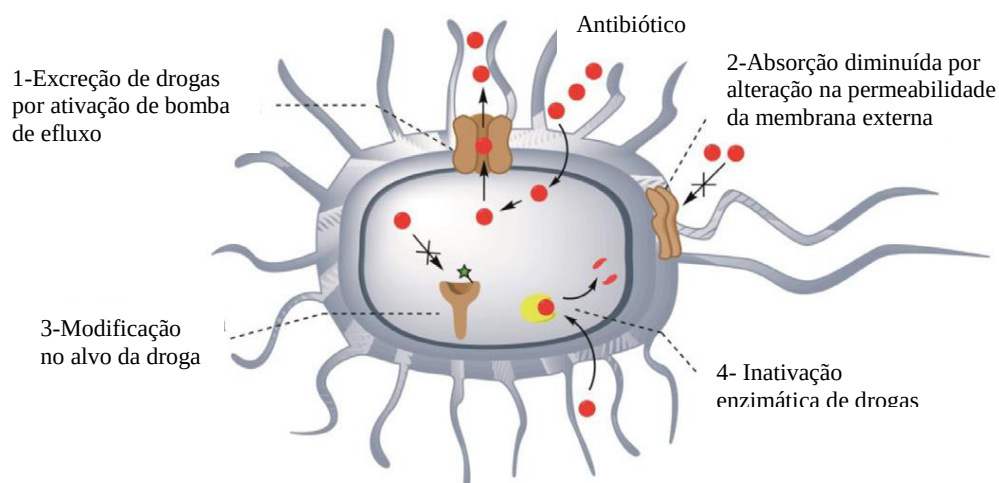
Em 2019, a resistência antimicrobiana foi definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das principais ameaças à saúde global, considerando que as doenças causadas por patógenos resistentes causam cerca de 700.000 mortes anualmente, e poderá ultrapassar os 10 milhões até 2050 se medidas preventivas não forem tomadas (AHMAD *et al.*, 2021).

Entre os patógenos bacterianos de maior ameaça à saúde humana, *S. aureus* e *Enterococcus faecium* são bactérias de alta prioridade no combate a resistência aos antibióticos (MANCUSO *et al.*, 2021).

1.3 Mecanismos de resistência bacteriana

As bactérias podem apresentar resistência intrínseca a alguns antibióticos, mas também podem se tornar resistentes por mutações espontâneas em seus genes cromossômicos ou por aquisição de genes de resistência por transferência gênica horizontal. Os principais mecanismos de resistência que as bactérias apresentam contra a ação dos antibióticos incluem: 1) Superexpressão de proteínas de efluxo, aumentando o efluxo de drogas, e assim, reduzindo sua concentração intracelular; 2) Redução da expressão de porinas, reduzindo a permeabilidade da célula; 3) Alteração da molécula-alvo, quando ocorrem mutações em genes que codificam o alvo do antibiótico; e 4) Inativação do antibiótico por hidrólise ou modificação (Figura 1) (BLAIR *et al.*, 2015; TOUATI *et al.*, 2021; ROSSITER *et al.*, 2017).

Figura 1 – Mecanismos gerais de resistência bacteriana aos antibióticos



Legenda: Quatro mecanismos de resistência principais afetam a ação dos antibióticos nas células bacterianas: 1) Ao entrar na célula o antibiótico (em vermelho) pode ser expulso por proteínas de efluxo; 2) A entrada do antibiótico pode ser bloqueada pela redução de porinas de membrana; 3) O antibiótico não consegue reconhecer o seu local de ação por modificação do alvo; e 4) O antibiótico dentro da célula é degradado por enzimas. Fonte: Adaptado de González-Bello (2017).

A diminuição das concentrações intracelulares de antibióticos na célula bacteriana pode ocorrer de duas formas: pela alteração de proteínas de membrana chamadas porinas e pela superexpressão de bombas de efluxo. As modificações nas porinas podem afetar a sua especificidade, tamanho e número de porinas expressas, causando a redução da permeabilidade da membrana. Esse mecanismo de resistência é observado para os antibióticos beta-lactâmicos, tetraciclinas, cloranfenicol e fluoroquinolonas que, através de porinas, atravessam a membrana externa de bactérias Gram-negativas (DELCOUR, 2009). A superexpressão de bombas de efluxo causa a expulsão aumentada de compostos, evitando seu acúmulo dentro da célula. Em relação à resistência aos antibióticos, essas proteínas de efluxo prejudicam a concentração intracelular adequada para que esses compostos realizem sua função (ROSSITER *et al.*, 2017). As bombas de efluxo serão tratadas de forma detalhada no próximo tópico, sendo o objeto de estudo deste trabalho.

No mecanismo de resistência por modificação da molécula-alvo, o antibiótico não reconhece o local de ação com o qual interage e não exerce sua função na célula. Este mecanismo de resistência foi descrito para glicopeptídeos e beta-lactâmicos. Os beta-lactâmicos reconhecem uma proteína responsável pela síntese do peptidoglicano, que forma a parede celular bacteriana. Por mutações no local de ligação dessas proteínas, o antibiótico não consegue se ligar e bloquear sua atividade, permitindo a formação da parede celular bacteriana e, assim, sua sobrevivência (DZIDIC *et al.*, 2008; POOLE, 2002).

Em se tratando do mecanismo de resistência enzimático, o antibiótico pode ser inativado ou degradado por enzimas bacterianas através de hidrólise, modificação por transferência de grupo ou processo redox. A hidrólise pode ocorrer por enzimas hidrolíticas, como as beta-lactamases, que degradam e são responsáveis pela resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. A transferência de grupos é realizada principalmente por enzimas transferases, que podem adicionar grupos como o acetil, o fosforil e o adenilil nos antibióticos aminoglicosídeos, estreptograminas, macrolídeos, entre outros (DZIDIC *et al.*, 2008). No processo redox ocorre a oxidação ou redução do antibiótico pela bactéria, causando a sua inativação. Este tipo de inativação foi bem estudado para tetraciclinas, em que a sua oxidação ocorre pela enzima TetX (FLUIT *et al.*, 2001).

1.4 Bombas de efluxo

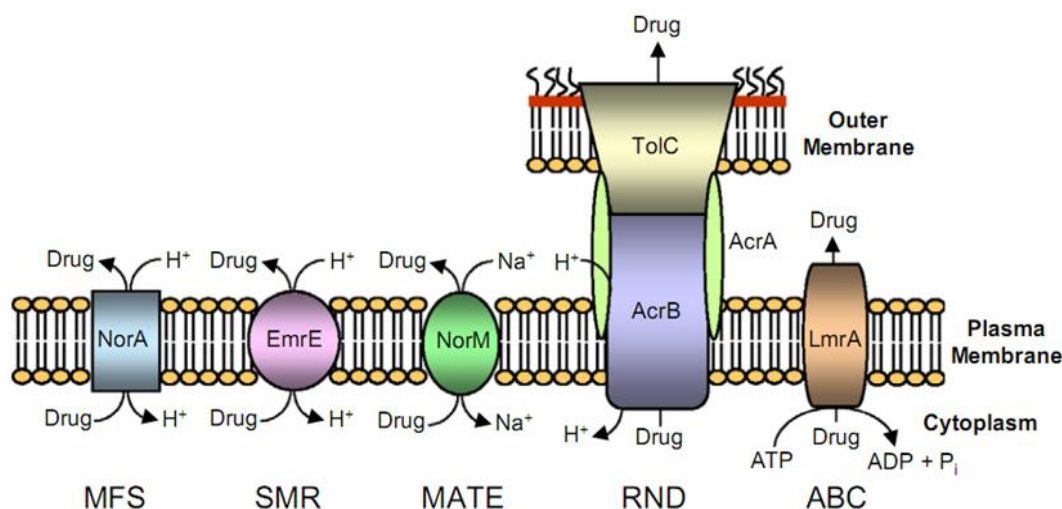
Bombas de efluxo são proteínas transmembrana envolvidas no transporte de substratos tóxicos – incluindo todas as classes de antibióticos clinicamente relevantes – do interior da célula para o ambiente extracelular, diminuindo a concentração intracelular do substrato antimicrobiano e tornando a célula menos susceptível ao agente infeccioso. Assim, a proteína de efluxo contribui para a sobrevivência das bactérias no seu habitat (PIDDOCK, 2006; ROSSITER *et al.*, 2017).

Os genes das proteínas de efluxo e seus produtos estão presentes em todos os organismos, desde bactérias até fungos e eucariotos superiores (BAMBEKE *et al.*, 2003). Essas proteínas de efluxo podem ser específicas a um substrato ou transportar vários compostos estruturalmente não relacionados, como antibióticos de classes diferentes. Neste último caso, tais bombas podem estar associadas à MDR (WEBBER; PIDDOCK, 2003).

A primeira descrição feita de uma proteína de efluxo em bactéria ocorreu em 1980, ao se estudar a resistência à tetraciclina em *Escherichia coli* (McMURRY *et al.*, 1980); Diversas bombas de efluxo foram identificadas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas resistentes a diferentes classes de antibióticos, incluindo macrolídeos, fluoroquinolonas, β -lactâmicos e mais recentemente os aminoglicosídeos (BAMBEKE *et al.*, 2003; STAVRI *et al.*, 2007).

Os sistemas de efluxo são classificados em sete superfamílias, de acordo com a energia usada para expulsar o substrato e a similaridade na sequência. São elas: superfamília MFS (*Major Facilitator*), superfamília ABC (*ATP Binding Cassette*), família MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*), família SMR (*Small Multidrug Resistance*), família RND (*Resistance Nodulation Division*), superfamília PACE (*Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux*) e família MET (*Multidrug Endosomal Transporter*). Esta última família é exclusiva de eucariotos superiores, enquanto as outras seis também são encontradas em microrganismos (KUMAR; SCHWEIZER, 2005; TEGOS *et al.*, 2011). Todos esses sistemas utilizam gradiente de próton (H^+ ou Na^+) como energia para exportar os substratos, exceto a família ABC, que utiliza hidrólise de ATP (Figura 2) (SEUKEP *et al.*, 2020; SPENGLER *et al.*, 2017).

Figura 2 – Representação dos sistemas de efluxo bacteriano



Legenda: MFS (*Major Facilitator Superfamily*); SMR (*Small Multidrug Resistance*); MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*); RND (*Resistance Nodulation Division*); ABC (*ATP Binding Cassette*). As proteínas da família ABC transportam os substratos para o meio extracelular utilizando a energia do ATP, enquanto as outras proteínas utilizam o gradiente de prótons (H^+ ou Na^+). Fonte: Kumar e Schweizer (2005).

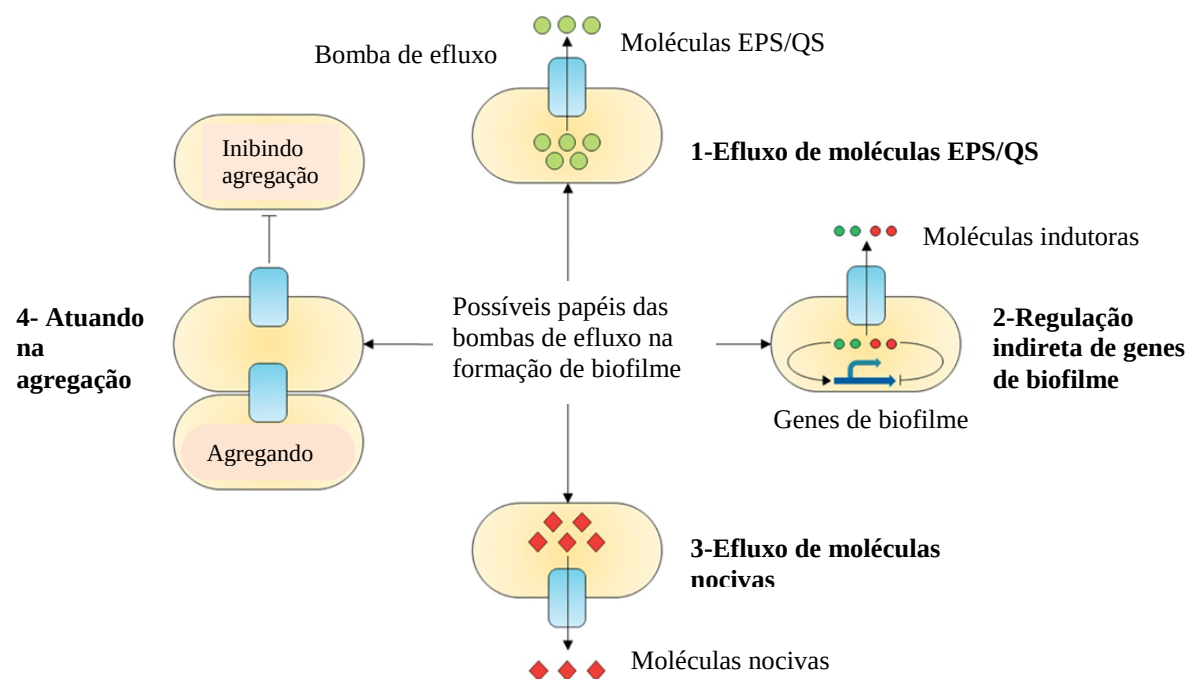
O mecanismo de resistência por bombas de efluxo em *S. aureus* funciona como a primeira linha de defesa contra compostos nocivos, demonstrando o importante papel desse mecanismo em linhagens resistentes, sendo que várias bombas de efluxo de resistência a múltiplas drogas (MDR) já foram identificadas em isolados clínicos (COSTA *et al.*, 2015; LAKHUNDI; ZHANG, 2018).

Além de contribuírem para a resistência a múltiplas drogas, as bombas de efluxo estão envolvidas em outros processos fisiológicos importantes para as células bacterianas, como o transporte de nutrientes, comunicação celular na adaptação ao estresse, formação de biofilme, patogenicidade e virulência. Em comparação à forma planctônica, biofilmes bacterianos podem apresentar resistência aos antibióticos e biocidas de até 1000 vezes (WANG *et al.*, 2017). Esse aumento na resistência foi observado em biofilmes formados por *S. aureus* resistentes a diferentes antibióticos, como ciprofloxacino, oxacilina, vancomicina e outros (LOPES *et al.*, 2017). O biofilme é formado por um mecanismo chamado *quorum sensing*, que é uma comunicação entre as células bacterianas, mediada pela produção e transporte de moléculas autoindutoras. Essas moléculas são responsáveis por controlar a densidade da população bacteriana e, entre outros fatores, assegurar os níveis de nutrientes do meio que habitam (DAVIES, 2003; SEUKEP *et al.*, 2020).

As bombas efluxo podem desempenhar pelo menos quatro papéis diferentes na formação de biofilmes bacterianos (Figura 3): 1) Efluxo de Substâncias Poliméricas

Extracelulares (EPS) e / ou de *quorum-sensing* (QS), importantes para a formação da matriz de biofilme; 2) Regulação indireta de genes envolvidos na formação de biofilme; 3) Efluxo de moléculas nocivas, como antibióticos e intermediários metabólicos; e 4) Agregação através da promoção ou prevenção da adesão às superfícies e a outras células (ALAV *et al.*, 2018).

Figura 3 – Funções das bombas de efluxo na formação de biofilme bacteriano



Legenda: As bombas de efluxo (em azul) presentes na membrana bacteriana podem: 1) Realizar o transporte de moléculas EPS/QS (em verde) essenciais na formação de biofilmes; 2) Transportar moléculas indutoras que estão envolvidas na regulação de genes de biofilmes; 3) Realizar o efluxo de moléculas nocivas (losango vermelho) para a célula bacteriana; e 4) Promover ou inibir a adesão a outras células, importante para o desenvolvimento de biofilmes. Fonte: Adaptado de Alav *et al.* (2018).

O aumento na expressão de sistemas de efluxo em bactérias é importante para regular as quantidades intracelulares de compostos residuais do metabolismo celular no ambiente da matriz do biofilme. Assim, as bombas de efluxo são alvos potentes para combater os fenótipos de bactérias resistentes aos medicamentos, bem como reduzir a patogenicidade bacteriana, inibindo, portanto, a formação e a manutenção de biofilmes (LOPES *et al.*, 2017; SHRIRAM *et al.*, 2018).

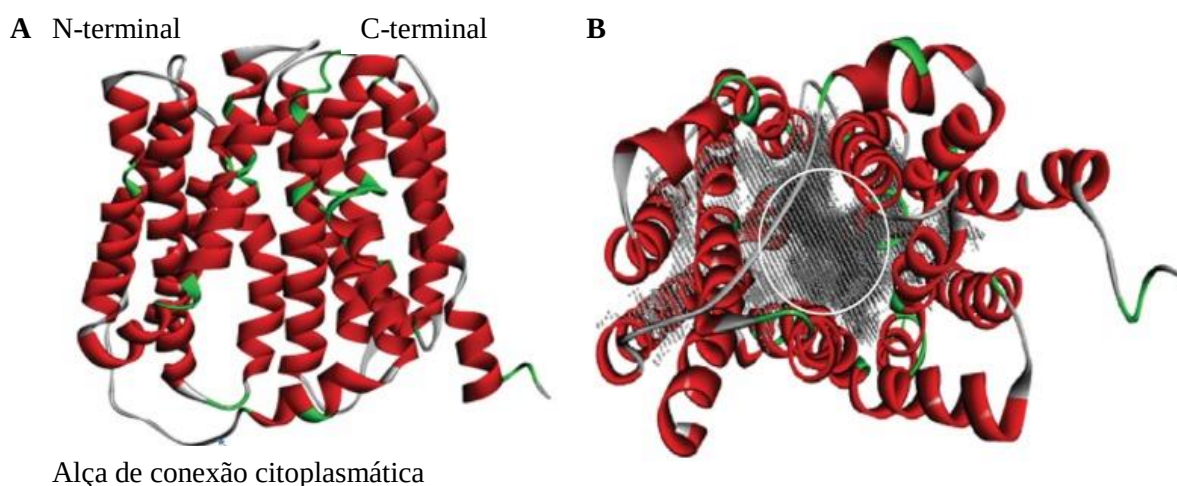
Diversos compostos naturais têm sido encontrados com ação antibiofilme, entre eles os compostos fenólicos, incluindo ácidos fenólicos, flavonóides e taninos, bem como as cumarinas xantol, esculetina e dafnetina, que exibem atividade antibiofilme significativa em

bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (GHOSH *et al.*, 2021; LOPES *et al.*, 2017). Entre outros mecanismos de inibição de biofilme, o ácido tânico parece afetar proteínas de membrana em *S. aureus* SA-1199B e possivelmente estaria interferindo em bombas de efluxo, como a bomba NorA (DINIZ-SILVA *et al.*, 2016).

1.4.1 Bomba NorA

A maior proteína de efluxo MDR caracterizada em *Staphylococcus aureus* é a NorA, encontrada tanto em linhagens MSSA (sensíveis à meticilina) como MRSA (resistentes à meticilina) (GIBBONS, 2004; PIDDOCK, 2006), a qual é superexpressa em 43% das linhagens de *S. aureus*, inclusive em cepas identificadas em isolados clínicos (ASTOLFI *et al.*, 2017; MAHEY *et al.*, 2021). NorA é codificada pelo gene *norA*, identificado em *S. aureus* em 1990. Estruturalmente, NorA apresenta em sua sequência primária 388 aminoácidos, que formam 12 α -hélices transmembranas (Figura 4). Essa proteína faz parte da Superfamília Facilitadora Principal (MFS). As proteínas dessa família podem transportar substâncias do tipo uniporte, antiporte ou simporte, utilizando a energia do gradiente de prótons (H^+) (JANG, 2016; SEUKEP *et al.*, 2020; SMITH *et al.*, 2007).

Figura 4 – Representação estrutural da proteína NorA em 3D



Legenda: (A) Modelo de homologia da bomba de efluxo NorA com domínios amino- (N) e carboxil- (C) terminais conectados por uma longa alça de conexão citoplasmática. (B) Porção superior das 12 α -hélices transmembranas, como I-VI do domínio N-terminal e VII-XII do domínio C-terminal e uma grande cavidade hidrofóbica de ligação ao substrato em cinza, marcada com um círculo, composta por oito hélices I, II, IV e V da região N-terminal e as hélices VII, VIII, X e XI da região C-terminal. Fonte: Adaptado de Bhaskar *et al.* (2016).

A estrutura cristalina da bomba NorA ainda não foi resolvida e o seu bolso de ligação ao substrato não foi definido. Possivelmente, o sítio de ligação é grande e hidrofóbico, o que explicaria a ampla especificidade de substrato; contudo, o mecanismo de reconhecimento da diversidade estrutural de compostos permanece desconhecido. Desta forma, apesar da bomba NorA ser considerada um alvo potencial para o desenvolvimento de inibidores de bomba de efluxo (EPIs), basear-se em estrutura para o projeto de inibidores desse transportador se torna difícil (LAMUT *et al.*, 2019).

Os substratos que a bomba NorA transporta são: fluoroquinolonas hidrofílicas (*viz* norfloxacino, ciprofloxacino, enoxacino), biocidas, incluindo os compostos ligantes de ácido nucléico (NAB), tais como compostos quartenários de amônio (*viz* cloreto benzalcônio e centrimida), corantes intercalantes de DNA (*viz* brometo de etídio e acriflavina), rodamina, brometo de tetrafenilfosfônio, clorafenicol, além do alcalóide berberina, considerada, portanto, como uma proteína de resistência à múltiplas drogas (MDR). De há muito a inativação da proteína NorA fornece o aumento da susceptibilidade bacteriana de quatro a oito vezes para as fluoroquinolonas (HSIEH *et al.*, 1998; YAMADA *et al.*, 1997).

SA-1199 é um isolado clínico sensível à fluoroquinolonas que expressa a bomba NorA, em nível basal, sendo considerada tipo selvagem e a SA-1199B é um mutante resistente selecionado *in vivo*. A cepa SA-1199B apresenta mutações na região promotora que causa a superexpressão de NorA de forma constitutiva (KAATZ; SEO, 1995, 1997; KAATZ *et al.*, 1993).

Além da mutação que promove a superexpressão da bomba NorA, a linhagem SA-1199B apresenta outro mecanismo de resistência: uma mutação na Topoisomerase IV subunidade A (GrlA), que impede a inibição da replicação do DNA pelas fluoroquinolonas. E uma mutação na Girase A (GyrA), as mutações em GyrA e GrlA, muitas vezes ocorrem concomitantemente nas cepas de *S. aureus* (KAATZ; SEO, 1997; SCHINDLER *et al.*, 2013).

1.5 Agentes modificadores de atividade antibiótica

Os adjuvantes de antibióticos ou modificadores da atividade antibiótica são considerados como a alternativa mais apropriada das novas terapias antibacterianas, pois podem atuar como moduladores da resistência a drogas, principalmente nos mecanismos de resistência que envolvem degradação enzimática e ação de bombas de efluxo (BAYM *et al.*, 2016).

Inibidores de enzimas bem conhecidos são os inibidores de beta-lactamases (ácido clavulânico, sulbactam, tazobactam e avibactam), que podem ser aplicados em associação com os antibióticos beta-lactâmicos, posto que estes se ligam de forma irreversível às beta-lactamases, evitando que o antibiótico seja hidrolisado (SHRIRAM *et al.*, 2018).

Os inibidores de bomba de efluxo (EBIs) podem impedir o efluxo de drogas, por bombas de efluxo, de diferentes formas (SHARMA *et al.*, 2019; WADITZER; BUCAR, 2021):

- 1) Inibindo a bomba de maneira competitiva ao se ligar a um ou mais sítios de ligação na proteína de efluxo, que corresponde ao mesmo sítio de ligação do substrato;
- 2) Inibindo a bomba de forma não-competitiva, prejudicando as mudanças conformacionais essenciais da bomba durante o efluxo ou impedindo a ligação adequada dos substratos;
- 3) Formando um complexo com o substrato da bomba por afinidade, de forma que o substrato não pode ser mais reconhecido pela bomba de efluxo;
- 4) Interferindo no gradiente de próton ou suprimento de ATP, que são utilizadas como fonte de energia no mecanismo de efluxo das bombas;
- 5) Inibindo a expressão do gene da bomba ao interferir na regulação gênica.

Outros mecanismos que impedem o efluxo por bombas são, de um modo geral: o redesenho de antibióticos para não serem mais reconhecidos como substratos; a aplicação de anticorpos contra proteínas de bombas; a inibição da montagem da bomba e a aplicação de moléculas mimetizadoras que seriam reconhecidas e bombeadas preferencialmente ao antibiótico (WADITZER; BUCAR, 2021). Todos esses mecanismos interferem no efluxo do substrato da bomba. Assim, a aplicação desses inibidores em associação com antibióticos convencionais poderia aumentar a concentração intracelular desses antibióticos, restaurando sua eficiência, além de reduzir o emergente desenvolvimento da resistência bacteriana. Eles poderiam também aumentar a potência dos antibióticos e seu espectro de ação, bem como reduzir a formação de biofilmes (LAMUT *et al.*, 2019).

As chamadas “drogas não-antibióticas” são substâncias que mostram alguma influência na fisiologia e na viabilidade de microrganismos. Essa influência pode se revelar através da atividade do antibiótico, da modificação da atividade antimicrobiana do antibiótico e da atividade na fisiologia e na patogenicidade do microrganismo. Incluem-se entre os não-antibióticos: neurolépticos tricíclicos, antidepressivos, anti-inflamatórios não esteróides, agentes mucolíticos, bloqueadores de canal de cálcio e inibidores de bomba de prótons (AYAZ *et al.*, 2015; HADERA *et al.*, 2018; KADAM *et al.*, 2019).

A reserpina, alcalóide vegetal anti-hipertensivo, primeiro isolado das raízes de *Rauwolfia vomitoria* e descoberto por acaso como um inibidor eficaz de uma bomba de efluxo de *Bacillus subtilis*, foi o primeiro inibidor de bomba de efluxo NorA identificado (NEYFAKH *et al.*, 1993) e tem sido usado como controle/referência para a triagem de novos inibidores em *S. aureus* e outras bactérias Gram-positivas (FREMPONG-MANSO *et al.*, 2009; SCHINDLER *et al.*, 2013).

Na verdade, além da reserpina, outros inibidores de bombas de efluxo descritos foram também descobertos por acaso, fortuitamente, a partir de drogas existentes. Efeitos semelhantes ao da reserpina foram descritos com fenotiazinas, antagonistas de cálcio, inibidores seletivos da recaptação de serotonina ou inibidores de bomba de prótons (BAMBEKE *et al.*, 2006).

Outro produto natural de origem vegetal identificado como inibidor de NorA foi a flavolignana 5'-metoxihidnocarpina (5'-MHC), isolada de plantas do gênero *Berberis*, que potencializa a fraca atividade antimicrobiana do alcalóide berberina, produzida pelas mesmas plantas. É um claro exemplo de sinergismo entre componentes de uma planta medicinal, e foi sugerido que emular a estratégia da natureza seria também um caminho eficaz para a descoberta de novos adjuvantes de antibióticos, prováveis EPIs (STERMITZ *et al.*, 2000a)

A identificação da 5'-MHC como inibidor da NorA intensificou a busca por novos inibidores. Outros trabalhos do mesmo grupo de Stermitz e Lewis (2000b, 2002, 2003) identificaram as duas primeiras flavonas como inibidoras de bombas MDR que foram isoladas de *Artemisia annua*; essas substâncias eram conhecidas por potencializar a atividade da artemisinina antimalárica contra o agente *Plasmodium falciparum*, causador da doença. Identificaram também a isoflavona encontrada em *Lupinus argenteus*, que, assim como a 5'-MHC, potencializa um antibiótico produzido pela mesma planta de origem. Nesta mesma espécie de *Lupinus* é produzido o antibacteriano ácido linolênico. Outras substâncias estruturalmente diversas também foram descritas por estes autores, pela capacidade de potencializar a atividade de antibióticos como a porfirina feoforbídeo A, o flavolignano silibina de *Silybum marianum* e os neohesperidosídeos poliacetilados presentes em *Geranium caespitosum*.

Gibbons e colaboradores iniciaram seus estudos sobre modificadores da resistência bacteriana com o composto sintético GG918, que é baseado em alcalóides de acridona e tetrahydroisoquinolina (GIBBONS, 2005). A atividade de GG918 contra a bomba NorA em *S. aureus* induziu o grupo na investigação de inibidores naturais, sendo as plantas uma rica fonte de potenciais EPIs. Inicialmente, investigaram plantas europeias e do Oriente Médio. No

extrato vegetal de *Lycopus europaeus* observaram a atividade de modulação da resistência aos antibióticos tetraciclina e eritromicina. Alguns fitoquímicos identificados nesta planta incluíram compostos fenólicos e diterpenos. Na espécie *Rosmarinus officinalis*, da mesma família de *Lycopus* (Lamiaceae), foram encontrados os diterpenos ácido carnósico e carnosol, possíveis inibidores de NorA, por aumentarem a atividade de norfloxacino. Ao avaliarem *Prosopis juliflora*, uma árvore de pequeno porte, identificaram alcalóides de piperidina que inibiram o efluxo do brometo de etídio por inibição de NorA em *S. aureus* (GIBBONS, 2005). Gibbons (2008) também relatou que o alcalóide ergotamina de *Claviceps purpurea* reduziu 4 vezes a CIM de norfloxacino em uma linhagem resistente. Em colaboração, Gibbons e Kaatz avaliaram que a flavonona 8-geranilnaringenina, além de apresentar atividade antibacteriana, inibe sistemas de efluxo como um potente EPI (GIBBONS, 2008).

De há muito o Laboratório de Genética de Microrganismos e laboratórios associados estão envolvidos na avaliação de produtos naturais de plantas do Nordeste (extratos, óleos essenciais e fitoconstituintes) como moduladores da resistência a drogas, bem como da flora algológica (fenólicos) (ANDRADE *et al.*, 2020; CRUZ *et al.*, 2020; DINIZ-SILVA *et al.*, 2017; FALCÃO-SILVA *et al.*, 2009; FIGUEIREDO *et al.*, 2019; GOMES *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2017; MAIA *et al.*, 2011; MENEZES-SILVA *et al.*, 2020; OLIVEIRA-TINTINO *et al.*, 2018; RESENDE-JÚNIOR *et al.*, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2019; SILVA, *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2019; SIQUEIRA *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2021).

De início foram avaliados os flavonóides 4',5-dihidroxi-3,6,7,8,3'-pentametoxiflavona e canferol-3-O-D-(6''-E-p-cumaroil) glicosídeo (tilirosídeo) (FALCÃO-SILVA *et al.*, 2009), todos isolados de plantas da família Malvaceae (*Herissantia tiubae*). A pentametoxiflavona e o tilirosídeo, embora não apresentassem atividade antibacteriana relevante (CIM $\geq$ 512 $\mu\text{g/mL}$), revelaram-se moduladores da resistência a drogas. É possível que essa atividade tenha relação com a lipofilicidade da pentametoxiflavona e com a porção flavonoídica do tilirosídeo. De qualquer forma, foi a primeira indicação de que espécies da família Malvaceae são fontes de produtos, particularmente flavonóides, que modulam a resistência bacteriana a drogas, ou seja, fonte de potenciais adjuvantes de antibióticos.

Posteriormente foram identificados como moduladores os flavonóides acacetina e 7,4'-di-O-metiliscutelareína, isolados de *Sidastrum micranthum* (Malvaceae) (GOMES *et al.*, 2011), os flavonóides metoxilados genkwanin (4',5-dihidroxi-7-metoxiflavona), 7,4'-dimetilapigenina (5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona), trimetilapigenina (4',5,7-trimetoxiflavona), cirsimaritina (4',5,-dihidroxi-6,7-dimetoxiflavona) e tetrametilscutelareína (4',5,6,7-tetrametoxiflavona), isolados de *Praxelis clematidea* (Asteraceae) (MAIA *et al.*,

2011), e o flavonóide retusin (3,7,3',4'-tetra-O-metilquercetina) isolado de *Solanum paludosum* (Solanaceae) (FALCÃO-SILVA *et al.*, 2009; SIQUEIRA *et al.*, 2011).

Enfim, flavonóides de frutas na forma de aglicona (diosmetina, hesperitina, naringenina) ou flavonóides 3-O-glicosídeos (miricitrina, quercitrina), modularam a resistência a norfloxacino em *S. aureus*, que superexpressa NorA (DINIZ-SILVA *et al.*, 2017). Tais flavonóides dietéticos além de modulação se mostraram inibidores da formação de biofilmes (LOPES *et al.*, 2017).

As chalconas de ocorrência natural têm sido relatadas com pouca frequência para inibir as bombas de efluxo bacteriano (WADITZER; BUCAR, 2021). No entanto, foi identificada como moduladora da resistência a drogas a chalcona dietética floretina (DINIZ-SILVA *et al.*, 2017) e também as chalconas isoladas de flores de *Arrabidaea brachypoda*: (4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-chalcona; 3'-hidroxi-3-acetato, 4-metoxi-chalcona; 3',4'-dihidroxi, 3,4,4'-trimetoxi-chalcona e 3,4-dimetoxi-chalcona (RESENDE-JÚNIOR *et al.*, 2020). Da flora algológica, foram avaliados diterpenos dolastanos (FIGUEIREDO *et al.*, 2019) e feofitina (MENEZES-SILVA *et al.*, 2020).

Mais recentemente, foram identificados como moduladores da resistência ao norfloxacino e ao brometo de etídio: 1) o óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* (OLIVEIRA-TINTINO *et al.*, 2018); 2) o extrato etanólico de *Phyllanthus amarus* e a lignana filantina (RIBEIRO *et al.*, 2019); 3) o extrato etanólico (fração diclorometano) de *Mimosa caesalpiniiifoli* (SILVA *et al.*, 2019); 4) o extrato etanólico (fração diclorometano) de *Arrabidaea brachypoda* e os isolados flavonoides diméricos Braquidinas A e B (ANDRADE *et al.*, 2020); 5) o álcool sesquiterpênico monocíclico α -Bisabolol em complexo com a ciclodextrina (CRUZ *et al.*, 2020); 6) o extrato etanólico (fração acetato de etila) de *Platonia insignis* e os isolados biflavonóides moreloflavona e volkensiflavona (SILVA, *et al.*, 2021); e 7) o extrato etanólico de *Bauhinia forficata* (SOUSA *et al.*, 2021).

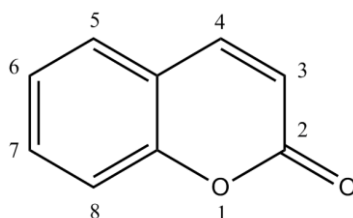
Diversos outros compostos naturais e sintéticos foram revisados, e muitos podem inibir bombas de efluxo incluindo NorA, demonstrando a grande heterogeneidade de moléculas que podem atuar como inibidoras dessa bomba de efluxo. Isso dificulta o estudo da relação estrutura-atividade desses inibidores, que seria uma abordagem para o desenvolvimento de EPIs mais potentes e menos tóxicos. Deve-se lembrar que é justamente devido à alta toxicidade desses compostos nenhum EPI está em uso clínico (MONTEIRO *et al.*, 2020; SCHINDLER *et al.*, 2013; SEUKEP *et al.*, 2020).

1.6 Cumarinas

As cumarinas são um grupo importante de produtos naturais, podendo estar presentes em algas marinhas, bactérias, fungos e numa grande diversidade de espécies vegetais (mais de 1300 já foram identificadas). Extraídas pela primeira vez da planta *Dipteryx odorata*, chamada de coumarou, em 1820, as cumarinas são um grupo conhecido de fitoalexinas nas plantas – nesses vegetais, tais substâncias são produzidas em grande quantidade, em decorrência de infecções e condições de estresse (PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2003; RIBEIRO; KAPLAN, 2002).

Quimicamente, a cumarina é considerada como a fusão de um benzeno ao anel 1,2-pirona (Figura 5), esta por sua vez, é a estrutura básica dos outros derivados cumarínicos, que são classificados como: cumarinas simples, furocumarinas, piranocumarinas, cumarinas diméricas, fenilcumarinas e isocumarinas (ANNUNZIATA *et al.*, 2020). Entre estas, as cumarinas simples e as furocumarinas vêm sendo bem estudadas por apresentarem grande diversidade química e aplicações biológicas diferentes (SHARIFI-RAD *et al.*, 2021; TINE *et al.*, 2017).

Figura 5 — Cumarina (1,2-Benzopirona)



Fonte: (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

As cumarinas simples compreendem os derivados da cumarina *per se* contendo radicais hidróxi, alcóxi, alquil, bem como as formas glicosídicas. O grupo alquil (cadeia carbono e hidrogênio) singular ligado ao oxigênio constitui o grupo alcóxi. A variedade de grupos alcóxi é grande, e entre esses o mais simples é o grupo metóxi ($-\text{CH}_3\text{O}$).

Cumarinas têm sido utilizadas em perfumes, cosméticos, aditivos, em certas bebidas e tabacos, e possui atividade antibacteriana, anti-inflamatória, analgésica, antifúngica, antitumoral, entre outras – muitas delas com baixa toxicidade e alta biodisponibilidade. Diversas moléculas híbridas com a cumarina têm sido desenvolvidas com capacidade

antibacteriana maior que os antibióticos de referência utilizados na clínica, e também com efeito sinérgico com antibióticos, aumentando a eficácia destes em cepas anteriormente resistentes, ou seja, com atividade moduladora da resistência a drogas (FENG *et al.*, 2020; Para revisão ver SHARIFI-RAD *et al.*, 2021; THAKUR *et al.*, 2020).

Sobretudo em angiospermas encontram-se as cumarinas, com maior prevalência nas famílias Apiaceae, Rutaceae e Asteraceae. As duas primeiras destacam-se em relação à diversidade de cumarinas, produzindo de cinco a seis classes diferentes delas, enquanto a família Asteraceae apresenta apenas cumarinas simples. Em menor prevalência, as cumarinas estão presentes nas famílias Rosaceae, Rubiaceae, Solanaceae, Fabaceae, Moraceae, Lamiaceae, Oleaceae e Trymeleaceae (RIBEIRO; KAPLAN, 2002).

As furocumarinas lineares e angulares ficam mais restritas às famílias Apiaceae, Moraceae, Rutaceae e Fabaceae, estando presentes em maior quantidade nas duas primeiras famílias. As furocumarinas angulares também estão presentes na família Trymeleaceae. Num estudo com 87 famílias de angiospermas, foi avaliado que a maior produção é de cumarinas simples em comparação com as furocumarinas lineares, angulares e os outros tipos de cumarinas (RIBEIRO; KAPLAN, 2002).

1.7 Furocumarinas

As furocumarinas são compostos tricíclicos, naturais ou sintéticos, formados pela fusão linear (psoraleno) ou angular (isopsoraleno) de um anel furano com a cumarina (1,2-benzopirona), e representam uma importante classe de compostos fotoativos (SCOTT *et al.*, 1976; ARABZADEH *et al.*, 2002).

As furocumarinas, na presença de luz ultravioleta longa (UVA, ~365 nm), causam letalidade e uma série de outros efeitos biológicos devido à sua fotorreatividade com o DNA e outras macromoléculas e componentes celulares (SCOTT *et al.*, 1976; AVERBECK, 1989; SCHMITT *et al.*, 1995; BETHEA *et al.*, 1999). No escuro, DNA e furocumarinas formam complexos intermoleculares, através da intercalação deste composto entre os pares de bases do DNA, o que é considerado um pré-requisito para uma subsequente reação fotoquímica entre as furocumarinas e as bases pirimídicas (KITAMURA *et al.*, 2005). Furocumarinas bifuncionais, como 8-metoxipsoraleno (8-MOP, xantotoxina) e 4,5',8-trimetilpsoraleno (4,5'8-TMP, trioxsaleno), após intercalação (no escuro), fotorreagem com pirimidinas do DNA, na presença de UVA, formando monoadições (MA) com o anel furano (4',5' MA) ou com o anel cumarínico (3,4 MA). Uma segunda reação fotoquímica, envolvendo uma pirimidina

convenientemente localizada na fita oposta, converte 4',5' monoadições em biadições (BA) (CIMINO *et al.*, 1985). Furocumarinas monofuncionais, como a angelicina, pela sua estrutura angular, e o 3-carbetoxipsoraleno (3-CPs), pela disponibilidade de apenas um sítio reativo na molécula, só são capazes de formar monoadições. Efeitos letais mutagênicos e recombinogênicos têm sido atribuídos primordialmente à formação de adições; no entanto, certas furocumarinas, sob UVA, podem ainda fotoinduzir danos oxidativos no DNA (MOL *et al.*, 1981). Já foi também reportado que as furocumarinas, sob UVA, podem induzir a formação de biadições DNA-proteína (BORDIN *et al.*, 1993).

Pelo fato de, uma vez excitadas, poderem reagir fotoquimicamente com uma ampla variedade de biomoléculas, as furocumarinas são amplamente utilizadas como sondas moleculares no estudo da estrutura e função de ácidos nucleicos “*in situ*” (CIMINO *et al.*, 1985, GUNTHER *et al.*, 1996; KITAMURA *et al.*, 2005), e como drogas na fotoquimioterapia de certas doenças de pele (BARROS *et al.*, 2021; GIA *et al.*, 1992; VEDALDI *et al.*, 1992).

A associação furocumarina/UVA tem sido empregada no estudo de mutação, recombinação e reparo de DNA em vírus, bactérias e microrganismos eucarióticos (SCOTT *et al.*, 1976; AVERBECK, 1989).

Por outro lado, os efeitos de furocumarinas em combinação com a luz ultravioleta curta (UVC, ~254 nm) têm sido bem menos estudados. Igali *et al.* (1970) evidenciaram que o tratamento por 8MOP-UVC reduziu o aparecimento de mutantes auxotróficos em *E. coli*. Bridges (1971), Hass e Webb (1979) mostraram que o pré-tratamento com 8-MOP protege as células de *E. coli* contra os efeitos letais da UVC. No trabalho pioneiro de Bridges (1971), foi relatado que 8-MOP também aumenta a sensibilidade à UVC quando presente no meio de plaqueamento pós-irradiação (ver também Bridges e Mottershead, 1979). Muito tempo depois, tais efeitos fotobiológicos de furocumarinas começaram a ser relatados em *S. aureus*.

Em *S. aureus*, além de letalidade (OGINSKY *et al.*, 1959), o 8-MOP (e outras furocumarinas), em combinação com UVA, induzem profagos (SIQUEIRA-JUNIOR; AZEVEDO, 1983), curam um plasmídeo de resistência à tetraciclina (SIQUEIRA-JUNIOR *et al.*, 1988), curam o profago responsável pela supressão da atividade lipolítica (CAVALCANTI; SIQUEIRA-JUNIOR, 1995). Além disso, as furocumarinas têm um efeito protetor contra a UVC, que pode ser atribuído à inibição da formação de letais dímeros de pirimidina pela UVC (BARRETO; SIQUEIRA-JUNIOR, 2006) e, quando presente no meio de plaqueamento pós-irradiação, diminui a sobrevivência após tratamento por UVC, provavelmente por inibição de reparo (BARROS; SIQUEIRA-JÚNIOR, 2002).

Ainda em *S. aureus*, agora com relação à irradiação por luz ultravioleta B (UVB, ~312 nm), e com duas furocumarinas testadas (8-MOP e 4,5'8-TMP), foi verificado um possível efeito dual: a fotossensibilização devido à formação de mono- e bi- adições e a fotoproteção como consequência da inibição de dímeros de pirimidina (SILVA *et al.*, 2014).

Comparando com outros microrganismos (*E. coli* e *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo), estudos sobre efeitos (foto) biológicos de furocumarinas são escassos e pouco documentados em *S. aureus*.

Consequências biológicas da interação de furocumarinas com o DNA no escuro (na ausência de UVA) também foram reportadas nas três últimas décadas do século 20, revelando, em bactérias, mutagenicidade (CLARKE; WADE, 1975; BRIDGES; MOTTERSHEAD, 1977; ASHWOOD-SMITH, 1978; VENTURINI *et al.*, 1981; QUINTO *et al.*, 1984) e indução de reparo (LECOINTE, 1984), bem como inativação do vírus HSV1 (PALÙ *et al.*, 1984) e do bacteriófago T7 (TÓTH *et al.*, 1990; RONTÓ *et al.*, 1992).

Mais recentemente, o psoraleno ainda apresenta atividade antiviral contra o vírus da hepatite B, pelo bloqueio da polimerase viral e contra os vírus herpes gama, impedindo o ciclo lítico desses vírus, e também do vírus da dengue (REN *et al.*, 2020). Além disso, o trioxaleno, assim como outras furocumarinas, demonstraram atividade anti-HIV (SANTANA *et al.*, 2004).

O psoraleno também inibe o transporte de drogas pela glicoproteína-P (P-gp) por meio da interrupção do efluxo e por inibição de sua atividade de ATPase, e não por afetar a expressão protéica ou reduzir o RNAm codificante da proteína. Várias furocumarinas também estão envolvidas na inibição de outras proteínas, como a proteína quinase C, monoamina oxidase, bem como a modulação de certos canais iônicos, como canais Ca^{2+} , canais de K^{+} do tipo *Shaker*, no transporte de Cl^{-} , entre outros (MELOUGH *et al.*, 2018; REN *et al.*, 2020; SANTANA *et al.*, 2004).

Por meio de estudo de docagem molecular e análises *in vitro*, as furocumarinas angelicina, bergapteno, xantotoxol, isoimperatorina e psoraleno inibiram receptores envolvidos no câncer de mama, como o receptor de estrogênio ($\text{ER}\alpha$), receptor de progesterona (PR), receptor do fator de crescimento da epiderme (EGFR) e o alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR) (ACHARYA *et al.*, 2019).

O estudo com furocumarinas vem aumentando, e novas propriedades dessas moléculas foram relatadas, o que contribuiu para aumentar ainda mais seu interesse na farmacologia, na fotoquimioterapia, na biologia molecular, na fisiologia e bioquímica (SANTANA *et al.*, 2004; THAKUR *et al.*, 2020).

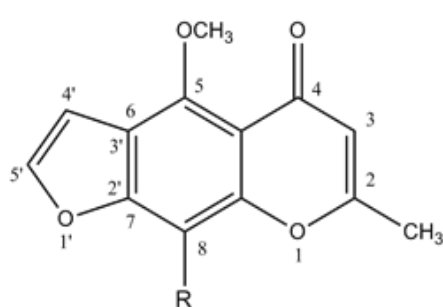
1.8 Furocromonas

A cromona (1,4-benzopirona) é um isômero da cumarina (1,2-benzopirona) e sua estrutura faz parte da estrutura dos flavonoides. É, contudo, muito menos comum na natureza, presente em poucas famílias de plantas, entre elas a Apiaceae, a Fabaceae e a Ranunculaceae. Devido à ocorrência limitada e à atividade farmacológica dessas substâncias, elas têm sido de grande interesse biológico (ERST *et al.*, 2021). Além disso, as cromonas apresentam baixa toxicidade para mamíferos e estão presentes em grandes quantidades na dieta humana (KERI *et al.*, 2014).

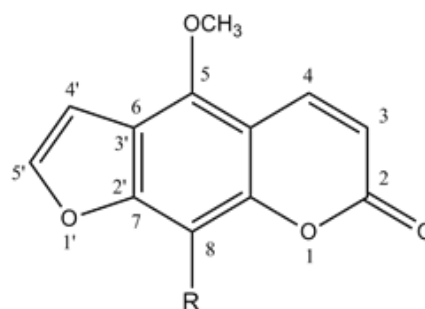
Existem cerca de 50 cromonas descritas, que podem ser classificadas em benzo-, pirano- e furo- cromonas. A estrutura das cromonas tem sido considerada com uma base para o desenvolvimento de novos fármacos e de moléculas bioativas, devido a esses compostos e seus derivados apresentarem diversas atividades biológicas importantes, como propriedade anticancerígena, antimicrobiana, anti-inflamatória, antiviral e antioxidante (ERST *et al.*, 2021; NAZHAND *et al.*, 2019; SHARMA *et al.*, 2011).

A primeira cromona, purificada, a ser utilizada na clínica foi a furocromona quelina (EDWARDS; HOWELL, 2000). As furocromonas possuem um anel furano ligado ao núcleo cromona. As furocromonas quelina e visnagina são estruturalmente semelhantes às furocumarinas isopimpinellina e bergapteno, respectivamente (Figura 6).

Figura 6 – Estrutura química das furocromonas (Visnagina e Quelina) e das furocumarinas (Bergapteno e Isopimpinellina) análogas



Visnagina, R= H
Quelina, R= OCH₃



Bergapteno, R= H
Isopimpinellina, R= OCH₃

Fonte: (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Foi relatado que quelina, visnagina e o psoraleno (furocumarina) estão presentes em *Psoralea coryifolia* (Fabaceae) e em *Ammis visnaga* Lam (Apiaceae). Há muito foi relatado que essas substâncias fotorreagem com DNA e apresentam fototoxicidade e genotoxicidade semelhante às furocumarinas (ABEYSEKERA *et al.*, 1983; para revisão, ver ABU-HASHEM; EL-SHAZLY, 2015; HUDSON; TOWERS, 1991; OMAR; ERIKSSON, 2009; TOWERS *et al.*, 1997).

As furocromonas possuem duas ligações duplas fotorreativas (uma no anel furano e a outra no anel pirona), que podem se ligar ao DNA, e essa foto-ligação depende de vários fatores, tais como: a substância cromona, a dose de irradiação, o comprimento de onda, a sequência de DNA, a temperatura, o solvente, entre outros. Quelina pode formar monoadições com o DNA, mas apresenta baixa tendência em formar biadições (OMAR; ERIKSSON, 2009).

Há muito, quelina e visnagina são utilizadas como fotoquimioterápicos, em conjunto com a luz UVA, a quelina tem sido aplicada no tratamento de vitiligo, com eficácia similar ao tratamento de psoraleno-UVA e nenhum efeito colateral relevante, e também nos tratamentos de psoríase (VEDALDI *et al.*, 1988; SCHIMMER, 1997), angina de peito e asma, devido à sua potente ação como um vasodilatador coronariano e agente antiespasmódico (ANREP *et al.*, 1946, 1949) e cálculo renal (VANACHAYANGKUL *et al.*, 2010).

Derivados dessas furocromonas demonstraram atividade anti-inflamatória e analgésica (ABU-HASHEM; YOUSSEF, 2011), atividade inibitória do fator de crescimento epidérmico (ELGAZWY *et al.*, 2013), bem como atividade antimicrobiana contra a *Escherichia coli* e *Fusarium culmorum* L. (BORGES *et al.*, 1998).

1.9 Docagem molecular

A docagem molecular é uma ferramenta *in silico* (método computacional) para avaliar possíveis mecanismos de ligação, bem como a conformação e orientação (referidas como “pose”) de moléculas em um alvo macromolecular, como em proteínas. Para esse fim, se faz necessária a utilização de algoritmos específicos para a geração de funções de pontuação, que determinam o local, a afinidade e o modo de ligação. Essa técnica pode ser aplicada no desenvolvimento de drogas avaliando métodos de encaixe no estudo de estrutura/função e em complexos de proteína-substrato (LI *et al.*, 2019; PINZI; RASTELLI, 2019). Dentre os *softwares* mais utilizados estão o *AutoDock4* (MORRIS *et al.*, 1998), o *AutoDock Vina*

(TROTT; OLSON, 2010), o *Molegro Virtual Docker* (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006), entre outros.

O *software AutoDock Vina*, utilizado neste trabalho, aplica uma função de pontuação que considera as seguintes propriedades, com os respectivos valores dos pesos de contribuição: ligações de hidrogênio (-0,587), hidrofobicidade (-0,0351), interações estéricas (-0,0356 [gauss1]; -0,00516 [gauss2]; 0,840 [repulsão]) e número de ângulos de torção de rotação livre dos ligantes (N_{rot}) (0,0585) (TROTT; OLSON, 2010).

As estruturas tridimensionais de proteínas e ligantes para serem utilizadas no estudo de docagem molecular podem ser recuperadas a partir de bancos de dados (*Protein Data Bank* (PDB), ZINC e *PubChem* são alguns exemplos). Na indisponibilidade da estrutura proteica desejada, outros métodos podem ser aplicados para sua obtenção, como modelagem comparativa, métodos de predição computacional e outros. Antes da análise por docagem molecular, as estruturas são preparadas adicionando cargas parciais em seus átomos, ajustando o estado de protonação e os conflitos estéricos da proteína, para isso alguns serviços online podem ser utilizados, como o *MolProbity* (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>); esta etapa é importante para que a avaliação de encaixe seja bem sucedida (CHEN *et al.*, 2010; LASKOWSKI *et al.*, 1993; TORRES *et al.*, 2019).

Os estudos de docagem são importantes na avaliação de compostos naturais, incluindo os derivados de plantas, para o desenvolvimento de drogas pela melhor caracterização entre receptores e seus ligantes (SRINIVAS *et al.*, 2014).

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar furocumarinas e furocromonas como agentes modificadores da atividade antibiótica em *Staphylococcus aureus*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar furocumarinas (psoraleno, angelicina, 3-carbetoxipsoraleno, heraclenol, isosaxalina) como antibacterianas e moduladoras da resistência a drogas contra *S. aureus* SA-1199B.
- Avaliar furocromonas (quelina e visnagina) como antibacterianas e moduladoras da resistência a drogas contra *S. aureus* SA-1199B.
- Realizar estudos de docagem molecular das furocumarinas preniladas que apresentaram os melhores resultados de modulação (isosaxalina e heraclenol), no modelo da bomba de efluxo NorA.
- Realizar estudos de docagem molecular das furocromonas (quelina e visnagina) em comparação com as suas furocumarinas análogas que não modulam (isopimpinellina e bergapteno, respectivamente), no modelo da bomba de efluxo NorA.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local da pesquisa

Os estudos para avaliação da atividade antimicrobiana e modulação da resistência foram realizados no Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Biologia Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba (LGM/DBM/CCEN/UFPB). A análise de docagem molecular foi realizada em parceria com o Prof. Dr. Carlos Emídio Sampaio Nogueira no Departamento de Química Biológica da Universidade Regional do Cariri, Crato, Ceará.

3.2 Linhagem

A linhagem de *Staphylococcus aureus* utilizada foi a SA-1199B, que superexpressa o gene *norA*; este codifica a proteína de efluxo NorA, responsável pelo efluxo de fluoroquinolonas hidrofílicas (como norfloxacino e ciprofloxacino), bem como do brometo de etídio e da berberina, mas não de fluoroquinolonas hidrofóbicas como pefloxacino (KAATZ; SEO, 1995; STERMITZ *et al.* 2000a). A linhagem foi gentilmente fornecida pelo Prof. Simon Gibbons (UCL School of Pharmacy, London, UK) e mantida em Ágar-Sangue-Base nutriente (*Blood Agar Base* - BAB, Difco). Antes de ser utilizada, teve suas células crescidas em caldo Infusão-Cérebro-Coração (*Brain Heart Infusion* - BHI, Difco) por 18-24h a 37°C.

3.3 Substâncias utilizadas

Antibióticos, Brometo de etídio e Berberina

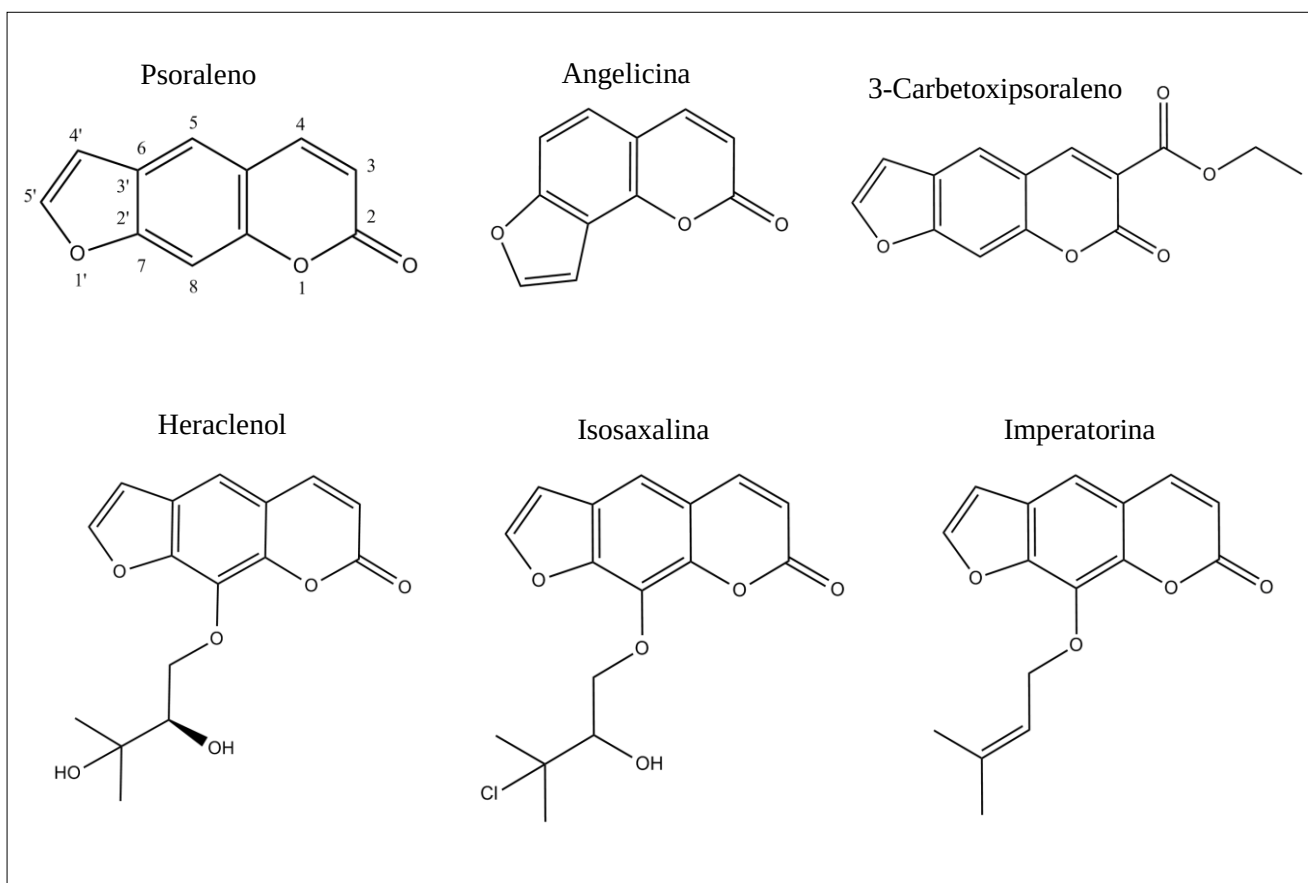
A solução-estoque do antibiótico norfloxacino foi preparada em NaOH (1 mL/0,1 M) e 9 mL de água destilada esterilizada. As soluções dos antibióticos ciprofloxacino e pefloxacino foram preparadas em 10 mL de água destilada esterilizada de acordo com o manual CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2020). As soluções-estoque do brometo de etídio (EtBr) e da berberina foram preparadas em água destilada e esterilizada. Todos os compostos foram obtidos da Sigma-Aldrich.

Furocumarinas e furocromonas

As soluções-estoque das furocumarinas e furocromonas (Figuras 7 e 8) utilizadas neste trabalho foram preparadas em dimetilsulfóxido [DMSO:H₂O (4:1)], que em sua maior concentração final após diluição no caldo BHI (4%) não inibe o crescimento bacteriano (FALCÃO-SILVA *et al.*, 2009).

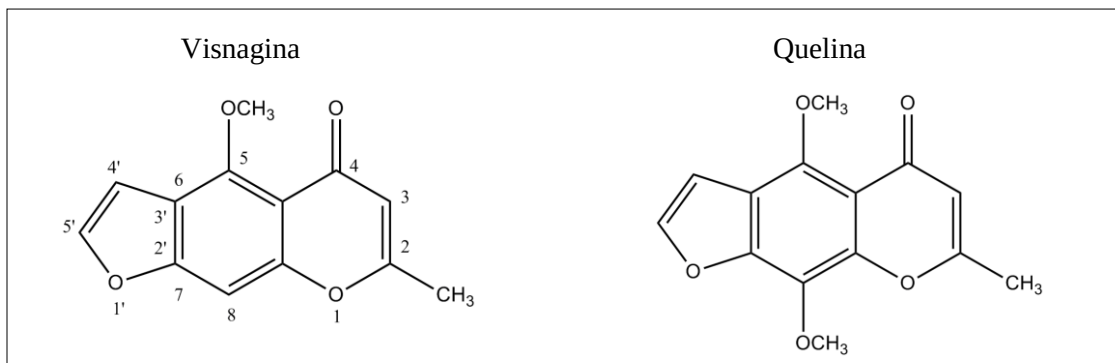
As furocumarinas preniladas (imperatorina, heraclenol e isosaxalina) foram obtidas do extrato hexânico de *Pilocarpus spicatus* (Rutaceae) e fornecidas pelo Prof. Josean Fachine Tavares (DCF/CCS/UFPB). O 3-carbetoxipsoraleno foi fornecido pelo Prof. João Antonio Pegas Henriques (UFRGS). E as outras substâncias foram obtidas da Sigma-Aldrich.

Figura 7 – Furocumarinas



Fonte: (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Figura 8 – Furocromonas



Fonte: (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

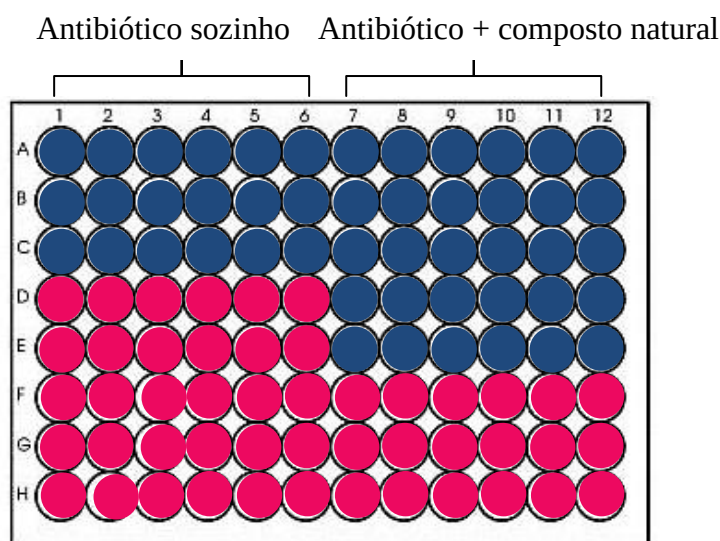
3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora da resistência a drogas

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) das furocumarinas, furocromonas e substratos da bomba de efluxo NorA, incluindo os antibióticos (norfloxacino, ciprofloxacino e pefloxacino) foram determinadas pelo método da microdiluição no caldo BHI, em microplacas de 96 poços (Figura 9), usando uma suspensão bacteriana de c.a. 10^5 ufc/mL e concentrações das drogas usualmente variando de a 8 µg/mL ou 512 a 1 µg/mL (diluição seriada razão 2). A CIM é definida como a menor concentração onde nenhum crescimento bacteriano é observado. Para a melhor visualização da ausência/presença de crescimento bacteriano, foi utilizado o corante resazurina (0,01%).

Para a avaliação das furocumarinas e furocromonas como agentes modificadores de atividade antibiótica (inibidores putativos de bomba de efluxo), o “ensaio de modulação” (STAVRI *et al.*, 2007), um método que tem sido amplamente aplicado para identificar potenciais inibidores de bomba de efluxo (EBIs), foi utilizado. A metodologia básica consiste na determinação da CIM dos antibióticos, brometo de etídio e berberina, na presença e na ausência do produto natural em uma concentração correspondente a $\frac{1}{4}$ de sua CIM. Os experimentos foram realizados em duplicata (réplicas na mesma microplaca) e ao menos duas vezes (em diferentes ocasiões), com resultados consistentes.

O antibiótico pefloxacino foi utilizado como controle negativo por ser uma fluoroquinolona hidrofóbica e portanto não substrato da bomba de efluxo NorA (HIRAI *et al.*, 1986; KAATZ *et al.*, 1993; PIDDOCK *et al.*, 2001). A imperatorina foi utilizada como controle positivo (MADEIRO *et al.*, 2017).

Figura 9 – Representação de leitura da Concentração Inibitória Mínima em microplaca de 96 poços utilizando o corante resazurina



Fonte: O autor

Legenda: A cor azul indica a ausência de viabilidade celular e a cor rosa indica o crescimento celular.

3.5 Procedimento de docagem molecular

O modelo de NorA para o procedimento de docagem molecular foi criado recuperando a sequência de NorA da cepa *S. aureus* SA1199, a partir do banco de dados *Universal Protein Resource* (Uniprot, Entry Q03325). Em seguida, o serviço *SWISS-MODEL* (WATERHOUSE *et al.*, 2018) foi usado para construir o modelo de homologia. Dos modelos gerados, aquele com a melhor pontuação GMQE (*Global Model Quality Estimation*) foi aquele baseado na estrutura do transportador *E. coli* YajR (PDB-ID: 3wdo). O serviço *MolProbity* (CHEN *et al.*, 2010) foi usado para a protonação do modelo de NorA.

Para a docagem molecular, que foi realizada no *software Autodock Vina* (TROT; OLSON, 2010), a caixa da grade foi definida como uma caixa de 30Åx30Åx30Å em torno do centro geométrico do modelo. Cargas parciais de *Gasteiger* foram adicionadas aos átomos do ligante, átomos de hidrogênio não polares foram misturados, enquanto todos os outros parâmetros foram mantidos em seus valores padrão. Os melhores resultados foram escolhidos com base na pontuação de ligação.

Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade de modulação da resistência a drogas

Nenhuma substância ensaiada apresentou atividade antimicrobiana frente à cepa *S. aureus* SA-1199B, a CIM das substâncias foi $>512 \mu\text{g/mL}$ (exceto Angelicina, que foi $512 \mu\text{g/mL}$). Segundo Gibbons (2008), as substâncias com a CIM maior que $100 \mu\text{g/mL}$ possuem baixa atividade antimicrobiana, diferente daquelas que apresentam CIM entre $< 2 - 10 \mu\text{g/mL}$, considerada atividade antibacteriana relevante.

Apesar de não apresentarem atividade antimicrobiana, as substâncias testadas apresentaram atividade moduladora da resistência bacteriana quando incorporadas ao meio de cultura na concentração subinibitória ($\frac{1}{4}$ da CIM) (Tabela 1).

O brometo de etídio (EtBr) foi utilizado como uma molécula padrão para modulação da resistência por bombas de efluxo, considerando que o efluxo ativo é o único mecanismo conhecido de resistência bacteriana a esse composto. Portanto, a utilização de EtBr contra a linhagem *S. aureus* SA-1199B é de valor para demonstrar que os produtos ensaiados modulam a resistência aos antibióticos realmente por inibição da bomba de efluxo (DEMARCO *et al.*, 2007). Também foi utilizada a berberina, um alcalóide isoquinolina que possui baixa atividade antimicrobiana, mas que, na presença de um EPI, tem sua atividade potencializada por se acumular na célula bacteriana (STERMITZ *et al.*, 2000a).

4.1.1 Furocumarinas

Todas as furocumarinas testadas apresentaram atividade de modulação da resistência a drogas na linhagem *S. aureus* SA-1199B. A furocumarina Isosaxalina reduziu a CIM de Norfloxacino 8 vezes e a CIM de EtBr ≥ 8 vezes. O Heraclenol reduziu 4 vezes e o Psoraleno, o 3-Carbetoxipsoraleno e a Angelicina reduziram 2 vezes a CIM de todos os substratos de NorA ensaiados (Tabela 1). Os resultados positivos em relação aos substratos EtBr e Berberina demonstram a possível ação dessas substâncias sobre bombas de efluxo. Além disso, nenhuma furocumarina modulou para o antibiótico Pefloxacino, utilizado como controle negativo (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos antibióticos, do EtBr e da Berberina na ausência/presença das furocumarinas testadas contra a cepa *S. aureus* SA-1199B

Substâncias	CIM (µg/mL)				
	NOR	CIP	PEF	EtBr	BER
— ^a	64	16	16	64	> 512
+ Psoraleno	32 (2)^b	8 (2)	16	32 (2)	512 (2)
+ Angelicina	32 (2)	8 (2)	16	32 (2)	512 (2)
+ 3-Carbetoxipsoraleno	32 (2)	8 (2)	16	32 (2)	512 (2)
+ Heraclenol	16 (4)	4 (4)	16	16 (4)	256 (4)
+ Isosaxalina	8 (8)	N/D	16	≤8 (≥8)	N/D
Imperatorina ¹	16 (4)	N/D	16	4 (16)	32 (32)

^aNorfloxacino (NOR), Ciprofloxacino (CIP), Pefloxacino (PEF), Brometo de etídio (EtBr) e Berberina (BER) sozinhos; Não determinado (N/D); ^b(Fator de modulação da CIM); ¹ (Controle positivo: Madeiro et al., 2017).

A diferença entre o Psoraleno e a Angelicina, é que o Psoraleno é uma furocumarina linear, enquanto que a Angelicina é angular. A presença do radical 3-carbetóxi no anel pirano do Psoraleno constitui o 3-Carbetoxipsoraleno. Apesar da diferença estrutural entre essas furocumarinas, nada disso influenciou no resultado de modulação, onde essas três furocumarinas reduziram apenas 2 vezes a CIM dos antibióticos (Tabela 1).

A furocumarina Isosaxalina mostrou o melhor resultado de modulação (Tabela 1). A Isosaxalina e o Heraclenol, bem como a Imperatorina, são furocumarinas oxipreniladas (com o grupo prenil ligado a um átomo de oxigênio). A única diferença estrutural entre a Isosaxalina e o Heraclenol é a presença do grupo Cl e OH, respectivamente, na cadeia lateral prenil no C-8 dessas moléculas (Figura 7). A presença de OH no Heraclenol pode ter influenciado uma menor atividade de modulação, como é observado em cumarinas simples (ARAÚJO *et al.*, 2016).

Nas cumarinas simples, o grupo prenil foi importante na modulação da resistência a drogas em *S. aureus*, o qual contribuiu com a inibição do efluxo do EtBr (ARAÚJO *et al.*, 2016; ROY *et al.*, 2013). O bloqueio do efluxo do EtBr é principalmente atribuível à inibição da bomba NorA, apesar de diversas bombas terem afinidade com esse substrato (DEMARCO *et al.*, 2007; FELICETTI *et al.*, 2018).

No caso das furocumarinas, a presença do grupo prenila resulta num aumento da lipofilicidade da molécula, e este fator pode favorecer a modulação da resistência por bombas de efluxo de bactérias Gram-positivas (STAVRI; GIBBONS, 2005), o que poderia explicar a

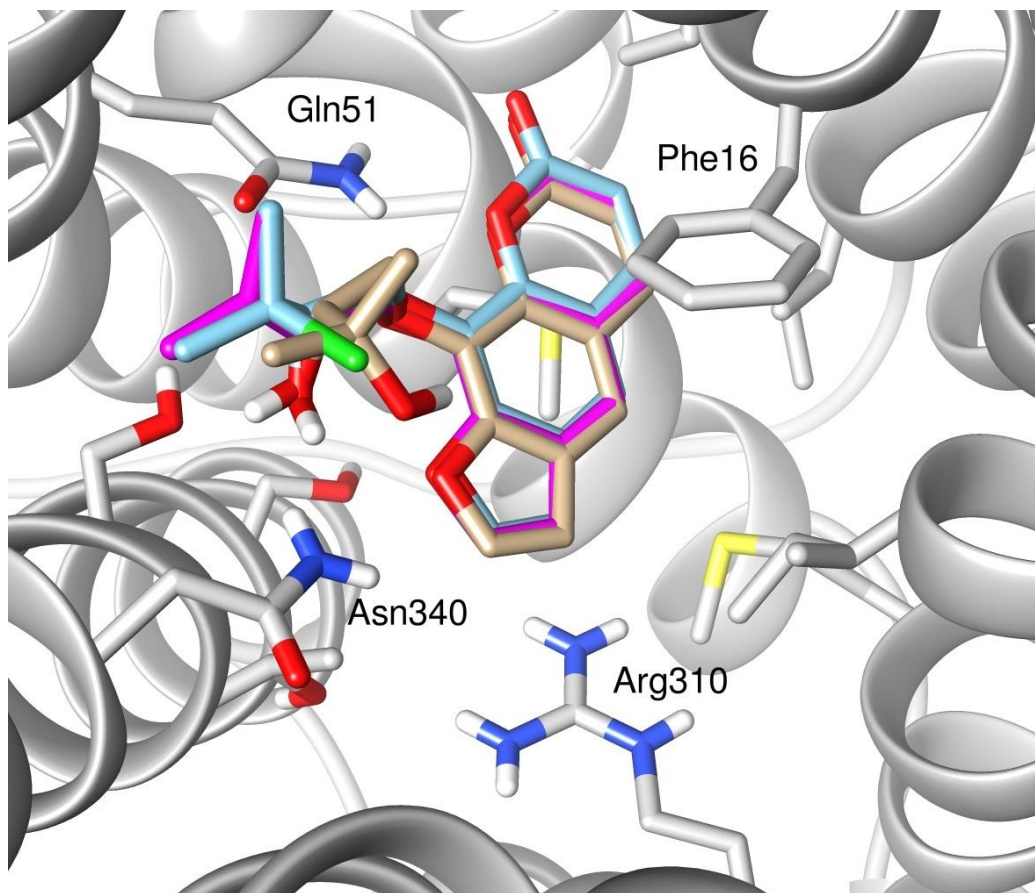
relevante atividade de modulação observada nas furocumarinas preniladas, principalmente comparando com as furocumarinas não preniladas (Psoraleno, Angelicina e 3-Carbetoxipsoraleno), ensaiadas neste trabalho (Tabela 1).

Em xantonas, a presença de grupos prenil influenciou a lipofilicidade e também as propriedades tridimensionais dessas moléculas, o que favoreceu na interação com diferentes alvos biológicos. Além disso, serviram como uma porção estrutural para interações hidrofóbicas, sendo que diversas atividades biológicas foram correlacionadas com o radical prenil em posições-chave dessas moléculas (CASTANHEIRO *et al.*, 2009; PINTO; CASTANHEIRO, 2009).

Os compostos oxiprenilados podem interagir com vários alvos biológicos intracelulares e extracelulares, levando a diferentes respostas biológicas benéficas a saúde humana, conhecidos como potentes agentes neuroprotetores, anticarcinogênicos e anti-inflamatórios (EPIFANO *et al.*, 2007; FIORITO *et al.*, 2019). A cumarina Aurapteno, encontrada em *Citrus aurantium L.* (Rutaceae), foi descrita em 1930 como a primeira substância oxiprenilada, e atualmente cerca de 400 desses compostos foram descritos (FIORITO *et al.*, 2019).

Considerando que as furocumarinas preniladas (Isosaxalina, Heraclenol e Imperatorina) apresentaram os melhores resultados de modulação, como pode ser observado na Tabela 1, a fim de compreender as diferenças nas capacidades de atuar como inibidores de bomba de efluxo (EPI), foi realizado um estudo de docagem molecular com essas substâncias contra o modelo da bomba de efluxo NorA. De qualquer forma, todas as furocumarinas atacam de modo semelhante, interagindo com os mesmos resíduos, como pode ser visto na Figura 10.

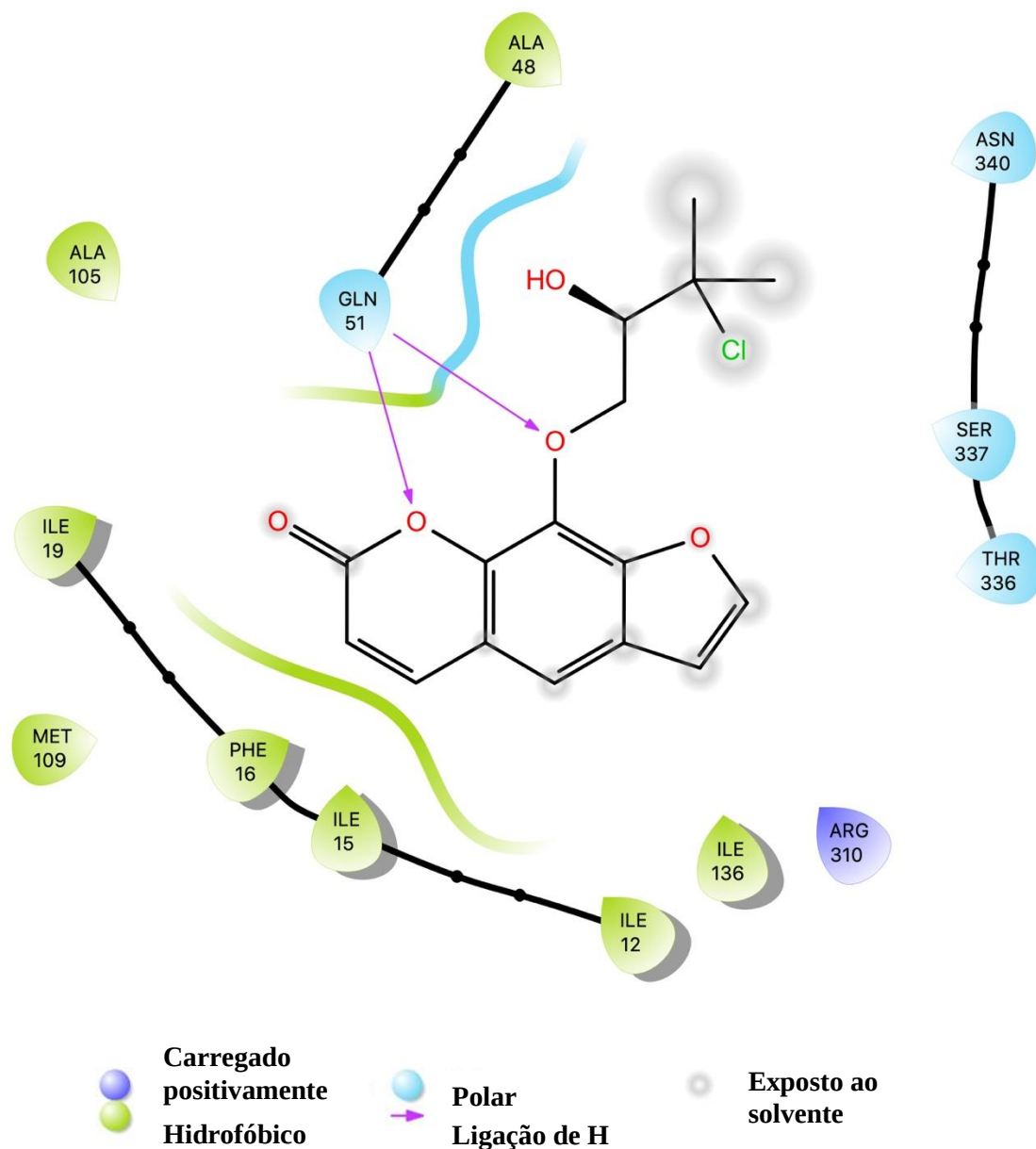
Figura 10 - Melhores posicionamentos da Isosaxalina, Heraclenol e Imperatorina no modelo da bomba de efluxo NorA



Legenda: Isosaxalina (azul claro), Heraclenol (dourado), Imperatorina (rosa), átomo de nitrogênio (azul escuro), átomo de oxigênio (vermelho), átomo de cloro (verde), átomo de enxofre (amarelo).

Em particular, as três furocumarinas interagem através de duas ligações de hidrogênio com a Gln51. No caso da Imperatorina, as distâncias das ligações de hidrogênio são de 2,63 e 2,16Å. Estas distâncias são de 2,53 e 2,16Å para Isosaxalina e 2,21 e 2,68Å para Heraclenol. Todos eles também fazem contatos próximos com Phe16, Arg310, Ala48, entre outros. O bolso de ligação de NorA é descrito como sendo composto por Ile19, Ile23, Gln51, Met109, Ile136, Thr211, Arg310, Ile313, Thr314, Asn332, Ser333, Ser337, Asn340 e Phe341, e outros mais. Um diagrama de interação 2D Proteína-Ligante da Isosaxalina acoplada no sítio de ligação do modelo de NorA é dado como exemplo na Figura 11.

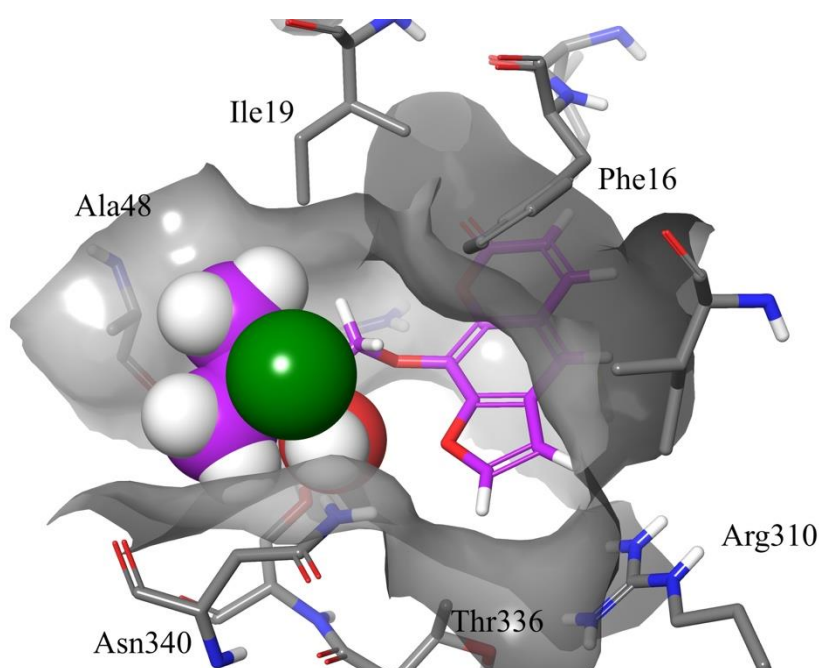
Figura 11 – Diagrama 2D de interação Proteína-Ligante da Isosaxalina ancorado no local de ligação do modelo da bomba de efluxo NorA



Freitas *et al.* (2021) mostraram que várias chalconas com capacidade de inibição de NorA se ligam a esta região do sítio de ligação, interagindo através de ligações de hidrogênio com a Gln51. Outras moléculas que foram descritas como inibidoras da bomba de efluxo NorA parecem se ligar a esta região específica do sítio de ligação (LEAL *et al.*, 2021; CUNHA XAVIER *et al.*, 2021), interagindo com os resíduos Glu222, Asn340, Phe16 e Phe140, entre outras. Estas furocumarinas não só se ligam a esta região de ligação, como também bloqueiam o canal de acesso a este local de ligação. Na Figura 12, o ligante Isosaxalina está acoplado ao modelo NorA, juntamente com as suas interações com os resíduos e uma porção de sua superfície molecular. Como o formato de visualização por

bastão não transmite corretamente o volume ocupado pelos átomos, a extremidade volumosa da cadeia lateral é exibida no formato de esferas, com o canal entre a Ala48 e a Asn340 bloqueado por esses átomos, impedindo o movimento através da bomba. Como esperado, a Isosaxalina parece ter maior inibição de efluxo do que o Heraclenol, devido ao tamanho e eletronegatividade do cloro (juntamente com os dois grupos metilo e uma hidroxila), que está de acordo com a diferença na CIM visto anteriormente (Tabela 1).

Figura 12 – Isosaxalina (rosa) acoplada no sítio de ligação do modelo da bomba de efluxo NorA juntamente com resíduos próximos e superfície molecular (cinza)



Legenda: Os átomos no final da cadeia lateral são exibidos como esferas de van der Waals. Átomo de nitrogênio (azul escuro), átomo de oxigênio (vermelho), átomo de cloro (verde), átomo de hidrogênio (branco).

4.1.2 Furocromonas

Quelina e Visnagina reduziram 2 vezes a CIM de Norfloxacin, Ciprofloxacin e Berberina. A CIM de EtBr foi reduzida pela Visnagina em 4 vezes e por Quelina apenas 2 vezes (Tabela 2). Não houve modulação para o antibiótico Pefloxacin, indicando que essas substâncias possivelmente atuam em bombas de efluxo. Essas furocromonas diferem uma da outra apenas na presença adicional de um grupo metóxi no C-8 em Quelina.

Tabela 2 – Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos antibióticos, do EtBr e da Berberina na ausência/presença de Quelina, Visnagina e Imperatorina contra a cepa *S. aureus* SA-1199B

Substâncias	CIM (µg/mL)				
	NOR	CIP	PEF	EtBr	BER
— ^a	64	16	16	64	> 512
+ Quelina	32 (2)^b	8 (2)	16	32 (2)	512 (2)
+ Visnagina	32 (2)	8 (2)	16	16 (4)	512 (2)
Imperatorina ¹	16 (4)	N/D	16	4 (16)	32 (32)

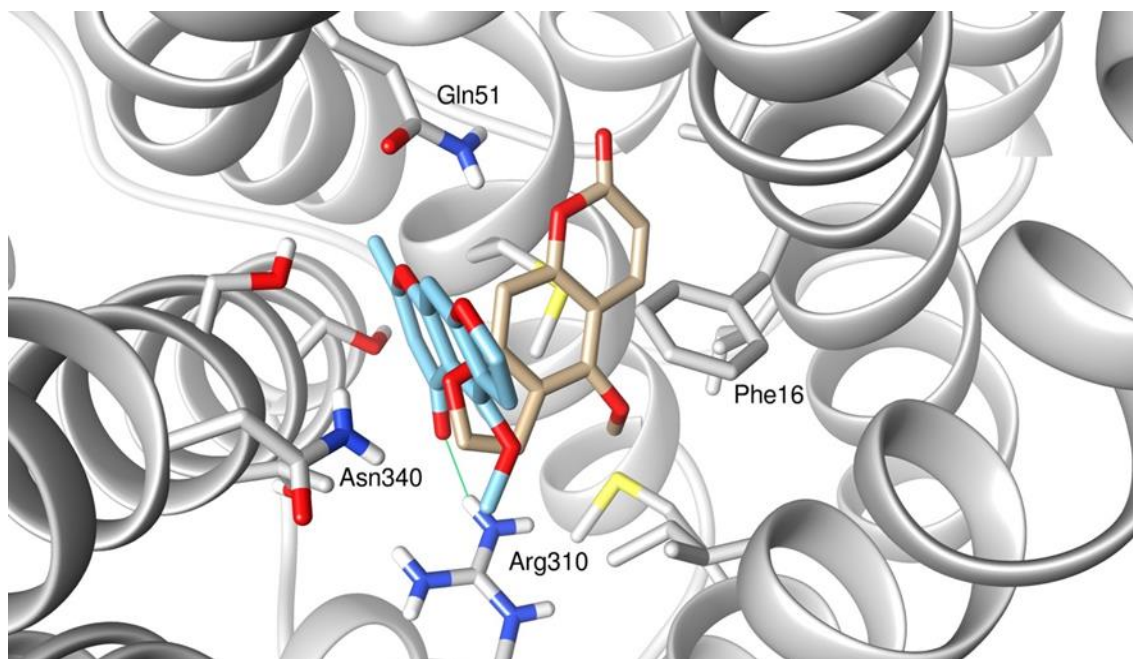
^aNorfloxacino (NOR), Ciprofloxacino (CIP), Pefloxacino (PEF), Brometo de etídio (EtBr) e Berberina (BER) sozinhos; Não determinado (N/D); ^b(Fator de modulação da CIM); ¹(Controle positivo: Madeiro et al., 2017).

Segundo Kulshrestha *et al.* (2017), a presença de grupos metóxi na posição 4 e 9 (posição 5 e 8 considerando a numeração a partir do oxigênio do anel pirona) e do grupo alquilaminometil na posição 6 de furocromonas, como é o caso das substâncias 9- e 6-Alquilaminometil furocromonas, sintetizadas a partir da Quelina e Visnagina, contribuiu para atividades gastroprotetoras de dano por etanol, como observado em ratos. Além disso, a presença de grupos metóxi e dimetóxi em furocromonas derivadas de Quelina e Visnagina também demonstraram melhores atividades anti-inflamatórias e analgésicas em testes animais (ABU-HASHEM; YOUSSEF, 2011).

A atividade de modulação observada em Quelina e Visnagina (Tabela 2) também pode ocorrer devido à natureza lipofílica que os próprios derivados de cromona apresentam, como foi relatado em um estudo que avaliou a atividade antimicrobiana da cromona Actasídeo (AMOUSSA *et al.*, 2016).

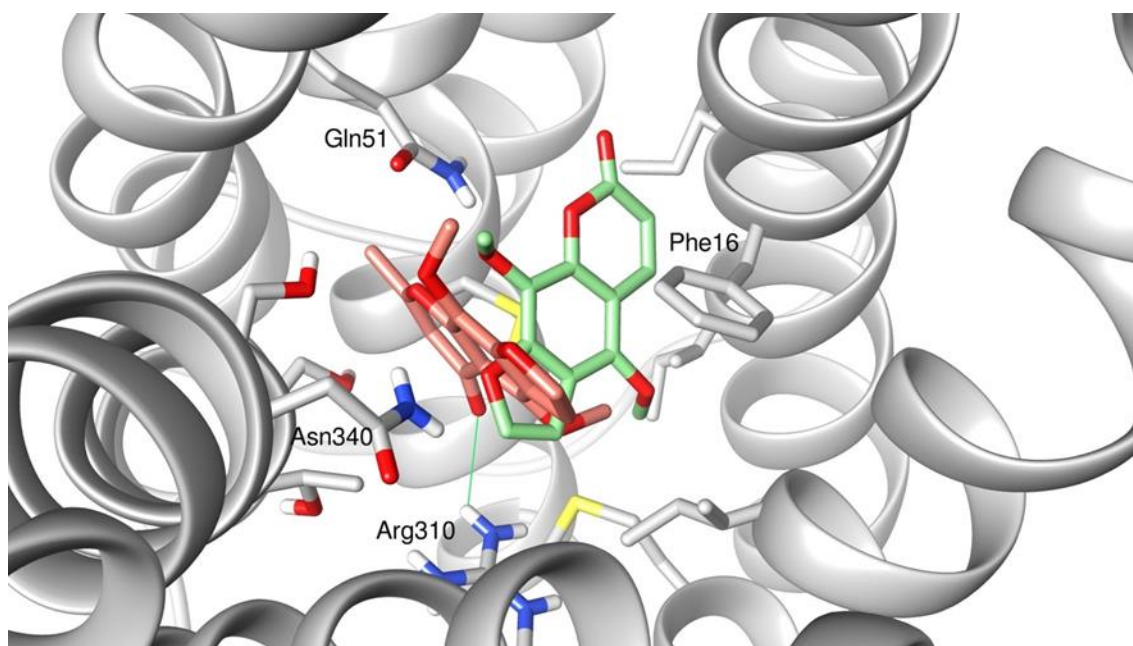
A fim de compreender as diferenças nas capacidades de atuar como inibidores de bomba de efluxo (EPI), foi conduzido um estudo de docagem molecular das furocromonas (Quelina e Visnagina) e suas furocumarinas análogas (Isopimpinellina e Bergapteno, respectivamente) que não modulam (MADEIRO *et al.*, 2017) contra o modelo da bomba de efluxo NorA. Foi observado que as duas furocromonas se posicionaram de maneiras semelhantes e interagiram com os mesmos resíduos. Em particular, ambos interagiram por meio de pontes de hidrogênio com a Arg310. Existem contatos próximos com Phe16, Asn340 e Gln51, presentes no bolso de ligação de NorA, como descrito anteriormente. Uma comparação do posicionamento de ligação da Visnagina vs Bergapteno e da Quelina vs Isopimpinellina é mostrada nas Figuras 13 e 14, respectivamente.

Figura 13 – Melhores posicionamentos da Visnagina e do Bergapteno no modelo NorA



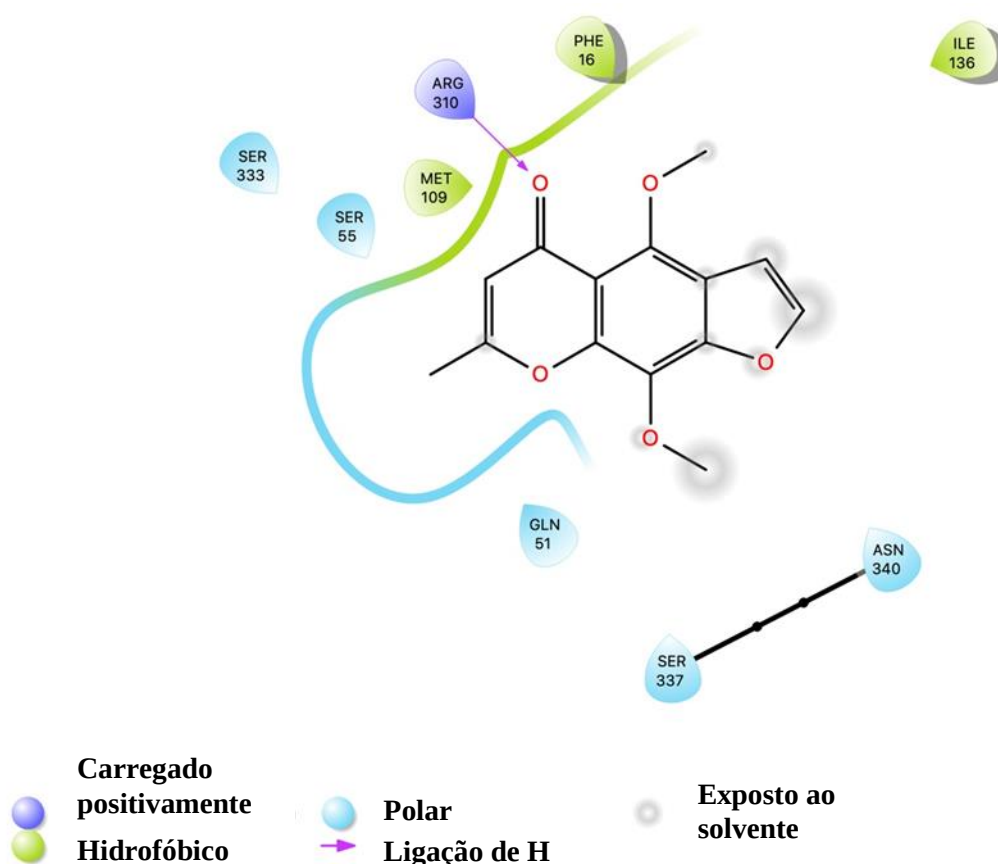
Legenda: Ponte de hidrogênio (linha verde) da Visnagina (azul claro) com a Arg310 no sítio de ligação do modelo NorA. Bergapteno (dourado) não faz ligações com NorA. Átomo de nitrogênio (azul escuro), átomo de oxigênio (vermelho), átomo de enxofre (amarelo).

Figura 14 – Melhores posicionamentos da Quelina e da Isopimpinellina no modelo NorA.



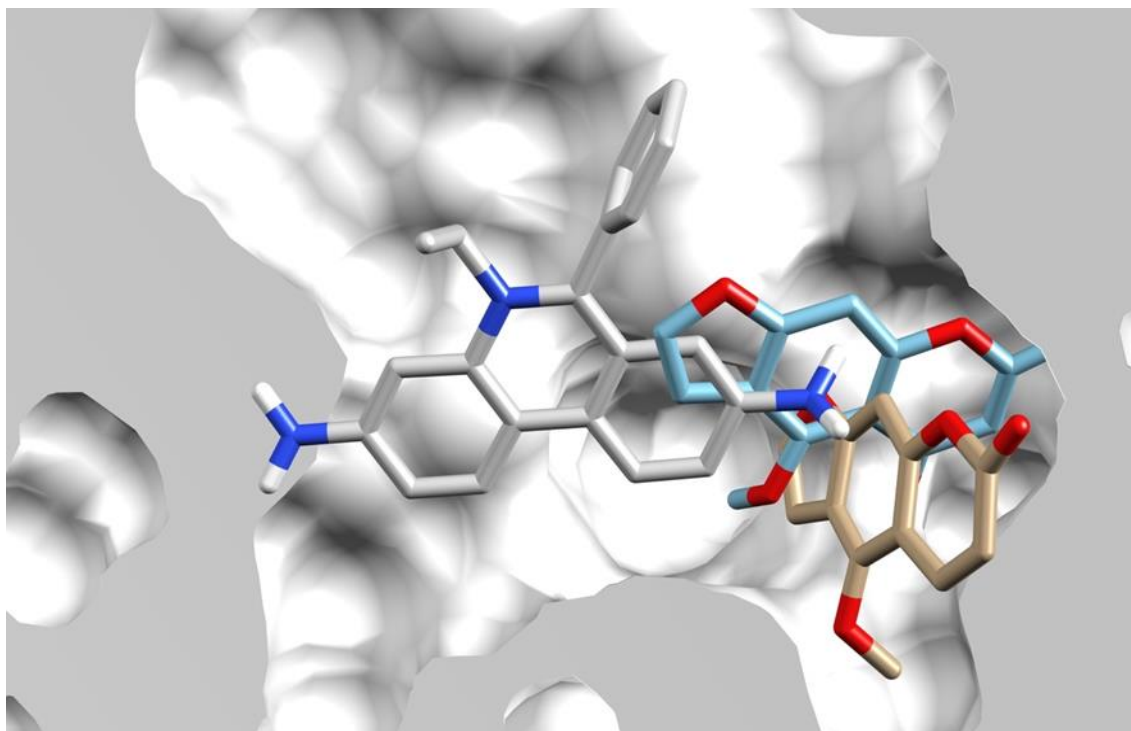
Legenda: Ponte de hidrogênio (linha verde) da Quelina (laranja) com a Arg310 no sítio de ligação do modelo NorA. Isopimpinellina (verde) não faz ligações com NorA. Átomo de nitrogênio (azul escuro), átomo de oxigênio (vermelho), átomo de enxofre (amarelo).

Figura 15 – Diagrama 2D de interação Proteína-Ligante da Quelina no sítio de ligação do modelo da bomba de efluxo NorA.



As furocromonas fizeram contato próximo com a maioria destes resíduos de aminoácidos, como pode ser visto no diagrama de interação Proteína-Ligante (Figura 15). Oliveira *et al.* (2020) descrevem uma chalcona com atividade inibidora de NorA que também interage com a Arg310 através de uma ponte de hidrogênio. Também já foi reportado que imidazolidinas inibidoras de NorA se ligam a essa mesma região do sítio de ligação e interagem com a Arg310 por meio de pontes de hidrogênio (FAILLACE *et al.*, 2021). A interação através de ligação de hidrogênio com Arg310 também foi relatada para hidrazonas de aminoguanidina (DANTAS *et al.*, 2018). Estes resultados sugerem que a Arg310 é um resíduo de aminoácido importante para o reconhecimento de substratos de NorA.

Figura 16 – Posicionamento de EtBr (branco), Visnagina (azul claro) e Bergapteno (dourado) no sítio de ligação do modelo da bomba de efluxo NorA



Legenda: Átomo de nitrogênio (azul escuro), átomo de oxigênio (vermelho).

As furocumarinas, por outro lado, não interagiram com a Arg310. Além disso, a ponte de hidrogênio formada com a Arg310 ancorou as furocromonas de uma forma que impediu a ligação do EtBr, como pode ser visto na Figura 16. Por outro lado, a postura de ligação das furocumarinas quase não se sobrepôs à posição do EtBr. É cabível, portanto, argumentar que as furocromonas poderiam atuar como inibidores da bomba de efluxo por competição em contraste com as furocumarinas análogas, corroborando os resultados experimentais apresentados anteriormente (Tabela 2).

Conclusões

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- As furocumarinas preniladas, Heraclenol e principalmente a Isosaxalina mostraram as melhores atividades de modulação da resistência a drogas, reduzindo a CIM dos antibióticos Norfloxacino e Ciprofloxacino (no caso do Heraclenol), de 4 a 8 vezes, contra a linhagem de *Staphylococcus aureus* SA-1199B. Enquanto as furocumarinas não preniladas (Psoraleno, Angelicina e 3-Carbetoxipsoraleno) reduziram 2 vezes a CIM desses antibióticos.
- As furocromonas Quelina e Visnagina estão sendo descritas pela primeira vez como moduladoras da resistência antibiótica, ambas reduziram a CIM dos antibióticos Norfloxacino e Ciprofloxacino 2 vezes, contra a linhagem *S. aureus* SA-1199B.
- Na docagem molecular foi possível observar que, teoricamente, a Isosaxalina demonstrou a maior capacidade de inibição da bomba NorA, pelo tamanho e eletronegatividade do cloro no grupo prenila dessa molécula, corroborando com o estudo microbiológico.
- Na docagem molecular as furocromonas parecem atuar como inibidores da bomba NorA por competição, em contraste com as suas furocumarinas análogas, corroborando os resultados microbiológicos obtidos.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABEYSEKERA, B. F; ABRAMOWSKI, Z; TOWERS, G. H. N. Genotoxicity of the natural furochromones, khellin and visnagin and the identification of a khellin-thymine photoadduct. **Photochemistry and Photobiology**, v. 38, n. 3, p. 311-315, 1983.
- ABU-HASHEM, A. A; EL-SHAZLY, M. Synthesis, reactions and biological activities of furochromones: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 90, p. 633-665, 2015.
- ABU-HASHEM, A. A; YOUSSEF, M. M. Synthesis of new visnagin and khellin furochromone pyrimidine derivatives and their anti-inflammatory and analgesic activity. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 1956-1972, 2011.
- ABULROB, A. N; SULLER, M. T; GUMBLETON, M; SIMONS, C; RUSSELL, A. D. Identification and biological evaluation of grapefruit oil components as potential novel efflux pump modulators in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterial strains. **Phytochemistry**, v. 65, n. 22, p. 3021-3027, 2004.
- ACHARYA, R; CHACKO, S; BOSE, P; LAPENNA, A; PATTANAYAK, S. P. Structure based multitargeted molecular docking analysis of selected furanocoumarins against breast cancer. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.
- AHMAD, I; MALAK, H. A; ABULREESH, H. H. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: A potential threat to public health. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 27, p. 101-111, 2021.
- ALAV, I; SUTTON, J. M; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 8, p. 2003-2020, 2018.
- AMOUSSA, A. M. O; BOURJOT, M; LAGNIKA, L; VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C; SANNI, A. Acthaside: a new chromone derivative from *Acacia ataxacantha* and its biological activities. **BMC Complementary And Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2016.
- ANDRADE, S. L. M; DE OLIVEIRA, A. B. M; LEAL, A. L. A. B; DE ALCÂNTARA OLIVEIRA, F. A; PORTELA, A. L; NETO, J. D. S. L; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P; KAATZ, G. W; DA ROCHA, C. Q; BARRETO, H. M. Antimicrobial activity and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by extract and isolated compounds from *Arrabidaea brachypoda*. **Microbial Pathogenesis**, v. 140, p. 103935, 2020.
- ANNUNZIATA, F; PINNA, C; DALLAVALLE, S; TAMBORINI, L; PINTO, A. 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.
- ANREP, G. V; BARSOUM, G. S; KENAWY, M. R; MISRAHY, G. *Ammi visnaga* in the treatment of the anginal syndrome. **British Heart Journal**, v. 8, n. 4, p. 171, 1946.
- ANREP, G. V; KENAWY, M. R; BARSOUM, G. S. The coronary vasodilator action of khellin. **American Heart Journal**, v. 37, n. 4, p. 531-542, 1949.

ARABZADEH, A; BATHAIE, S. Z; FARSAM, H; AMANLOU, M; SABOURY, A. A; SHOCKRAVI, A; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Studies on mechanism of 8-methoxypsoralen–DNA interaction in the dark. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 237, n. 1-2, p. 47-55, 2002.

ARAUJO, R. S. A; BARBOSA-FILHO, J. M; SCOTTI, M. T; SCOTTI, L; CRUZ, M. D; FALCÃO-SILVA, V. S; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P; MENDONÇA-JUNIOR, F. J. Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* with coumarin derivatives. **Scientifica**, v. 2016, 2016.

ASHWOOD-SMITH, M. J. Frameshift mutations in bacteria produced in the dark by several furocoumarins; absence of activity of 4,5',8-trimethylpsoralen. **Mutation Research**, v. 58, p. 23-27, 1978.

ASTOLFI, A; FELICETTI, T; IRACI, N; MANFRONI, G; MASSARI, S; PIETRELLA, D; CECCHETTI, V. Pharmacophore-based repositioning of approved drugs as novel *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 1598-1604, 2017.

AVERBERCK, D. Recent advances in psoralen phototoxicity mechanism. **Photochemistry and Photobiology**, n. 50, p. 859-882, 1989.

AYAZ, M; SUBHAN, F; AHMED, J; KHAN, A. U; ULLAH, F; ULLAH, I; ALI, G; SYED, N. I. H; HUSSAIN, S. Sertraline enhances the activity of antimicrobial agents against pathogens of clinical relevance. **Journal of Biological Research**, v. 22, n. 1, p. 1-8, 2015.

BAMBEKE, V. F; LEE, V. J. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 1, n. 2, p. 157-175, 2006.

BAMBEKE, V. F; PLÉSIAT, G. P; PECHÈRE, J. C; TULKENS, P. M. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 1055–1065. 2003.

BARRETO, H. M; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. Protective effect of furocoumarins against 254-nm ultraviolet in *Staphylococcus aureus*. **Current Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 40-44, 2006.

BARROS, S. M. D; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. Decreased survival of UV-irradiated *Staphylococcus aureus* in the presence of 8-methoxypsoralen in the post-irradiation plating medium. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 66, n. 2, p. 153-156, 2002.

BARROS, N. D. M; SBROGLIO, L. L; BUFFARA, M. D. O; BAKA, J. L. C; PESSOA, A. D. S; AZULAY-ABULAFIA, L. Phototherapy. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 96, p. 397-407, 2021.

BAYM, M; STONE, L. K; KISHONY, R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. **Science**, v. 351, n. 6268, p. aad3292, 2016.

BETHEA, D; FULLMER, B; SYED, S; SELTZER, G; TIANO, J; RISCHKO, C; GILLESPIE, L; BROWN, D; GASPARRO, F. P. Psoralen photobiology and

photochemotherapy: 50 years of science and medicine. **Journal of Dermatological Science**, v. 19, n. 2, p. 78-88, 1999.

BHASKAR, B. V; BABU, T. M. C; REDDY, N. V; RAJENDRA, W. Homology modeling, molecular dynamics, and virtual screening of NorA efflux pump inhibitors of *Staphylococcus aureus*. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 3237, 2016.

BLAIR, J; WEBBER, M. A; BAYLAY, A. J; OGBOLU, D. O; PIDDOCK, L. J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

BORDIN, F; CARLASSARE, F; BUSULINI, L; BACCICHETTI, F. Furocoumarin sensitization induces DNA-protein cross-links. **Photochemistry and Photobiology**, v. 58, n. 1, p. 133-136, 1993.

BORGES, M. L; LATTERINI, L; ELISEI, F; SILVA, P. F; BORGES, R; BECKER, R. S; MAÇANITA, A. L. Photophysical properties and photobiological activity of the furanochromones visnagin and khellin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 67, n. 2, p. 184-191, 1998.

BRIDGES, B. A. Genetic Damage Induced by 254nm Ultraviolet Light in *Escherichia coli*: 8-methoxypsoralen as Protective Agent and Repair Inhibitor. **Photochemistry and Photobiology**, v. 14, n. 5, p. 659-662, 1971.

BRIDGES, B. A; MOTTERSHEAD, R. P. Inactivation of *Escherichia coli* by near-ultraviolet light and 8-methoxypsoralen: different responses of strains B/r and K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 139, n. 2, p. 454-459, 1979.

BRIDGES, B. A; MOTTERSHEAD, R. P. Frameshift mutagenesis in bacteria by 8-methoxypsoralen (methoxalen) in the dark. **Mutation Research**, v. 44, p. 305-312, 1977.

CASTANHEIRO, R. A; SILVA, A; CAMPOS, N. A; NASCIMENTO, M. S; PINTO, M. M. Antitumor activity of some prenylated xanthenes. **Pharmaceuticals**, v. 2, n. 2, p. 33-43, 2009.

CAVALCANTI, S. M; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P. Cure of prophage in *Staphylococcus aureus* by furocoumarin photoadditions. **Microbios**, v. 81, n. 327, p. 85-91, 1995.

CHEN, V. B; ARENDALL, W. B; HEADD, J. J; KEEDY, D. A; IMMORMINO, R. M; KAPRAL, G. J; RICHARDSON, D. C. *MolProbity*: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 1, p. 12-21, 2010.

CIMINO, G. D; GAMPER, H. B; ISAACS, S. T; HEARST, J. E. Psoralens as photoactive probes of nucleic acid structure and function: Organic Chemistry, photochemistry and biochemistry. **Annual Review of Biochemistry**, v. 54, p.1151-1193, 1985.

CLARKE, C. H; WADE, M. T. Evidence that caffeine, 8-methoxypsoralen and steroidal diamines are frameshift mutagens for *E. coli*, K-12. **Mutation Research**, v. 28, p. 123-125, 1975.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

COSTA, S. S; VIVEIROS, M; ROSATO, A. E; MELO-CRISTINO, J; COUTO, I. Impact of efflux in the development of multidrug resistance phenotypes in *Staphylococcus aureus*. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 232, 2015.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-582. 1999.

CRUZ, R. P; SAMPAIO DE FREITAS, T; DO SOCORRO COSTA, M; LUCAS DOS SANTOS, A. T; FERREIRA CAMPINA, F; PEREIRA, R. L. S; ALMEIDA BEZERRA, J. W; QUINTAS-JÚNIOR, L. J; DE SOUZA ARAÚJO, A. A; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P; IRITI, M; VARONI MARIA E; ALENCAR DE MENEZES, I. R; COUTINHO, H. D. M; BEZERRA MORAIS-BRAGA, M. F. Effect of α -bisabolol and its β -cyclodextrin complex as TetK and NorA efflux pump inhibitors in *Staphylococcus aureus* strains. **Antibiotics**, v. 9, n. 1, p. 28, 2020.

CUNHA XAVIER, J; ALMEIDA-NETO, F. W; ROCHA, J. E; FREITAS, T. S; FREITAS, P. R; ARAUJO, A. C; SILVA, P. T; NOGUEIRA, C. E; BANDEIRA, P. N; MARINHO, M. M.; MARINHO, E. S; KUMAR, N; BARRETO, A. C. H; COUTINHO, H. D. M; JULIÃO, M. S. S; DOS SANTOS, H. S; TEIXEIRA, A. M. R. Spectroscopic analysis by NMR, FT-Raman, ATR-FTIR, and UV-Vis, evaluation of antimicrobial activity, and in silico studies of chalcones derived from 2-hydroxyacetophenone. **Journal of Molecular Structure**, v. 1241, p. 130647, 2021.

DANTAS, N; DE AQUINO, T. M; DE ARAÚJO-JÚNIOR, J. X; DA SILVA-JÚNIOR, E; GOMES, E. A; GOMES, A. A. S; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P; JUNIOR, F. J. B. M. Aminoguanidine hydrazones (AGH's) as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that overexpress NorA efflux pump. **Chemico-Biological Interactions**, v. 280, p. 8-14, 2018.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 114-122, 2003.

DELCOUR, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 5, p. 808-816, 2009.

DEMARCO, C. E; CUSHING, L. A; FREMPONG-MANSO, E; SEO, S. M; JARAVAZA, T. A; KAATZ, G. W. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3235-3239, 2007.

DINIZ-SILVA, H. T; DA SILVA CIRINO, I. C; DOS SANTOS FALCÃO-SILVA, V; MAGNANI, M; DE SOUZA, E. L; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. Tannic acid as a potential modulator of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* overexpressing *norA*. **Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 319-322, 2016.

DINIZ-SILVA, H. T; MAGNANI, M; DE SIQUEIRA, S; DE SOUZA, E. L; DE SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. Fruit flavonoids as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus*

aureus that overexpresses *norA*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 85, p. 324-326, 2017.

DODDS, D. R. Antibiotic resistance: A current epilogue. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 139-146, 2017.

EDWARDS, A. M; HOWELL, J. B. L. The chromones: history, chemistry and clinical development. A tribute to the work of Dr REC Altounyan. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, n. 6, p. 756-774, 2000.

ELGAZWY, A. S. S. H; EDREES, M. M; ISMAIL, N. S. Molecular modeling study bioactive natural product of khellin analogues as a novel potential pharmacophore of EGFR inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1171-1181, 2013.

EPIFANO, F; GENOVESE, S; MENGHINI, L; CURINI, M. Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. **Phytochemistry**, v. 68, n. 7, p. 939-953, 2007.

ERST, A. S; CHERNONOSOV, A. A; PETROVA, N. V; KULIKOVSKIY, M. S; MALTSEVA, S. Y; WANG, W; KOSTIKOVA, V. A. Investigation of Chemical Constituents of *Eranthis longistipitata* (Ranunculaceae): Coumarins and Furochromones. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 1, p. 406, 2021.

FAILLACE, M. S; LEAL, A. L. A. B; DE OLIVEIRA ALCANTARA, F. A; FERREIRA, J. H; DE SIQUEIRA-JUNIOR, J. P; NOGUEIRA, C. E. S; BARRETO, H. M; PELAEZ, W. J. Inhibition of the NorA efflux pump of *S. aureus* by (Z)-5-(4-Fluorobenzylidene)-Imidazolidines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 31, p. 127670, 2021.

FALCÃO-SILVA, V. S; SILVA, D. A; SOUZA, M. F. V; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P. Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by a kaempferol glycoside. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1367-1370, 2009.

FELICETTI, T; CANNALIRE, R; PIETRELLA, D; LATACZ, G; LUBELSKA, A; MANFRONI, G; SABATINI, S. 2-Phenylquinoline *S. aureus* NorA efflux pump inhibitors: evaluation of the importance of methoxy group introduction. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 17, p. 7827-7848, 2018.

FENG, D; ZHANG, A; YANG, Y; YANG, P. Coumarin-containing hybrids and their antibacterial activities. **Archive of Pharmacy**, v. 353, n. 6, p. 1900380, 2020.

FIGUEIREDO, C. S; MENEZES SILVA, S. M. P. D; ABREU, L. S; DA SILVA, E. F; DA SILVA, M. S; CAVALCANTI DE MIRANDA, G. E; DE O. COSTA, V. C; LE HYARIC, M; SIQUEIRA JUNIOR, J. P; BARBOSA FILHO, J. M; TAVARES, J. F. Dolastane diterpenes from *Canistrocarpus cervicornis* and their effects in modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. **Natural Product Research**, v. 33, n. 22, p. 3231-3239, 2019.

FIORITO, S; EPIFANO, F; PREZIUSO, F; TADDEO, V. A; GENOVESE, S. Biomolecular targets of oxyprenylated phenylpropanoids and polyketides. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, v. 108, p. 143-205, 2019.

FLUIT, A. C; VISSER, M. R; SCHMITZ, F. J. Molecular detection of antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 836-871, 2001.

FREITAS, T. S; XAVIER, J. C; PEREIRA, R. L; ROCHA, J. E; CAMPINA, F. F; ARAÚJO NETO, J. B; SILVA, M. M; BARBOSA, C. R; MARINHO, E. S; NOGUEIRA, C. E; SANTOS, H. S; COUTINHO, H. D. M; TEIXEIRA, A. M. R. 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.

FREMPONG-MANSO, E; RAYGADA, J. L; DEMARCO, C. E; SEO, S. M; KAATZ, G. W. Inability of a reserpine-based screen to identify strains overexpressing efflux pump genes in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 4, p. 360-363, 2009.

GHOSH, S; SAHA, I; DEY, A; LAHIRI, D; NAG, M; SARKAR, T; RAY, R. R. Natural compounds underpinning the genetic regulation of biofilm formation: An overview. **South African Journal of Botany**, 2021.

GIA, O; MAGNO, S. M; CARBESI, A; COLONNA, F. P; PALUMBO, M. Sequence specificity of psoralen photobinding to DNA: A quantitative approach. **Biochemistry**, v. 31, n. 47, p. 11818-11822, 1992.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**, v. 21, n. 2, p. 263-277, 2004.

GIBBONS, S. Phytochemicals for Bacterial Resistance – Strengths, Weaknesses and Opportunities. **Planta Medica**, v.74, p.597-602. 2008.

GIBBONS, S. Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. **Phytochemistry Reviews**, v. 4, n. 1, p. 63-78, 2005.

GONZÁLEZ-BELLO, C. Antibiotic adjuvants–A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 18, p. 4221-4228, 2017.

GOMES, R. A; RAMIREZ, R. R; MACIEL, J. K. D. S; AGRA, M. D. F; SOUZA, M. D. F. V. D; FALCÃO-SILVA, V. S; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P. Phenolic compounds from *Sidastrum micranthum* (A. St.-Hil.) fryxell and evaluation of acacetin and 7, 4'-Di-O-methylisoscutearein as motulator of bacterial drug resistance. **Química Nova**, v. 34, n. 8, p. 1385-1388, 2011.

GOULD, K. Antibiotics: from prehistory to the present day. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 3, p. 572-575, 2016.

GUNTHER, E. J; HAVRE, P. A; GASPARRO, F. P; GLAZER, P. M. Triplex-Mediated, in vitro Targeting of Psoralen Photoadducts within the Genome of a Transgenic Mouse. **Photochemistry and Photobiology**, v. 63, n. 2, p. 207-212, 1996.

HADERA, M; MEHARI, S; BASHA, N. S; AMHA, N. D; BERHANE, Y. Study on antimicrobial potential of selected non-antibiotics and its interaction with conventional antibiotics. **Pharmaceutical and Biosciences Journal**, p. 01-07, 2018.

HANIF, E; HASSAN, S. A. Evaluation of antibiotic resistance pattern in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 4, p. 1749-1753, 2019.

HASS, B. S; WEBB, R. B. 8-methoxypsoralen effects on survival and repair of *Escherichia coli* after ultraviolet irradiation: Action spectra. **Radiation Research**, v. 80, n. 1, p. 170-185, 1979.

HIRAI, K; AOYAMA, H; IRIKURA, T; IYOBE, S; MITSUHASHI, S. Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 29, n. 3, p. 535-538, 1986.

HSIEH, P. C; SIEGEL, S. A; ROGERS, B; DAVIS, D; LEWIS, K. Bacteria lacking a multidrug pump: a sensitive tool for drug discovery. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 12, p. 6602-6606, 1998.

HUDSON, J. B; TOWERS, G. H. N. Therapeutic potential of plant photosensitizers. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 49, n. 3, p. 181-222, 1991.

IGALI, S; BRIDGES, B. A; ASHWOOD-SMITH, M. J; SCOTT, B. R. Mutagenesis in *Escherichia coli* IV. Photosensitization to near ultraviolet light by 8-methoxypsoralen. **Mutation Research**, v. 9, n. 1, p. 21-30, 1970.

JANG, S. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* and their clinical implications. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 1-8, 2016.

JOSHI, P; SINGH, S; WANI, A; SHARMA, S; JAIN, S. K; SINGH, B; VISHWAKARMA, R. A. Osthonol and curcumin as inhibitors of human Pgp and multidrug efflux pumps of *Staphylococcus aureus*: reversing the resistance against frontline antibacterial drugs. **Medicinal Chemistry Communications**, v. 5, n. 10, p. 1540-1547, 2014.

KAATZ, G. W; SEO, S. M. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 2650-2655. 1995.

KAATZ, G. W; SEO, S. M. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 12, p. 2733-2737, 1997.

KAATZ, G. W; SEO, S. M; RUBLE, C. A. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 1086-1094. 1993.

KADAM, S; SHAI, S; SHAHANE, A; KAUSHIK, K. S. Recent advances in non-conventional antimicrobial approaches for chronic wound biofilms: have we found the 'chink in the armor'?. **Biomedicines**, v. 7, n. 2, p. 35, 2019.

KERI, R. S; BUDAGUMPI, S; PAI, R. K; BALAKRISHNA, R. G. Chromones as a privileged scaffold in drug discovery: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 78, p. 340-374, 2014.

KITAMURA, N; KOHTANI, S; NAKAGAKI, R. Molecular aspects of furocoumarin reactions: Photophysics, photochemistry, photobiology, and strural analysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 6, p. 168-185, 2005.

KULSHRESTHA, A; RUPANWAL, R; SINGH, N; SATPUTE, S; PANHEKAR, D; PANDEY, J. Therapeutic Potential of Chromones. **International Journal of Chemical Science**, v. 15, n. 4, p. 1-14, 2017.

KUMAR, A; SCHWEIZER, H. P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1486-1513. 2005.

LAKHUNDI, S; ZHANG, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. e00020-18, 2018.

LAMUT, A; PETERLIN MAŠIČ, L; KIKELJ, D; TOMAŠIČ, T. Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, n. 6, p. 2460-2504, 2019.

LASKOWSKI, R. A; MACARTHUR, M. W; MOSS, D. S; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.

LEAL, A. L. A. B; SILVA, P. T; ROCHA, M. N; MARINHO, E. M; MARINHO, E. S; MARINHO, M. M; BANDEIRA, P. N; NOGUEIRA, C. E. S; BARRETO, H. M; TEIXEIRA, A. M. R; SANTOS, H. S. Potentiating activity of Norfloxacin by synthetic chalcones against NorA overproducing *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 155, p. 104894, 2021.

LECOINTE, P. Induction of the SFIA SOS repair function by psoralens in the dark. **Mutation Research**, v. 131, p. 111-113, 1984.

LEWIS, K. In Search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 3, p. 247-254. 2001.

LI, J; YIN, P; GONG, P; LV, A; ZHANG, Z; LIU, F. 8-Methoxypsoralen protects bovine mammary epithelial cells against lipopolysaccharide-induced inflammatory injury via suppressing JAK/STAT and NF- κ B pathway. **Microbiology and Immunology**, v. 63, n. 10, p. 427-437, 2019.

LI, J; FU, A; ZHANG, L. An overview of scoring functions used for protein–ligand interactions in molecular docking. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, v. 11, n. 2, p. 320–328, 2019.

LOPES, L. A. A; DOS SANTOS RODRIGUES, J. B; MAGNANI, M., DE SOUZA, E. L; DE SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. Inhibitory effects of flavonoids on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* that overexpresses efflux protein genes. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 193-197, 2017.

MADEIRO, S. A; BORGES, N. H; SOUTO, A. L; DE FIGUEIREDO, P. T; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P; TAVARES, J. F. Modulation of the antibiotic activity against multidrug

resistant strains of coumarins isolated from Rutaceae species. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 151-154, 2017.

MAHEY, N; TAMBAT, R; CHANDAL, N; VERMA, D. K; THAKUR, K. G; NANDANWAR, H. Repurposing approved drugs as fluoroquinolone potentiators to overcome efflux pump resistance in *Staphylococcus aureus*. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 3, p. e00951-21, 2021.

MAIA, G. L. D. A; FALCÃO-SILVA, V. D. S; AQUINO, P. G. V; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. D; TAVARES, J. F; DA SILVA, M. S; RODRIGUES, L. C; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P; BARBOSA-FILHO, J. M. Flavonoids from *Praxelis clematidea* RM King and Robinson modulate bacterial drug resistance. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 4828-4835, 2011.

MANCUSO, G; MIDIRI, A; GERACE, E; BIONDO, C. Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1310, 2021.

McMURRY, L; JR. PETRUCCI, R. E; LEVY, S. B. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, p. 3974-3977. 1980.

MENEZES-SILVA, S; LIRA, N. S; DO NASCIMENTO, Y. M; MEIRELES, R. A. R; DA SILVA DIAS, C; TAVARES, J. F; DE SIQUEIRA-JUNIOR, J. P. Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by 132-hydroxy-(132-R/S)-pheophytin isolated from *Sargassum polyceratum*. **Microbial Pathogenesis**, v. 141, p. 104034, 2020.

MELOUGH, M. M; CHO, E; CHUN, O. K. Furocoumarins: A review of biochemical activities, dietary sources and intake, and potential health risks. **Food and Chemical Toxicology**, v. 113, p. 99-107, 2018.

MOL, N. J; VAN HENEGOUWEN, G. B; MOHN, G. R; GLICKMAN, B.W; VAN KLEEF, P. M. On the involvement of singlet oxygen in mutation induction by 8-methoxypsoralen and UVA irradiation in *Escherichia coli* K-12. **Mutation Research**, v. 82, n. 1, p. 23-30, 1981.

MONTEIRO, K. L; DE AQUINO, T. M; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B. An update on *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 24, p. 2168-2185, 2020.

MORRIS, G. M; GOODSSELL, D. S; HALLIDAY, R. S; HUEY, R; HART, W. E; BELEW, R. K; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.

NAZHAND, A; DURAZZO A; LUCARINI M; ROMANO R; MOBILIA MA; IZZO AA; SANTINI A. Human health-related properties of chromones: an overview. **Natural Product Research**, v. 34, n. 1, p. 137-152, 2020.

NEYFAKH, A. A; BORSCH, C. M; KAATZ, G. W. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 1, p. 128-129, 1993.

OGINSKY, E. L; GREEN, G. S; GRIFFITH, D. G; FOWLKS, W. L. Lethal photosensitization of bacteria with 8-methoxypsoralen to long wave length ultraviolet radiation. **Journal of Bacteriology**, v. 78, n. 6, p. 821-833, 1959.

OLIVEIRA, M. M; SANTOS, H. S; COUTINHO, H. D; BANDEIRA, P. N; DA SILVA, P. T; FREITAS, T. S; NOGUEIRA, C. E. Spectroscopic characterization and efflux pump modulation of a thiophene curcumin derivative. **Journal of Molecular Structure**, v. 1215, p. 128291, 2020.

OLIVEIRA-TINTINO, M. C. D; TINTINO, S. R; LIMAVERDE, P. W; FIGUEREDO, F. G; CAMPINA, F. F; DA CUNHA, F. A; DA COSTA, R. H. S; PEREIRA, P. S; LIMA, L. F; DE MATOS, Y. M. L. S; COUTINHO, H. D. M; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P; BALBINO, V. Q; DA SILVA, T. G. Inhibition of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L. and α -terpinene on the NorA efflux-pump of *Staphylococcus aureus*. **Food Chemistry**, v. 262, p. 72-77, 2018.

OMAR, S; ERIKSSON, L. A. Computational study of khellin excited states and photobinding to DNA. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 8, n. 8, p. 1179-1186, 2009.

OU, C. N; TSAI, C. H; TAPLEY JR, K. J; SONG, P. S. Photobinding of 8-methoxypsoralen and 5, 7-dimethoxycoumarin to DNA and its effect on template activity. **Biochemistry**, v. 17, n. 6, p. 1047-1053, 1978.

PALU, G; PALUMBO, M; CUSINATO, R; MELONI, G. A; MAGNOI, S. M. Antiviral properties of psoralen derivatives: a biological and physico-chemical investigation. **Biochemical Pharmacology**, v. 33, n. 21, p. 3451-3456, 1984.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, E; AGUILERA, J; FIGUEROA, F. L. Tissular localization of coumarins in the green alga *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser: a photoprotective role? **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 1093-1100. 2003.

PIDDOCK, L. J; JIN, Y. F; GRIGGS, D. J. Effect of hydrophobicity and molecular mass on the accumulation of fluoroquinolones by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 3, p. 261-270, 2001.

PIDDOCK, L. J. V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacterial. **Clinical Microbiology Review**, v. 19, p. 382-402. 2006.

PINTO, M. M. M; CASTANHEIRO, R. Natural prenylated xanthenes: chemistry and biological activities. **Natural Products: Chemistry, Biochemistry and Pharmacology**, p. 520-675, 2009.

PINZI, L; RASTELLI, G. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4331, 2019.

POOLE, K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 55-64. 2002.

QUINTO, I; AVERBECK, D; MOUSTACCHI, E; HRISOHO, Z; MORON, J. Frameshift mutagenicity in *Salmonella typhimurium* of furocoumarins in the dark. **Mutation Research**, v. 136, n. 1, p. 49-54, 1984.

REN, Y; SONG, X; TAN, L; GUO, C; WANG, M; LIU, H; PENG, C. A review of the pharmacological properties of psoralen. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 571535, 2020.

REZENDE-JÚNIOR, L. M; ANDRADE, L. M. S; LEAL, A. L. A. B; MESQUITA, A. B. S; SANTOS, A. L. P. A; LIMA-NETO, J. S; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P; NOGUEIRA, C. E. S; KAATZ, G. W; COUTINHO, H. D. M; MARTINS, N; ROCHA, C. Q; BARRETO, H. M. Chalcones Isolated from *Arrabidaea brachypoda* flowers as inhibitors of NorA and MepA multidrug efflux pumps of *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 351, 2020

RIBEIRO, A. M. B; DE SOUSA, J. N; COSTA, L. M; DE ALCÂNTARA OLIVEIRA, F. A; DOS SANTOS, R. C; NUNES, A. S. S; OLIVEIRA DA SILVA, W; CORDEIRO, P. J. M; LIMA NETO, J. S; SIQUEIRA- JÚNIOR, J. P; KAATZ, G. W; BARRETO, H. M; DE OLIVEIRA, A. P. Antimicrobial activity of *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by Phyllanthin. **Microbial Pathogenesis**, v. 130, p. 242-246, 2019.

RIBEIRO, C. V. C; KAPLAN, M. A. C. Tendências evolutivas de Famílias produtoras de cumarinas em angiospermae. **Química Nova**, v. 25, p. 533-538. 2002.

RONTÓ, G; TÓTH, K; GÁSPÁR, S; CZIK, G. Phage nucleoprotein-psoralen interaction: quantitative characterization of dark and photoreactions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 12, p. 9-27, 1992.

ROSSITER, S. E; FLETCHER, M. H; WUEST, W. M. Natural products as platforms to overcome antibiotic resistance. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 19, p. 12415-12474, 2017.

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**, v. 90, p. 140-150, 2013.

SABATINI, S; GOSETTO, F; SERRITELLA, S; MANFRONI, G; TABARRINI, O; IRACI, N; CECCHETTI, V. Pyrazolo [4, 3-c][1, 2] benzothiazines 5, 5-dioxide: a promising new class of *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 3568-3572, 2012.

SANTANA, L; URIARTE, E; ROLEIRA, F; MILHAZES, N; BORGES, F. Furocoumarins in medicinal chemistry. Synthesis, natural occurrence and biological activity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 24, p. 3239-3261, 2004.

SCHIMMER, O. Studies on the photobiological activity of two naturally occurring furochromones, visnagin and khellin, in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Mutagenesis**, v. 12, n. 3, p. 141-145, 1997.

SCHMITT, I. M; CHIMENTI, S; GASPARRO, F. P. Psoralen-protein photochemistry—a forgotten field. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 27, n. 2, p. 101-107, 1995.

SCHINDLER, B. D; JACINTO, P; KAATZ, G. W. Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: current status of potentiating existing antibiotics. **Future Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 491-507, 2013.

SCOTT, B. R; PATHAK, M. A; MOHN, G. R. Molecular and genetic basis of furocoumarin reactions. **Mutation Research**, v. 39, p. 29-34, 1976.

SEUKEP, A. J; KUETE, V; NAHAR, L; SARKER, S. D; GUO, M. Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n. 4, p. 277-290, 2020.

SHARIFI-RAD, J; CRUZ-MARTINS, N; LÓPEZ-JORNET, P; LOPEZ, E. P. F; HARUN, N; YESKALIYEVA, B; CHO, W. C. Natural Coumarins: Exploring the Pharmacological Complexity and Underlying Molecular Mechanisms. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.

SHARMA, A; GUPTA, V. K; PATHANIA, R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 149, n. 2, p. 129, 2019.

SHARMA, S; KUMAR S; CHAND K; KATHURIA A; GUPTA A; JAIN R. An update on natural occurrence and biological activity of chromones. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 25, p. 3825-3852, 2011.

SHRIRAM, V; KHARE, T; BHAGWAT, R; SHUKLA, R; KUMAR, V. Inhibiting bacterial drug efflux pumps via phyto-therapeutics to combat threatening antimicrobial resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2990, 2018.

SILVA, A. K. F; DOS REIS, A. C; PINHEIRO, E. E. A; DE SOUSA, J. N; DE ALCÂNTARA OLIVEIRA, F. A; MOURA, A. K. S; DE SOUZA, L. N; DAS GRAÇAS, A. M. L. C; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P; KAATZ, G. W; BARRETO, H. M. Modulation of the drug resistance by *Platonia insignis* Mart. extract, ethyl acetate fraction and Morelloflavone/Volkensiflavone (Biflavonoids) in *Staphylococcus aureus* strains overexpressing efflux pump genes. **Current Drug Metabolism**, v. 22, n. 2, p. 114-122, 2021.

SILVA, E. B; BARBOSA, I. J; BARRETO, H. M; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. Modulation of the UVB-induced lethality by furocoumarins in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 130, p. 260-263, 2014.

SILVA, S. W. C; MONÇÃO, N. B. N; ARAÚJO, B. Q; ARCANJO, D. D. R; FERREIRA, J. H. L; LIMA NETO, J. S; CITÓ, A. M. G. L; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P; KAATZ, G. W; BARRETO, H. M. Antimicrobial activity of *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth and its interaction with antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains overexpressing efflux pump genes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 57-63, 2019.

SILVEIRA, G. P; NOME, F; GESSER, J. C; SÁ, M. M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, p. 844-855, 2006.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. P; AZEVEDO, J. L. Induction of prophage by 8-methoxypsoralen plus near UV light in *Staphylococcus aureus*. **Revista Microbiol**, v. 14, p. 16-20, 1983.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. P. D; LEMOS, M. V. F; AZEVEDO, J. L. D. Elimination of a *Staphylococcus aureus* plasmid by 8-methoxypsoralen plus near UV light. **Revista Microbiol**, v. 19, p. 40-1, 1988.

SIQUEIRA, S; FALCÃO-SILVA, V. S; AGRA, M. F, DARIVA, C; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P; FONSECA, M. J. V. Biological activities of *Solanum paludosum* Moric. extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 58, n. 3, p. 391-397, 2011.

SMITH, E. C; KAATZ, G. W; SEO, S. M; WAREHAM, N; WILLIAMSON, E. M; GIBBONS, S. The phenolic diterpene totarol inhibits multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4480-4483, 2007.

SOUSA, J. N; OLIVEIRA, A. B. M; SILVA, A. K. F; SOUSA, L. M. S; ROCHA, M. C. F; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P; KAATZ, G. W; ALMEIDA, J. R. G. S; SOUZA, J. S. N; BARRETO, H. M. Modulation of the resistance to norfloxacin in *Staphylococcus aureus* by *Bauhinia forficata* link. **Natural Product Research**, v. 35, n. 4, p. 681-685, 2021.

SPENGLER, G; KINCSES, A; GAJDÁCS, M; AMARAL, L. New roads leading to old destinations: efflux pumps as targets to reverse multidrug resistance in bacteria. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 468, 2017.

SRINIVAS, N; SANDEEP, K. S; ANUSHA, Y; DEVENDRA, B. N. In vitro cytotoxic evaluation and detoxification of monocrotaline (Mct) alkaloid: an in silico approach. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 2, n. 3, p. 20-29, 2014.

STAVRI, M; GIBBONS, S. The antimycobacterial constituents of dill (*Anethum graveolens*). **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 11, p. 938-941, 2005.

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

STERMITZ, F. R; CASHMAN, K. K; HALLIGAN, K. M; MOREL, C; TEGOS, G. P; LEWIS, K. Polyacylated neohesperidosides from *Geranium caespitosum*: bacterial multidrug resistance pump inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 11, p. 1915-1918, 2003.

STERMITZ, F. R; LORENZ, P; TAWARA, J. N; ZENEWICZ, L. A; LEWIS, K. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 4, p. 1433-1437, 2000a.

STERMITZ, F. R; SCRIVEN, L. N; TEGOS, G; LEWIS, K. Two flavonols from *Artemisa annua* which potentiate the activity of berberine and norfloxacin against a resistant strain of *Staphylococcus aureus*. **Planta Medica**, v. 68, n. 12, p. 1140-1141, 2002.

STERMITZ, F. R; TAWARA-MATSUDA, J; LORENZ, P; MUELLER, P; ZENEWICZ, L; LEWIS, K. 5'-Methoxyhydnocarpin-D and Pheophorbide a: Berberis species components that potentiate Berberine growth inhibition of resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 8, p. 1146-1149, 2000b.

TEGOS, G; HAYNES, M; JACOB STROUSE, J; MD T KHAN, M; G BOLOGA, C; I OPREA, T; A SKLAR, L. Microbial efflux pump inhibition: tactics and strategies. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 13, p. 1291-1302, 2011.

THAKUR, A; SHARMA, R; JASWAL, V. S; NEPOVIMOVA, E; CHAUDHARY, A; KUCA, K. Psoralen: A Biologically Important Coumarin with Emerging Applications. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 18, p. 1838-1845, 2020.

THOMSEN, R; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking Rene'. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315–3321, 2006.

TINE, Y; RENUCCI, F; COSTA, J; WÉLÉ, A; PAOLINI, J. A method for LC-MS/MS profiling of coumarins in *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) B. Zepernich and Timler extracts and essential oils. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 174, 2017.

TÓTH, K; CSIK, G; RONTÓ, G. Dark and photoreactivity of 4'-aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen with T7 phage, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 5, p. 167-178, 1990.

TORRES, P. H. M; SODERO, A. C. R; JOFILY, P; SILVA-JR, F. P. Key topics in molecular docking for drug design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4574, 2019.

TOUATI, A; BELLIL, Z; BARACHE, D; MAIRI, A. Fitness cost of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*: A systematic review. **Microbial Drug Resistance**, v. 27, n. 9, p. 1218-1231, 2021.

TOWERS, G. H. N; PAGE, J. E; HUDSON, J. B. Light-mediated biological activities of natural products from plants and fungi. **Current Organic Chemistry**, v. 1, p. 395-414, 1997.

TROTT, O; OLSON, A. J. *AutoDock Vina*: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

VANACHAYANGKUL, P; BYER, K; KHAN, S; BUTTERWECK, V. An aqueous extract of *Ammi visnaga* fruits and its constituents khellin and visnagin prevent cell damage caused by oxalate in renal epithelial cells. **Phytomedicine**, v. 17, n. 8-9, p. 653-658, 2010.

VEDALDI, D; CAFFIERI, S; DALL'ACQUA, F; ANDREASSI, L; BOVALINI, L; MARTELLI, P. Khellin, a naturally occurring furochromone, used for the photochemotherapy of skin diseases: mechanism of action. **Il Farmaco; Edizione Scientifica**, v. 43, n. 4, p. 333-346, 1988.

VEDALDI, D; CAFFIERI, S; MIOLO, G; GUIOTTO, A; DALL'ACQUA, F. Benzoangelicins: new monofunctional DNA photobinding agents. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 14, n. 1-2, p. 81-93, 1992.

VENTURINI, S; TAMARO, M; MONTI-BRAGADIN, C; CARLASSARE, F. Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* of some angelicin derivatives proposed as new monofunctional agents for photochemotherapy of psoriasis. **Mutation Research**, v. 88, p. 17-22, 1981.

VICTORIA, Francine Novack. **Novos Compostos Organosselênio Bioativos: Estudo da Ação Antimicrobiana Frente a Patógenos de Importância em Alimentos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

WADITZER, M; BUCAR, F. Flavonoids as Inhibitors of Bacterial Efflux Pumps. **Molecules**, v. 26, n. 22, p. 6904, 2021.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, p. 775-781. 2000.

WANG, H; TAY, M; PALMER, J; FLINT, S. Biofilm formation of *Yersinia enterocolitica* and its persistence following treatment with different sanitation agents. **Food Control**. v. 73, p. 433-437, 2017.

WATERHOUSE, A; BERTONI, M; BIENERT, S; STUDER, G; TAURIELLO, G; GUMIENNY, R; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296-W303, 2018.

WEBBER, M. A; PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 9-11, 2003.

YAMADA, H; KUROSE-HAMADA, S; FUKUDA, Y; MITSUYAMA, Y; TAKAHATA, M; MINAMI, S; WATANABE, NARITA, H. Quinolone susceptibility of *norA*-disrupted *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 2308-2309. 1997.

ANEXOS

ANEXO A – COMPROVAÇÃO DE ARTIGO ACEITO NA REVISTA: EVIDENCE-BASED COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE



Dear Dr. Arcanjo,

I am delighted to inform you that the review of your Research Article 9244500 titled Modulation of drug resistance by furanochromones in *norA*-overexpressing *Staphylococcus aureus* has been completed and your article has been accepted for publication in Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.

Please visit the manuscript details page to review the editorial notes and any comments from external reviewers. If you have deposited your manuscript on a preprint server, now would be a good time to update it with the accepted version. If you have not deposited your manuscript on a preprint server, you are free to do so.

We will now check that all of your files are complete before passing them over to our production team for processing. We will let you know soon should we require any further information.

**ANEXO B — ARTIGO ACEITO NA REVISTA: EVIDENCE-BASED
COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE**

Modulation of drug resistance by furanochromones in *NorA* overexpressing

Staphylococcus aureus

Running title: Modulation of drug resistance by furanochromones

Damara F. Rodrigues¹, Nathalie H. P. B. Borges¹, Carlos Emídio S. Nogueira², Josean F. Tavares³, Daniel Dias Rufino Arcanjo⁴, Humberto M. Barreto^{5}, José P. Siqueira-Junior^{1*}*

¹ Laboratory of Genetics of Microorganisms, Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil;

² Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, Ceará, Brazil;

³ Department Pharmaceutical Science, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

⁴ Laboratory of Functional and Molecular Studies on Physiopharmacology (LAFMOL), Department of Biophysics and Physiology, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

⁵ Laboratory of Research in Microbiology, Department of Parasitology and Microbiology, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

***Corresponding authors:** hmbarreto@ufpi.edu.br (H.M.B.); jpsiq@uol.com.br (J.P.S.-J).

Abstract:

Khellin and Visnagin are natural furanochromones that photoreact with DNA. Khellin has been used in the treatment of vitiligo and psoriasis, as well as in the treatment of angina pectoris and asthma due to its potent action as a coronary vasodilator and antispasmodic agent. The present study aimed to investigate whether the compounds Khellin and Visnagin act as inhibitors of NorA protein, an efflux pump overproduced by the strain of *Staphylococcus aureus* SA1199B that confers resistance to the fluoroquinolones, such as Norfloxacin and Ciprofloxacin. These substances alone did not show antibacterial activity against the strain tested. On the other hand, when these compounds were added to the culture medium at subinhibitory concentration, they were able to reduce the minimum inhibitory concentration (MIC) of Norfloxacin, Ethidium Bromide, as well as Berberine, suggesting that these compounds are modulating agents of Norfloxacin resistance, possibly due to NorA inhibition. Molecular docking analysis showed that both Khellin and Visnagin form hydrogen bonds with Arg310, an important residue in the interaction between NorA and its substrates, supporting the hypothesis that these compounds are NorA inhibitors. These results suggest a possible application of Khellin and Visnagin as adjuvants to Norfloxacin in the treatment of infections caused by strains of *S. aureus* that overproduce NorA.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; Resistance to antibiotics; Efflux pump inhibitors; Molecular docking.

1. Introduction

Infectious diseases caused by multidrug-resistant bacteria have become a global health problem, leading to high mortality rates [1], and high costs for healthy systems [2]. Bacterial resistance is an adaptive response caused by the intensive use of antibacterial agents in the most diverse areas, including in the human and veterinary medicines, as well as animal feed supplementation, selecting the most adapted strains [3]. Several mechanisms of antibiotic resistance have been demonstrated in bacteria, such as reducing the permeability of bacteria to antimicrobials, enzymatic modification of the antibiotic target, antibiotic modification, or degradation, as well as drug extrusion by efflux pumps [4].

Efflux pumps are transmembrane proteins that account for much of the bacterial resistance, since they pump antimicrobial agents out of the cell [5]. Some of these pumps are specific for a given compound or class of compounds, whereas others remove a variety of structurally unrelated antimicrobial compounds [6,7]. Several efflux pumps related to drug-resistance in *Staphylococcus aureus* have already been identified, including MsrA, MepA, LmrS, MdeA, NorA, NorB, NorC, QacA, and QacC [8]. NorA is a proton-dependent multidrug efflux pump that belongs to Major Facilitator Superfamily (MFS) and it confers resistance to hydrophilic fluoroquinolones, such as Norfloxacin, and Ciprofloxacin, as well as to biocide agents, such as Ethidium Bromide, Acriflavine, and Benzalkonium Chloride [9-11].

Resistance modifying agents/modulators are compounds that potentiate the activity of an antibiotic against resistant strains, and some of these agents may act as efflux pump inhibitors (EPIs), as in the case of several naturally occurring compounds from plants [12-16]. Various phytocompounds have been studied for its ability to inhibit *S. aureus* efflux pumps, including terpenes such as eugenol [17], carvacrol, thymol [18], estragole [19], α -pinene, and limonene [20]. Inhibition of NorA also have been reported for ferulic acid and its esterified

derivatives [21], chalcones [22] and vitamin K3 [23]. On the other hand, various synthetic EPIs have been reported as efflux pump inhibitors [24-26].

Chromone (1,4-benzopyrone) is a derivative of benzopyran with a substituted keto group on the pyran ring, being an isomer of coumarin (1,2 benzopyrone). Visnagin and Khellin are two naturally occurring furanochromones able to photoreact with DNA [27]. Khellin and visnagin derivatives have anti-inflammatory and analgesic activity [28], epidermal growth factor inhibitory activity [29], as well as light mediated antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Fusarium culmorum* L. [30]. Khellin has been used in the treatment of vitiligo, and psoriasis [31], as well as in the treatment of angina pectoris and asthma due to its potent action as a coronary vasodilator and antispasmodic agent [32,33]. Furthermore, Khellin also has been used in the treatment of kidney stones [34].

Furochromones, as well as furocoumarins, are widely studied for their photoactive properties [35,36]. The modulating activity of drug resistance by furochromones has not yet been reported, requiring the development of studies with these molecules as potential efflux pump inhibitors.

In an ongoing project to evaluate coumarins as modulators of antibiotic resistance, the modulatory activity of semisynthetic and commercial coumarins [37], as well as of furanocoumarins isolated from Rutaceae species [38] has been demonstrated. Still regarding the furanocoumarins, Bergapten, and Isopimpinellin do not modulate the resistance to Norfloxacin and to Ethidium bromide in an effluxing *Staphylococcus aureus* strain. Although furanochromones Visnagin and Khellin present similar molecular structures to bergapten and isopimpinellin, respectively (Figure 1), these compounds were considered different enough from the furacoumarins to justify the evaluate these homologous furanochromones (Visnagin and Khellin) as modulators of antibiotic resistance using an effluxing *Staphylococcus aureus* strain.

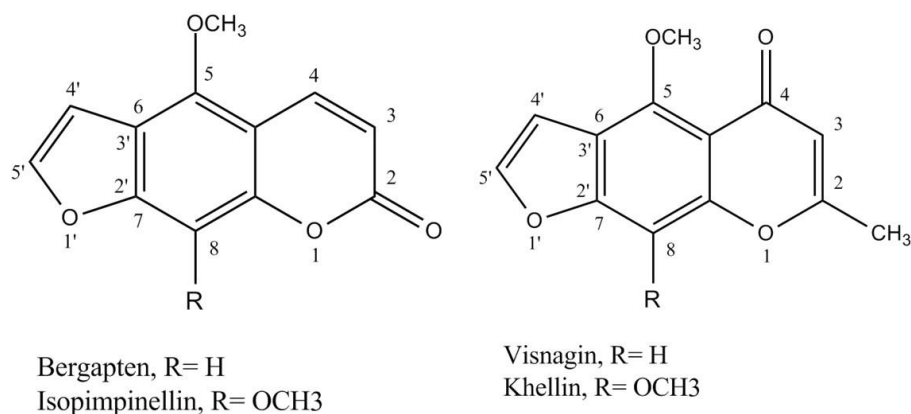


Fig. 1. Chemical structure of furanocoumarins (Bergapten and Isopimpinellin) and furanochromones (Visnagin and Khellin).

2. Material and methods

2.1. Chemicals

The stock solution of the Norfloxacin was prepared in a mixture of 1 M NaOH and sterile distilled water (1:9 proportion). The stock solution of Ethidium bromide (EtBr) and Berberine were prepared in distilled water. The stock solution of the furanochromones – Khellin and Visnagin, were prepared in DMSO which, at its highest final concentration after dilution in the broth (4%), displayed no inhibition of bacterial growth. Chlorpromazine was prepared in sterile distilled water. All drugs were from Sigma-Aldrich, USA.

2.2. Bacteria

The SA-1199B strain of *S. aureus* was used as it overexpresses the *norA* gene. This gene encodes the NorA efflux protein that extrudes not only Norfloxacin but several

compounds, such as: hydrophilic fluoroquinolones, quaternary ammonium compounds benzalkonium chloride and cetrimide, intercalating dyes Acriflavine and Ethidium Bromide [10], as well as the alkaloid Berberine [39]. The strain, kindly provided by Professor Simon Gibbons (University College London, UK), was maintained in blood agar base (Laboratories Difco Ltda., Brazil) slants, and prior to use, the cells were grown overnight at 37 °C in brain heart infusion broth (BHI – Difco Ltda., Brazil).

2.3. Drug susceptibility testing and modulation assay

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of the Norfloxacin, Pefloxacin, Ethidium bromide and furanochromones were determined in BHI by the microdilution assay using a suspension of ca. 10^5 cfu/mL and a drug concentration range of 1024 – 1 µg/mL (two-fold serial dilutions). The MIC was defined as the lowest concentration at which no growth is observed. The detection was done after the addition of resazurin at 0.01%. For the evaluation of furanochromones as a modulator of drug resistance, the ‘modulation assay’ was used, a method that has been widely applied to identify potential EPIs [12] i.e. the MICs of Norfloxacin, Pefloxacin, Ethidium bromide and Berberine were determined in the presence of furanochromones at a sub-inhibitory concentration (MIC 1/4). Chlorpromazine, a known NorA inhibitor [40], was used as a positive control.

2.4. Docking procedure

The NorA model for the docking procedure was created by retrieving the NorA sequence of *S. aureus* 1199 strain from the Universal Protein Resource database (Uniprot, Entry Q03325). Then, the SWISS-MODEL [41] service was used to build the homology model. Out of templates generated, the one with the best GMQE (Global Model Quality Estimation) score was the one based on the structure of the *Escherichia coli* YajR transporter

(PDB-ID: 3wdo). The Molprobit [42] service was used for the protonation of the NorA model. For the docking procedure, which was carried out using the Autodock Vina [43] software, the grid box was defined as a 20Åx20Åx20Å box around the geometrical center of the model. Partial Gasteiger charges were added to ligand atoms, non-polar hydrogen atoms were mixed while all other parameters were kept at their default values. Best results were chosen based on the binding score.

3. Results and discussion

According to a previous study, the antimicrobial activity of an isolated compound must be considered significant if its MIC value is $\leq 10 \mu\text{g/mL}$ [44]. Both furanochromones Khellin, and Visnagin showed MIC values $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$. These results indicate that the tested compounds were inactive against the *S. aureus* strain used.

Despite not showing activity against this specific strain, addition of these compounds to the growth medium at 256 $\mu\text{g/mL}$ (MIC 1/4) potentiated the antibacterial effect of Norfloxacin against the SA1199-B strain, reducing the MIC values for Norfloxacin by at least two-fold (Table 1). Modulating effect on the resistance to Norfloxacin could be explained by inhibition of NorA efflux pump overproduced by SA1199-B, as already reported for several compound classes, such as alkamides [18], chalcones [45-47], flavonoids [48-51], and lignans [52]. In fact, Visnagin, and Khellin showed a modulating effect like that exhibited by the known NorA inhibitor Chlorpromazine.

Table 1 Minimum inhibitory concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of Norfloxacin, Ethidium bromide and Berberine against *Staphylococcus aureus* strain SA-1199B in the absence or presence of Khellin, Visnagin, and Chlorpromazine.

Drugs	Alone	+ Khellin	+ Visnagin	+ Chlorpromazine
Norfloxacin	64	32 (2)*	32 (2)	16 (4)
Ethidium bromide	64	32 (2)	16 (4)	8 (8)
Berberine	512	256 (2)	256 (2)	512
Pefloxacin	16	16	16	16

*(fold reduction in MIC)

To investigate a potential action as NorA inhibitors, assays were performed replacing Norfloxacin by two known NorA substrates: EtBr [53] and Berberine [54]. EtBr is a well-known substrate for the NorA efflux protein, and active efflux is the only known mechanism of resistance to this DNA-intercalating dye [55]. Therefore, the use of EtBr against SA-1199B is of enough to demonstrate that the compounds evaluated here modulated the resistance to norfloxacin by efflux pump inhibition. Results showed that compounds tested also reduced MIC values for EtBr and Berberine by at least two-fold. It is worth noting the results obtained with Visnagin regarding EtBr (Table 1). All experiments were carried out at least twice with consistent results suggesting that compounds tested could be NorA inhibitors.

A previous study verified that furanocoumarins Bergapten and Isopimpinellin did not modulate the antibacterial activity of Norfloxacin against the strain evaluated [38]. To understand the differences in efflux pump inhibition (EPI) capabilities of furanocoumarins and furanochromones, a molecular docking study against the NorA efflux pump model was conducted. A comparison of the binding pose of Visnagin vs Bergapten and Khellin vs Isopimpinellin are shown in Figures 2 and 3, respectively.

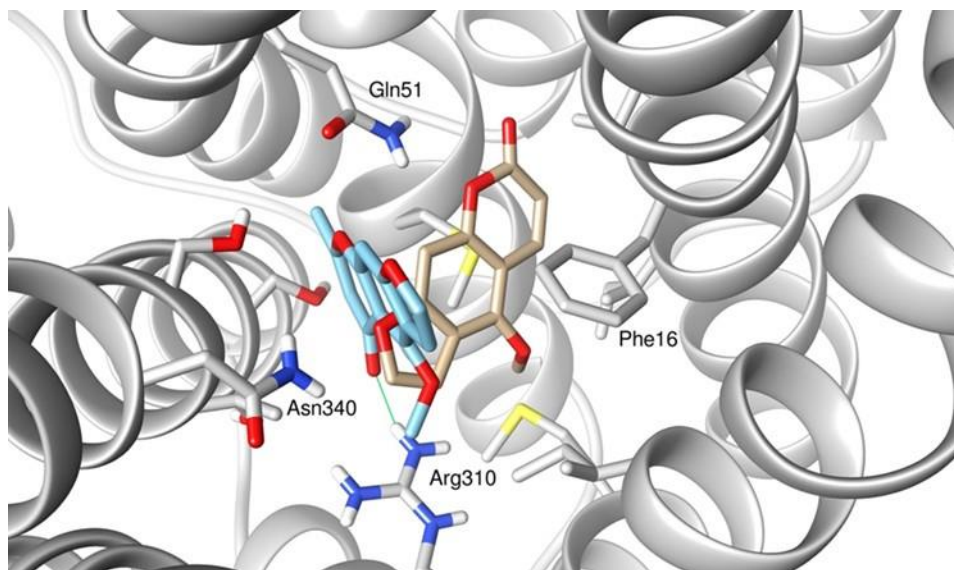


Fig. 2. The best poses of Visnagin (blue) and Bergapten (golden) on the binding site of the NorA model. Hydrogen bond with Arg310 depicted in green.

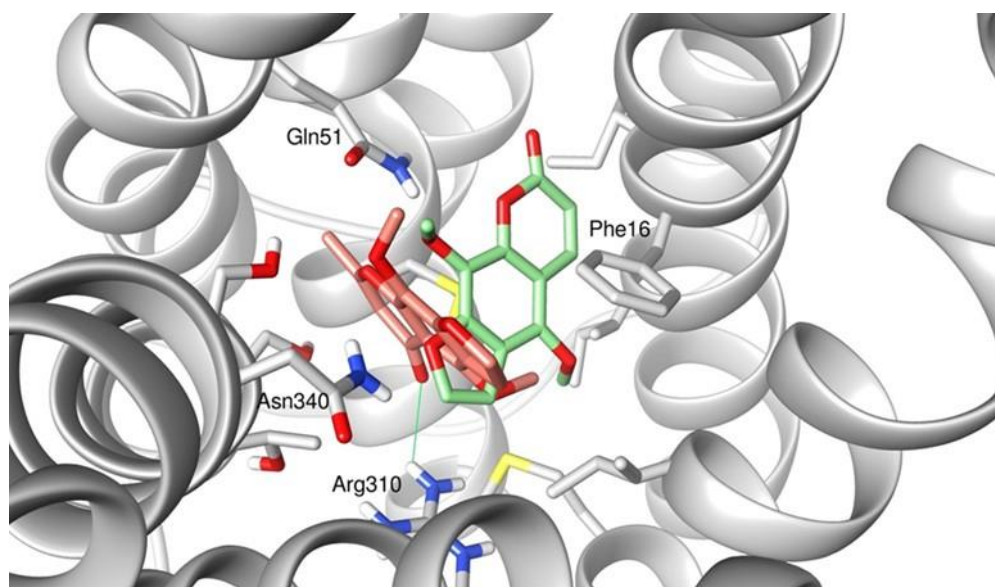


Fig. 3. The best poses of Khellin (orange) and Isopimpinellin (green) on the binding site of the NorA model. Hydrogen bond with Arg310 depicted in green.

Interestingly, both furanochromones dock in almost the same fashion and interact with the same residues. In particular, both interact through hydrogen bonds with Arg310. There are close contacts with Phe16, Asn340 and Gln51. The binding pocket of NorA is described as being composed by Ile19, Ile23, Gln51, Met109, Ile136, Thr211, Arg310, Ile313, Thr314, Asn332, Ser333, Ser337, Asn340 and Phe341, among others. The furanochromones make close contact with most of these, as can be seen in the Protein-Ligand interaction diagram in Figure 4. Not only that, but a previous study. described a chalcone with NorA inhibition properties that interacts with Arg310 through a hydrogen bond [56]. There are also imidazolines EPIs that bind to this same region of the binding site and interact with Arg310 through hydrogen bonds [19]. Interaction through H-bond with Arg310 also was reported to aminoguanidine hydrazones [57, 58]). These results suggest that Arg310 is an important amino acid residue for NorA substrate recognition.

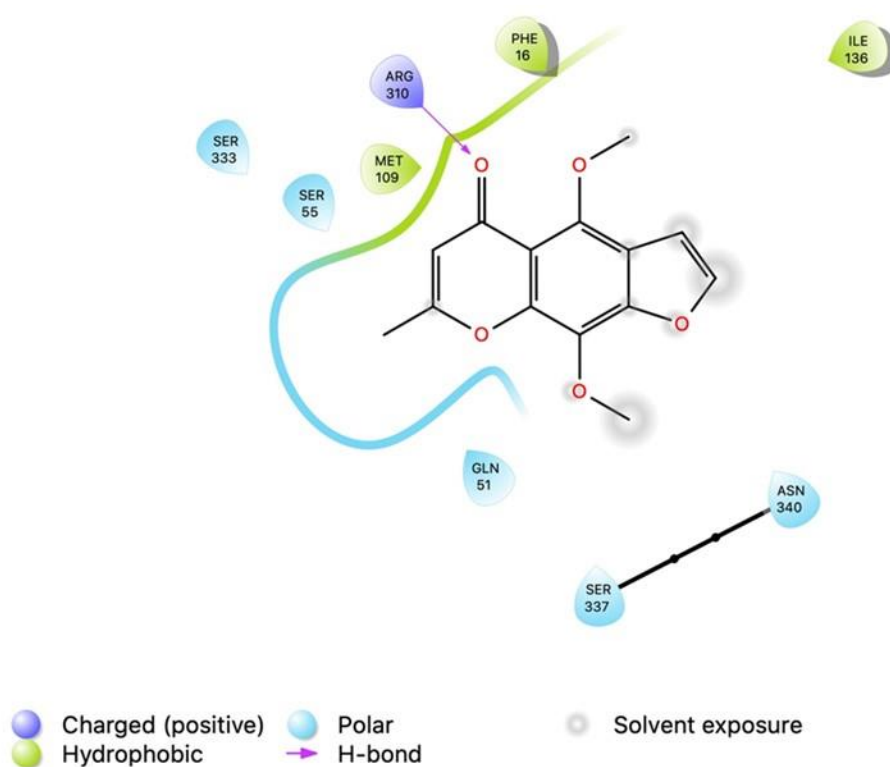


Fig. 4. Protein-Ligand interaction diagram of Khellin on the binding site of the NorA model.

On the other hand, furanocoumarins do not interact with Arg310. Also, the Arg310 hydrogen bond anchors the furanochromones in a way that hinders the binding of EtBr, as can be seen in Figure 5. As such, the binding pose of furanocoumarins shows almost no overlap with the position of EtBr. It could, thus, be argued that the furanochromones could act as efflux pump inhibitors through competition in contrast with furanocoumarins, supporting the experimental results shown before.

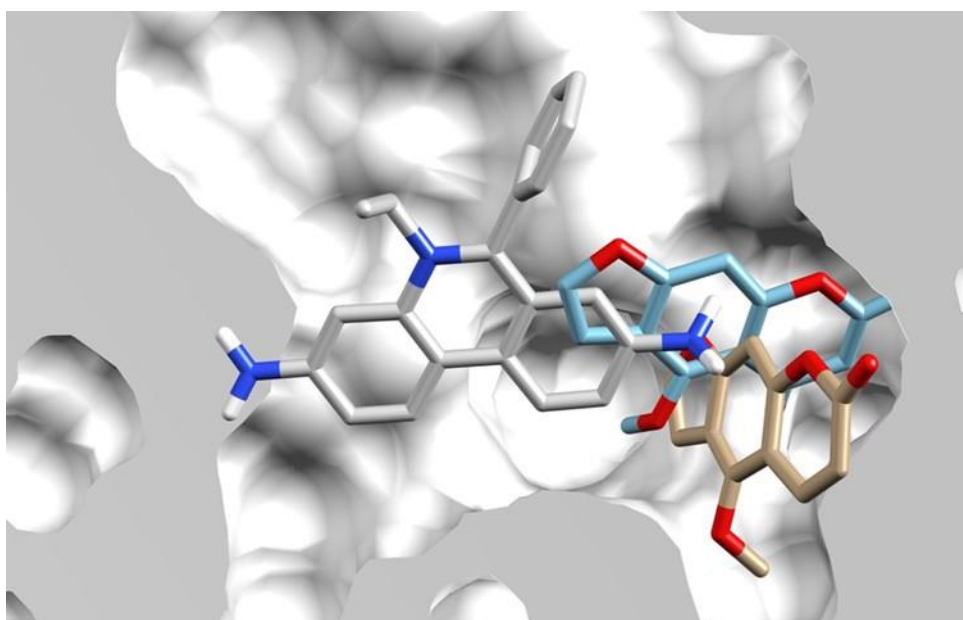


Fig. 5. Binding poses of EtBr (white), Visnagin (blue) and Bergapten (golden) on the binding site of the NorA model.

We also compared the docked pose of other known efflux pump inhibitors, such as chlorpromazine (Figure 6), as well as piperine (Figure S1), verapamil (Figure S2), and reserpine (Figure S3). Chlorpromazine binds to the same region of the binding site, interacting not only with Arg310, but with Phe16, Asn340, Ile136 and others. More

importantly, its best pose overlaps with that of EtBr in a similar fashion as those of furanochromones.

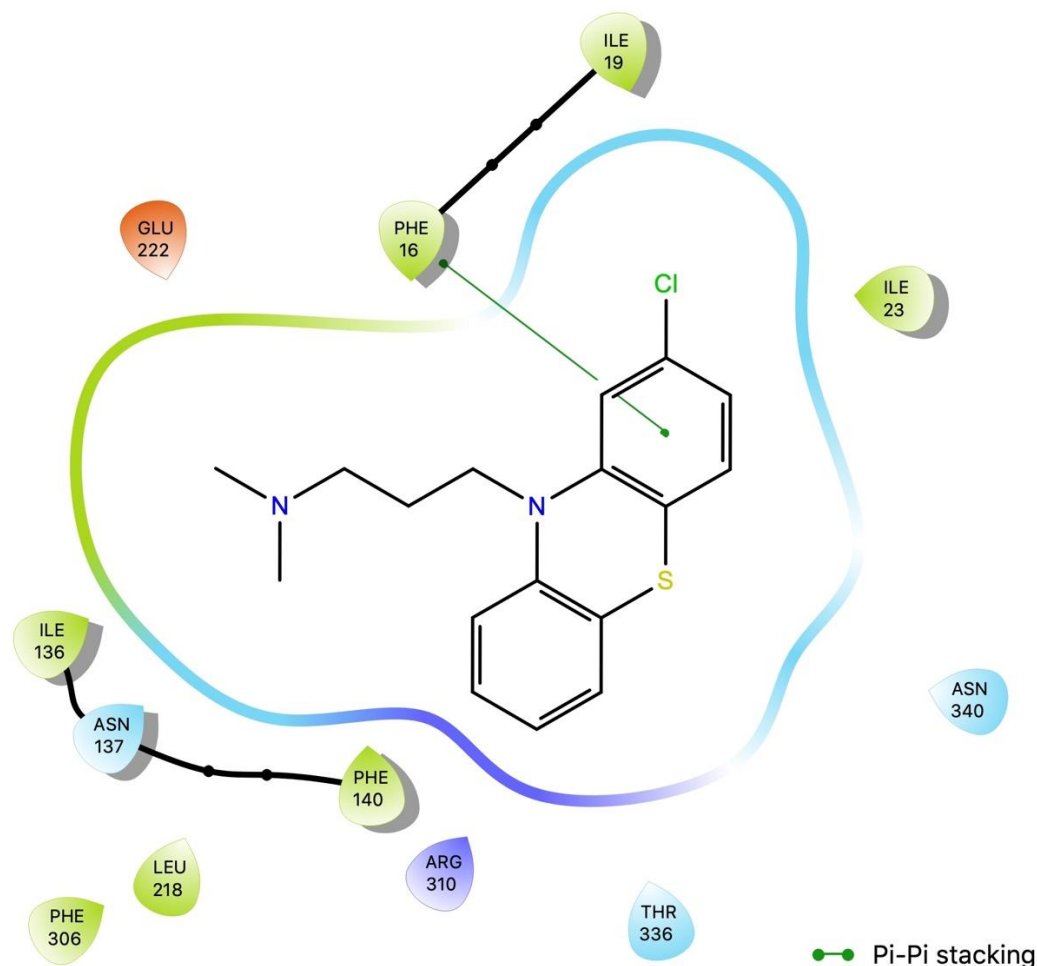


Fig. 6. Protein-Ligand interaction diagram of Chlorpromazine on the binding site of the NorA model.

Also, other EPIs such as Piperine and Verapamil also bind to the same region of the binding site (Figures S1 and S2), as both interact with Arg310, Phe16, Gln51, etc. The binding pose of Reserpine, on the other hand, is a bit different. As it is much larger than the previously mentioned EPIs, its interaction site goes from Ile136, Asn340 and Phe16 to other

parts of the binding site, such as Ala48 and Met52, its sheer size contributing to inhibition as much as its interactions (Figure S3).

Our results indicate that Khellin, and Visnagin could be applied in combination with Norfloxacin against NorA overproducer *S. aureus* strains. Khellin showed a low-level toxicity in humans, at an average daily dose of 120 mg, administered orally [59]. Liver and dermal histological and pathological analyses demonstrated that hydroxyethyl cellulose hydrogels based on Khellin loaded in the ASC10 ascosomes have no toxic effects in rats [60]. On the other hand, both Khellin and Visnagin showed a strong cytotoxic activity (IC_{50} ranging between 12.54 and 17.53 $\mu\text{g/mL}$) on breast cancer (MCF-7) and hepatocellular carcinoma (Hep G2) cell lines [61]. Therefore, studies *in vivo* will be necessary to evaluate the safety of using Khellin or Visnagin combined with Norfloxacin.

4. Conclusion

The furanochromones Khellin and Visnagin did not show any antibacterial activity against *S. aureus* resistant to norfloxacin by efflux pump mechanism. However, both compounds reduced the MIC of Norfloxacin at subinhibitory concentration. Furthermore, Khellin and Visnagin modulated the resistance to EtBr, and Berberine, suggesting a possible inhibition of NorA efflux pump overproduced by *S. aureus* SA1199-B strain. Molecular docking analysis showed that both Khellin and Visnagin form hydrogen bonds with Arg310, an important residue in the interaction between NorA and its substrates, supporting the hypothesis that these compounds could be NorA inhibitors. Results obtained at this work are quite promising, which may stimulate future studies about the use of natural products concerning the viability of its use against microbial resistance.

Conflict of interest

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgements

We are grateful to CNPq (Grant 308988/2020-5) and Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado do Piauí - FAPEPI (Grant 050/2019) for financial support. C.E.S. Nogueira acknowledges the support of Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP, grant BP4-00172-00065.01.01/20.

References

1. World Health Organization (2014) Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance, <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564748> (accessed 19 January 2022).
2. J. O'Neill, Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations, (2014), <https://amr-review.org> (accessed 19 January 2022).
3. H. Venter, M.L. Henningsen, S.L. Begg, Antimicrobial resistance in healthcare, agriculture and the environment: the biochemistry behind the headlines, *Essays Biochem.* 61 (2017) 1-10. Doi: 10.1042/EBC20160053.
4. L. Kakoullis, E. Papachristodoulou, P. Chra, G. Panos, Mechanisms of antibiotic resistance in important Gram-positive and Gram-negative pathogens and novel antibiotic solutions, *Antibiotics* 10 (2021) 1-25. Doi: 10.3390/antibiotics10040415.
5. D. Du, X. Wang-Kan, A. Neuberger, H.W. van Veen, K.M. Pos, L.J.V. Piddock, B.F. Luisi, Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation, *Nat. Rev. Microbiol.* 16 (2018) 523-539. Doi: 10.1038/s41579-018-0048-6.

6. G. Spengler, A. Kincses, M. Gajdács, L. Amaral, New roads leading to old destinations: efflux pumps as targets to reverse multidrug resistance in bacteria, *Molecules*, 22 (2017) 468. Doi: 10.3390/molecules22030468.
7. Sharma, V.K. Gupta, R. Pathania, Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside, *Indian J. Med. Res.* 149 (2019) 129-145. Doi: 10.4103/ijmr.IJMR_2079_17.
8. B.D. Schindler, G.W. Kaatz, Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria, *Drug Resist. Updates* 27 (2016) 1-13. Doi: 10.1016/j.drug.2016.04.003.
9. H. Yoshida, M. Bogaki, S. Nakamura, K. Ubukata, M. Konno, Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones, *J. Bacteriol.* 172 (1990) 6942–6949. Doi: 10.1128/jb.172.12.6942-6949.1990.
10. G.W. Kaatz, S.M. Seo, Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 (1995) 2650–2655.
11. P.C. Hsieh, S.A. Siegel, B. Rogers, D. Davis, K. Lewis, Bacteria lacking a multi-drug pump: a sensitive tool for drug discovery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 6602–6606. Doi: 10.1073/pnas.95.12.6602.
12. M. Stavri, L.J.V. Piddock, S. Gibbons, Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources, *J. Antimicrob. Chemother.* 59 (2007) 1247-1260.
13. T. Rana, S. Singh, N. Kaur, K. Pathania, U. Farooq, A review on efflux pump inhibitors of medically important bacteria from plant sources, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 26 (2014) 101-111.
14. H.T. Diniz-Silva, M. Magnani, S. de Siqueira, E.L. de Souza, J.P. de Siqueira-Júnior, Fruit flavonoids as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that

- overexpress *norA*, Food Sci. Technol. 85 (2016) 324-326. Doi: 10.1016/j.lwt.2016.04.003
15. S. Menezes-Silva, N.S. Lira, Y.M. do Nascimento, R.A.R. Meireles, C.S. Dias, J.F. Tavares, M.S. da Silva, G.E.C. de Miranda, J.M. Barbosa-Filho, J.P. de Siqueira-Júnior, Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by 132-hydroxy-(132-R/S)-pheophytin isolated from *Sargassum polyceratum*, Microb. Pathog. 141 (2020) 104033. Doi: 10.1016/j.micpath.2020.104034.
 16. A.J. Seukep, V. Kuete, L. Nahar S. Sarker, M. Guo, Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification, J Pharm Anal. 10 (2020) 277–90. Doi: 10.1016/j.jpha.2019.11.002.
 17. D.F. Muniz, C.R.S. Barbosa, I.R.A. de Menezes, E.O. de Sousa, R.L.S. Pereira, J.T. Calixto-Júnior, P.S. Pereira, Y.M.L.S. de Matos, R.H.S. da Costa, C.D.M. Oliveira-Tintino, H.D.M. Coutinho, J.M. Barbosa-Filho, G.R. de Sousa, J. Ribeiro-Filho, J.P. Siqueira-Junior, S.R. Tintino, In vitro and in silico inhibitory effects of synthetic and natural eugenol derivatives against the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus*, Food Chem. 337 (2021) 127776. Doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127776.
 18. C.R.S. Barbosa, J.R. Scherf, T.S. Freitas, I.R.A. de Menezes, R.L.S. Pereira, J.F.S. dos Santos, S.S.P. de Jesus, T.P. Lopes, Z.S. Silveira, C.D.M. Oliveira-Tintino, J.P. Siqueira-Júnior, H.D.M. Coutinho, S.R. Tintino, F.A.B. da Cunha, Effect of Carvacrol and Thymol on NorA efflux pump inhibition in multidrug-resistant (MDR) *Staphylococcus aureus* strains, J Bioenerg Biomembr. 53 (2021) 489-498. Doi: 10.1007/s10863-021-09906-3.
 19. R.H.S. da Costa, J.E. Rocha, T.S. de Freitas, R.L.S. Pereira, F.N. Pereira-Junior, M.R.C. de Oliveira, F.L.A. Batista, H.D.M. Coutinho, I.R.A. de Menezes, Arch Microbiol. 203 (2021) 3551–3555 (2021). Do 10.1007/s00203-021-02347-x

20. A.C.J. de Araújo, P.R. Freitas, C.R.S. Barbosa, D.F. Muniz, R.S. de Almeida, I.R.A. de Menezes, J. Ribeiro-Filho, S.R. Tintino, H.D.M. Coutinho, In Vitro and In Silico Inhibition of *Staphylococcus aureus* Efflux Pump NorA by α -Pinene and Limonene, *Curr Microbiol.* 78 (2021), 3388–3393. Doi: 10.1007/s00284-021-02611-9.
21. P.G. Pinheiro, G.M.P. Santiago, F.E.F. da Silva, A.C.J. de Araújo, C.R.T. de Oliveira, P.R.Freitas, J.E. Rocha, J.B. de Araújo-Neto, M.M.C. da Silva, S.R. Tintino, I.R.A. de Menezes, H.D.M. Coutinho, J.G.M. da Costa, Antibacterial activity and inhibition against *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump by ferulic acid and its esterified derivatives, *Asian Pac J Trop Biomed.* 11 (2021) 405-413. Doi: 10.4103/2221-1691.321130.
22. P.T. da Silva, T.S. de Freitas, D.M. Sena-Jr, P.N. Bandeira, M.S.S. Julião, E.S. Marinho, A.A.C. Alcanfor, E.M. Marinho, P. de Lima-Neto, C.E.S. Nogueira, H.D.M. Coutinho, A.L.A.B. Leal, H.M. Barreto, N. Martins, A.M.R. Teixeira, H.S. dos Santos, Structural, Vibrational and Electrochemical Analysis and Antibacterial Potential of Isomeric Chalcones Derived from Natural Acetophenone, *Appl Sci.* 10 (2020) 4713. Doi:10.3390/app10144713.
23. S.R. Tintino, V.C.A. de Souza, J.M.A. da Silva, C.D.M. Oliveira-Tintino, P.S. Pereira, T.C. Leal-Balbino, A. Pereira-Neves, J.P. Siqueira-Junior, J.G.M., da Costa, F.F.G. Rodrigues, I.R.A. Menezes, G.C.A. da Hora, M.C.P. Lima, H.D.M. Coutinho, V.Q. Balbino, Effect of Vitamin K3 Inhibiting the Function of NorA Efflux Pump and Its Gene Expression on *Staphylococcus aureus*, *Membranes.* 10 (2020) 130. Doi: 10.3390/membranes10060130.
24. B.D. Schindler, P. Jacinto, G.W. Kaatz, Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: current status of potentiating existing antibiotics, *Future Microbiol.*, 8 (2013) 491–507. Doi: 10.2217/fmb.13.16.

25. L.M. Costa, E.V. Macedo, F.A.A. Oliveira, J.H.L. Ferreira, S.J.C Gutierrez, W.J. Peláez, F.C.A Lima, J.P. Siqueira-Júnior, H.D.M.; Coutinho, G.W. Kaatz, R.M. Freitas, H.M. Barreto, Inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by synthetic riparins, *J. Appl. Microbiol.* 121 (2016) 1312–1322. Doi: 10.1111/jam.13258.
26. M.S. Faillace, A.L.A.B. Leal, F.A.O. Alcântara, J.H.L. Ferreira, J.P. Siqueira-Júnior, C.E.S. Nogueira, H.M. Barreto, W.J. Pelaez, Inhibition of the NorA efflux pump of *S. aureus* by (Z)-5-(4-Fluorobenzylidene)-Imidazolidines, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 31 (2021) 127670. Doi: 10.1016/j.bmcl.2020.127670.
27. A.A. Abu-Hashem, M. El-Shazly, Synthesis, reactions and biological activities of furochromones: a review, *Eur. J. Med. Chem.* 90 (2015) 633–665. Doi: 10.1016/j.ejmech.2014.12.001.
28. A.A. Abu-Hashem, M.M. Youssef, Synthesis of new Visnagen and Khellin furochromone pyrimidine derivatives and their anti-inflammatory and analgesic activity, *Molecules.* 16 (2011) 1956–1972. Doi: 10.3390/molecules16031956.
29. A.-S.S.H. Elgazwy, M.M. Edrees, N.S.M. Ismail, Molecular modeling study bioactive natural product of Khellin analogues as a novel potential pharmacophore of EGFR inhibitors, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 28 (2012) 1171–1181. Doi: 10.3109/14756366.2012.719504.
30. M.L. Borges, L. Latterini, F. Elisei, P.F. Silva, R. Borges, R.S. Becker, A.L. Maçanita, Photophysical properties and photobiological activity of the furanochromones Visnagin and Khellin, *Photochem. Photobiol.* 67 (1998) 184–191, Doi: 10.1111/j.1751-1097.1998.tb05185.x.

31. D. Vedaldi, S. Caffieri, F. Dall'Acqua, L. Andreassi, L. Bovalini, P. Martelli, Khellin, a naturally occurring furochromone, used for the photochemotherapy of skin diseases: mechanism of action, *Farmaco Sci.* 43 (1988) 333–346.
32. G.V. Anrep, G.S. Barsoum, M.R. Kenawy, G. Misrahy, Ammi visnaga in the treatment of the anginal syndrome, *Br. Heart J.* 8 (1946) 171–177.
33. G. V. Anrep, M. R. Kenawy, G. S. Barsoum, The coronary vasodilator action of khellin, *Am. Heart J.* 37 (1949) 531–542. Doi: 10.1016/0002-8703(49)91131-X.
34. P. Vanachayangkul, K. Byer, S. Khan, V. Butterweck, An aqueous extract of Ammi visnaga fruits and its constituents khellin and visnagin prevent cell damage caused by oxalate in renal epithelial cells, *Phytomedicine.* 17 (2010) 653–658. Doi: 10.1016/j.phymed.2009.10.011.
35. J. Sharifi-Rad, N. Cruz-Martins, P. López-Jornet, E.P.F. Lopez, N. Harun, B. Yeskaliyeva, W.C. Cho, Natural Coumarins: Exploring the Pharmacological Complexity and Underlying Molecular Mechanisms, *Oxid Med Cell Longev.* 2021 (2021) 6492346. Doi: 10.1155/2021/6492346
36. A.A. Abu-Hashem, M. El-Shazly, Synthesis, reactions and biological activities of furochromones: A review, *Eur J Med Chem.* 90 (2015) 633–665. Doi: 10.1016/j.ejmech.2014.12.001
37. R.S.A Araújo, J.M. Barbosa-Filho, M.T. Scotti, L. Scotti, R.M.D. Cruz, V.S. Falcão-Silva, J.P. Siqueira-Júnior, F.J.B. Mendonça-Junior, Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* with coumarin derivatives, *Scientifica* (2016) article ID 6894758. Doi: 10.1155/2016/6894758 A.L.
38. S.A.L. Madeiro, N.H.P.B. Borges, A.L. Souto, P.T.R Figueiredo, J.P. Siqueira-Junior, J.F. Tavares, Modulation of the antibiotic activity against multidrug resistant strains of

- coumarins isolated from *Rutaceae* species, *Microb. Pathog.* 104 (2017) 151-154. Doi: 10.1016/j.micpath.2017.01.028.
39. F.R. Stermitz, P. Lorenz, J.N. Tawara, L.A. Zenewicz, K. Lewis, Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97 (2000) 1433–1437. Doi: 10.1073/ypnas.030540597.
 40. A.A. Neyfakh, C.M. Borsch, G.W. Kaatz, Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter, *Antimicrob. Agents Chemother.* 37 (1993) 128-129. Doi: 10.1128/AAC.37.1.128.
 41. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, F.T. Heer, T.A.P. Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, R. Lepore, T. Schwede, Swiss-Model: homology modelling of protein structures and complexes, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) 296-303. Doi: 10.1093/nar/gky427.
 42. V.B. Chen, W.B. Arendall III, J.J. Headd, D.A. Keedy, R.M. Immormino, G.J. Kapral, L.W. Murray, J.S. Richardson, D.C. Richardson, *MolProbity*: all-atom structure validation for macromolecular crystallography, *Acta Cryst.* 66 (2010) 12-21. Doi: 10.1107/S0907444909042073.
 43. O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.* 31(2010) 455-461.
 44. L. Rios, M.C. Reccio, Medicinal plants and antimicrobial activity, *J. Ethnopharmacol.* 100 (2005) 80-84. Doi: 10.1016/j.jep.2005.04.025.
 45. A.L.A.B. Leal, P.T. Silva, M.N. Rocha, E.M. Marinho, E.S. Marinho, M.M. Marinho, P.N. Bandeira, C.E.S. Nogueira, H.M. Barreto, A.M.R. Teixeira, H.S. Santos, Potentiating activity of norfloxacin by synthetic chalcones against NorA

- overproducing *Staphylococcus aureus*, Microb. Pathog. 155 (2021) 104894. Doi: 10.1016/j.micpath.2021.104894.
46. P.T. Silva, J.C. Xavier, T.S. Freitas, M.M. Oliveira, H.D.M. Coutinho, A.L.A.B. Leal, H.M. Barreto, P.N. Bandeira, C.E.S. Nogueira, D.M. Sena-Júnior, F.W.Q. Almeida-Neto, E.S. Marinho, H.S. Santos, A.M.R. Teixeira, Synthesis, spectroscopic characterization and antibacterial evaluation by chalcones derived of acetophenone isolated from *Croton anisodontus* Müll.Arg, J. Mol. Struct. 1226 (2021) 129403. Doi: 10.1016/j.molstruc.2020.129403.
47. L.M. Rezende-Júnior, L.M.S. Andrade, A.L.A.B. Leal, A.B.S. Mesquita, A.L.P.A. Santos, J.S. Lima-Neto, J.P. Siqueira-Júnior, C.E.S. Nogueira, G.W. Kaatz, H.D.M. Coutinho, N. Martins, C.Q. Rocha, H.M. Barreto, Chalcones isolated from *Arrabidaea brachypoda* flowers as inhibitors of NorA and MepA multidrug efflux pumps of *Staphylococcus aureus*, Antibiotics 9 (2020) 351. Doi: 10.3390/antibiotics9060351
48. V.S. Falcão-Silva, D.A. Silva, M.D.F.V. Souza, J.P. Siqueira-Júnior, Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by a kaempferol glycoside from *Herissantia tiubae* (Malvaceae), Phytother. Res. 23 (2009) 1367–1370, 2009. Doi: 10.1002/ptr.2695.
49. G.L.A. Maia, V.S. Falcão-Silva, P.G.V. Aquino, J.X. Araújo-Júnior, J.F. Tavares, M.S. Silva, L.C. Rodrigues, J.P. Siqueira-Júnior, J.M. Barbosa-Filho, Flavonoids from *Praxelis clematidea* R.M. King and Robinson modulate bacterial drug resistance, Molecules 16 (2011) 4828–4835. Doi: 10.3390/molecules16064828.
50. H.C. Silva, A.L.A.B. Leal, M.M. Oliveira, H.M. Barreto, H.D.M. Coutinho, H.S. Santos, G.M.P. Santiago, T.S. Freitas, I.K.C. Lima, A.M.R. Teixeira, C.E.S. Nogueira, Structural characterization, antibacterial activity and NorA efflux pump inhibition of

- flavonoid fisetinidol, S. Afr. J. Bot. 132 (2020a) 140-145. Doi: 10.1016/j.sajb.2020.03.023.
51. A.K.F.E. Silva, A.C. Reis, E.E.A. Pinheiro, J.N. Sousa, F.A.A. Oliveira, A.K.S. Moura, J.S. Lima-Neto, A.M.G.L. Citó, J.P. Siqueira-Júnior, G.W. Kaatz, H.M. Barreto, Modulation of the drug resistance by *Platonia insignis* Mart. extract, ethyl acetate fraction and Morelloflavone/Volkensiflavone (Biflavonoids) in *Staphylococcus aureus* strains overexpressing efflux pump genes, Curr. Drug Metab. 21 (2020b) 114-122. Doi:10.2174/1389200221666200523155617
52. A.M.B. Ribeiro, J.N. Sousa, L.M. Costa, F.A.A. Oliveira, R.C. Santos, A.S.S. Nunes, W.O. Silva, P.J.M. Cordeiro, J.S. Lima-Neto, J.P. Siqueira-Júnior, G.W. Kaatz, H.M. Barreto, A.P. Oliveira, Antimicrobial activity of *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by Phyllanthin, Microb. Pathog. 130 (2019) 242-246. Doi: 10.1016/j.micpath.2019.03.012
53. G.W. Kaatz, S.M. Seo, C.A. Ruble, Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*, Antimicrob. Agents Chemother. 37 (1993) 1086-1094.
54. S. Samosorn, B. Tanwirat, N. Muhammad, G. Casadei, D. Tomkiewicz, K. Lewis, J.B. Bremner, Antibacterial activity of berberine - NorA pump inhibitor hybrids with a methylene ether linking group, Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 3866-3872.
55. P. Markham, E. Westhaus, K.K. Iyachko, M.E. Johnson, A. Neyfakh, Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*, Antimicrob. Agents Chemother. 43 (1999) 2404-2408. Doi: 10.1128/AAC.43.10.2404
56. M.M. Oliveira, H.S. Santos, H.D.M. Coutinho, P.N. Bandeira, P.T. Silva, T.S. Freitas, J.E. Rocha, J.C. Xavier, F.F. Campina, C.R.S. Barbosa, J.B. Araújo-Neto, R.L.S. Pereira, M.M.C. Silva, D.F. Muniz, A.M.R. Teixeira, V.M. Frota, T.H.S. Rodrigues,

- A.M. Amado, M.P.M. Marques, L.A.E.B. Carvalho, C.E.S. Nogueira, Spectroscopic characterization and efflux pump modulation of a thiophene curcumin derivative, *J. Mol. Struct.* 1215 (2020) 128291. Doi: 10.1016/j.molstruc.2020.128291
57. N. Dantas, T.M. Aquino, J.X. Araújo-Júnior, E. Silva-Júnior, E.A. Gomes, A.A.S. Gomes, J.P. Siqueira-Júnior, F.J.B. Mendonça-Júnior, Aminoguanidine hydrazones (AGH's) as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that overexpress NorA efflux pump, *Chem.-Biol. Interact* 280 (2018) 8-14. Doi: 10.1016/j.cbi.2017.12.009.
58. A. Sharma, V.K. Gupta, R. Pathania, Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside, *Indian J. Med. Res.* 149 (2019) 129-145. Doi: 10.4103/ijmr.IJMR_2079_17
59. M.M. Best, Management of khellin toxicity; effects of dosage and purification, *Am. J. Med. Sci.* 224 (1952) 308-313.
60. L. Risaliti, X. Yu, G. Vanti, M.C. Bergonzi, M. Wang, A.R. Bilia, Hydroxyethyl cellulose hydrogel for skin delivery of khellin loaded in ascosomes: Characterization, in vitro/in vivo performance and acute toxicity. *Int. J. Biol. Macromol.* 179 (2021) 217-229. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.206.
61. N. Khalil, M. Bishr, M. El-Degwy, M. Abdelhady, M. Amin, O. Salama, Assessment of conventional solvent extraction vs. supercritical fluid extraction of Khella (*Ammi visnaga* L.) furanochromones and their cytotoxicity, *Molecules* 26 (2021) 1290. Doi: 10.3390/molecules26051290.