



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



ÉVERTON PAREDES FALCÃO

**Efeito do *p*-cumarato de 4-clorobenzila sobre bactérias multirresistentes:
atividade sobre biofilme, modo de ação, inibição de bombas de efluxo,
modulação de resistência bacteriana e avaliação toxicológica**

JOÃO PESSOA, PB
2025

ÉVERTON PAREDES FALCÃO

**Efeito do *p*-cumarato de 4-clorobenzila sobre bactérias multirresistentes:
atividade sobre biofilme, modo de ação, inibição de bombas de efluxo,
modulação de resistência bacteriana e avaliação toxicológica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração: FARMACOLOGIA.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro

João Pessoa, PB
2025

**Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação**

F178e Falcão, Éverton Paredes.

Efeito do p-cumarato de 4-clorobenzila sobre bactérias multirresistentes : atividade sobre biofilme, modo de ação, inibição de bombas de efluxo, modulação de resistência bacteriana e avaliação toxicológica / Éverton Paredes Falcão. - João Pessoa, 2025.

146 f. : il.

Orientação: Ricardo Dias de Castro.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Toxicidade - P-cumarato de 4-clorobenzila. 2. Atividade antimicrobiana - Modelagem molecular. 3. Resistência a antimicrobianos. I. de Castro, Ricardo Dias. II. Título.

UFPB/BC

CDU 615(043)

ÉVERTON PAREDES FALCÃO

Efeito do *p*-cumarato de 4-clorobenzila sobre bactérias multirresistentes: atividade sobre biofilme, modo de ação, inibição de bombas de efluxo, modulação de resistência bacteriana e avaliação toxicológica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração: FARMACOLOGIA.

Trabalho aprovado em 20 de agosto de 2025.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente
 **ULRICH VASCONCELOS DA ROCHA GOMES**
Data: 27/08/2025 09:39:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
 **EDELTRUDES DE OLIVEIRA LIMA**
Data: 28/08/2025 12:46:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da R. Gomes
(Interno – UFPB)

Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
(Interno – UFPB)

Documento assinado digitalmente
 **ELOIZA HELENA CAMPANA**
Data: 01/09/2025 15:49:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
 **JOZINETE VIEIRA PEREIRA**
Data: 27/08/2025 22:25:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Eloiza Helena Campana
(Externo ao Programa – UFPB)

Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira
(Externo à Instituição – UEPB)

Documento assinado digitalmente
 **RICARDO DIAS DE CASTRO**
Data: 26/08/2025 16:45:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro
(Presidente – UFPB)

João Pessoa _ PB
2025

AGRADECIMENTOS

O primeiro e mais importante agradecimento que faço, com lágrimas nos olhos, é ao Pai misericordioso e provedor, aquele que cuidou de todos os detalhes, dos maiores aos menores, para que eu pudesse concluir o doutorado. Jesus, meu Deus e Senhor, a Ti devo minha vida! Muito obrigado!

Mulher sábia e que edifica o lar, parte essencial dessa realização, à minha esposa guerreira que tanto me auxiliou nessa trajetória, Renata Falcão, muito obrigado! Sem você certamente eu não conseguaria. Eu te amo!

Gabriel Falcão, nasceu no meio da jornada do doutorado, um milagre de Deus que veio para me ensinar tanto sobre tantos aspectos. Eu te agradeço por me fazer pai de uma criança maravilhosa como você. Você é a realização de um sonho que Jesus me permitiu viver. E como sou grato por isso! Te amo, meu filho!

Aos meus pais, representando todos os familiares, Josenildo Araújo Falcão e Eliete Dias Paredes, por terem me formado e repassado seus ensinamentos e conselhos, em especial à minha mãe por estar sempre presente e atuante. Pelo amor a mim entregue durante toda minha vida, muito obrigado!

Aos irmãos em Cristo que oraram, torceram e me incentivaram durante toda a jornada da pós-graduação, minha gratidão;

À Universidade Federal da Paraíba por toda assistência e suporte de infraestrutura na realização da pesquisa;

Ao programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos onde foi possível a concretização do trabalho;

Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro, um grande orientador que tanto me ensinou sobre pesquisa e vida acadêmica, que não media esforços em me ajudar. Obrigado pelos conhecimentos passados, pela motivação, pela compreensão e pela disponibilidade em me ensinar ao longo de todo esse tempo sob sua orientação;

Ao Grupo de Estudos em Farmacologia e Terapêutica em Odontologia pela oportunidade das trocas de conhecimentos e aprendizados;

Aos membros das bancas de qualificação e defesa de tese, entre titulares e suplentes, Prof. Dr. Felipe Sarmento Queiroga Guerra, Profa. Dra. Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori, Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral, Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes, Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, Profa. Dra. Eloiza Helena Campana, Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira, Profa. Dra. Margareth

de Fátima Formiga Melo Diniz e Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho pela participação nesse momento da minha vida acadêmica e pelas contribuições para a melhoria do trabalho;

Agradeço aos professores Luciana e Marcus Scotti (UFPB), Pedro Rosalen (USP), Juan Gonçalves (UFPB), Henrique Douglas (URCA/CE), João Felipe (CTP/UFPB) e à Fiocruz/PE pelas parcerias realizadas durante o estudo;

Gratidão, também, aos todos os professores que me instruíram durante as disciplinas cursadas nessa pós-graduação;

Aos colegas de turma por dividir algumas aflições conjuntas e pela ajuda mútua enquanto estivemos mais próximos;

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para que este trabalho fosse realizado.

"O temor do Senhor é o princípio da sabedoria, e o conhecimento do Santo é entendimento."

Provérbios 9:10

RESUMO

As infecções bacterianas, especialmente aquelas causadas por linhagens multirresistentes, representam um desafio relevante à saúde pública global, exigindo o desenvolvimento contínuo de novas estratégias terapêuticas e permanecendo como um foco prioritário na investigação científica. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito antibacteriano do *p*-cumarato de 4-clorobenzila, sua toxicidade, bem como investigar seu modo de ação. O composto foi testado para avaliar sua atividade frente a linhagens bacterianas nas formas planctônicas e em biofilme, sua toxicidade por meio de abordagens *in silico*, *in vitro* sobre fibroblastos gengivais humanos e *in vivo* em larvas de *Galleria mellonella*, o seu modo de ação e suas propriedades de inibição de bombas de efluxo e de modulação da atividade de antibióticos. Por análise computacional foram estimadas as previsões farmacocinéticas e através de metodologias de *docking* molecular e simulações de dinâmica molecular foram verificados os possíveis alvos de ação, além das interações com mecanismos de efluxo. Após triagem inicial contemplando 3 linhagens Gram-positivas e 5 linhagens Gram-negativas, a molécula apresentou atividade antibacteriana contra as bactérias Gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (CIM = 8 µg/mL; 27,77 µM) e *Enterococcus faecalis* (CIM = 16 µg/mL; 55,54 µM), promovendo sua eliminação em até 24 horas de contato. As avaliações toxicológicas foram promissoras nos modelos preditivos, demonstrando, nos modelos experimentais, baixa citotoxicidade até 16 µg/mL (55,54 µM) e baixa toxicidade sistêmica em todas as concentrações testadas. As previsões farmacocinéticas indicaram um perfil propício, incluindo adequação à administração oral. O composto reduziu o biofilme bacteriano em 71% na CIMx4 e penetrou na matriz extracelular para alcançar as células presentes no interior da estrutura, comprometendo sua arquitetura. A molécula apresentou maior afinidade de ligação e estabilidade do complexo com a enzima associada à membrana fosfatidilglicerol fosfato sintase (-113.343 kJ.mol⁻¹), além de apresentar menores flutuações nos resíduos e melhor flexibilidade estrutural com a DNA ligase dependente de NAD⁺ (< 0,3 nm). Também foram observadas interações moleculares com as proteínas de efluxo MepA e NorA e, experimentalmente, o composto inibiu essas bombas (brometo de etídio – MepA: CIM de 32 para 0,62 µg/mL; NorA: CIM de 64 para 0,50 µg/mL) promovendo a modulação da atividade de antibióticos (CIM do ciprofloxacino de 32 para 0,70 µg/mL e do norfloxacino de 128 para 8 µg/mL). O composto induziu alterações morfológicas tanto na superfície como no interior das células, culminando em lise celular e reduziu a concentração celular de DNA. Os achados deste estudo contribuem para a identificação de um novo composto com potencial para inibir bactérias Gram-positivas multirresistentes, incluindo efeitos sobre o biofilme. Sugerem, também, que a molécula pode exercer um mecanismo de ação duplo, interferindo tanto na síntese de fosfatidilglicerol como na replicação do DNA, além de apresentar propriedades inibitórias e moduladoras sobre bombas de efluxo. Ademais, o *p*-cumarato de 4-clorobenzila apresentou parâmetros toxicológicos favoráveis, sustentando a hipótese de que este composto pode ser considerado em propostas de pesquisa translacional como uma alternativa farmacológica oportuna para o combate a infecções causadas por bactérias Gram-positivas multirresistentes.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana. Modelagem molecular. Alvo de medicamento. Toxicidade. Resistência a antimicrobianos.

ABSTRACT

Bacterial infections, particularly those caused by multidrug-resistant strains, represent a major global public health challenge, demanding the continuous development of novel therapeutic strategies and remaining a priority focus in scientific research. Therefore, the present study aimed to evaluate the antibacterial effect of 4-chlorobenzyl *p*-coumarate, its toxicity, as well as to investigate its mode of action. The compound was tested for activity against bacterial strains in both planktonic and biofilm forms, toxicity through *in silico* approaches, *in vitro* assay on human gingival fibroblasts and *in vivo* assay in *Galleria mellonella* larvae, its mechanism of action and properties related to efflux pump inhibition and modulation of antibiotic activity. Pharmacokinetic predictions were estimated through computational analyses, and potential molecular targets, as well as interactions with efflux mechanisms, were verified by molecular docking and molecular dynamics simulations. Following an initial screening against three Gram-positive and five Gram-negative strains, the compound exhibited antibacterial activity against Gram-positive bacteria, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MIC = 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 27.77 μM) and *Enterococcus faecalis* (MIC = 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 55.54 μM), leading to bacterial elimination within 24 h of exposure. Toxicological evaluations yielded promising results, showing low cytotoxicity up to 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (55.54 μM) in experimental models and low systemic toxicity at all tested concentrations. Pharmacokinetic predictions suggested a favorable profile, including suitability for oral administration. The compound reduced bacterial biofilm biomass by 71% at 4xMIC and penetrated the extracellular matrix to reach cells within the structure, compromising its architecture. The molecule demonstrated higher binding affinity and complex stability with the membrane-associated enzyme phosphatidylglycerol phosphate synthase ($-113.343 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), in addition to exhibiting lower residue fluctuations and greater structural flexibility with NAD $^+$ -dependent DNA ligase ($<0.3 \text{ nm}$). Molecular interactions were also observed with the efflux proteins MepA and NorA, and experimentally, the compound inhibited these pumps (ethidium bromide – MepA: MIC from 32 to 0.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$; NorA: MIC from 64 to 0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), enhancing antibiotic activity (ciprofloxacin MIC from 32 to 0.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$; norfloxacin MIC from 128 to 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The compound induced morphological alterations on both the surface and the interior of bacterial cells, culminating in cell lysis, and reduced intracellular DNA content. Collectively, these findings support the identification of a novel compound with potential to inhibit multidrug-resistant Gram-positive bacteria, including biofilm-related effects. They also suggest that the molecule may exert a dual mechanism of action by interfering with both phosphatidylglycerol synthesis and DNA replication, while additionally displaying inhibitory and modulatory effects on efflux pumps. Furthermore, 4-chlorobenzyl *p*-coumarate exhibited favorable toxicological parameters, supporting its consideration in translational research as a promising pharmacological alternative to combat infections caused by multidrug-resistant Gram-positive bacteria.

Keywords: Antimicrobial activity. Molecular modeling. Drug target. Toxicity. Antimicrobial resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Acima: Mapa mundial das taxas de mortalidade por infecções bacterianas atribuídas à resistência aos antimicrobianos em 2021. Abaixo: Mapa mundial das taxas de mortalidade por infecções bacterianas atribuídas à resistência aos antimicrobianos previstas para 2050.....	25
Figura 2. Biossíntese e desconstrução do peptidoglicano.....	36
Figura 3. Mecanismo de ação da daptomicina.....	38
Figura 4. Superenrolamento do DNA pela DNA girase e ação as quinolonas.....	40
Figura 5. Mecanismos moleculares de resistência em <i>Staphylococcus aureus</i>	46
Figura 6. Mecanismos moleculares de resistência em <i>Enterococcus faecalis</i>	48
Figura 7. Representação da reação para a síntese do <i>pC4C</i>	56
Figura 8. Curvas de crescimento microbiano das linhagens <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 (a), <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) NCTC 13373 (b) e <i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 12981 (c) sob a ação do <i>pC4C</i> . Os resultados são apresentados como média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata (ANOVA one-way seguida pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,0001$ para todos os grupos).....	72
Figura 9. Mensuração do tempo de morte microbiana da linhagem <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina NCTC13373 sob a ação do <i>pC4C</i> . Os resultados são apresentados como média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata (ANOVA one-way seguida pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,0001$, exceto para <i>pC4C</i> 8 μ g/mL vs. controle em 0 h e <i>pC4C</i> 16 μ g/mL vs. vancomicina 4 μ g/mL em 24 h).....	73
Figura 10. Efeito inibitório do <i>pC4C</i> e vancomicina sobre o biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) NCTC 113373. Os resultados são apresentados como média ± DP de três experimentos independentes. Todos os grupos foram comparados entre si. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA one-way seguida pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).....	75
Figura 11. Porcentagem de viabilidade celular em fibroblastos gengivais humanos (FGH). Os FGH foram tratados com meio de cultura (M); <i>pC4C</i> nas concentrações de 3,47, 6,94, 13,89, 27,77, 55,54, 111,09, 222,18, 444,37 e 888,73 μ M (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 μ g/mL) e com o veículo DMSO (0,6%). A viabilidade dos fibroblastos foi determinada pelo método de MTT após 24 horas de tratamento. Os	

resultados são expressos como média \pm desvio padrão, n = 4. Todos os grupos foram comparados entre si e letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA one-way seguida pelo pós-teste de Tukey, p < 0,05).....	76
Figura 12. Toxicidade sistêmica de pC4C em modelo de larvas de <i>Galleria mellonella</i> . As larvas receberam tratamento com pC4C nas concentrações de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 μ g/mL (3,47, 6,94, 13,89, 27,77, 55,54, 111,09, 222,18, 444,37 e 888,73 μ M) e veículo DMSO (0,6%), sendo os sinais específicos verificados até 72 horas após o tratamento. O teste foi submetido à curva de sobrevivência (p < 0,05, teste de log-rank).....	77
Figura 13. Representação da absorção gastrointenstinal e penetração cerebral do p-cumarato de 4-clorobenzila (pC4C) pelo modelo <i>Boiled-Egg</i> . BHE (Barreira hematoencefálica); AGI (Absorção gastrointestinal); gP (Substrato de proteína de permeabilidade G + ou -).....	79
Figura 14. Interações 2D dos compostos pC4C (a) e do controle positivo cerulenina (b) com o alvo PgsA. Resíduos: Lys (Lisina), Pro (Prolina), Leu (Leucina), Asn (Asparagina), Ala (Alanina), Asp (Ácido Aspártico) e Val (Valina).....	81
Figura 15. Interações 2D dos compostos pC4C (a) e do controle positivo levofloxacino (b) com o alvo DNA ligase dependente de NAD ⁺ . Resíduos: Ser (Serina), Met (Metionina), Leu (Leucina), Tyr (Tirosina), Val (Valina), Arg (Arginina), Thr (Treonina), Pro (Prolina), Asp (Ácido Aspártico), Arg (Arginina), Gln (Glutamina) e Phe (Fenilalanina).....	82
Figura 16. Interações 2D dos compostos pC4C (a) e do controle positivo penicilina G (b) com o alvo proteína de ligação à penicilina 4 (PBP4). Resíduos: Glu (Ácido Glutâmico), Gln (Glutamina), Thr (Treonina), Tyr (Tirosina), Val (Valina), Ser (Serina), Asn (Asparagina), Gln (Glutamina), Thr (Treonina) e Gly (Glicina).....	84
Figura 17. Interações 2D dos compostos pC4C (a) e do controle positivo CCCP (b) com a bomba de efluxo alvo MepA (da família MATE, em <i>Staphylococcus aureus</i>). Resíduos: Gln (Glutamina), Glu (Ácido Glutâmico), Met (Metionina), Phe (Fenilalanina), Pro (Prolina), Arg (Arginina), Val (Valina) e Ala (Alanina), Ser (Serina) e Thr (Treonina).....	85
Figura 18. Interações 2D dos compostos pC4C (a) e do controle positivo CCCP (b) com a bomba de efluxo alvo NorA. Resíduos: Tyr (Tirosina), Phe (Fenilalanina), Met (Metionina), Ile (Isoleucina), Trp (Triptofano), Gly (Glicina) e Ser (Serina).....	86

Figura 19. Desvio Quadrático Médio - Proteína (RMSD-Proteína) do Carbono- α . Proteína: (A) Enzima da membrana celular: PgsA; (B) Enzima envolvida na replicação do DNA: DNA ligase dependente de NAD $^{+}$; (C) Enzima da parede celular: PBP4. Complexo: proteína (linha preta); composto <i>p</i> C4C (linha vermelha) e controle positivo (linha verde).....	88
Figura 20. Desvio Quadrático Médio - Ligante (RMSD-Ligante) do Carbono- α . Proteína: (A) Enzima da membrana celular: PgsA; (B) Enzima envolvida na replicação do DNA: DNA ligase dependente de NAD $^{+}$; (C) Enzima da parede celular: PBP4. Complexo: composto <i>p</i> C4C (linha vermelha) e controle positivo (linha verde).	89
Figura 21. Raio de giro. Proteína: (A) Enzima da membrana celular: PgsA; (B) Enzima envolvida na replicação do DNA: DNA ligase dependente de NAD $^{+}$; (C) Enzima da parede celular: PBP4. Complexo: proteína (linha preta); composto <i>p</i> C4C (linha vermelha) e controle positivo (linha verde).....	90
Figura 22. Raiz Quadrática Média de Flutuação (RMSF). Proteína: (A) Enzima da membrana celular: PgsA; (B) Enzima envolvida na replicação do DNA: DNA ligase dependente de NAD $^{+}$; (C) Enzima da parede celular: PBP4. Complexo: proteína (linha preta); composto <i>p</i> C4C (linha vermelha) e controle positivo (linha verde).....	91
Figura 23. (a) Imagens representativas da avaliação do dano à membrana por coloração com iodeto de propídio (IP) em células de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) NCTC13373, <i>Staphylococcus aureus</i> (SA) NCTC 12981 e <i>Enterococcus faecalis</i> (EF) ATCC 29212 incubadas com vancomicina e <i>p</i> C4C por 3 horas de tratamento. (b) Percentual de fluorescência das células bacterianas com membranas danificadas. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) de dois experimentos independentes realizados em duplicita, analisados por ANOVA one-way seguida do teste de Dunnett (* indica $p < 0,05$ versus controle). Ctrl (Grupo não tratado), CCI (Campo claro).....	94
Figure 24. Micrografias de transmissão eletrônica de <i>S. aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) NCTC 13373 e <i>Enterococcus faecalis</i> (EF) ATCC 29212 (a e b) tratados com vancomicina (c e d) e <i>p</i> C4C (e, f, g e h) por 3 horas. Ctrl (grupos não tratados), Van (vancomicina), <i>p</i> C4C (<i>p</i> -cumarato de 4-clorobenzila).....	96
Figura 25. Avaliação da lise celular pelo espectro visível (DO_{600nm}) de células de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) NCTC13373, <i>Staphylococcus aureus</i> (SA) NCTC 12981 e <i>Enterococcus faecalis</i> (EF) ATCC 29212 incubadas com	

DMSO, vancomicina (Van) e <i>p</i> C4C por 24 horas de tratamento. O ensaio foi realizado em triplicata e os dados são expressos como média ± EPM, analisados por ANOVA <i>one-way</i> seguida do teste de Dunnett (* indica $p < 0,05$). CC (controle de crescimento) refere-se ao grupo não tratado utilizado como controle negativo, DMSO (dimetilsulfóxido) foi empregado como controle veicular na maior concentração (1%), Van (vancomicina) foi utilizado como controle positivo, e CE (controle de esterilidade) corresponde ao controle de esterilidade do meio.....	97
Figura 26. Biofilmes bacterianos de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) NCTC13373 antes e após o tratamento com <i>p</i> C4C nas concentrações de 27,77, 111,09 e 277,73 μ M (8, 32 e 80 μ g/mL) e vancomicina (Van) nas concentrações de 1,38, 5,52 e 13,80 μ M (2, 8 e 20 μ g/mL), corados com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP), e analisados por MCVL. Ctrl (Grupo não tratado).....	98
Figura 27. Impacto do <i>p</i> C4C na concentração de DNA (a); Eletroforese em gel de agarose do DNA genômico de <i>E. faecalis</i> (b). * $p < 0,0001$ indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A significância estatística foi avaliada por ANOVA unidirecional, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. CN (controle negativo); <i>p</i> C4C (<i>p</i> -cumarato de 4-clorobenzila); DMSO (dimetilsulfóxido).....	99
Figura 28. Ensaio do brometo de etídio para avaliação da inibição do efluxo. A CIM foi avaliada em culturas de <i>Staphylococcus aureus</i> K2068, portadora da bomba de efluxo MepA, e <i>S. aureus</i> 1199B, portadora da bomba NorA, tratadas com CCCP e <i>p</i> C4C em associação com brometo de etídio. **** $p < 0,0001$ indica diferenças significativas entre os grupos. Os resultados foram expressos em média geométrica ± desvio padrão, avaliados estatisticamente por ANOVA unidirecional seguido do teste post-hoc de Bonferroni.....	101
Figura 29. Modulação da atividade antibiótica contra linhagens portadoras de bomba de efluxo. 4CpC foi testado em combinação com ciprofloxacino e norfloxacino contra <i>Staphylococcus aureus</i> K2068 e 1199B carreadoras das proteínas de efluxo MepA e NorA, respectivamente. **** $p < 0,0001$ indica diferenças significativas entre os grupos. Os resultados foram expressos em média geométrica ± desvio padrão, avaliados estatisticamente por ANOVA unidirecional seguido pelo teste post-hoc de Bonferroni.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Subletal Máxima (CSM) do <i>p</i> -cumarato de 4-clorobenzila, vancomicina e polimixina contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	70
Tabela 2. Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) após a combinação entre <i>p</i> C4C e vancomicina sobre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.....	74
Tabela 3. Dados toxicológicos <i>in silico</i> estimados pela plataforma pkCSM.....	78
Tabela 4. Valores de energia de ligação (kJ.mol ⁻¹) do composto <i>p</i> C4C com os alvos em estudo, segundo o algoritmo MolDock Score.....	80
Tabela 5. Contribuições das energias de Coulomb e Lennard-Jones para os compostos em estudo com a enzima alvo da membrana celular: PgsA.....	92
Tabela 6. Contribuições das energias de Coulomb e Lennard-Jones para os compostos em estudo com a enzima alvo envolvida na replicação do DNA: DNA ligase dependente de NAD+.....	92
Tabela 7. Contribuições das energias de Coulomb e Lennard-Jones para os compostos em estudo com a enzima alvo da parede celular: PBP4.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus centígrados

2D – Duas dimensões

3D – Três dimensões

ABHI – Agar *Brain Heart Infusion*

ADME – Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção

AhpC – Alquil hidroperóxido redutase C

Als – Autoindutoras

Akt/PKB – Proteína cinase B

AMH – Agar Mueller Hinton

AMPs – Peptídeos antimicrobianos

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATP – Trifosfato de adenosina

BGNNFs – Bacilos Gram negativos não fermentadores

Ca²⁺ – Íon cálcio

CatA – Catalase

CBHI – Caldo *Brain Heart Infusion*

CBM – Concentração bactericida mínima

CBS – *Centraalbureau voor Schimmelcultures*

CCCP – Carbonilcianeto *m*-clorofenilhidrazona

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CIM – Concentração inibitória mínima

CL – Concentração letal

cls – Cardiolipina sintase

CLSI – *Clinical & Laboratory Standards Institute*

CMH – Caldo Mueller Hinton

CRE – Enterobacteriales resistentes aos carbapenêmicos

CSM – Concentração subletal máxima

CYP450 – Citocromo P450

DglcDAG – Diglucosil-diacilglicerol

DL – Dose letal

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsufóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade óptica

EF – *Enterococcus faecalis*

EMA – *European Medicines Agency*

EPA/epa – Antígeno polissacarídeo enterocócico

EROs – Espécies reativas ao oxigênio

ESBL – β -lactamase de espectro estendido

EtBr – Brometo de etídio

EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FAK – Cinases de adesão focal

FDA – *Food and Drug Administration*

FIC – Concentração inibitória fracionada

FICI – Índice de concentração inibitória mínima fracionada

FnBP – Proteína de ligação à fibronectina

FTIR – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

gdpD – Glicerofosforil-diéster-fosfodiesterase

GelE – Gelatinase E

gP – Glicoproteína de permeabilidade

HGF-1 – Fibroblasto Gengival Humano-1

HIA – Agar *Heart Infusion*

IFN- α – Interferon- α

IP – Iodeto de propídeo

IRAS – Infecções relacionadas à assistência em saúde

ISO – *International Organization for Standardization*

IV – Infravermelho

K⁺ – Íon potássio

KBr – Brometo de potássio

kJ - Quilojoule

KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

LA – Laranja de acridina

liaF – Componente de resposta de detecção de estresse

LPS – Lipopolissacarídeo

LRE – *Enterococcus* resistente à linezolida

LTA – Ácido lipoteicoico

MATE – *Multidrug and toxic compound extrusion*

MBL – Metalo-β-lactamase

MCVL – Microscopia confocal de varredura a laser

MEP – Matriz extracelular polimérica

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MFS – *Major facilitator superfamily*

MHCII – Complexo de histocompatibilidade classe II

MPO – Mieloperoxidase

MR/MDR – Multirresistentes/Multi-droga resistentes

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

MRTD – Dose Máxima Recomendada Tolerada

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

MVD – *Molegro Virtual Docker*

NaCl – Cloreto de sódio

NAD⁺ – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NCTC – *National Collection of Type Cultures*

NETs – Armadilhas extracelulares de neutrófilos

NF-κB – Fator nuclear kappa B

OCT2 – *Organic Cation Transporter 2*

OMS – Organização Mundial de Saúde

ONU – Organização das Nações Unidas

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

PBP – Proteína ligadora de penicilina

PBS – Tampão fosfato salino

pC4C – *p*-cumarato de 4-clorobenzila

pCoA – Ácido *p*-cumárico

PDB – *Protein Data Bank*

PgsA – Fosfatidilglicerol fosfato sintase

PGPS – CDP-diacilglicerol-glicerol-3-fosfato 3-fosfatidil transferase

PI3K – Fosfoinositol-3-cinase

PKC – Proteína cinase C

PM – Peso molecular

PNAG – Exopolissacarídeo poli-N-acetil glucosamina

PRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à penicilina

PSGL-1 – Ligante-1 da glicoproteína P-selectina

RAM – Resistência aos antimicrobianos

RMN – Ressonância magnética nuclear

RMSD – *Root Mean Square Deviation*

RMSF – *Root Mean Square Fluctuation*

RNA – Ácido ribonucleico

SA – *Staphylococcus aureus*

SCIN – Substância inibidora do complemento estafilocócico

SFB – Soro fetal bovino

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

SPIN – Proteína inibidora de peroxidase estafilocócica

SSL5 – Proteína 5 semelhante a superantígeno estafilocócico

TGI – Trato gastrointestinal

TNF – Fator de necrose tumoral

TSA – Teste de sensibilidade a antimicrobianos

TSST-1 – Toxina do choque tóxico

UFC – Unidades formadoras de colônia

UV – Ultravioleta

VISA – *Staphylococcus aureus* intermediário à vancomicina

VDss – Volume de distribuição em estado estacionário

VRE – *Enterococcus* resistente à vancomicina

VRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina

WTA – Ácido teicoico

µg/mL – Micrograma por mililitro

µM – Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Geral.....	23
2.2 Específicos.....	23
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	24
3.1 Aspectos epidemiológicos das infecções bacterianas.....	24
3.2 <i>S. aureus</i> e <i>E. faecalis</i> , fatores de virulência e vias de transdução.....	28
3.3 Mecanismos moleculares dos antimicrobianos frente a alvos de parede, membrana e DNA bacterianos.....	33
3.4 Resistência antibacteriana em <i>S. aureus</i> e <i>E. faecalis</i>	41
3.5 Produtos naturais e semissintéticos.....	48
3.6 Ácido <i>p</i> -cumárico (<i>p</i> CoA) e <i>p</i> -cumarato de 4-clorobenzila (<i>p</i> C4C).....	50
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1 Locais de pesquisa.....	53
4.2 Linhagens celulares.....	54
4.3 Antimicrobianos e reagentes.....	54
4.4 Preparação química e caracterização do composto.....	55
4.5 Avaliação da atividade antibacteriana do <i>p</i> C4C.....	56
4.5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Subletal Máxima (CSM).....	56
4.5.2 Cinética de crescimento bacteriano.....	57
4.5.3 Cinética de morte bacteriana.....	57
4.5.4 Teste de ação combinada.....	58
4.5.5 Ensaio de ruptura do biofilme bacteriano formado.....	58
4.6 Ensaios de toxicidade.....	59
4.6.1 Avaliação da citotoxicidade sobre fibroblastos FGH.....	59
4.6.2 Ensaio de toxicidade sistêmica em larvas de <i>Galleria mellonella</i>	60
4.7 Análises <i>in silico</i>	61
4.7.1 Predições toxicológicas e farmacocinéticas.....	61
4.7.2 Docking molecular.....	61

4.7.3 Dinâmica molecular.....	63
4.8 Identificação do modo de ação do <i>pC4C</i>	64
4.8.1 Ensaio de integridade de membrana e viabilidade bacteriana.....	64
4.8.2 Avaliação de alterações morfológicas por MET.....	64
4.8.3 Ensaio de lise celular.....	65
4.8.4 Análise da atividade antibiofilme por MCVL.....	65
4.8.5 Análise do efeito do composto sobre o DNA.....	66
4.9 Modulação à resistência bacteriana.....	66
4.9.1 Ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	66
4.9.2 Avaliação da inibição de bombas de efluxo MepA e NorA pelo método do brometo de etídio.....	67
4.9.3 Análise da atividade modulatória de <i>pC4C</i> sobre a resistência antibiótica.....	67
4.10 Tratamento de dados e análise estatística.....	68
5 RESULTADOS.....	69
5.1 Preparação química e caracterização do composto.....	69
5.2 Avaliação da atividade antibacteriana do <i>pC4C</i>	69
5.2.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Subletal Máxima (CSM).....	69
5.2.2 Cinética de crescimento bacteriano.....	71
5.2.3 Cinética de morte bacteriana.....	73
5.2.4 Teste de ação combinada.....	74
5.2.5 Ensaio de ruptura do biofilme bacteriano formado.....	74
5.3 Ensaios de toxicidade.....	75
5.3.1 Avaliação da citotoxicidade sobre fibroblastos FGH.....	75
5.3.2 Ensaio de toxicidade sistêmica em larvas de <i>Galleria mellonella</i>	76
5.4 Análises <i>in silico</i>	77
5.4.1 Predições toxicológicas e farmacocinéticas.....	77
5.4.2 Docking molecular.....	79
5.4.3 Dinâmica molecular.....	87
5.5 Identificação do modo de ação do <i>pC4C</i>	93
5.5.1 Ensaio de integridade de membrana e viabilidade bacteriana.....	93
5.5.2 Avaliação de alterações morfológicas por MET.....	94
5.5.3 Ensaio de lise celular.....	96

5.5.4 Análise da atividade antibiofilme por MCVL.....	97
5.5.5 Análise do efeito do composto sobre o DNA.....	98
5.6 Modulação à resistência bacteriana.....	99
5.6.1 Ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	99
5.6.2 Avaliação da inibição de bombas de efluxo MepA e NorA pelo método do brometo de etídio.....	100
5.6.3 Análise da atividade modulatória de <i>pC4C</i> sobre a resistência antibiótica.....	101
6 DISCUSSÃO.....	103
7 CONCLUSÃO.....	124
REFERÊNCIAS.....	125
APÊNDICE A – Perfil de resistência a fármacos apresentado pelo <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) NCTC 13373. Leitura realizada no sistema Siemens® MicroScan® WalkAway®96 Plus.....	141
APÊNDICE B – Perfil de resistência a fármacos apresentado pela <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC) NCTC 13809. Leitura realizada no sistema Siemens® MicroScan® WalkAway®96 Plus.....	142
APÊNDICE C – Artigo publicado.....	143
APÊNDICE D – Artigo submetido.....	144
ANEXO A – Espectros do <i>pC4C</i>	145

1 INTRODUÇÃO

O avanço no campo científico para a descoberta, estudo e desenvolvimento de novas moléculas contribui para a proposição de novos planejamentos terapêuticos para doenças de difícil tratamento, alimentando a esperança da população que sofre com problemas de saúde. Apesar de já existir a disponibilidade de medicamentos para as diferentes patologias, restrições como baixa eficácia, toxicidade e efeitos colaterais dificultam as terapias (Jackson, Czaplewski e Piddock, 2018). As infecções bacterianas sempre foram consideradas um grande problema mundial, sobretudo aos aspectos que tangem as resistências ao arsenal terapêutico disponível e, por esse motivo, estratégias em pesquisa e desenvolvimento devem receber impulsionamento global em curto, médio e longo prazos, devendo incluir fármacos ativos tanto contra bactérias multidrogarresistentes (MDR) como para bactérias comunitárias (Jackson, Czaplewski e Piddock, 2018; Tacconelli *et al.*, 2018).

Os Estados Unidos, através da *Food and Drug Administration* (FDA) e a União Europeia, através da *European Medicines Agency* (EMA), assim como o Brasil, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), têm tornado públicos vários guias documentais e incentivos a respeito do registro de substâncias antimicrobianas levantando o tema da necessidade de antimicrobianos que sejam efetivamente ativos principalmente contra bactérias multirresistentes. As recomendações para dosagens desses agentes devem ser baseadas nas relações que entregam informações entre a exposição ao agente e a sua resposta embasada na eficácia, toxicidade e manifestações de possíveis mecanismos de resistência como também em dados sobre atividade pré-clínica e pontos de corte diagnósticos, assim como os descritos pela *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Andrei, Droc e Stefan, 2019; Corrêa *et al.*, 2022; Muller, Theuretzbacher e Mouton, 2015; Murthannagari, Thumpati e Gnk, 2024).

Dentre as preocupações geradas por patógenos bacterianos, as infecções causadas por bactérias Gram-positivas, como os *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, representam um desafio clínico significativo tanto em ambientes

hospitalares como nos comunitários. Esses microrganismos possuem a habilidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos disponíveis reduzindo substancialmente as opções de terapia medicamentosa. Essa resistência tem contribuído para o aumento da morbidade e da mortalidade associadas a essas infecções, configurando um problema de saúde pública com impacto crescente (Ahmed e Baptiste, 2018; Gergova, Boyanov e Muhtarova, 2024; Michalik, Podbielska-Kubera e Dmowska-Koroblewska, 2025).

A avaliação de novas substâncias e análise da sua atividade antimicrobiana, bem como a elucidação da forma de ação e de como essa ação afeta e modifica as células-alvo constituem uma fase crucial no desenvolvimento de novos medicamentos. Para mais, a toxicidade de novas substâncias constitui um desafio para futuras aplicações clínicas (Cheng *et al.*, 2016; Sazonova *et al.*, 2022).

Diante desses desafios, compostos obtidos na natureza ou produzidos a partir de síntese orgânica, com reconhecida atividade antimicrobiana têm se mostrado alternativas promissoras. Os compostos bioativos naturais com polifenóis como ativo principal são reportados pelo potencial biológico (Contardi *et al.*, 2019). Dentro destes, destacam-se os ácidos hidroxicinâmicos como os ácidos ferúlico (FeA), cafeico (CaA) e *p*-cumárico (*p*CoA) que são encontrados na dieta humana, estando presentes em vinhos, legumes, frutas e cana-de-açúcar (Contardi *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2019). O *p*CoA é um metabólito fenólico secundário presente de forma extensa na natureza e que por exibir promissoras propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, quimioprotetora, antidiabética, antimicrobiana e neuro-hepato protetoras mostra-se uma relevante molécula de pesquisa (Ferreira *et al.*, 2019).

Uma coleção de derivados de *p*-cumaratos foi obtida por meio de processos de semissíntese a partir do *p*CoA e avaliada quanto à sua atividade antimicrobiana. Dentro os compostos analisados, o *p*-cumarato de 4-clorobenzila (*p*C4C) destacou-se por apresentar resultados promissores frente a leveduras de *Candida* (Lopes, 2022). Ensaios subsequentes conduzidos por nosso grupo de pesquisa demonstraram que essa molécula apresentou concentrações inibitórias mínimas (CIM) variando entre 3,9 µg/mL (13,54 µM) e 62,5 µg/mL (217,01 µM) contra 16 diferentes linhagens de *Candida*, com evidências de ação dirigida à membrana

plasmática fúngica (Melo *et al.*, 2024). Esses achados sustentam a hipótese de que a referida molécula, em baixas concentrações, apresenta atividade antibacteriana, atuando por meio de mecanismos que eliminem e/ou inibam a multiplicação de diferentes espécies bacterianas clinicamente relevantes, incluindo as multirresistentes aos antibióticos disponíveis para uso clínico.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana e a toxicidade do *pC4C*, bem como investigar seu modo de ação por meio de abordagens *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

Esta tese está estruturada em uma seção teórica inicial, seguida por seções que correspondem aos diferentes conjuntos experimentais. A seção intitulada **“Avaliação da atividade antibacteriana do *pC4C*”** descreve os efeitos da molécula frente aos microrganismos testados. Em **“Ensaios de toxicidade”** são apresentadas análises relacionadas à toxicidade do composto. A seção **“Análises *in silico*”** compreende previsões de propriedades moleculares e possíveis locais de interação celular, contribuindo para a elucidação dos mecanismos de ação. Em **“Identificação do modo de ação do *pC4C*”**, são investigados os processos biológicos mediados pela molécula. Por fim, a seção **“Modulação à resistência bacteriana”** aborda o potencial do composto em atenuar mecanismos de resistência microbiana.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a atividade antibacteriana e a toxicidade do *p*-cumarato de 4-clorobenzila, bem como investigar seu modo de ação contra microrganismos clinicamente relevantes.

2.2 Específicos

- a)** Determinar as concentrações inibitória mínima, bactericida mínima e subletal máxima sobre os microrganismos testados;
- b)** Avaliar as cinéticas de crescimento e de sobrevivência dos microrganismos tratados;
- c)** Verificar possível ação associativa com antimicrobiano clinicamente utilizado;
- d)** Avaliar ação do composto sobre biofilme formado e descrever as possíveis alterações em sua estrutura;
- e)** Avaliar a toxicidade do composto por meio de ensaios *in silico*, *in vitro* e *in vivo*;
- f)** Realizar estudos moleculares *in silico* (*Docking* molecular, Dinâmica molecular, ADME);
- g)** Verificar possível dano causado à membrana e/ou parede celular;
- h)** Descrever possíveis alterações morfológicas nas estruturas celulares dos microrganismos após o tratamento;
- i)** Avaliar a ocorrência de lise celular induzida pelo composto;
- j)** Investigar possíveis interações do composto com o DNA bacteriano;
- k)** Analisar atividade inibitória sobre bombas de efluxo;
- l)** Avaliar a capacidade do composto em modular a resistência microbiana.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Aspectos epidemiológicos das infecções bacterianas

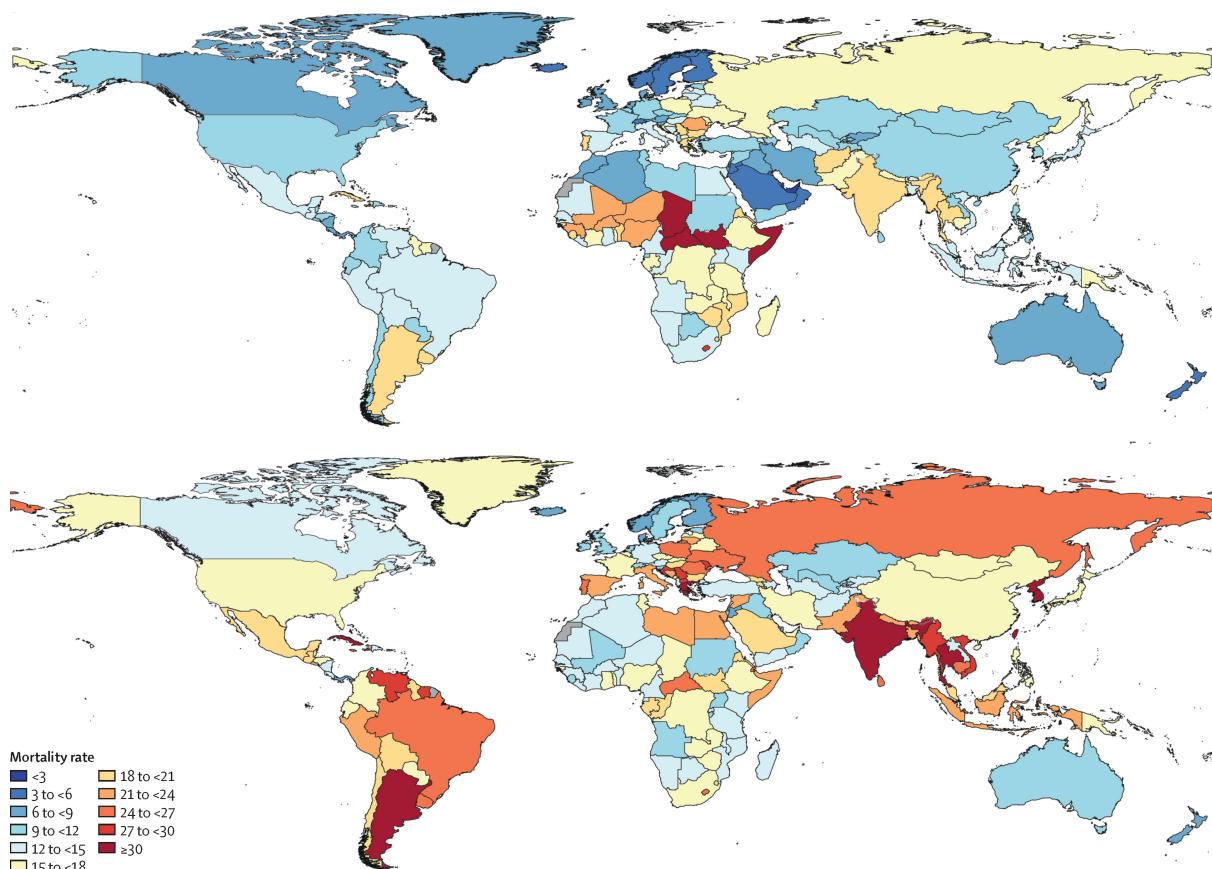
Independente do nível de desenvolvimento em que as nações se encontram, é observado um crescimento nas taxas de infecções com o surgimento de novos mecanismos de resistência entre linhagens de microrganismos, estando, esses, ligados ao comportamento individual, às políticas regulamentadoras, à atuação dos profissionais de saúde, às indústrias de cuidados com a saúde e ao manejo no setor agropecuário (Caniça *et al.*, 2019; *World Health Organization*, 2020a). Em 2019, infecções foram ranqueadas entre as dez maiores causas de morte no mundo, e.g. as infecções do trato respiratório baixo, em quarto lugar, que conduziram 2,6 milhões de mortes, e as infecções neonatais gerais e sepse, na quinta posição com 2 milhões de mortes (*World Health Organization*, 2020b).

Conforme os *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (2019), só nos Estados Unidos, bactérias multidrogas resistentes (MDR) são responsáveis por mais de 2,8 milhões de doenças por ano, das quais mais de 35 mil registram desfecho em mortalidade. Ademais, bactérias resistentes a antibacterianos são responsáveis por 700 mil óbitos a cada ano no mundo e podem causar, até o ano de 2050, mais de 10 milhões de mortes anualmente por doenças de origem infecciosa, ocasionando um custo econômico global acumulado estimado em 100 trilhões de dólares. As mortes estimadas para 2050 são previstas em maior número no eixo sul do mundo nas regiões da América Latina, incluindo o Brasil, Caribe e sul da Ásia, regiões em desenvolvimento (Figura 1) (Lancet, 2024). Apenas ao sistema de saúde americano, o custo extra anual seria de 20 bilhões de dólares (O'Neill, 2014, 2016). Ainda em 2021 foram estimadas, globalmente, 4,71 milhões de mortes tendo relação com as resistências em infecções bacterianas, dentre as quais 1,14 milhões foram atribuídas à resistência antimicrobiana (Lancet, 2024).

Staphylococcus aureus resistente à meticilina e *Escherichia coli* representam dois dos indicadores dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da resistência aos antimicrobianos (RAM) pela Organização das Nações Unidas (ONU) expressando níveis medianos globais de resistência de 35 e 42%, em 2020,

respectivamente, e, não só as infecções hospitalares, mas as infecções bacterianas comunitárias mostraram-se mais resistentes aos tratamentos medicamentosos. Nesse mesmo ano, as infecções mais frequentemente relatadas foram as de corrente sanguínea representando 17% das infecções bacteriologicamente confirmadas e as do trato urinário com 82% desses números, sendo a *E. coli* o patógeno mais isolado (World Health Organization, 2022).

Figura 1. Acima: Mapa mundial das taxas de mortalidade por infecções bacterianas atribuídas à resistência aos antimicrobianos em 2021. Abaixo: Mapa mundial das taxas de mortalidade por infecções bacterianas atribuídas à resistência aos antimicrobianos previstas para 2050.



Fonte: Lancet (2024) adaptado.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou, em (2024), a sua lista de bactérias patogênicas prioritárias entre as quais encontram-se no grupo crítico as Enterobacterales resistentes aos carbapenêmicos (CRE) e à cefalosporinas de terceira geração, *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmicos e a *Mycobacterium tuberculosis* resistente à rifampicina. No grupo de alta prioridade estão a *Salmonella typhi*, *Salmonella* não tifoidal e *Shigella* spp. resistentes à fluoroquinolonas, *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE),

Pseudomonas aeruginosa resistente a carbapenêmicos, *Neisseria gonorrhoeae* resistente à fluoroquinolonas e/ou à cefalosporinas de terceira geração e a *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). No grupo de média prioridade estão os estreptococos do grupo A e *Streptococcus pneumoniae* resistentes aos macrolídeos, *Haemophilus influenzae* resistente à ampicilina e os estreptococos do grupo B resistentes à penicilina. Estas estão entre as ameaças avaliadas pela Organização. Mais da metade dos óbitos causados por bactérias no mundo, em 2019, tiveram como principais agentes cinco espécies principais: *S. aureus*, *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* e *P. aeruginosa* (Lancet, 2022).

Entre 2004 e 2019 foram documentados, na China Continental, 28,8 milhões de casos de doenças infecciosas bacterianas com uma média anual de 134 casos para cada 100.000 habitantes. Apesar dos números, houve um declínio de 1,87% quando se compara os casos de 2004 com os de 2019. Entre as infecções bacterianas, destacam-se a tuberculose com 72.60 e a sífilis com 25.74 por 100.000 como as maiores médias de incidências anuais. Coqueluche, causada por *Bordetella pertussis*, teve um aumento significante de 53,99% por ano entre 2013 e 2019 (Zhu et al., 2023).

Foram registradas, em 2019, 5,2 milhões de mortes por doenças infecciosas em crianças menores de 5 anos no mundo. A África subsariana liderou esse ranking com 53% desses casos. Ressalta-se que *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* são três das bactérias mais conhecidas que provocam meningite em países subdesenvolvidos (Yamba et al., 2021).

No Brasil, em 2016, foi verificada, entre as bactérias Gram-positivas, resistência à oxacilina em 74,9% das amostras de *Staphylococcus coagulase negativa* e 57,4% das amostras de *S. aureus* e à vancomicina em 28,8% dos *Enterococcus* spp. Para as bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGNNFs) observou-se, em 2015, resistência aos carbapenêmicos em 77,4% dos *Acinetobacter* spp. e 39,1% de *Pseudomonas aeruginosa* e entre os membros da ordem Enterobacterales reportou-se resistência aos carbapenêmicos e às cefalosporinas de terceira e quarta gerações em 9,7% para *E. coli*, 43,3% para *K. pneumoniae* e 21,6% para *Enterobacter* spp. (Brasil, 2017).

As estimativas econômicas médias e totais calculadas por paciente com infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) no Brasil demonstraram que o custo diário por paciente portador de IRAS supera em 55% os custos de um paciente sem IRAS (Brasil, 2021).

S. aureus é um microrganismo comensal que coloniza de forma persistente pele e mucosas de aproximadamente 30% da população mundial, habitando, de maneira transitória, outros 60% da população (Craft *et al.*, 2019). É sugerido que MRSA atinge, anualmente, mais de 150 mil pacientes da União Europeia causando um prejuízo para o sistema de saúde de 380 milhões de euros com custos hospitalares extras, sendo o custo excedente médio entre 5.700 e 10.000 euros por paciente acometido por MRSA (Garoy *et al.*, 2019). Estimou-se, também, que em 2012, *S. aureus* casou bacteremias em uma taxa de incidência de 20 a 50 casos/100 mil/ano, levando a óbito entre 10 e 30% dos pacientes acometidos. Ademais, em 2018, nos Estados Unidos, MRSA causou cerca de 20 mil mortes, sendo a taxa mais alta entre microrganismos resistentes (Cheung, Bae e Otto, 2021). Essa linhagem é altamente prevalente em hospitais apresentando altas taxas de incidência (> 50%) nas Américas do Norte e do Sul, Ásia e Malta; taxas intermediárias (entre 25 e 50%) na Austrália, China, África e diferentes países europeus como Portugal (49%), Itália (37%), Grécia (40%) e Romênia (34%); e baixa incidência em outros países europeus como a Holanda e a Escandinávia (Craft *et al.*, 2019).

Dentre as bactérias Gram-positivas, *Enterococcus* spp. representam a principal etiologia nas infecções do trato urinário. Esses microrganismos também são responsáveis, globalmente, por cerca de 10% das bacteremias instaladas (Archambaud *et al.*, 2024). Além das infecções hospitalares, aos enterococos são atribuídos 5 a 20% dos casos de endocardite comunitária (Fiore, Tyne e Gilmore, 2019). *E. faecalis* é o principal agente causador das infecções enterocócicas, sendo relacionado a aproximadamente 80 a 90% dos casos de infecções hospitalares ligadas a enterococos. Por outro lado, entre os enterococos, *E. faecium* tem sido relatado como mais suscetível a alterações que culminam em resistência microbiana (Goh *et al.*, 2017). Dos pacientes avaliados, 80% dos isolados de *E. faecalis* em Roma, na Itália; 57 % em Pamplona, na Espanha; 100 % dos isolados

de hemoculturas no Reino Unido; 93 % nos Estados Unidos; 59 % na Polônia e 100 % dos isolados de infecções urinárias em Okayama, no Japão formavam biofilme (Mohamed e Huang, 2007).

3.2 *S. aureus* e *E. faecalis*, fatores de virulência e vias de transdução

As superfícies do corpo do ser humano são naturalmente habitadas por inúmeras espécies de microrganismos que convivem de forma equilibrada, a microbiota normal. Diversos desses microrganismos são bactérias que podem agir de forma oportunista a um declínio defensivo qualquantitativo tornando-se patogênicas (Kolář, 2022). As infecções bacterianas são causadas pelo crescimento bacteriano, invasão de tecidos e/ou pela liberação de toxinas no local em que esse microrganismo se encontra podendo afetar qualquer parte do corpo do ser humano (Popoff, 2020; Soni, Sinha e Pandey, 2024).

Staphylococcus aureus e *Enterococcus faecalis* são bactérias Gram-positivas oportunistas e apresentam importância devido às suas altas taxas de incidência em infecções humanas e por terem desenvolvido, ao longo dos anos, diferentes tipos de mecanismos de resistência aos antimicrobianos. *S. aureus* são comumente encontradas na pele e mucosas, enquanto que *E. faecalis* colonizam o trato gastrointestinal de seres humanos (Ahmed e Baptiste, 2018; Craft *et al.*, 2019).

A despeito de existirem numerosas possibilidades na relação entre agentes etiológicos e tipos de infecções importantes no âmbito clínico, destacam-se, entre as bactérias Gram-positivas, *S. aureus*, identificada pela primeira vez em 1884, uma das bactérias mais disseminadas, causadora desde infecções de pele não complicadas como os abcessos, furúnculos e celulites até infecções invasivas mais complexas como as pleuropulmonares, endocardites, infecções ligadas a instrumentos médico-hospitalares, sendo o agente mais prevalente e destrutivo em osteomielites (Leme, Bispo e Salles, 2021; Masters *et al.*, 2022; Qadri *et al.*, 2023) e *E. faecalis*, uma das mais notáveis espécies do gênero enterococos. Os enterococos, até 1984, eram classificados como estreptococos do grupo D, sendo reclassificados após estudos relatarem a distância genética entre os microrganismos. Resistente a vários tratamentos antimicrobianos, *E. faecalis* pode causar endocardite, bacteremia, infecções do trato urinário associadas às sondas

hospitalares, sobrevivendo a um amplo range de condições de temperatura, pH e variações osmóticas (Ahmed e Baptiste, 2018; Fiore, Tyne e Gilmore, 2019; Qadri *et al.*, 2023).

A habilidade das bactérias em aderir, invadir, colonizar e adaptar-se a um organismo hospedeiro define sua virulência. Os fatores relacionados a essa facilitação são denominados fatores de virulência. Esses fatores podem ser estruturas, sistemas ou moléculas produzidas pelo microrganismo e são associados à superfície celular, auxiliando na adesão à célula hospedeira e evasão do sistema de defesa local, ou ao citosol, ajudando nas mudanças fisiológicas e metabólicas, além de produtos secretados, como toxinas, enzimas e exopolissacarídeos (Leitão, 2020; Sharma *et al.*, 2017).

A adesão bacteriana aos tecidos é um processo importante no mecanismo de virulência, visto que é o primeiro passo para a internalização celular e para a formação de biofilmes. *S. aureus* expressam proteínas de superfície como a proteína A, a proteína de ligação ao fibrinogênio e a proteína de ligação à fibronectina (FnBP) que, entre outras, facilitam a adesão aos tecidos. A FnBP-Fn- $\alpha 5\beta 1$ integrina é a principal via de adesão de *S. aureus*. A interação entre essas proteínas desencadeia a cascata de sinalização FAK (cinases de adesão focal), Src, PI3K (fosfoinositol-3-cinase), Akt/PKB (proteína cinase B) mobilizando o citoesqueleto de actina para que ocorra a endocitose (Josse, Laurent e Diot, 2017).

E. faecalis possui proteínas de superfície como a LpxTG, Asa1 e glicopolímeros como o ácido teicoico (WTA), o ácido lipoteicoico (LTA) e o antígeno polissacarídeo enterocócico (EPA) que dirigem a interação inicial às células epiteliais, incluindo as intestinais, renais, da bexiga, assim como células endoteliais, fibroblastos e hepatócitos. Ancorado no LTA, o glicopeptídeo diglucosil-diacilglicerol (DglcDAG) parece se ligar às células do hospedeiro por meio da interação com a heparina e o sulfato de heparina. Ademais, a alanização do LTA aumenta a adesão bacteriana para alguns tipos celulares. Para o processo de internalização, *E. faecalis* utiliza diferentes mecanismos como a macropinocitose e através do receptor fosfolipídico PAFr que parece mediar a translocação do microrganismo para o interior da célula intestinal. Em todos os casos, *E. faecalis* necessita da

polimerização da actina para a efetivação do processo de internalização (Archambaud et al., 2024; Goh et al., 2017).

A aderência das bactérias para a formação do biofilme é, também, influenciada pelo fornecimento de cargas às suas superfícies externas pelas propriedades do WTA que é encontrado nas paredes celulares das bactérias Gram-positivas (Ruhal e Kataria, 2021).

Em um ambiente desfavorável, após a aderência celular em um sistema biótico ou abiótico, há o estímulo para a formação de uma matriz extracelular polimérica (MEP) composta de polissacarídeos extracelulares, DNA exógeno, proteínas e lipídios que envolve as bactérias protetendo-as contra fagocitose, substâncias antibacterianas, desinfetantes, componentes do sistema imunológico e inflamatório. A MEP também permite a nutrição das células dentro do biofilme possibilitando a captura de elementos cruciais para as células como o carbono, nitrogênio e fósforo (Oliveira, Borges e Simões, 2018; Zhao, Sun e Liu, 2023).

Uma das substâncias primárias sintetizadas por *S. aureus* para a formação inicial da MEP é a N-acetil- β -(1-6)-glucosamina que é uma adesina intercelular polissacarídica (Craft et al., 2019). Entre os fatores implicados ao processo de formação de biofilme de *E. faecalis* estão os genes *fsr*, *gelE*, *epa* e *atn*. O gene *epa* (antígeno polissacarídico enterocócico), por exemplo, codifica uma glicosiltransferase que compõe a síntese de polissacarídeos envolvidos na produção do biofilme (Mohamed e Huang, 2007).

Em comunidades bacterianas, como nos biofilmes, o sistema *quorum sensing* regula o comportamento bacteriano através da síntese de pequenas moléculas autoindutoras (Als), que processam a comunicação célula a célula baseada na densidade populacional. Esse sistema de detecção é codificado pelo *locus* regulador do gene acessório que controla a cascata para a produção de fatores de virulência e resistência quando a concentração das Als atinge um patamar específico emitindo um sinal para ligação a receptores bacterianos (Moreno-Gámez, Hochberg e Doorn, van, 2023; Oliveira, Borges e Simões, 2018; Wu e Luo, 2021). As Als usadas na comunicação entre bactérias Gram-negativas são moléculas da classe das Acil-homoserinas lactonas que adentram na célula por difusão e se ligam ao fator de transcrição para alterar a expressão genética, enquanto que entre Gram-

positivas, são os peptídeos autoindutores que se ligam a um receptor na superfície celular ativando uma proteína cinase que fosforila um fator de transcrição ligado à regulação da transcrição gênica (Wu e Luo, 2021).

Um dos maiores fatores de virulência e patogenicidade das bactérias é a síntese de toxinas. Toxinas formadoras de poros, como a α -hemolisina, usam, em células epiteliais, a proteína ADAM10 nas membranas celulares como substrato para anconragem e formação do dano na membrana da célula. Isso acarreta a saída de íons potássio (K^+) e trifosfato de adenosina (ATP) como também o influxo de íons Ca^{2+} que ativa a proteína cinase C (PKC) e o fator nuclear kappa B (NF- κ B) para a produção das interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-8 estimulando a inflamação. As toxinas esfoliativas, como a toxina A, causam descolamento da epiderme ao penetrar na pele usando espaços criados pela diapedese de neutrófilos e por clivar as junções dos queratinócitos. Os superantígenos, como a toxina do choque tóxico (TSST-1) e as enterotoxinas, atuam modulando o sistema imune ao se ligarem ao complexo de histocompatibilidade classe II (MHCII) e ao receptor V de células T que conduz a estimulação simultânea de várias outras células T, desencadeando uma resposta inflamatória sistêmica intensa pela produção das citocinas pró-inflamatórias IL-2, interferon- α (IFN- α) e o fator de necrose tumoral (TNF) (Oliveira, Borges e Simões, 2018; Popoff, 2020).

A produção de enzimas degradativas como hialuronidase, lipase e DNase promovem a disseminação da bactéria pelos tecidos. A nuclease, por exemplo, pode digerir armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) e a partir do produto dessa digestão há a formação de deoxiadenosina pela enzima AdsA que desencadeia a cascata da caspase-3 mediando a morte celular. Várias citolisinias produzidas por *S. aureus*, incluindo leucocidinas, lisam diretamente os leucócitos (Archambaud *et al.*, 2024). A gelatinase E (GeIE) e a citolisin produzidas por *E. faecalis* podem mediar a permeabilidade epitelial intestinal agindo nas junções celulares de E-caderina ou lisando as células do hospedeiro para alcançar a corrente sanguínea e, uma vez fagocitada por leucócitos, produzem catalase para escapar do ataque oxidativo (Fiore, Tyne, van e Gilmore, 2019; Goh *et al.*, 2017). *S. aureus* formam um complexo chamado estafilotrombina a partir das atividades da coagulase e da proteína de ligação ao Fator de von Willebrand que se unem à

protrombina. A estafilotrombina cliva o fibrinogênio para formar agregados bacterianos contendo fibrina para escapar da ingestão por fagócitos (Cheung, Bae e Otto, 2021).

No início de uma infecção por bactérias Gram-positivas, o sistema complemento sinaliza a opsonização através da ligação de C3b à superfície bacteriana e a quimioatração através de C5a. *S. aureus* secretam várias substâncias, como a substância inibidora do complemento estafilocócico (SCIN), que impedem a opsonização e a ativação do complemento inibindo as convertases C3. No mesmo sentido, *E. faecalis* cliva C3 através da metaloprotease GelE reduzindo a fagocitose. *S. aureus* também inibe a adesão de neutrófilos ao endotélio vascular impedindo a diapedese para os tecidos infectados através da proteína 5 semelhante a superantígeno estafilocócico (SSL5) e SelX, que se ligam ao ligante-1 da glicoproteína P-selectina (PSGL-1) na superfície do leucócito. Os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ativam os receptores *Toll-like* que desencadeia a formação de mediadores inflamatórios para atuar no combate à infecção. A lipase produzida por *S. aureus* degrada lipoproteínas reduzindo a atividade pró-inflamatória dos PAMPs (Cheung, Bae e Otto, 2021; Fiore, Tyne, van e Gilmore, 2019).

Para estabelecer a infecção, *S. aureus* sintetiza substâncias extracelulares, como o exopolissacarídeo poli-N-acetil glucosamina (PNAG) que inibe a fagocitose. Dentre os mecanismos bactericidas neutrofílicos estão a liberação granular da mieloperoxidase (MPO), que produz as espécies reativas de oxigênio (EROs) mais potentes, e dos peptídeos antimicrobianos (AMPs). Esses mecanismos são inibidos pela proteína inibidora de peroxidase estafilocócica (SPIN) e por proteases secretadas por *S. aureus*, respectivamente. O pigmento amarelo estafilocantina também contribui na eliminação de radicais originados da atividade das EROs enquanto a superóxido dismutase (SOD), catalase (CatA) e a alquil hidroperóxido redutase C (AhpC) convertem moléculas prejudiciais em moléculas inócuas à bactéria. A atividade da lisozima é reduzida pela alteração do peptidoglicano catalisada pela enzima OatA que acetila partes do ácido murâmico (Cheung, Bae e Otto, 2021).

Após ser internalizada pelas células, *E. faecalis* sofre o ataque endossomal mediados pelas proteínas Rab5, Rab7 e LAMP1 com posterior fusão lisossomal onde hidrolases e proteases eliminariam a infecção. Para sobreviver, *E. faecalis* resiste a ação da lisozima e evita a fusão lisossomal, possivelmente por afetar os níveis de Rab5 e Rab7, conseguindo se replicar tanto dentro do compartimento intracelular como no citosol. As vias envolvidas na saída da célula hospedeira para uma possível reinfecção ainda são desconhecidos. Além disso, *E. faecalis* pode impedir a ativação de NF-κB e modular a resposta do hospedeiro à infecção facilitando sua sobrevivência (Archambaud *et al.*, 2024).

3.3 Mecanismos moleculares dos antimicrobianos frente a alvos de parede, membrana e DNA bacterianos

Antimicrobianos de diferentes classes atuam por distintos modos de ação sobre as células bacterianas afetando diversos processos de modo a causar a inibição do seu crescimento (bacteriostáticos) ou de maneira a deflagrar sua morte (bactericidas). Baseados no seu modo de ação, na sua estrutura química e nos seus alvos, os antimicrobianos distinguem-se em classes como, por exemplo, os β-lactâmicos e os glicopeptídeos que agem inibindo a síntese da parede celular; os macrolídeos, tetraciclinas, lincosaminas, estreptograminas, oxazolidinonas e os aminoglicosídeos que atuam modificando a síntese proteica; as sulfonamidas que inibem a síntese do ácido fólico; as quinolonas e rifamicinas que agem inibindo a síntese de ácidos nucleicos; a polimixina e a daptomicina que exercem sua ação perturbando a integridade da membrana celular bacteriana e não se encaixam perfeitamente em alguma das classes, e, ainda, a platensimicina que age sobre a biossíntese dos ácidos graxos (Baran, Kwiatkowska e Potocki, 2023; Peterson e Kaur, 2018).

A parede celular bacteriana é uma estrutura fundamental que fornece suporte mecânico, forma e proteção osmótica às células procarióticas. Composta principalmente por peptidoglicano, essa parede é crucial para a sobrevivência bacteriana, especialmente em ambientes com variação osmótica significativa. Como os eucariotos não possuem peptidoglicano, essa diferença estrutural representa

uma excelente oportunidade terapêutica seletiva, permitindo que antibióticos ataquem as bactérias sem afetar as células humanas (Zhou et al., 2022).

Diferenças estruturais entre as paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas endereçam alvos peculiares distintos. Além disso, dentre as bactérias Gram-positivas, a porção peptídica das camadas de peptidoglicano também apresenta diferenças de composição entre gêneros, espécies e linhagens indicando a necessidade do desenvolvimento de antibacterianos possuidores de mecanismos de ação com alvos mais específicos. A biossíntese da parede celular é um processo complexo que envolve muitas proteínas. Cada proteína envolvida nas etapas de síntese é um potencial alvo para os antibacterianos. Diversos antibióticos amplamente utilizados, como β -lactâmicos, glicopeptídeos e lipoglicopeptídeos atuam interferindo em etapas-chave da síntese do peptidoglicano (Figura 2) (Zhydzetski et al., 2024).

Os β -lactâmicos se dividem em penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos exibindo, em comum, a presença de um anel β -lactâmico em sua estrutura química, essencial para sua atividade bactericida. Atuam inibindo as transpeptidases (PBPs – proteínas de ligação à penicilina), impedindo a formação de ligações cruzadas entre cadeias de peptidoglicano, o que enfraquece a parede celular. Esses antibacterianos se ligam covalentemente às PBPs por acilação de um resíduo de serina com o núcleo β -lactâmico reativo formando um complexo estável acil-enzima que inibe a transpeptidação pelas PBPs. Ademais, é importante ressaltar que alguns fármacos dessa classe alvejam outras enzimas como as L,D-transpeptidases, essenciais em alguns organismos como as micobactérias (Mora-Ochomogo e Lohans, 2021).

As penicilinas incluem agentes de amplo uso como a penicilina G (ativa principalmente contra Gram-positivos), amoxicilina e ampicilina (aminopenicilinas com espectro ampliado), e penicilinas resistentes às penicilinases, como oxacilina e cloxacilina. Dentre os novos representantes, destaca-se a temocilina, uma penicilina semissintética resistente a β -lactamases de espectro estendido (ESBLs). As cefalosporinas são classificadas em gerações com diferentes espectros de atividade como a cefalexina e a cefazolina (1^a geração), a cefuroxima (2^a geração), a ceftriaxona e a ceftazidima (3^a geração), a cefepima (4^a geração), e a ceftarolina e o

ceftobiprole (5^a geração), estes últimos com atividade contra MRSA. Entre as inovações, destacam-se ceftolozane associado ao tazobactam e ceftazidima associada ao avibactam, que oferecem atividade contra patógenos Gram-negativos multirresistentes (Konaklieva, 2014; Martin-Loches, Bruno e DeRyke, 2024; Zhydzetski et al., 2024).

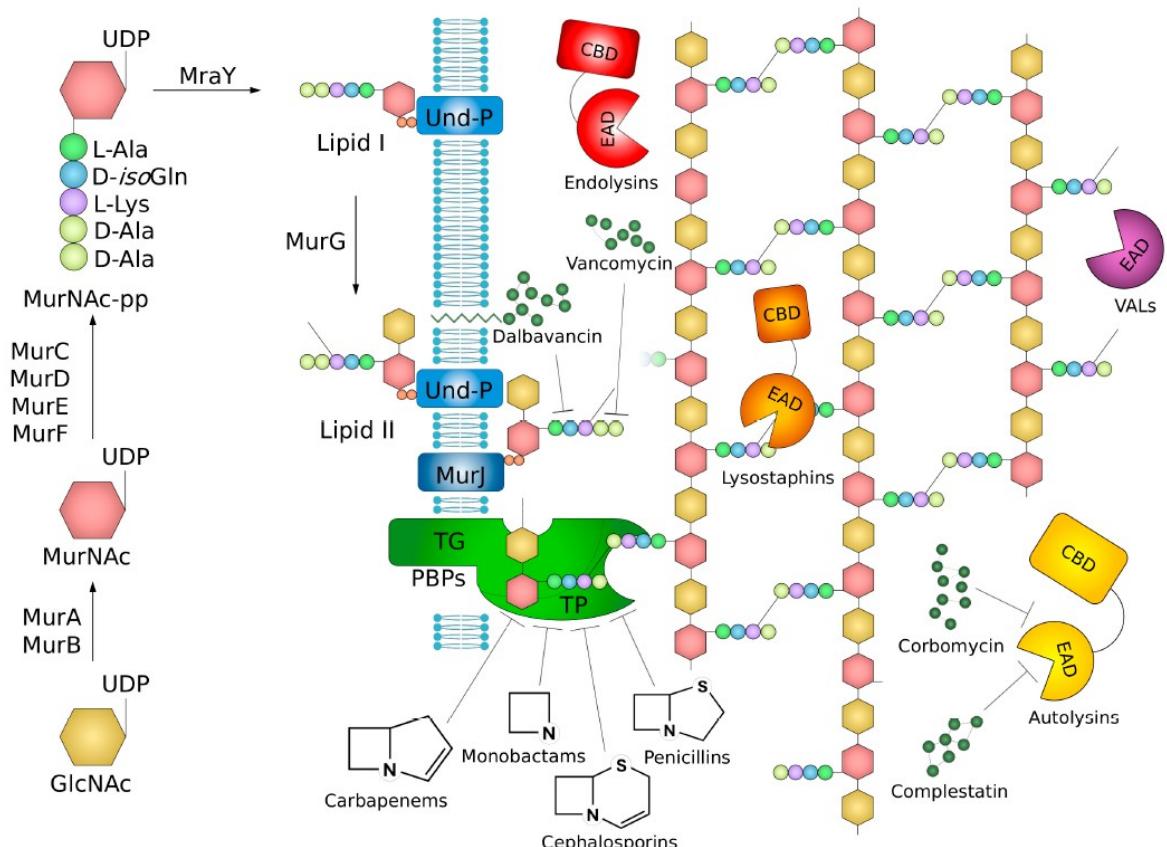
Os carbapenêmicos representam a classe de β -lactâmicos com o mais amplo espectro, incluindo Gram-positivos, Gram-negativos e anaeróbios. Exemplos clássicos incluem imipenem, meropenem e ertapenem. Mais recentemente, novos carbapenêmicos como meropenem/vaborbactam e imipenem/celebactam têm sido introduzidos na prática clínica. Já os monobactâmicos, representados pelo aztreonam, possuem atividade restrita a bacilos Gram-negativos aeróbios e têm a vantagem de não apresentar reatividade cruzada significativa com outras subclases de β -lactâmicos em pacientes alérgicos. Como inovação terapêutica, a combinação experimental de aztreonam com avibactam tem se mostrado promissora no combate a bactérias produtoras de metalo- β -lactamases (MBLs) e outras β -lactamases simultaneamente (Konaklieva, 2014; Mora-Ochomogo e Lohans, 2021).

Os glicopeptídeos como vancomicina e a teicoplanina e os lipoglicopeptídeos como a dalbavancina, oritavancina e telavancina possuem uma estrutura química heptapeptídica cíclica sendo diferidos pelos grupos glicosil dos glicopeptídeos e pelas caudas lipofílicas dos lipoglicopeptídeos, as quais conferem uma interação adicional com a membrana citoplasmática bacteriana. Essa ancoragem lipídica potencializa a afinidade com o alvo e pode promover desorganização da membrana, resultando em maior potência antimicrobiana. Esses antibacterianos possuem o núcleo glicopeptídico que se liga diretamente com alta afinidade aos precursores D-Ala-D-Ala terminal do lipídeo II das unidades de peptidoglicano bloqueando a polimerização e a reticulação provenientes da transglicosilação e transpeptidação. Como resultado, a parede celular torna-se estruturalmente instável, levando à lise osmótica da célula bacteriana (Schaenzer e Wright, 2020; Zeng et al., 2016).

Recentemente descobertos, os glicopeptídeos corbomicina e a complestatina são compostos naturais que possuem um mecanismo de ação diferente dos demais fármacos da classe, embora ainda relacionado ao peptidoglicano. Diferentemente

dos glicopeptídeos clássicos que atuam diretamente na biossíntese do peptidoglicano, a corbomicina e a complestatina impedem o acesso das autolisinas ao seu substrato, bloqueando processos essenciais para o crescimento e divisão celular. As autolisinas são hidrolases necessárias para a remodelação da parede celular durante o crescimento bacteriano. Essas enzimas hidrolisam ligações específicas nos polímeros da parede celular, permitindo processos como divisão celular, elongação e separação das células-filhas sendo uma atividade rigorosamente regulada, uma vez que sua desregulação pode levar à lise celular (Zhydzetski *et al.*, 2024).

Figura 2. Biossíntese e desconstrução do peptidoglicano.



Fonte: Zhydzetski *et al.* (2024).

Outrossim, além da divisão celular, a parede celular participa de processos de sinalização e evasão imune, tornando-se um alvo terapêutico versátil. A seleção da parede como alvo também reduz a probabilidade de resistência cruzada com fármacos que atuam em vias metabólicas internas. Diante do aumento de linhagens resistentes, há um esforço contínuo para desenvolver novos agentes que atinjam

etapas alternativas da biossíntese da parede celular ou que potencializem a ação de antibióticos clássicos, reforçando a parede bacteriana como um dos alvos mais estratégicos e bem-sucedidos na história da terapia antibacteriana (Zhou *et al.*, 2022).

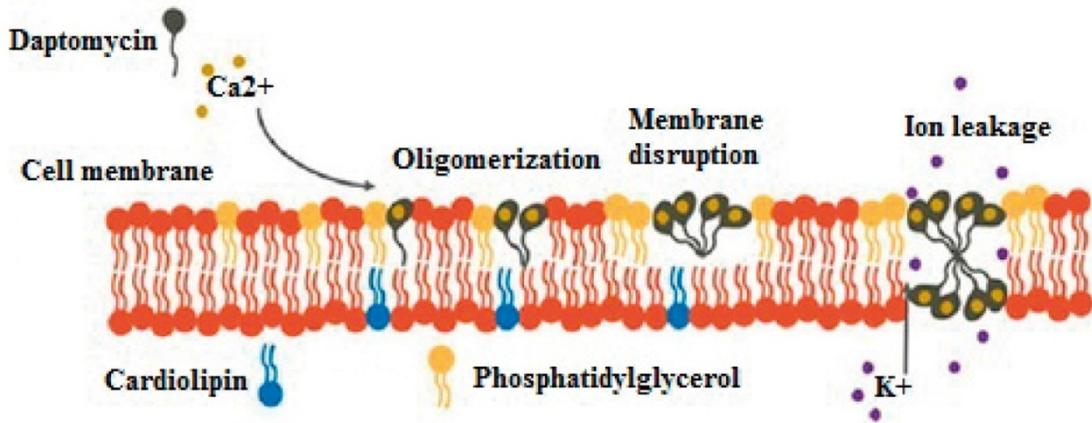
A membrana plasmática bacteriana é um componente essencial da célula procariótica, atuando como uma barreira seletiva que regula o transporte de íons, nutrientes e metabólitos entre o meio extracelular e o citoplasma. Além de sua função estrutural, ela participa ativamente em processos bioenergéticos, como a geração de ATP por meio da cadeia transportadora de elétrons e manutenção do gradiente de prótons. Devido a essa multiplicidade de funções vitais e à sua composição distinta em relação às membranas de células eucarióticas, a membrana plasmática constitui um alvo estratégico para agentes antibacterianos (Epand *et al.*, 2016).

Antibióticos que interferem na integridade ou funcionalidade da membrana plasmática podem induzir efeitos bactericidas rápidos e irreversíveis. Compostos como a daptomicina e as polimixinas atuam diretamente sobre a bicamada lipídica, promovendo despolarização da membrana, aumento da permeabilidade e consequente perda de conteúdo citoplasmático, levando à morte celular. Esses antibióticos exploram componentes específicos da membrana bacteriana, como o fosfatidilglicerol e o lipopolissacarídeo (LPS), ausentes ou raros em membranas humanas, o que confere maior grau de seletividade terapêutica (Epand *et al.*, 2016; Taylor e Palmer, 2016).

A daptomicina é um lipopeptídeo cíclico que atua especificamente em bactérias Gram-positivas. Seu mecanismo molecular envolve a ligação ao cálcio (Ca^{2+}) sofrendo uma ativação conformacional dependente deste íon, o que facilita sua interação com a membrana bacteriana, rica em fosfatidilglicerol. Uma vez ativada, a molécula se insere na bicamada lipídica da membrana citoplasmática onde ocorre a oligomerização pelo agrupamento das moléculas de daptomicina e formação de complexos porosos ou canais. Esses poros permitem a saída de íons essenciais, como K^+ (despolarização da membrana), levando à perda do potencial de membrana e inibição da síntese de macromoléculas (DNA, RNA e proteínas)

(Figura 3). O colapso bioenergético causado pela despolarização resulta em morte celular sem lise da membrana (Gray e Wenzel, 2020; Grein *et al.*, 2020).

Figura 3. Mecanismo de ação da daptomicina.



Fonte: Heidary *et al.* (2018).

O WTA é um polissacarídeo aniónico presente na parede celular de bactérias Gram-positivas contribui para a carga negativa da superfície celular, favorecendo a atração eletrostática da daptomicina, que é carregada positivamente quando complexada com íons Ca^{2+} . Embora a daptomicina não se ligue diretamente ao ácido teicoico como alvo funcional, a presença deste ácido favorece a aproximação da daptomicina à membrana plasmática aumentando a afinidade do antibiótico pela superfície celular, especialmente em bactérias com paredes ricas em fosfatidilglicerol (Taylor e Palmer, 2016).

Além disso, a membrana plasmática abriga diversas proteínas de transporte e sistemas enzimáticos envolvidos na síntese de parede celular, divisão celular e resistência antimicrobiana. A inibição dessas funções, seja diretamente ou por mecanismos sinérgicos com outros fármacos, pode comprometer a homeostase bacteriana e aumentar a eficácia do tratamento. A crescente resistência a antibióticos tradicionais tem motivado o desenvolvimento de novos compostos que visam componentes da membrana ou mecanismos relacionados à sua dinâmica, consolidando a membrana plasmática como um alvo central e versátil na terapia antibacteriana moderna (Epand *et al.*, 2016).

Os ácidos nucleicos (DNA e RNA) são importantes alvos na terapia antibacteriana devido ao seu papel central nos processos vitais da célula bacteriana. O DNA contém a informação genética necessária para a replicação e

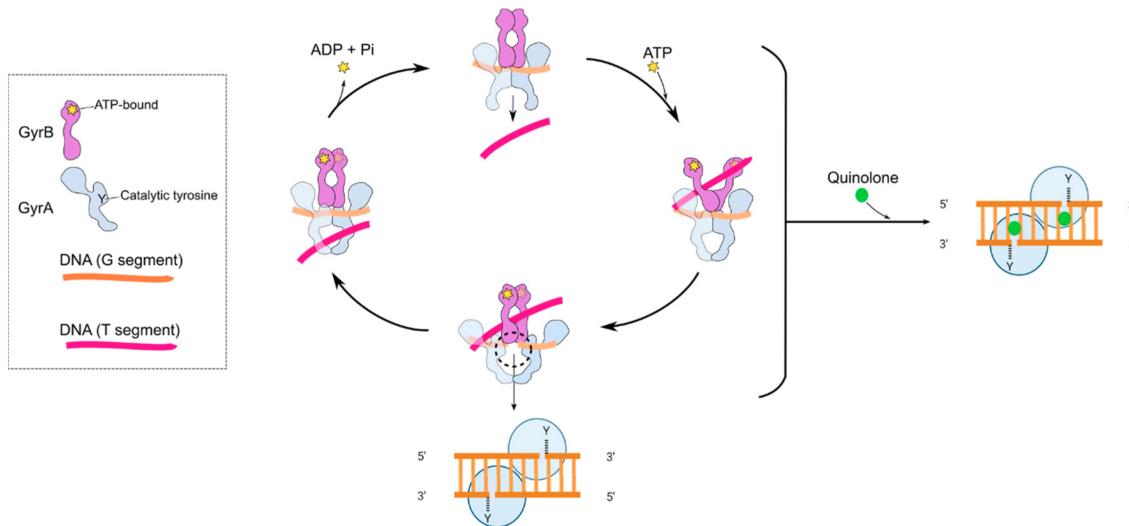
para a síntese de proteínas, enquanto o RNA atua como intermediário na expressão gênica. Inibir a replicação do DNA ou a transcrição do RNA pode, portanto, comprometer a viabilidade celular, interrompendo a multiplicação bacteriana. Antibacterianos como as fluoroquinolonas exemplificam essa abordagem, pois inibem enzimas essenciais como a DNA girase e a topoisomerase IV, que são cruciais para o desenrolamento e replicação do DNA (Bush *et al.*, 2020; Collins e Osheroff, 2024).

DNA girase atua introduzindo superenrolamentos negativos no DNA para aliviar as tensões formadas à frente da forquilha de replicação durante a duplicação do genoma. Sem essa atividade, o DNA se tornaria excessivamente tensionado e impediria o avanço da maquinaria replicativa. Essa enzima é composta por duas subunidades principais: GyrA e GyrB. GyrA realiza o corte do DNA, reconhecendo onde há superenrolamento, ligando-se a dois domínios da enzima, sendo o segmento G (*gate segment*) que é o trecho de DNA que será cortado e o segmento T (*transport segment*) que é o trecho de DNA que será transportado por dentro da quebra do segmento G, enquanto GyrB fornece a energia necessária por meio da hidrólise de ATP (Figura 4), embora o momento exato e o papel do ATP ainda não tenham sido determinados (Collins e Osheroff, 2024; Spencer e Panda, 2023).

Topoisomerase IV, por outro lado, tem como função principal a desencadeação de moléculas de DNA replicadas, ou seja, desfaz entrelaçamentos separando cromossomos bacterianos interligados após a replicação. Embora também consiga aliviar superenrolamentos, essa não é sua função primária. Assim como a girase, ela possui duas subunidades principais, ParC e ParE, que desempenham funções análogas às de GyrA (clivagem de ambas as fitas do segmento G usando resíduos de tirosina e passagem do segmento T através da quebra) e GyrB (fornecimento de energia através da hidrólise do ATP abrindo-se um "canal" através do segmento G quebrado) (Kathiravan *et al.*, 2013; Spencer e Panda, 2023).

As fluoroquinolonas atuam estabilizando os complexos enzima-DNA após o corte, que seria temporário, impedindo a religação das fitas e levando à fragmentação do genoma bacteriano que é um dano permanente e letal para a célula (Bush *et al.*, 2020).

Figura 4. Superenrolamento do DNA pela DNA girase e ação as quinolonas.



Fonte: Bush *et al.* (2020).

O material genético bacteriano oferece alvos específicos e seletivos, uma vez que há diferenças estruturais e funcionais importantes entre as enzimas bacterianas e as de células eucarióticas como é o caso da DNA girase que não estão presentes em humanos e da topoisomerase IV que difere da topoisomerase eucariótica. Essa seletividade reduz os efeitos colaterais sobre células humanas e aumenta a eficácia do tratamento, tornando os ácidos nucleicos componentes estratégicos no desenvolvimento de agentes antibacterianos. Adicionalmente, a resistência bacteriana tem impulsionado a busca por novos alvos terapêuticos dentro da maquinaria genética das bactérias como na interferência direta da expressão gênica bacteriana ou na busca de novas enzimas-alvo (Bush *et al.*, 2020; Kathiravan *et al.*, 2013).

A DNA ligase é uma outra enzima fundamental no metabolismo do DNA, tanto em bactérias como em organismos eucarióticos. Seu papel principal é selar quebras na fita de DNA. Ao formar uma ligação fosfodiéster entre o grupo 5'-fosfato de uma extremidade de DNA e o grupo 3'-hidroxila da extremidade adjacente, promove uma ligação covalente entre fragmentos de DNA durante processos como replicação, reparo e recombinação. Embora a função geral da DNA ligase em bactérias e eucariotos seja a mesma, existem diferenças estruturais e de uso de cofator energético entre elas, o que traz seletividade como alvo farmacológico (Eijk *et al.*, 2017).

Do ponto de vista terapêutico, embora ela ainda não seja um alvo primário de antibióticos em uso clínico, a DNA ligase é um alvo potencial para o desenvolvimento de antibacterianos, especialmente inibidores seletivos das variantes bacterianas, uma vez que a inibição dessa enzima pode comprometer o reparo e a manutenção do genoma bacteriano, levando à morte celular, sendo, portanto, essencial para a sobrevivência celular e um alvo potencial em estratégias terapêuticas inovadoras (Eijk *et al.*, 2017).

3.4 Resistência antibacteriana em *S. aureus* e *E. faecalis*

Fundamentados nos modos de agir dos fármacos antibacterianos, vários diferentes mecanismos decorrentes de mutações, recombinações genéticas por conjugação, transdução, transformação ou vesiculação podem estar associados ao desenvolvimento da resistência bacteriana aos antimicrobianos. Modificações podem alterar ou extinguir a molécula-alvo, atividades das bombas de efluxo podem ser aumentadas, enzimas inativadoras podem ser produzidas pelo microrganismo, permeabilidade da membrana plasmática pode ser modificada, biofilmes podem ser formados. Esses e outros aspectos desencadeiam baixos níveis de eficácia ou a ineficácia total do fármaco na sua ação contra esses microrganismos gerando o fenômeno da RAM (Baran, Kwiatkowska e Potocki, 2023; Cheng *et al.*, 2016; Ruhal e Kataria, 2021).

É natural que microrganismos que produzem substâncias com ação antimicrobiana tenham mecanismos próprios de defesa contra sua própria substância produzida o que torna a possibilidade de repasse e rearranjos genéticos entre populações produtoras e não produtoras mais facilitada determinando possíveis coevoluções, incluindo bactérias do ambiente e patógenos clínicos (Peterson e Kaur, 2018). Transposons, plasmídeos, sequências de inserção e bacteriófagos intensificam a aquisição de fatores de patogenicidade, resultando em maior capacidade de adaptação a novos nichos, promovendo doenças bacterianas (Caniça *et al.*, 2019; Peterson e Kaur, 2018).

Embora existam múltiplos compostos que atuem sobre as bactérias, há, ainda, grande dificuldade no tratamento de algumas cepas. Além disso, o número crescente de microrganismos MDR tem uma relação negativa com o número de

antimicrobianos efetivos, o que gera grande preocupação de um hipotético retorno à chamada “Era pré-antibiótica”. Por outro lado, nos últimos anos, outros planos focados na pesquisa e desenvolvimento estão sendo traçados para que novos agentes cheguem, de fato, ao uso clínico, incluindo um sistema de entrega dos antibacterianos por nanopartículas (Baran, Kwiatkowska e Potocki, 2023; Terreni, Taccani e Pagnolato, 2021; *World Health Organization*, 2020c).

Moléculas como a evaraciclina, um derivado sintético da tetraciclina; delafloxacina, uma fluorquinolona; o cefiderocol, que é uma cefalosporina; a plazomicina, um novo aminoglicosídeo; lefamulina, um fármaco semissintético para pneumonias e combinações de β -lactâmicos com inibidores da β -lactamase, como o meropenem com vaborbactam e o imipenem com relebactam são exemplos de novos agentes recentemente aprovados para uso em distintas infecções bacterianas. Há, ainda, a recente aprovação de moléculas já conhecidas e utilizadas para novas abordagens infeccionais como é o caso da rifamicina que agora pode ser usada para diarréias causadas por *E. coli* não invasivas. Apesar dessas conquistas, a necessidade do desenvolvimento de novos agentes antibacterianos é contínua e, visto a evolução perene dos mecanismos de resistência, segue sendo urgente (Andrei, Droc e Stefan, 2019; Terreni, Taccani e Pagnolato, 2021).

Conforme o último relatório *Global antimicrobial resistance and use surveillance system* (GLASS) da OMS (2022), os antibacterianos foram a classe de antimicrobianos mais consumidas por humanos e, de acordo com os países que declararam suas informações, apesar do consumo extensivo desses medicamentos, 60% desses, em 2020, foram do grupo considerado eficazes em um extenso número de infecções comuns tendo um risco relativamente baixo de criar resistência.

Não obstante, o uso amplo e, por vezes, exacerbado de antibacterianos para prevenção de doenças no manejo de animais na pecuária e para a promoção do crescimento de vegetais na agricultura reverbera no quesito segurança alimentar com consequente impacto na saúde humana, visto que gera ambientes propícios ao compartilhamento de genes de resistência entre cepas e tornam os animais e vegetais de consumo veículos para disseminação dessas variantes ao ser humano

(Caniça *et al.*, 2019). *S. aureus* é uma das bactérias mais comuns a serem veiculadas por alimentos (Hu *et al.*, 2019).

O grupo ESKAPE, composto por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp., representa os principais patógenos multirresistentes responsáveis por infecções hospitalares graves e de difícil tratamento. Sua importância clínica decorre da elevada capacidade de adquirir e disseminar genes de resistência, da adaptação eficiente a ambientes hostis e da associação com elevadas taxas de morbidade, mortalidade e custos em saúde. Esses microrganismos figuram como modelos emblemáticos da crise atual da resistência antimicrobiana, visto que frequentemente escapam da ação dos antibióticos convencionais, comprometendo a eficácia terapêutica (Miller e Arias, 2024).

Além de sua relevância epidemiológica global, os ESKAPE são reconhecidos como alvos prioritários para pesquisa e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. A emergência de clones de alto risco e a rápida disseminação de determinantes de resistência, como carbapenemases e mecanismos de tolerância a múltiplas classes de antibióticos, reforçam a necessidade urgente de alternativas ao arsenal tradicional. Nesse contexto, o estudo do grupo ESKAPE não apenas ilustra os desafios enfrentados no controle das infecções bacterianas resistentes, mas também orienta a formulação de políticas de vigilância, o uso racional de antimicrobianos e o investimento em terapias inovadoras capazes de conter a ameaça crescente da resistência bacteriana (Miller e Arias, 2024).

Por estarem associadas às colonizações hospitalares de árdua erradicação, a variante resistente à meticilina de *S. aureus*, MRSA, e a variante resistente à vancomicina dos *Enterococcus* sp., VRE, permanecem incluídas em nível de alta prioridade na lista da OMS para pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos (World Health Organization, 2024). A elevada capacidade de persistência no ambiente hospitalar e a ampla disseminação por contato direto ou superfícies contaminadas tornam sua erradicação um desafio substancial para o controle de infecções. Além disso, a limitação de opções terapêuticas eficazes frente a essas cepas multirresistentes agrava o prognóstico dos pacientes e

contribui para o aumento da morbidade, mortalidade e custos hospitalares (Tacconelli *et al.*, 2018; Terreni, Taccani e Pregnolato, 2021).

S. aureus possui a capacidade de se adaptar às condições adversas e desenvolver resistência múltipla quando exposta a diferentes antibacterianos. Na década de 1940, *S. aureus* apresentou sua primeira resistência. As infecções causadas por esse microrganismo não estavam sendo mais debeladas quando tratadas com penicilina. As linhagens de *S. aureus* resistentes à penicilina (PRSA) produziam uma enzima lactamase que hidrolisava o anel β -lactâmico da penicilina. A penicilinase surgiu como resultado de uma mutação no gene *blaZ* que pode estar localizado no cromossomo ou em um plasmídeo. Em 1959, iniciou-se o uso da meticilina na intenção de se conseguir tratar infecções causadas por PRSA, visto que sua estrutura química, por possuir uma fração arila maior perto do anel β -lactâmico, diminui a ação da penicilinase. Porém, já em 1961 surgiram relatos de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Diferente da resistência à penicilina, na resistência à meticilina não há hidrólise do anel β -lactâmico inativando o composto. Nos MRSA há uma modificação do alvo do medicamento que gera a incapacidade dos β -lactâmicos combaterem as infecções (Craft *et al.*, 2019; Michalik, Podbielska-Kubera e Dmowska-Koroblewska, 2025).

O mecanismo de resistência dos MRSA está ligado a modificações nas PBPs que são codificadas pelo gene *mecA*. Essa modificação gera a presença da PBP2a que faz com que a meticilina e os compostos penicilinase-resistentes tenham baixa afinidade pelo local de ligação na parede celular da bactéria deixando, assim, de serem efetivos (Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2022).

Os MRSA apresentam uma resistência intrínseca aos β -lactâmicos, mas também podem apresentar resistência a outras classes de antibacterianos como aos macrolídeos, aminoglicosídeos, às tetraciclinas, fluoroquinolonas, entre outros (Figura 5). Em *S. aureus*, por exemplo, o mecanismo de resistência aos macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas mais comum é a modificação do alvo do antibiótico através da enzima adenilil-N-metiltransferase, codificada pelo gene *erm*. A resistência às fluorquinolonas é causada pela mutação nos genes *gyrA* e *gyrB*, *parC* e *parE* que expressam a síntese das subunidades das enzimas topoisomerase II (girase) e VI, alvos das fluorquinolonas, culminando na redução

da sensibilidade aos fármacos. O mecanismo mais comum na resistência aos aminoglicosídeos é a síntese de transferases que modificam a estrutura do fármaco, sendo a mais importante a acetilfosfotransferase de dois domínios AAC(6')-Ie/APH(2")-Ia, codificada pelo gene *aacA-aphD* (Brdová, Rumí e Viktorová, 2024; Michalik, Podbielska-Kubera e Dmowska-Koroblewska, 2025; Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2022).

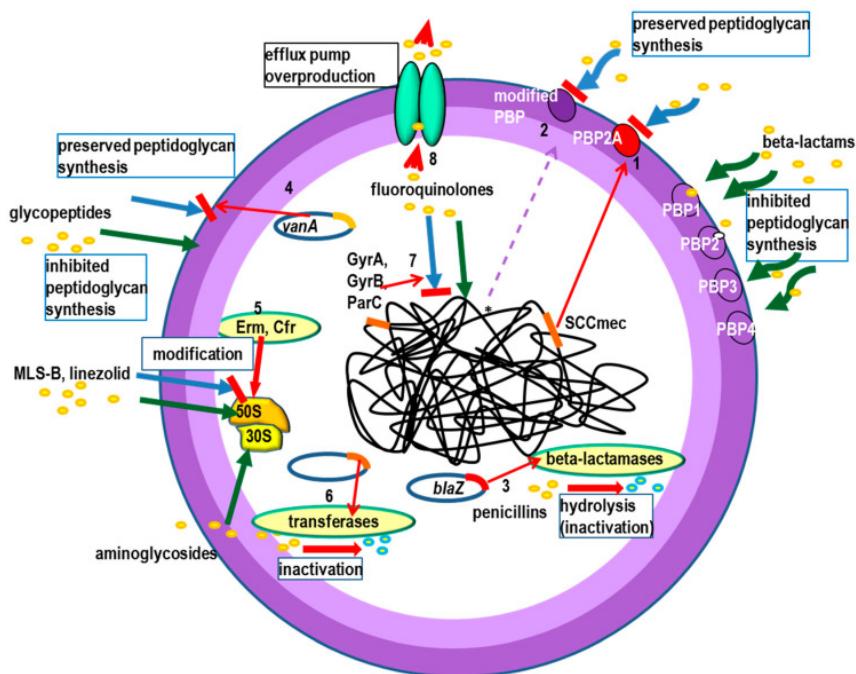
Todo o contexto levou a um maior uso do glicopeptídeo vancomicina como fármaco de escolha para infecções por MRSA que ainda permanecia suscetível a esse fármaco. Contudo, o uso massivo da vancomicina conduziu a evolução de *S. aureus* através da aquisição do *cluster* de genes *vanA* que alteram a estrutura da parede celular bacteriana reduzindo a afinidade da vancomicina. Ao final da década de 1990 surgiu o fenótipo de *S. aureus* intermediário à vancomicina (VISA) culminando, em 2002, em linhagens de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) (Craft *et al.*, 2019; Michalik, Podbielska-Kubera e Dmowska-Koroblewska, 2025).

As bombas de efluxo são proteínas transmembrana, classificadas conforme suas especificidades nas famílias ABC (*ATP Binding Cassette*), MFS (*Major Facilitator Superfamily*), MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*), SMR (*Small Multidrug Resistance*), RND (*Resistance Nodulation and Cell Division*) e PACE (*Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux*), presentes em células eucariotas e/ou procariotas que desempenham a função de expelir substâncias tóxicas à célula. Em bactérias, funcionam como um mecanismo de defesa contribuindo para a resistência a múltiplos antibióticos. Várias bombas de efluxo relacionadas à resistência a medicamentos em *S. aureus* foram caracterizadas tais quais as TetK, MsrA, NorA, NorB, NorC, MdeA, SepA, MepA, SdrM, LmrS, QacA/B, qacC, QacG, QacH, QacJ e Smr. MsrA é uma bomba de efluxo para marcolídeos como a eritromicina; MepA e NorA conferem resistência à fluoroquinolonas hidrofílicas como o ciprofloxacino e norfloxacino; TetK causa a extrusão de tetraciclinas; LmrS concede resistência à linezolida e o cloranfenicol (Sinha, Aggarwal e Singh, 2024; Sousa, de *et al.*, 2024).

Atualmente, a terapia clínica antibacteriana contra infecções por MRSA conta com novos antimicrobianos como as cefalosporinas de quinta geração (ceftarolina e ceftobiprole), com as oxazolidinonas, com os lipoglicopeptídeos de amplo espectro

(dalbavancina, oritavancina e telavancina) e antibióticos glicopeptídeo-cefalosporina (Michalik, Podbielska-Kubera e Dmowska-Korobleska, 2025). No entanto, como o histórico nos mostra, há uma grande possibilidade de evolução genética com surgimento de linhagens resistentes aos novos antibacterianos apontando para a real necessidade do desenvolvimento contínuo de compostos antimicrobianos.

Figura 5. Mecanismos moleculares de resistência em *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Mlynarczyk-Bonikowska (2022).

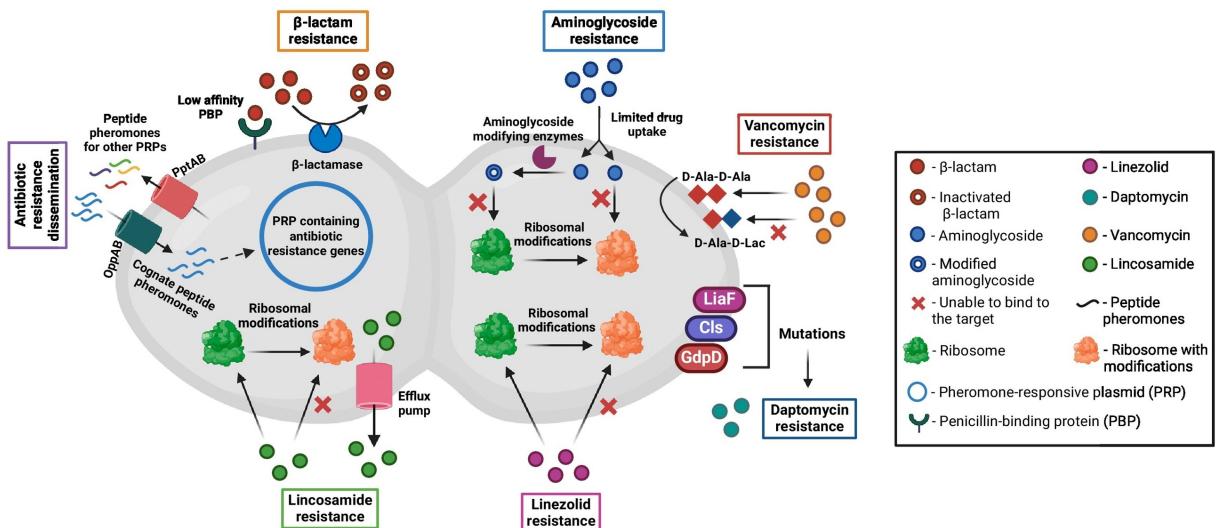
Os enterococos apresentam resistência intrínseca a cefalosporinas, aminoglicosídeos, lincosamidas e estreptograminas. A transferência e aquisição de elementos genéticos móveis está associada a infecções resistentes e contribui para a aquisição de mecanismos de resistências adicionais. Além disso, muitos β -lactâmicos não matam os enterococos comprometendo ainda mais a terapia. A tolerância inerente à ação dos β -lactâmicos está relacionada à existência de um gene cromossômico específico dos enterococos, o *ppb5*, que codifica uma PBP de classe B com baixa afinidade de ligação à ampicilina e às cefalosporinas. Ademais, foram identificados enterococos que expressaram uma β -lactamase, porém foram raros os casos identificados. A terapia combinada entre aminoglicosídeos e β -lactâmicos resultou em sinergia se tornando o tratamento padrão para infecções enterococais no final dos anos 1970. Porém, em meados da década de 1980, na Europa e Estados Unidos, a resistência aos aminoglicosídeos, em especial à

vancomicina, foi reportada em enterococos. Essa resistência foi atribuída à aquisição de um fator de resistência transmitido por plasmídeo e levantou um alarme, pois seria a eliminação de um tratamento de última linha. Os VRE agora estão mundialmente difundidos com até 80% dos isolados de *E. faecium* resistentes em alguns hospitais (Fiore, Tyne e Gilmore, 2019; Miller, Munita e Arias, 2014).

O mecanismo de resistência central do VRE é codificado pelo operon *van* e está conectado a alterações na via de síntese do peptidoglicano em que há a substituição de D-Alanina-D-Alanina por D-Alanina-D-Lactato ou por D-Alanina-D-Serina (Figura 6). Essas alterações reduzem a afinidade de ligação do antibacteriano pela parede celular em 1000 e 7 vezes, respectivamente (Ahmed e Baptiste, 2018).

A daptomicina demonstrou eficácia contra VRE, porém, ao longo dos tratamentos foram observados o desenvolvimento de resistência ao fármaco, limitando seu uso. Foi verificado que amostras resistentes apresentaram mutações em vários genes que afetam a composição e carga da membrana celular, incluindo a *cls* (cardiolipina sintase), a *gdpD* (glicerofosforil-diéster-fosfodiesterase) e *liaF* (componente de resposta de detecção de estresse). A linezolida, o primeiro composto oxazolidinona aprovado pelo FDA, teve sua introdução no uso clínico caracterizada pelo rápido surgimento de VRE (em 2001 nos Estados Unidos e em 2002 no Reino Unido) que também desenvolveram resistência à linezolida (LRE). Essas linhagens apresentaram uma mutação G2576U na subunidade do RNA ribossômico 23S como também no gene *optrA* descoberto recentemente. Na Tailândia, um isolado resistente à linezolida demonstrou ter adquirido a metiltransferase *cfr* de forma plasmidial, levando à metilação da posição A2503 no rRNA 23S causando alta resistência à linezolida. Uma outra opção ao tratamento de VRE é a glicilciclina tigeciclina. Apesar do sucesso no seu uso para tratar infecções por VRE, emergiram-se linhagens de *E. faecium* e *E. faecalis* resistentes ao composto. Foram encontradas mutações em bombas de efluxo associadas à resistência à tigeciclina, além de mutações na subunidade *rpsJ* da proteína ribossômica (Figura 6) (Ahmed e Baptiste, 2018; Fiore, Tyne e Gilmore, 2019).

Figura 6. Mecanismos moleculares de resistência em *Enterococcus faecalis*.



Fonte: Shah e Varahan (2024).

Linhagens emergentes de enterococos multirresistentes levantam um nível de preocupação, visto que vêm ampliando seu perfil de resistência e desenvolvendo resistência a antibióticos de todas as classes que foram introduzidas na prática até agora, deixando opções limitadas de tratamento (Goh et al., 2017).

A RAM continua sendo umas das 10 maiores preocupações mundiais, pois mesmo a medicina moderna depende de antimicrobianos efetivos. Persiste em ser um problema de saúde pública global revelando-se, também, como uma adversidade socioeconômica (World Health Organization, 2022).

3.5 Produtos naturais e semissintéticos

Os produtos naturais englobam uma grande variedade de entidades químicas com amplo espectro de atividades biológicas. Apesar das plantas ocuparem uma tradicional e larga posição dentre os produtos naturais, não são as únicas fontes dessa classe para a extração de compostos bioativos. Minerais, animais marinhos, venenos e microrganismos como bactérias e fungos destacam-se como origens de fármacos de alto sucesso terapêutico (Beutler, 2019; Katz e Baltz, 2016).

A descoberta da penicilina, um metabólito de fungos do gênero *Penicillium*, em 1928, por Alexander Fleming; o isolamento da gramicidina do sobrenadante da cultura de *Bacillus brevis* por René Dubos e a exploração de peptídeos

antimicrobianos produzidos por actinobactérias do solo por Selman Waksman constituíram o início de uma era de pesquisas sendo cruciais para o prosseguimento de descobertas e seleção de novos agentes microbianos considerada como a “Era de ouro dos antibióticos” (Katz e Baltz, 2016; Thomford *et al.*, 2018; Wright, 2017).

Três quartos dos antibacterianos disponíveis são provenientes de produtos naturais, os quais dominam o catálogo antibiótico existente. Desses, a maior parte provém de produtos do metabolismo secundário microbiano. A linha sucessória histórica desses agentes expõe a importância da natureza como origem material. No entanto, no decorrer da história, derivados semissintéticos também garneceram os arsenais a partir de produtos naturais já constituídos (Jackson, Czaplewski e Piddock, 2018; Wright, 2017).

Dentro da complexidade de substâncias que os produtos naturais apresentam, a tecnologia científica vem ajudando no discernimento, isolamento e purificação das moléculas que exibem perfis potenciais de ação terapêutica para que possam ser, se desenvolvidas, utilizadas na clínica médica na solução de doenças. Grande parte de exitosos medicamentos foi produzida e/ou sintetizada a partir de compostos provenientes de produtos naturais. Ademais, produtos naturais são um dos principais contribuintes para a descoberta de tratamentos eficazes na resolução dos desafios globais de saúde para alcançar as metas de desenvolvimento na área (Beutler, 2019; Thomford *et al.*, 2018).

A diversidade de grupos funcionais, as variações de posicionamentos dos substituintes e a quiralidade constituem características estruturais que conferem aos compostos naturais um papel central como fontes valiosas de conhecimento químico e farmacológico. O avanço das ferramentas modernas de descoberta de fármacos permitem que os usos tradicionais de moléculas naturais sejam ressignificados no contexto da química medicinal contemporânea, possibilitando a pesquisa e investigação de novas vias de transdução e mecanismos de ação associados (Ribaudo, 2023).

Não obstante a importância e o sucesso dos produtos naturais como fonte de substâncias antibacterianas, o desenvolvimento de medicamentos alicerçado em tais produtos, por vezes, não consegue fornecer um retorno sustentável, seja ao

meio ambiente, seja ao financiador (Jackson, Czaplewski e Piddock, 2018). Apontando para a resolutividade desse entrave, surge a busca por produzir diferentes substâncias com a síntese de compostos para triagens de bioatividade e, posteriormente, urge a “Era genômica” que, pautada na biossíntese de produtos naturais permite a fusão, combinação e substituição de genes de biossíntese de substâncias naturais para formar novos produtos híbridos. As falhas dessas tentativas na descoberta de novos compostos e novos alvos antibacterianos, impulsionaram o interesse para o retorno de pesquisas voltadas aos produtos naturais (Jackson, Czaplewski e Piddock, 2018; Katz e Baltz, 2016).

Entretanto, melhoramentos químico-estruturais por semissíntese como no caso da azitromicina, minociclina, amoxicilina e plazomicina, mostraram-se valorosos, ultrapassando, inclusive o número de antibacterianos sintéticos de uso clínico (Wright, 2017). A combinação de fragmentos derivados de produtos naturais a outros produtos naturais podem conduzir moléculas a alvos terapêuticos que, a partir de uma biossíntese natural, seriam inacessíveis, fornecendo a possibilidade de explorar um espaço químico com relevância a uma ação biológica (Karageorgis *et al.*, 2021).

3.6 Ácido *p*-cumárico (*p*CoA) e *p*-cumarato de 4-clorobenzila (*p*C4C)

O ácido cumárico, um dos derivados hidroxilados do ácido cinâmico, é encontrado na natureza sob três formas isoméricas: ácido *o*-cumárico, *m*-cumárico e *p*-cumárico, sendo este último o isômero mais abundante. Esses compostos pertencem à classe dos compostos fenólicos, um grupo relevante de metabólitos secundários amplamente distribuídos em plantas superiores (Ferreira *et al.*, 2019).

O *p*CoA, com fórmula molecular $C_9H_8O_3$, também conhecido como ácido 4-hidroxicinâmico, é um ácido fenólico com várias finalidades comerciais importantes dentro das indústrias farmacêutica, nutracêutica, de materiais e química, visto que esse metabólito é um precursor para a síntese de numerosos derivados. *p*CoA tem massa molecular 164,16 g/mol e ponto de fusão de 211,5 °C. Se apresenta como um pó cristalino verde-amarelado com baixa solubilidade em água e boa solubilidade em solventes orgânicos como o etanol e o dimetilsulfóxido (Ferreira *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2018).

Em experimentos *in vivo*, o *p*CoA exibiu rápida absorção intestinal (t_{max} , 10 min; C_{max} , 165.7 ± 31.0 mmol/L) sendo eliminado com $t_{1/2}$ de 15,9 minutos (Konishi, Hitomi e Yoshioka, 2004). Um outro estudo demonstrou que a absorção do *p*CoA não é exclusiva intestinal, mas que todos os outros órgãos digestivos participam desse processo farmacocinético. Esse mesmo estudo mostrou que o composto é removido do plasma com excreção renal, sendo recolhido na urina (Garrait *et al.*, 2006). O conjunto de suas propriedades farmacocinéticas, aliadas à baixa toxicidade levaram o *p*CoA a ser amplamente utilizado em diversos meios industriais, incluindo o de alimentos e o farmacêutico (Ferreira *et al.*, 2019).

Entre vários outros atributos, o *p*CoA apresenta características antimicrobianas atribuídas, principalmente, à sua habilidade em romper a membrana celular bacteriana e de interagir com o DNA, interferindo em funções celulares essenciais e exercendo atividade bactericida. Esses efeitos já foram observados contra bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, e Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*. (Lou *et al.*, 2012; Zulkarnain *et al.*, 2020).

Devido às suas pequenas concentrações encontradas nos vegetais, a extração do *p*CoA é custosa e ineficiente e sua síntese química produz substâncias tóxicas e condições não propensas, não sendo favorável nem sustentável ao ambiente. Todavia, tendo o desenvolvimento biossintético como aparato tecnológico, a elaboração de fenilpropanoides microbianos representa uma ótima abordagem para produção de novos compostos medicamentosos. O *p*CoA é um produto natural bioativo que pode ser formado partindo da desaminação não oxidativa da *L*-tirosina catalisada por tirosina amônia liase ou partindo da desaminação da *L*-fenilalanina por fenilalanina amônia liase seguida da hidroxilação catalisada por cinamato-4-hidroxilase, sendo uma substância relevante para a produção de uma variedade de componentes proveitosos, como flavonoides, polifenóis, cumarinas, estilbenos, lignanas e polímeros materiais (Cui *et al.*, 2020). É a partir desse composto que o *p*C4C é sintetizado.

O *p*-cumarato de 4-clorobenzila (*p*C4C), composto derivado do *p*CoA, já foi submetido a ensaios para avaliação de suas ações antienzimática e antifúngica. Nos testes de atividade antienzimática o *p*C4C foi avaliado frente a

Acetilcolinesterase (AChE), indispensável na degradação da acetilcolina, e a Butirilcolinesterase (BuChE), que desempenha um papel mais secundário na hidrólise deste mesmo neurotransmissor. A inibição da enzima AChE foi de 56,36% \pm 2,27 com $IC_{50} = 87,31 \pm 2,76 \mu\text{M}$ e da BuChE foi de 75,17% \pm 1,81 com $IC_{50} = 19,08 \pm 0,70 \mu\text{M}$, demonstrando que o *p*C4C tem uma boa atividade inibitória, principalmente frente a BuChE (Lopes, 2022).

A atividade antifúngica do *p*C4C foi testada frente a linhagens padrão *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) *Candida albicans* CBS 562 com CIM 7,81 $\mu\text{g/mL}$ (27,05 μM) e CFM 7,81 $\mu\text{g/mL}$ (27,05 μM), *Candida krusei* CBS 573 com CIM 15,62 $\mu\text{g/mL}$ (54,09 μM) e CFM 15,62 $\mu\text{g/mL}$ (54,09 μM) e *Candida tropicalis* CBS 94 com CIM 15,62 $\mu\text{g/mL}$ (54,09 μM) e CFM 15,62 $\mu\text{g/mL}$ (54,09 μM). Considerando a relação CFM/CIM ≤ 4 , o *p*C4C apontou atividade fungicida sobre todas as linhagens testadas. Em outro estudo, o *p*C4C foi testado frente a 16 linhagens de *Candida* de variadas espécies, sejam *C. albicans*, *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*), *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. rugosa*, *C. lusitaniae*, *C. utilis*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis* apresentando atividade antifúngica sobre todas as espécies testadas, com valores de CIM e CFM que variaram entre 3,9 $\mu\text{g/mL}$ (13,54 μM) e 65,51 $\mu\text{g/mL}$ (217,01 μM) e com razão CFM/CIM indicando ação fungicida sobre as linhagens pesquisadas com ação sobre a membrana celular fúngica indicada por experimentos com o sorbitol e o ergosterol (Lopes, 2022; Melo *et al.*, 2024).

Demonstrado o potencial da molécula, destacando-se sua ação antimicrobiana contra espécies fúngicas, o estudo sobre outras espécies microbianas, como as bactérias, conduz um melhor entendimento de suas propriedades para serem usadas em benefício humano. Sua promissora atividade sobre outras células microbianas ensejam mais testes para entregar ainda mais confiabilidade ao composto em futuros ensaios clínicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais de pesquisa

A preparação e obtenção da molécula de estudo ocorreu no Laboratório de Química Farmacêutica (LQF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sob a coordenação da Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa.

Os experimentos de atividade antimicrobiana e de lise celular, bem como o preparo e tratamento as amostras para os ensaios de investigação dos mecanismos de ação foram realizados no Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular (LAFECC) da Universidade Federal da Paraíba, sob a coordenação do Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro.

As avaliações toxicológicas *in vitro* e *in vivo* foram realizadas na Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo (FOP/UNICAMP), sob a coordenação do Prof. Dr. Pedro Luiz Rolasen. As previsões toxicológicas *in silico* foram conduzidas de forma autônoma.

As análises *in silico* (*docking* e dinâmica molecular) foram realizadas no Laboratório de Químioinformática da Universidade Federal da Paraíba, sob a coordenação do Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti e as previsões farmacocinéticas *in silico* foram realizadas de maneira autônoma.

As pesquisas do modo de ação do composto ocorreram no Instituto Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz localizado na Universidade Federal de Pernambuco (FIOCRUZ/UFPE); no Laboratório de Oncofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba, sob a supervisão do Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves; no Laboratório de Vigilância Molecular Aplicada (LAVIMAP) da Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal da Paraíba (ETS-UFPB) sob a coordenação da Prof. Dr. João Felipe Bezerra como também no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA-CE) sob a coordenação do Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho.

4.2 Linhagens celulares

As linhagens padrão de *Staphylococcus aureus* NCTC 12981, *Klebsiella pneumoniae* NCTC 9633, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) NCTC 13373 e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) NCTC 13809 foram obtidas da *National Collection of Type Cultures* (NCTC). Os perfis de resistência aos antimicrobianos das linhagens MRSA NCTC 13373 e KPC NCTC 13809 estão descritos nos apêndices A e B deste trabalho, respectivamente.

As linhagens padrão *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonela enterica* subsp. *enterica* sevovar *Typhimurium* ATCC 14028 foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC).

Além destas, foram utilizados isolados das linhagens *Staphylococcus aureus* K2068 e *Staphylococcus aureus* 1199B.

As linhagens bacterianas foram criopreservadas em glicerol 15-25% (ACS Científica®, Sumaré, Brasil), utilizando-se frascos criogênicos de 2 mL (NEST Biotechnology Co., Ltd.) e armazenadas a -80 °C em ultrafreezer (Indrel Scientific® IULT -86° 335D-590).

Para o ensaio de citotoxicidade, a linhagem celular fibroblástica utilizada foi obtida do banco de células HGF-1 (ATCC CRL-2014). As larvas de *Galleria mellonella*, utilizadas no ensaio de toxicidade sistêmica, foram criadas no Laboratório de Farmacologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.

4.3 Antimicrobianos e reagentes

Os antimicrobianos utilizados foram vancomicina (ABL® Ltda., São Paulo, Brasil), polimixina (Jodas Expoim® Pvt. Ltd., Telangana, Índia), norfloxacino e ciprofloxacino (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA). Os meios de cultura empregados incluíram o Caldo e o Agar Mueller Hinton (CMH/AMH - KASVI® Laboratórios Ltda., Curitiba, Brasil) e o Caldo e o Agar Brain Heart Infusion (CBHI/ABHI - KASVI® Laboratórios Ltda., Curitiba, Brasil), além do Agar Heart

Infusion (HIA, Difco Ltd., Brasil) *slants* e do Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM).

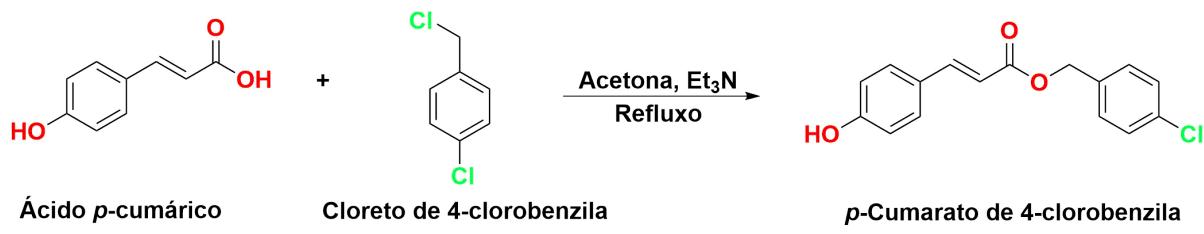
O dissolvente do composto estudado foi o dimetilsulfóxido (DMSO - Dinâmica® Química Contemporânea Ltda., Indaiatuba, Brasil) e as para as lavagens das células foi utilizado tampão fosfato salino (PBS) esterilizado a um pH de 7,4. Outros reagentes incluíram o cristal violeta (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA); o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT - Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA); o laranja de acridina e o iodeto de propídeo (LA/IP - Thermo Fisher®, Rochester, New York, EUA); o brometo de etídio e a resazurina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA); o carbonilcianeto *m*-clorofenilhidrazona (CCCP - Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA); o kit QIAamp® mini (Qiagen, Alemanha); o gel de agarose ultra puro (invitrogen™, Massachusetts, EUA) e para a microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi usado o fixador de Karnovsky, tetróxido de ósmio + fenck, acetato de uranila, acetona, resina pura e Embed 812.

4.4 Preparação química e caracterização do composto

A uma solução de ácido *p*-cumárico (0,2 g; 1,21 mmol) em 14,6 mL de acetona anidra, foram adicionados 0,65 mL de trietilamina (4,84 mmol) e o haleto (1,25 mmol). A solução foi mantida em refluxo sob agitação magnética por 48 horas. O solvente foi parcialmente evaporado sob pressão reduzida, e a extração foi realizada com 20 mL de água e 3 x 20 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com 3 x 10 mL de água, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e, em seguida, o solvente foi evaporado. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica gel 60, com hexano e acetato de etila (8:2) como eluentes (Figura 7) (Kim *et al.*, 2010).

O composto foi identificado por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, utilizando um espectrofotômetro Agilent Technologies® Cary 630 FTIR, com pastilhas de brometo de potássio (KBr) e medição da frequência em cm^{-1} . Além disso, foram realizadas análises por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de próton (^1H) e carbono-13 (^{13}C), obtidas em um sistema VARIAN-NMR-SYSTEM operando a 400 e 100 MHz, respectivamente (Boeck *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2012).

Figura 7. Representação da reação para a síntese do *p*C4C.



Fonte: elaboração própria (2021).

4.5 Avaliação da atividade antibacteriana do *p*C4C

4.5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Subletal Máxima (CSM)

A determinação da CIM e da CBM foi realizada em triplicata ao longo de três experimentos independentes utilizando a técnica de microdiluição em placa, baseada nas diretrizes do CLSI (2012), com pequenas modificações. Em uma placa de 96 poços de fundo plano (Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd.), foram dispensados 100 μ L de CMH e adicionados 100 μ L de *p*C4C (composto em teste), vancomicina ou polimixina (controles positivos), seguidos por diluições seriadas na razão 1:2.

Os inóculos das oito linhagens bacterianas foram previamente cultivados em BHI e preparados em CMH na escala 0,5 de McFarland, ajustada por espectrofotometria visível (722G BioPet technologiesTM) a $\lambda = 625$ nm. Em seguida, suspensões bacterianas de cada linhagem foram adicionadas ao sistema, atingindo uma concentração final de 5×10^5 UFC/mL por poço. Foram reservados poços para controle de crescimento bacteriano, esterilidade do meio e controle do veículo do composto. As leituras foram realizadas após incubação (Lucadema Científica[®] LUCA-81/100) à 37 °C por 24 horas. A primeira concentração sem crescimento bacteriano visível foi considerada a CIM, enquanto a última concentração com crescimento visível foi considerada a CSM. Os resultados foram analisados por estatística descritiva e expressos como moda.

A partir dos poços que apresentaram inibição do crescimento bacteriano após a leitura da CIM, alíquotas de 20 μ L foram retiradas das concentrações CIM, CIMx2

e CIMx4 e plaqueadas em AMH. Após incubação à 37 °C por 24 horas, a menor concentração na qual não foi observado crescimento bacteriano, indicando atividade bactericida, foi considerada a CBM (Parvekar *et al.*, 2020).

4.5.2 Cinética de crescimento bacteriano

Para observar possíveis variações no crescimento bacteriano na presença ou ausência de *pC4C* ao longo do tempo, foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato. As linhagens de *S. aureus*, MRSA e *E. faecalis* foram inoculadas em CMH na escala 0,5 de McFarland, contendo *pC4C* em concentrações correspondentes aos seus valores de CIM e CBM.

Como controles de crescimento, as linhagens foram inoculadas apenas em MHB, e para os controles de esterilidade, utilizou-se apenas MHB nos poços. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas em um leitor de microplacas BioTek-EON®. As leituras de densidade óptica (DO) foram determinadas em $\lambda = 625$ nm em cada poço, a cada hora, ao longo do período de incubação de 24 horas, utilizando o software Gen5 Secure 2.09 (Theophil *et al.*, 2014).

Com base nessas leituras, os dados foram analisados estatisticamente, permitindo a construção de curvas em gráficos para melhor visualização dos resultados.

4.5.3 Cinética de morte bacteriana

A atividade antimicrobiana do *pC4C* ao longo do tempo foi avaliada por meio do ensaio *Time-Kill* (Hu *et al.*, 2019). Nesse ensaio, o microrganismo foi preparado em CMH, padronizado na escala 0,5 de McFarland e exposto aos tratamentos com *pC4C* e vancomicina em concentrações correspondentes aos seus valores de CIM e CIMx2 previamente determinados. O experimento foi conduzido em triplicata utilizando placas de 96 poços de fundo plano com poços reservados para controle de crescimento e controle de esterilidade.

Após incubação a 37 °C por 24 horas foi realizado o plaqueamento nos tempos de 0, 4, 8, 12 e 24 horas. Alíquotas de cada poço foram transferidas para placas de Petri estéreis contendo AMH e o espalhamento foi realizado com alças de

Drigalski estéreis. Posteriormente, as placas de Petri foram incubadas a 37 °C por 24 horas para a determinação das unidades formadoras de colônia (UFC). A análise estatística foi realizada para avaliar as variações inter e intragruupo.

4.5.4 Teste de ação combinada

Este ensaio foi conduzido utilizando o Método *Checkerboard* de acordo com metodologia proposta por Orhan *et al.* (2005) com algumas alterações. Inicialmente, *pC4C* e vancomicina foram preparados em tubos de microdiluição estéreis em concentrações variando de CIMx8 a CIM/16 contra *E. faecalis* ATCC 29212. A suspensão bacteriana foi preparada em CMH e ajustada à escala 0,5 de McFarland em $\lambda = 625$ nm.

Em microplacas estéreis, CMH foi adicionado aos poços. Em seguida, *pC4C* foi distribuído verticalmente pela microplaca, enquanto a vancomicina foi adicionada horizontalmente. Posteriormente, a suspensão bacteriana foi adicionada. Os controles dos compostos foram incluídos individualmente nas respectivas concentrações de CIM contra *E. faecalis*. Poços foram reservados para controle de crescimento bacteriano e controle de esterilidade do meio.

A leitura foi realizada após incubação a 37 °C por 24 horas, e os resultados foram obtidos utilizando o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI), que emprega as Concentrações Inibitórias Fracionadas (FIC) dos compostos isolados e em combinação, calculadas pelas seguintes fórmulas matemáticas:

$$\text{FICI} = \text{FIC}_{\text{pC4C}} + \text{FIC}_{\text{vancomicina}}$$

$$\text{FIC}_{\text{pC4C}} = \frac{\text{MIC}_{\text{combinada}}}{\text{MIC}_{\text{isolada}}} \quad \text{FIC}_{\text{vancomicina}} = \frac{\text{MIC}_{\text{combinada}}}{\text{MIC}_{\text{isolada}}}$$

O índice foi interpretado conforme os seguintes critérios: $\text{FICI} \leq 0,5$ = sinergismo; $0,5 < \text{FICI} \leq 1,0$ = adição; $1,0 < \text{FICI} \leq 4,0$ = indiferente; $\text{FICI} > 4,0$ = antagonismo (Herrera *et al.*, 2022).

4.5.5 Ensaio de ruptura do biofilme bacteriano formado

O ensaio avaliou a ação do *pC4C* sobre o biofilme pré-formado da linhagem MRSA NCTC 13373. A suspensão da linhagem teste, preparada em caldo Mueller

Hinton duplamente concentrado (2xCMH) e padronizada na escala 0,5 de McFarland utilizando um espectrofotômetro visível, foi adicionada a uma placa de 24 poços (KASVI® Laboratórios Ltda.). A placa foi então incubada a 37 °C por 24 horas. Após esse período, os sobrenadantes foram removidos e os poços foram lavados com tampão fosfato-salino esterilizado (PBS). Em seguida, soluções de *pC4C* e vancomicina preparadas em caldo Mueller Hinton (1xCMH) nas concentrações de CIMx10, CIMx4 e CIM contra MRSA foram adicionadas aos poços contendo os biofilmes formados. Também foram realizados controles de esterilidade do meio, controle do dissolvente de *pC4C* (DMSO), utilizado a 1%, e controle de viabilidade da linhagem bacteriana.

Neste ensaio, cada grupo foi conduzido em octuplicata (oito poços para cada grupo). O sistema foi incubado a 37 °C por mais 24 horas. Após o período de incubação, a quantificação do biofilme foi realizada utilizando o método de coloração com cristal violeta em leitor de microplaca BioTek® Synergy HT a $\lambda = 590$ nm, utilizando-se o software Gen5 1.10 (Rajasekharan *et al.*, 2017).

4.6 Ensaios de toxicidade

4.6.1 Avaliação da citotoxicidade sobre fibroblastos FGH

A citotoxicidade foi avaliada em triplicata utilizando o método colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio]}. A linhagem de fibroblastos foi cultivada em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 200 µg/mL de L-glutamina, sendo mantida em atmosfera umidificada a 37 °C com 5% de CO₂.

Os fibroblastos foram semeados em placas de 96 poços na densidade de 1x10⁶ células por poço e, após 24 horas, o meio de cultura foi removido. Em seguida, as células foram tratadas com *pC4C* nas concentrações de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 µg/mL (correspondendo a 3,47; 6,94; 13,89; 27,77; 55,54; 111,09; 222,18; 444,37 e 888,73 µM) por 24 horas em incubadora a 37 °C. Como controle de crescimento, as células foram incubadas apenas com meio de cultura. O veículo

DMSO 0,6% foi avaliado como controle correspondente à maior concentração do composto.

Após o intervalo de tratamento, os sobrenadantes foram removidos dos poços e 200 μ L de solução de MTT (0,3 mg/mL) foi adicionado. As placas foram então incubadas por 4 horas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂. Após a incubação, a solução de MTT foi aspirada e 200 μ L de DMSO (100% v/v) foi adicionado a todos os poços, seguido de agitação por 5 minutos para lise celular e solubilização dos cristais de formazan.

A absorbância da solução resultante foi medida utilizando um leitor de ELISA (ASYS, UVM340, Biochrom, UK) a um comprimento de onda de 470 nm para determinar a viabilidade celular (Sanches *et al.*, 2019).

4.6.2 Ensaio de toxicidade sistêmica em larvas de *Galleria mellonella*

A avaliação da toxicidade sistêmica do *p*C4C foi realizada utilizando larvas de *Galleria mellonella*, conforme descrito por Wijesinghe *et al.* (2020). Larvas com peso entre 200 e 300 mg, sem sinais de melanização, foram selecionadas aleatoriamente e separadas em grupos em placas de Petri (n = 15). Foram testadas nove concentrações de *p*C4C: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 μ g/mL (correspondendo a 3,47; 6,94; 13,89; 27,77; 55,54; 111,09; 222,18; 444,37 e 888,73 μ M). Uma alíquota de 10 μ L de *p*C4C, controle (NaCl 0,9% v/v) ou veículo DMSO (0,6% v/v, correspondente à maior concentração do composto testado) foi injetada na hemocele de cada larva através da última pró-pata (*proleg*) esquerda, utilizando uma seringa Hamilton (Hamilton, Reno, NV). As larvas foram incubadas a 30°C em uma incubadora B.O.D. (Solidsteel SSBOD 120L, Piracicaba, SP), e sua sobrevivência foi monitorada em intervalos selecionados por até 72 horas. Larvas que não apresentaram movimento ao toque foram consideradas mortas.

4.7 Análises *in silico*

4.7.1 Predições toxicológicas e farmacocinéticas

As previsões toxicológicas e farmacocinéticas foram obtidas utilizando as plataformas virtuais pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/>) (Pires, Blundell e Ascher, 2015a) e SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) (Daina, Michelin e Zoete, 2017). Para a utilização das interfaces eletrônicas dos modelos preditivos, a estrutura química do composto foi convertida para o formato SMILES. A plataforma OSRA 2.1.4 foi empregada para gerar a conformação estrutural no formato requerido.

4.7.2 Docking molecular

A estrutura bimensional (2D) do *p*C4C foi construída utilizando o software Marvin Sketch v.24.1.3 e posteriormente convertida para o formato *.sdf*. As moléculas de fármacos controle foram obtidas a partir do banco de dados PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). As estruturas moleculares foram importadas para o software Spartan 14 v.1.1.4 para construção tridimensional (3D) e para a minimização de energia, utilizando mecânica molecular e o método semiempírico AM1, com o objetivo de obter as conformações mais estáveis. As estruturas otimizadas resultantes foram então utilizadas como entrada para as simulações de *docking* molecular realizadas no Molegro Virtual Docker (MVD) 2013 v.6.0.1.

As enzimas-alvo foram obtidas no formato *.pdb* a partir do Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). As estruturas das proteínas e dos ligantes foram preparadas por meio da correção dos estados de protonação dos resíduos de aminoácidos, além da remoção de moléculas de água e cofatores das estruturas.

Os mecanismos selecionados estão consolidados na literatura como alvos importantes na inibição de microrganismos e são cruciais para sua sobrevivência, estando relacionados à membrana celular, parede celular e ao DNA. As proteínas envolvidas em processos bacterianos essenciais incluíram as enzimas

fosfatidilglicerol fosfato sintase (PgsA) (PDB: 7DRJ), DNA ligase dependente de NAD⁺ (PDB: 3JSN) e a proteína ligadora de penicilina 4 (PBP4) (PDB: 6BSR).

Para o estudo de fatores relacionados à resistência antimicrobiana mediados por bombas de efluxo MepA e NorA, suas estruturas foram obtidas a partir da plataforma AlphaFold (Disponível em: <https://alphafold.ebi.ac.uk>; Acesso em: 30 de março de 2025), correspondendo a: proteína exportadora de múltiplas drogas MepA (AF-Q8NYB0-F1-v4) e proteína de resistência a quinolonas NorA (AF-P0A0J7-F1-v4).

A preparação dos modelos obtidos na plataforma AlphaFold foi realizada previamente por meio da visualização e verificação da estrutura tridimensional no software PyMol 2.0 (Schrödinger, LLC, 2016), com o objetivo de assegurar a integridade estrutural. Hidrogênios ausentes foram adicionados utilizando a ferramenta PyRX (Dallakyan e Olson, 2015). Em seguida, a proteína foi submetida à minimização de energia utilizando o GROMACS 2024.1 (Spoel *et al.*, 2024), com o campo de força AMBER99SB-ILDN (Lindorff-Larsen *et al.*, 2010), a fim de aliviar possíveis tensões estruturais. Foram realizadas 2000 etapas de minimização utilizando o método do gradiente conjugado, mantendo a estrutura principal fixa para preservar sua conformação nativa.

Nos alvos que apresentavam ligantes co-cristalizados, foram criados moldes para demarcar o sítio ativo, sendo realizado previamente o processo de validação da enzima por meio de *redocking*, com a avaliação dos valores de RMSD (*Root Mean Square Deviation*). A identificação do sítio ativo também foi baseada nos resíduos críticos descritos para a região ativa no artigo de referência do PDB, além da utilização de ferramentas de predição de bolsões moleculares, como a plataforma intuitiva Protein Plus (Disponível em: <https://proteins.plus/help/tutorial>; Acesso em: 10 de março de 2025) (Gandhi *et al.*, 2024).

O procedimento de *docking* foi realizado utilizando uma grade com raio de 15 Å e resolução de 0,30 Å, de forma a abranger adequadamente os sítios de ligação macromoleculares. Os demais parâmetros seguiram as configurações padrão fornecidas pelo pacote do software (Função de escore: MolDock Score; Avaliação do ligante: Internal ES, Internal Hbond, Sp2-Sp2 Torsions, todos verificados; Número de execuções: 30; Algoritmo: MolDock SE; Número máximo de interações: 1500;

Tamanho máximo da população: 50; Número máximo de etapas: 300; Fator de distância entre vizinhos: 1,00; Número máximo de poses retornadas: 5). As interações foram visualizadas no *software* Discovery Studio Visualizer v20.1.0.19295 – BIOVIA (Acesso em: 2 de abril de 2025; <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>).

4.7.3 Dinâmica molecular

As simulações de dinâmica molecular (DM) foram realizadas utilizando o *software* GROMACS 2023.1 (Abraham *et al.*, 2015; Berendsen, Spoel, van der e Drunen, van, 1995; GROMACS Development Team, 2023). A topologia do ligante foi gerada por meio da plataforma Automated Topology Builder (ATB) v. 3.0, utilizando o campo de força GROMOS 43a1 (Malde *et al.*, 2011; Stroet *et al.*, 2018), enquanto a topologia da proteína foi construída no GROMACS com o campo de força GROMOS96 54a7. Para a solvatação, foi empregado o modelo de água SPC (Bondi, 1964), com adição de íons Cl⁻ e Na⁺ para neutralização do sistema.

Após a minimização de energia, o sistema foi equilibrado a 300 K sob condições de número constante de partículas, volume e temperatura (conjunto NVT), utilizando o algorítimo V-rescale por 100 ps, seguido pelo equilíbrio de pressão a 1 atm sob número constante de partículas, pressão e temperatura (conjunto NPT), com o uso do algorítimo de Parrinello-Rahman por mais 100 ps (Lemkul, 2019). A simulação totalizou 100 ns (50 milhões de passos). A estabilidade estrutural e a flexibilidade do sistema foram avaliadas por meio das análises de desvio quadrático médio (RMSD) e flutuação quadrática média (RMSF), respectivamente, juntamente com a avaliação das energias de interação de Coulomb e Lennard-Jones. Os gráficos foram gerados no *software* Grace (Grace Development Team, <http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>).

4.8 Identificação do modo de ação do *pC4C*

4.8.1 Ensaio de integridade de membrana e viabilidade bacteriana

MRSA NCTC 13373, *S. aureus* NCTC 12981 e *E. faecalis* ATCC 29212 cultivadas e colhidas em fase logarítmica foram ajustadas a uma densidade de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, tratadas com *pC4C* e vancomicina em suas respectivas concentrações de CIM para as diferentes linhagens e incubadas a 37 °C por 3 h. Os grupos sem tratamento foram utilizados como controle negativo e os grupos tratados com vancomicina como os grupos controle positivos. As suspensões bacterianas foram centrifugadas a 5000 g por 5 min (Rotina 380R, Hettich®, North Rhine-Westphalia, Alemanha). Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* foram marcados com iodeto de propídeo (Thermo Fisher®, Rochester, New York, EUA) 10 µg/mL no escuro (Hu *et al.*, 2019). Em seguida, as amostras preparadas foram analisadas por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) (DMi8, Leica® Microsystems, Mannheim, Alemanha) usando um comprimento de onda de excitação de 552 nm e um comprimento de onda de emissão nas faixas de 639-701 nm (TCS SP8, Leica, Alemanha) através do software LAS X 3.5.5.19976 (Jonkman *et al.*, 2020). Foram conduzidos dois experimentos independentes em duplicatas, sendo capturadas imagens de campos aleatórios por amostra. A fluorescência foi mensurada utilizando o software ImageJ 1.54g.

4.8.2 Avaliação de alterações morfológicas por MET

Bactérias em fase exponencial (MRSA NCTC 13373 e *E. faecalis* ATCC 29212) cultivadas em caldo BHI foram padronizadas por espectrofotometria a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL e tratadas com *pC4C* e vancomicina em suas respectivas CIM para cada linhagem bacteriana por 3 h a 37 °C. Grupos não tratados foram processados como controle. Em seguida, as células foram peletizadas por centrifugação e ressuspensas em PBS com pH de 7,4 por três vezes. Então, os *pellets* bacterianos foram fixados com fixador Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 4,0% + tampão cacodilato 0,1 M), lavados em tampão cacodilato 0,1M e pós-fixados com OSO4 + fenck 1:1 (tetróxido de ósmio 1% + cloreto de cálcio 2 mm + ferrocianeto de

potássio 0,8% em tampão cacodilato 0,1 M) por 1 h. Depois disso, as bactérias foram lavadas em água destilada, levadas à contrastação com uranila 2,5% por 40 minutos e desidratadas com acetona em séries de 30% (20 min.), 50% (20 min.), 70% (overnight), 90% (20 min.) e 3x100% (20 min.). Após isso, procedeu-se a infiltração com acetona e resina Embed 812 (1:1 e 1:2) e resina pura e, então, seguiu-se para o emblocamento por 72 h a 60 °C. Seções ultrafinas (70 nm) foram cortadas usando um ultramicrótomo (Leica EM UC7). As amostras foram analisadas em um microscópio eletrônico de transmissão (MET) (FEI Tecnai G2 Spirit Biotwin) operando à tensão de 20 kV a 120 kV com imagens adquiridas com uma câmera CCD MegaView Olympus 2K e Eagle 4K, processadas pelo software para captura de imagens Tecnai Imaging & Analysis (TIA) da FEI (Lau *et al.*, 2018).

4.8.3 Ensaio de lise celular

pC4C foi avaliado com base na sua propriedade de causar lise nas células das linhagens bacterianas testadas. Para isso, foi utilizado espectrofotometria visível. Os inóculos bacterianos foram padronizados a uma densidade de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL e tratados com *pC4C* nas suas respectivas CIM de cada linhagem bacteriana por 24 h a 37° C. As células também foram tratadas com vancomicina nas suas CIM como controle positivo enquanto que as células não tratadas foram utilizadas como controle negativo. Também foram realizados o controle do dissolvente (DMSO) para cada linhagem e o controle de esterilidade do meio. Em seguida, foi determinada a D0600 nm de cada grupo (722G BioPet technologies™). Ensaio realizado em triplicata (Lima *et al.*, 2021).

4.8.4 Análise da atividade antibiofilme por MCVL

MRSA NCTC 13373 preparada em caldo Mueller Hinton duplamente concentrado (2xCMH) e padronizada a uma densidade de $1,5 \times 10^8$ UFC foi adicionada a placas confocais de cultura celular com fundo de vidro (WHB® Scientific, China). Após incubação a 37°C por 24 horas, os sobrenadantes foram removidos e as placas lavadas em PBS com pH 7,4 esterilizado. Em seguida os biofilmes de MRSA formados foram tratados com *pC4C* e vancomicina de acordo

com suas CIM, CIMx4 e CIMx10. As placas foram incubadas novamente a 37°C por mais 24 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos e as placas lavadas em PBS com pH 7.4 esterilizado (Rajasekharan *et al.*, 2017). Posteriormente, os biofilmes foram marcados com a coloração dupla de laranja de acridina e iodeto de propídeo (LA/IP) (Thermo Fisher®, Rochester, New York, EUA) 10 µg/mL no escuro por 3 minutos e analisados por MCVL (DMi8, Leica Microsystems, Mannheim, Alemanha) usando um comprimento de onda de excitação de 488 e 552 nm e um comprimento de onda de emissão nas faixas de 510-541 e 639-701 nm (TCS SP8, Leica, Alemanha) através do software LAS X 3.5.5.19976 (Jonkman *et al.*, 2020).

4.8.5 Análise do efeito do composto sobre o DNA

Cultivo bacteriano de *E. faecalis* padronizado a aproximadamente 10^8 UFC/mL foi tratado com *p*C4C a 16 µg/mL, correspondendo a CIM previamente determinada para essa linhagem, e incubado por 3 h a 37 °C. O DNA bacteriano foi extraído imediatamente após os tratamentos das células utilizando o kit QIAamp® mini (Qiagen GmbH, Alemanha). Em seguida, as soluções de DNA extraído foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% com coloração de brometo de etídio e visualizado em um transiluminador ultravioleta, bem como à análise espectroscópica em um comprimento de onda de 260 nm. Células tratadas com DMSO (Dinâmica® Química Contemporânea Ltda., Indaiatuba, Brazil) a 0,5% foram usadas para avaliar possível interferência do veículo nos resultados do ensaio. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo (Misba, Zaidi e Khan, 2017). O experimento foi realizado em triplicata.

4.9 Modulação à resistência bacteriana

4.9.1 Ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

No ensaio de concentração inibitória mínima as células das linhagens *S. aureus* K2068 e *S. aureus* 1199B foram colhidas após o crescimento bacteriano em HIA a 37 °C por 24 h. Os inóculos padronizados na escala 0,5 de McFarland (aproximadamente 10^8 UFC/mL) foram preparados na proporção 1:9 com CBHI,

sendo transferidos 100 μ L dessas soluções para cada cavidade em placas de microdiluição de 96 poços. Após essa etapa, foram realizadas as microdiluições dos compostos *p*C4C, brometo de etídio (EtBr), ciprofloxacino, norfloxacino e do inibidor carbonilcianeto *m*-clorofenil-hidrazona (CCCP) (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri, EUA) a partir de 1024 μ g/mL utilizando-se 100 μ L de cada composto até as penúltimas cavidades (1:1). As últimas cavidades foram reservadas para os controles de crescimento. As placas, então, foram incubadas a 37 °C por 24 h para a realização da leitura das CIMs. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas (Freitas *et al.*, 2024).

4.9.2 Avaliação da inibição de bombas de efluxo MepA e NorA pelo método do brometo de etídio

O crescimento bacteriano das linhagens *S. aureus* K2068 e *S. aureus* 1199B cultivados em HIA slants e mantido a 37 °C por 24 h foram utilizados para a preparação e padronização dos inóculos de acordo com a escala 0,5 McFarland (aproximadamente 10⁸ UFC/mL). *p*C4C, em concentração sub-inibitória (CIM/8), e CCCP foram adicionados aos inóculos bacterianos. Em seguida, 100 μ L dos conteúdos foram transferidos para placas de 96 poços onde o EtBr foi microdiluído em concentrações que variaram de 1024 μ g/mL a 0,5 μ g/mL. As últimas cavidades foram utilizadas para os controles de crescimento. Após 24h foram adicionados de 20 μ L resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido) (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri, EUA) para a realização da leitura das placas por visualização de mudança de cor do meio. A leitura da mudança de cor do meio de azul para vermelho indica a presença de crescimento bacteriano e a permanência em azul a ausência de crescimento. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas (Almeida, de *et al.*, 2024).

4.9.3 Análise da atividade modulatória de *p*C4C sobre a resistência antibiótica

Os inóculos das linhagens *S. aureus* K2068 e *S. aureus* 1199B foram preparados e padronizados em uma densidade de aproximadamente 1,5 x 10⁸

UFC/mL. O *p*C4C foi adicionado na concentração equivalente a sua CIM/8 frente às linhagens testadas e o CCCP foi usado como controle positivo. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 µL das soluções de cada tratamento e em seguida cada antibiótico (ciprofloxacino e norfloxacino) foi adicionado aos poços em concentrações entre 1024 µg/mL e 0,5 µg/mL. As placas de microtitulação foram incubadas a 37 °C por 24 h e, então, 20 µL de resazurina (0,01% p/v em água destilada esterilizada) foram adicionados a cada poço para constatar o crescimento bacteriano pela mudança de coloração. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas (Almeida, de *et al.*, 2024).

4.10 Tratamento de dados e análise estatística

Os dados obtidos foram organizados por categorias em um banco de dados utilizando-se o software LibreOffice Calc 7.4. Para a análise estatística descritiva e analítica dos dados, bem como para a produção dos gráficos foi empregado o software estatístico GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA). Os resultados considerados significativos foram os que apresentaram um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Preparação química e caracterização do composto

O *p*C4C foi obtido por meio de uma reação de esterificação entre o ácido *p*-cumárico e um haleto. A estrutura química foi confirmada por RMN de ^1H e ^{13}C , além de espectroscopia no infravermelho (FTIR), conforme previamente reportado (Kim *et al.*, 2010).

Ao final de sua síntese, o *p*C4C apresentou-se como uma molécula pura, na forma de sólidos amorfos brancos; rendimento de 30,84% (217 mg, 0,75 mmol); P.F.: 111-112 °C. R_f = 0,62 (hexano/AcOEt [8:2]); IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3414 (O-H), 3049 (C-H sp^2), 2893 (C-H sp^3), 1697 (C=O), 1632 (C=C), 1600 e 1440 (C=C), 1280 e 1166 (C-O), 550,4 (C-Cl). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δH 7,67 (d, J = 15,96 Hz, H=1); 7,41 (d, J = 8,56 Hz, H=2); 7,33-7,35 (m, H=4); 6,85 (d, J = 8,56 Hz, H=2); 6,35 (d, J = 15,96 Hz, H=1); 5,21 (s, H=2). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 167,8; 158,4; 145,7; 134,6; 134,3; 130,3; 129,7; 128,9; 126,9; 116,1; 114,7; 65,7 (Melo *et al.*, 2024). Os dados de síntese do composto foram cedidos pelo prof. Damião Pergentino/UFPB e os espectros obtidos encontram-se no anexo A deste trabalho.

5.2 Avaliação da atividade antibacteriana do *p*C4C

5.2.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Subletal Máxima (CSM)

Conforme apresentado na Tabela 1, o composto *p*C4C apresentou atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas com CIMs variando de 8 (27,77 μM) a 16 $\mu\text{g/mL}$ (55,54 μM). As CBMs corresponderam ao dobro dos valores de CIM, variando de 16 (55,54 μM) a 32 $\mu\text{g/mL}$ (111,09 μM). As CSMs foram de 4 $\mu\text{g/mL}$ (13,87 μM) para *S. aureus* e *S. aureus* resistente à meticilina, e 8 $\mu\text{g/mL}$ (27,77 μM) para *E. faecalis*. O composto não apresentou atividade significativa contra bactérias Gram-negativas, com CIMs acima do limite de detecção da concentração utilizada no experimento (> 512 $\mu\text{g/mL}$; > 1777,5 μM) para todas as linhagens testadas.

A vancomicina, utilizada como controle positivo para bactérias Gram-positivas, apresentou CIMs entre 2 (1,38 µM) e 4 µg/mL (2,76 µM), com CBM e CSM de 8 µg/mL (5,52 µM) e 1 µg/mL (0,69 µM), respectivamente, para *S. aureus* e *S. aureus* resistente à meticilina, e 32 µg/mL (22,08 µM) e 2 µg/mL (1,38 µM), respectivamente, para *E. faecalis*. A polimixina, utilizada como controle positivo para bactérias Gram-negativas, apresentou CIMs abaixo do limite de detecção da concentração utilizada no experimento, sendo < 4 µg/mL (< 2,88 µM) para *K. pneumoniae* e *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase, 4 µg/mL (2,88 µM) para *P. aeruginosa* e 8 µg/mL (5,77 µM) para *E. coli* e *S. typhimurium*.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Subletal Máxima (CSM) do *p*-cumarato de 4-clorobenzila, vancomicina e polimixina contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Bactérias Gram-positivas						
Cepa	<i>p</i> -Cumarato de 4-clorobenzila			Vancomicina		
	CIM µg/mL (µM)	CBM µg/mL (µM)	CSM µg/mL (µM)	CIM µg/mL (µM)	CBM µg/mL (µM)	CSM µg/mL (µM)
SA	8 (27,77)	16 (55,54)	4 (13,87)	2 (1,38)	8 (5,52)	1 (0,69)
MRSA	8 (27,77)	16 (55,54)	4 (13,87)	2 (1,38)	8 (5,52)	1 (0,69)
EF	16 (55,54)	32 (111,09)	8 (27,77)	4 (2,76)	32 (22,08)	2 (1,38)

Bactérias Gram-negativas						
Cepa	<i>p</i> -Cumarato de 4-clorobenzila			Polimixina		
	CIM µg/mL (µM)	CBM µg/mL (µM)	CSM µg/mL (µM)	CIM µg/mL (µM)	CBM µg/mL (µM)	CSM µg/mL (µM)
PsA	> 512 (> 1777,5)	----	----	4 (2,88)	----	----
EC	> 512 (> 1777,5)	----	----	8 (5,77)	----	----
ST	> 512 (> 1777,5)	----	----	8 (5,77)	----	----
KP	> 512 (> 1777,5)	----	----	< 4 (< 2,88)	----	----
KPC	> 512 (> 1777,5)	----	----	< 4 (< 2,88)	----	----

Bactérias Gram-positivas: SA: *Staphylococcus aureus* NCTC 12981; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina NCTC13373; EF: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. **Bactérias Gram-negativas:** PsA: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; EC: *Escherichia coli* ATCC 25922; ST: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* ATCC 14028; KP: *Klebsiella pneumoniae* NCTC9633; KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase NCTC 13809.

Fonte: elaboração própria (2023).

O DMSO, solvente utilizado na preparação da solução do composto, não interferiu no crescimento bacteriano. Os controles de crescimento e esterilidade também foram validados.

Dessa forma, o composto *p*C4C demonstrou potencial antibacteriano promissor, evidenciando sua propriedade de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas em baixas concentrações, além de apresentar efeito bactericida ao dobro de sua CIM contra as linhagens testadas.

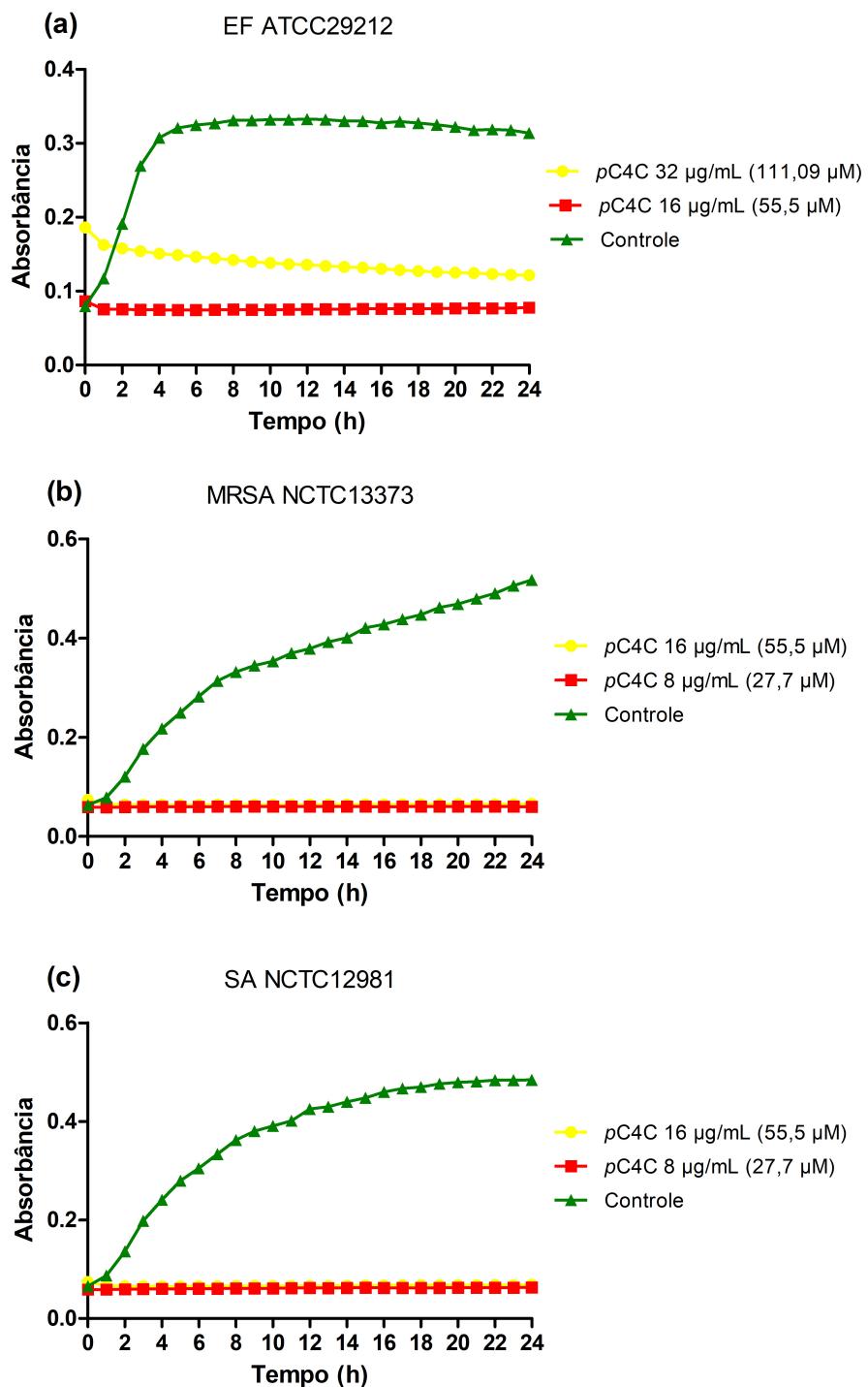
5.2.2 Cinética de crescimento bacteriano

Os resultados deste experimento estão representados em gráficos (Figura 8), os quais ilustram o grau de crescimento bacteriano registrado em intervalos de tempo pré-determinados por meio de curvas de crescimento.

O *p*C4C inibiu o crescimento de todas as cepas testadas a partir da primeira hora do contato inicial, tanto na concentração correspondente à CIM como na CBM para cada cepa respectiva. Para *E. faecalis*, o tratamento na CBM foi mais eficaz na supressão do crescimento bacteriano em comparação ao tratamento na CIM ao longo de todo o período estudado. Os controles de viabilidade validaram o experimento ao demonstrarem crescimento bacteriano ao longo do tempo, conforme indicado nos gráficos.

Quando comparados aos controles de viabilidade, os tratamentos apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,0001$), confirmando os resultados previamente determinados de CIM e CBM em relação à sua ação antibacteriana.

Figura 8. Curvas de crescimento microbiano das linhagens *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (a), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) NCTC 13373 (b) e *Staphylococcus aureus* NCTC 12981 (c) sob a ação do pC4C. Os resultados são apresentados como média \pm DP de três experimentos independentes realizados em triplicata (ANOVA one-way seguida pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,0001$ para todos os grupos).



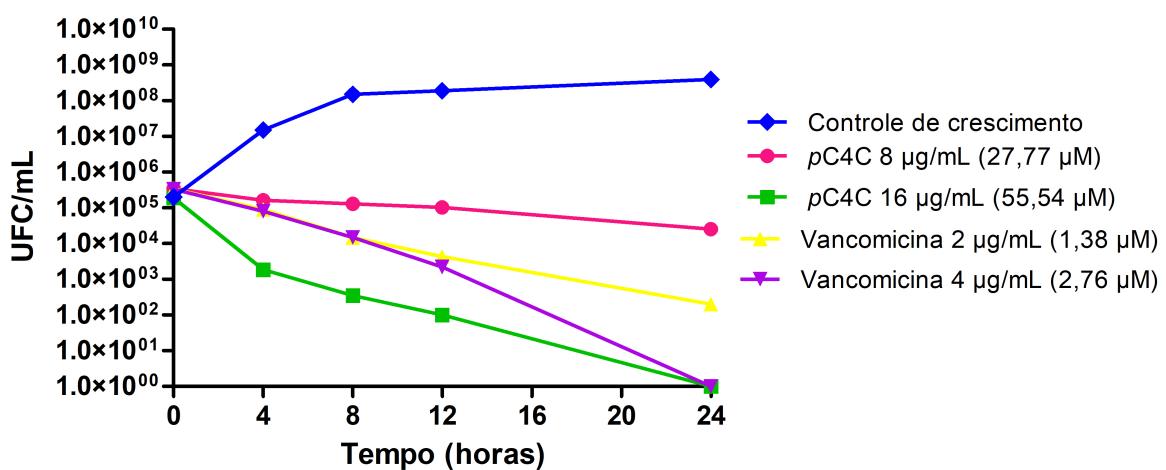
Fonte: elaboração própria (2023).

5.2.3 Cinética de morte bacteriana

A curva de eliminação temporal (*time-kill curve*) (Figura 9) demonstrou o tempo necessário para a eliminação do microrganismo tratado com os compostos *p*C4C e vancomicina. Na presença de *p*C4C na concentração de 27,77 μ M, correspondente à CIM, o crescimento de MRSA foi inibido, porém o composto não eliminou o microrganismo dentro de 24 horas de exposição. No entanto, na concentração de 55,54 μ M (CIMx2), correspondente à CBM, o *p*C4C eliminou com sucesso o MRSA em 24 horas de contato, confirmando seu efeito bactericida.

A vancomicina, em ambas as concentrações avaliadas de 1,38 μ M e 2,76 μ M (CIM e CIMx2), apresentou um comportamento semelhante, inibindo o crescimento de MRSA nas primeiras horas e eliminando-o dentro de 24 horas. O controle de crescimento validou o experimento ao demonstrar a densidade bacteriana em UFC/mL desde o início da incubação até o desenvolvimento do crescimento bacteriano nos intervalos estudados.

Figura 9. Mensuração do tempo de morte microbiana da linhagem *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina NCTC13373 sob a ação do *p*C4C. Os resultados são apresentados como média \pm DP de três experimentos independentes realizados em triplicata (ANOVA one-way seguida pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,0001$, exceto para *p*C4C 8 μ g/mL vs. controle em 0 h e *p*C4C 16 μ g/mL vs. vancomicina 4 μ g/mL em 24 h).



Fonte: elaboração própria (2023).

A análise estatística indicou diferenças significativas em todos os pontos temporais entre todos os grupos ($p < 0,0001$), exceto no tempo zero ao comparar o grupo tratado com a concentração de CIM de *p*C4C com o controle de crescimento,

e em 24 horas ao comparar o grupo tratado com a concentração de CIMx2 de *pC4C* com o grupo tratado com a concentração de CIMx2 de vancomicina.

5.2.4 Teste de ação combinada

Os dados obtidos no ensaio estão representados na Tabela 2. A FIC do *pC4C* calculada resultou em 1,0, enquanto que a FIC da vancomicina resultou em 0,5. Quando combinado à vancomicina o *pC4C* manteve estabilidade em sua concentração de CIM, indicando ausência de modificação devida à combinação. A vancomicina quando associada ao *pC4C* teve seu valor de CIM contra *E. faecalis* ATCC 20212 reduzida pela metade, demonstrando uma melhora decorrente da associação. Com base nesses resultados, a FICI foi calculada obtendo-se o valor de 1,5 classificando essa associação como indiferente.

Tabela 2. Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) após a combinação entre *pC4C* e vancomicina sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Compostos	Concentração Inibitória Fracionada
<i>p</i> -Cumarato de 4-clorobenzila	$FIC_A = 1$
Vancomicina	$FIC_B = 0,5$
	$FIC_A + FIC_B = 1,5$ (Indiferente)

Sinergismo: FICI $\leq 0,5$; Adição: $0,5 < FICI \leq 1,0$; Indiferente: $0,5 < FICI \leq 4$; Antagonismo: > 4
Fonte: Elaboração própria (2023).

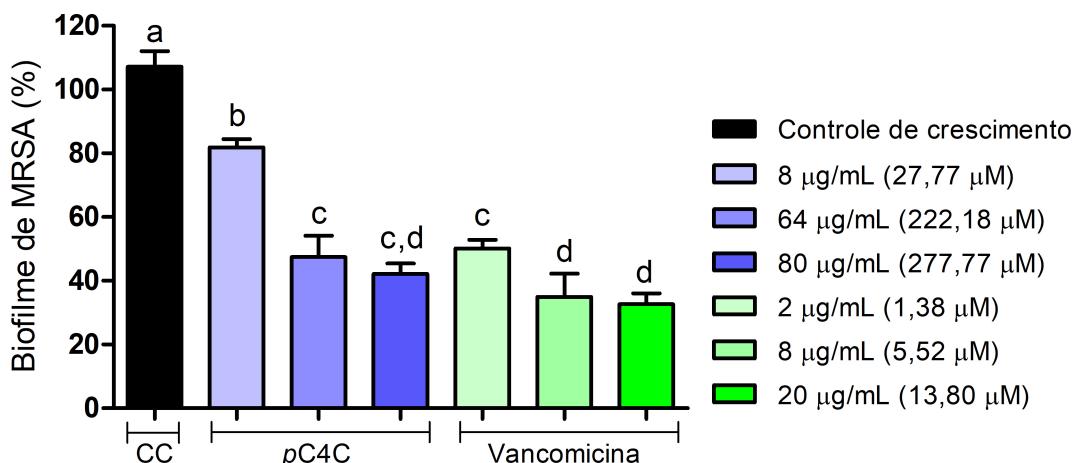
5.2.5 Ensaio de ruptura do biofilme bacteriano formado

O efeito da disruptão do biofilme formado por MRSA pelo *pC4C* (Figura 10) demonstra que todas as concentrações testadas apresentaram diferenças estatisticamente significativas em comparação ao controle de crescimento ($p < 0,0001$), com reduções do biofilme de aproximadamente 33% a 8 μ g/mL (27,7, μ M correspondente a CIM), 71% a 64 μ g/mL (222,1 μ M, correspondente a CIMx4) e 73% a 80 μ g/mL (277,7 μ M, correspondente a CIMx10). Também indica que não houve diferença significativa entre as duas maiores concentrações, sugerindo que, a

partir da concentração de 222,18 μM , a molécula atinge seu potencial máximo de destruição do biofilme.

O mesmo fenômeno descrito acima ocorre com a vancomicina com percentuais variáveis de redução do biofilme: 65% a 2 $\mu\text{g/mL}$ (1,38 μM , correspondente a CIM), 83% a 8 $\mu\text{g/mL}$ (5,52 μM , correspondente a CIMx4) e 84% a 20 $\mu\text{g/mL}$ (13,8 μM , correspondente a CIMx10). As maiores concentrações de vancomicina (5,52 e 13,80 μM) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação à concentração mais alta de *pC4C* (277,7 μM).

Figura 10. Efeito inibitório do *pC4C* e vancomicina sobre o biofilme de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) NCTC 113373. Os resultados são apresentados como média \pm DP de três experimentos independentes. Todos os grupos foram comparados entre si. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA one-way seguida pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).



Fonte: elaboração própria (2023).

5.3 Ensaios de toxicidade

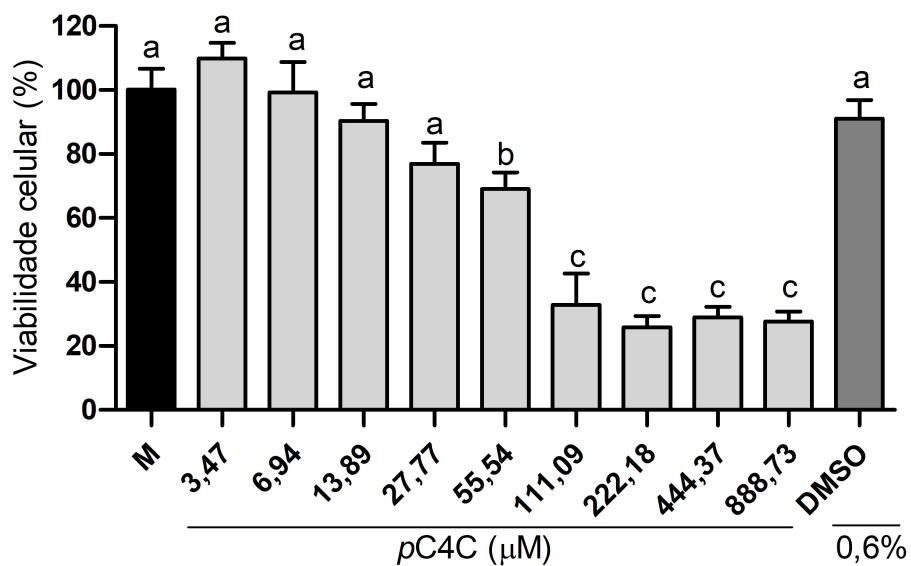
5.3.1 Avaliação da citotoxicidade sobre fibroblastos FGH

Para avaliar se o composto *pC4C* exerce efeitos citotóxicos sobre fibroblastos, foi realizado o ensaio de viabilidade celular (MTT) por 24 horas. Conforme demonstrado na Figura 11, as concentrações variando de 3,47 a 27,77 μM (1 a 8 $\mu\text{g/mL}$) e o veículo não afetaram a viabilidade celular em comparação ao controle ($p > 0,05$). A concentração de 55,54 μM (16 $\mu\text{g/mL}$) reduziu a viabilidade

celular em 25%, enquanto concentrações a partir de 111,09 μM (32 $\mu\text{g/mL}$) reduziram a viabilidade em mais de 60% ($p < 0,05$).

A citotoxicidade do *p*C4C é diretamente proporcional à sua concentração, com as maiores reduções na viabilidade celular observadas em concentrações mais elevadas. De acordo com a norma ISO 10993-5 (2009), o composto apresenta baixos efeitos citotóxicos em concentrações de até 55,54 μM (16 $\mu\text{g/mL}$). A partir da concentração de 111,09 μM (32 $\mu\text{g/mL}$), demonstra efeitos citotóxicos sobre a linhagem celular testada.

Figura 11. Porcentagem de viabilidade celular em fibroblastos gengivais humanos (FGH). Os FGH foram tratados com meio de cultura (M); *p*C4C nas concentrações de 3,47, 6,94, 13,89, 27,77, 55,54, 111,09, 222,18, 444,37 e 888,73 μM (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 $\mu\text{g/mL}$) e com o veículo DMSO (0,6%). A viabilidade dos fibroblastos foi determinada pelo método de MTT após 24 horas de tratamento. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão, $n = 4$. Todos os grupos foram comparados entre si e letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA one-way seguida pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).



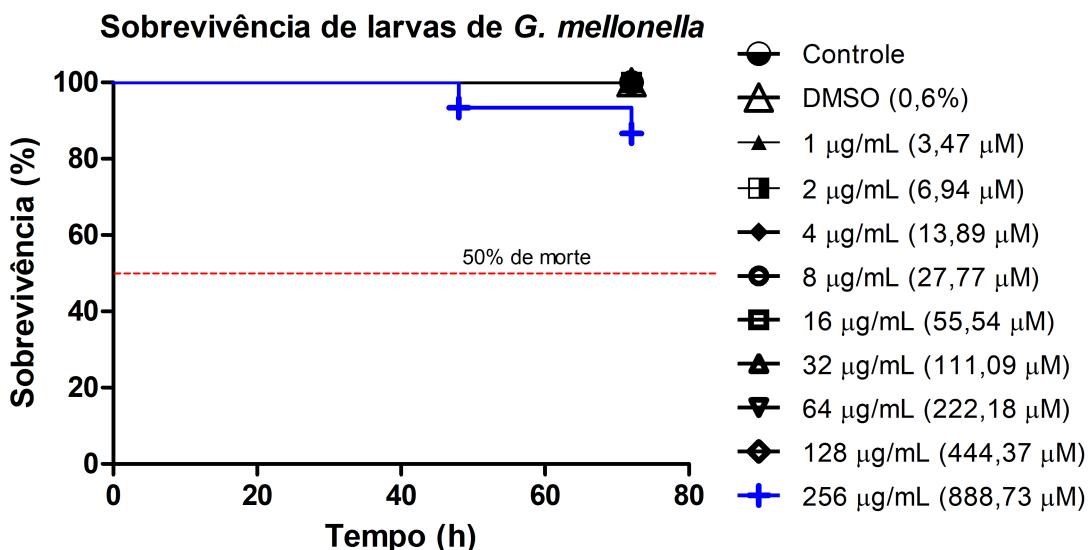
Fonte: elaboração própria (2023).

5.3.2 Ensaio de toxicidade sistêmica em larvas de *Galleria mellonella*

No intuito de avaliar a toxicidade sistêmica do composto, foi realizado o modelo utilizando larvas de *Galleria mellonella*. Conforme demonstrado na Figura 12, *p*C4C nas concentrações de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 $\mu\text{g/mL}$ (3,47, 6,94, 13,89, 27,77, 55,54, 111,09, 222,18 e 444,37 μM), assim como o veículo DMSO (0,6%), não demonstraram efeitos tóxicos sobre as larvas de *G. mellonella*, mesmo

após um período de observação de 72 horas, em comparação com o controle ($p > 0,05$). Somente na maior concentração testada, 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (888,73 μM), o *pC4C* apresentou efeitos tóxicos, após 48h, reduzindo a população de larvas em aproximadamente 10%.

Figura 12. Toxicidade sistêmica de *pC4C* em modelo de larvas de *Galleria mellonella*. As larvas receberam tratamento com *pC4C* nas concentrações de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3,47, 6,94, 13,89, 27,77, 55,54, 111,09, 222,18, 444,37 e 888,73 μM) e veículo DMSO (0,6%), sendo os sinais específicos verificados até 72 horas após o tratamento. O teste foi submetido à curva de sobrevivência ($p < 0,05$, teste de log-rank).



Fonte: elaboração própria (2023).

5.4 Análises *in silico*

5.4.1 Predições toxicológicas e farmacocinéticas

A identificação de potenciais problemas toxicológicos por meio de uma abordagem *in silico* utilizando modelos preditivos é uma estratégia para antecipar falhas no desenvolvimento de fármacos (Pires, Blundell e Ascher, 2015a). A análise realizada com o pkCSM forneceu parâmetros de toxicidade, conforme resumido na Tabela 3. Foram conduzidos os testes no modelo AMES, hepatotoxicidade, sensibilização dérmica, potencial inibitório dos canais de potássio codificados pelos genes *hERG* I e II, avaliação em *Tetrahymena pyriformis* e *Flathead minnow*, além da determinação da Dose Máxima Recomendada Tolerada (MRTD), apresentando resultados promissores, com exceção do teste em *Flathead minnow*.

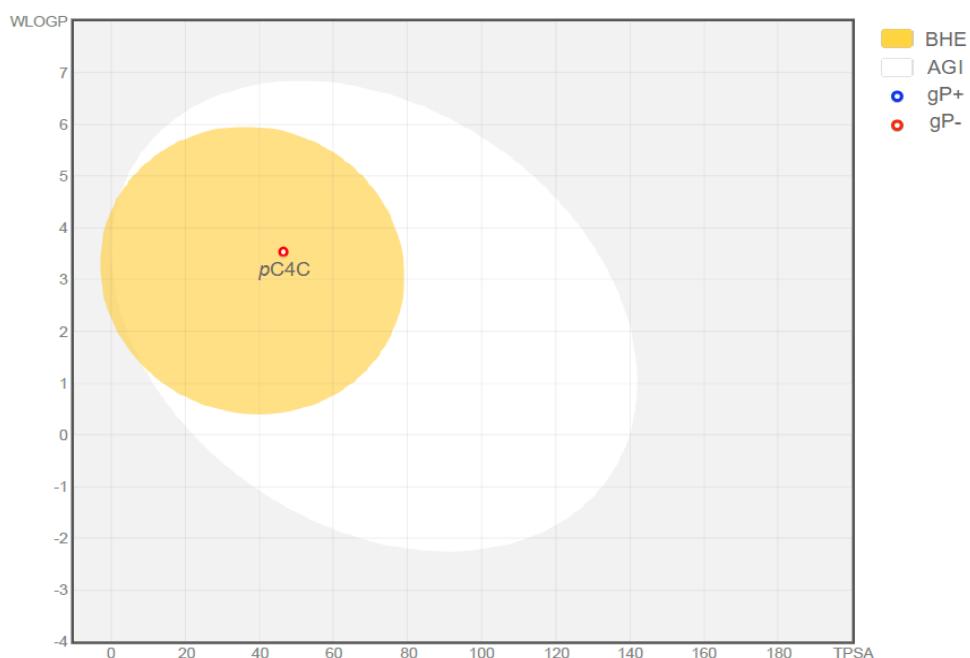
Tabela 3. Dados toxicológicos *in silico* estimados pela plataforma pkCSM.

Nome do modelo	Valor previsto (Categórico/Numérico)
Toxicidade AMES	Não
Hepatotoxicidade	Não
Sensibilização dérmica	Não
Inibidor <i>hERG</i> I	Não
Inibidor <i>hERG</i> II	Não
Toxicidade em <i>T. pyriformis</i>	2,255
Toxicidade em <i>F. minnow</i>	-0,511
MRTD	0,809

Fonte: elaboração própria (2024).

Uma das limitações no desenvolvimento de novos medicamentos são as falhas no processo da farmacocinética (Isyaku, Uzairu e Uba, 2020). O pC4C foi avaliado com base em previsões farmacocinéticas determinadas pelas plataformas computacionais incluindo a avaliação físico-química e as etapas do processo farmacocinético (ADME - absorção, distribuição, metabolismo e excreção). O composto se mostrou efetivo para administração por via oral seguindo os 5 parâmetros da regra de Lipinski, com probabilidade de 92,318% de absorção pelo trato gastrointestinal (TGI) e distribuição ($\log P = -1.431 > -2$) no sistema nervoso central (SNC) (Figura 13). Adicionalmente, não se mostrou um possível inibidor nem substrato para a glicoproteína de permeabilidade (gP-) e apresentou um baixo volume de distribuição em estado estacionário (VDss). Também foi previsto que o composto inibisse isoformas específicas do citocromo P450 (CYP450 - CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9), embora não servisse como substrato para outras, além de não formar substrato para a *Organic Cation Transporter 2* (OCT2).

Figura 13. Representação da absorção gastrointenstinal e penetração cerebral do *p*-cumarato de 4-clorobenzila (*p*C4C) pelo modelo *Boiled-Egg*. BHE (Barreira hematoencefálica); AGI (Absorção gastrointestinal); gP (Substrato de proteína de permeabilidade G + ou -).



Fonte: elaboração própria via SwissADME adaptado (2024).

5.4.2 Docking molecular

Simulações de *docking* molecular foram realizadas para avaliar a probabilidade de interação do composto *p*C4C com alvos relacionados à atividade antimicrobiana. Antes da realização das simulações de *docking* molecular, foi realizado o procedimento de *redocking* com o objetivo de validar se o programa está posicionando as poses corretamente e se há diferenças estruturais entre o ligante e sua pose mais estável. Essa métrica foi avaliada pelo valor de RMSD (*Root Mean Square Deviation*), sendo considerado um valor limite de até 2 Å. O alvo avaliado pelo *redocking* correspondeu à enzima relacionada ao mecanismo de parede celular proteína de ligação à penicilina 4 (PBP4) (PDB: 6BSR), visto que este é o único alvo que apresenta um ligante cocristalizado, que corresponde à penicilina G, sendo o valor de RMSD correspondente a 0,242 validando a metodologia utilizada. A Tabela 4 apresenta os valores de energia de ligação do composto *p*C4C segundo o algoritmo de pontuação MolDock para os alvos em estudo.

Tabela 4. Valores de energia de ligação (kJ.mol⁻¹) do composto *p*C4C com os alvos em estudo, segundo o algoritmo MolDock Score.

Compostos	PgsA	DNA ligase	PBP4	MepA	NorA
<i>p</i>C4C	-113.343	-105.397	-70.920	-123.85	-108.877
Controle	-102.591	-101.643	-108.045	-86.926	-93.487

Legenda: O menor valor de energia está destacado em negrito.

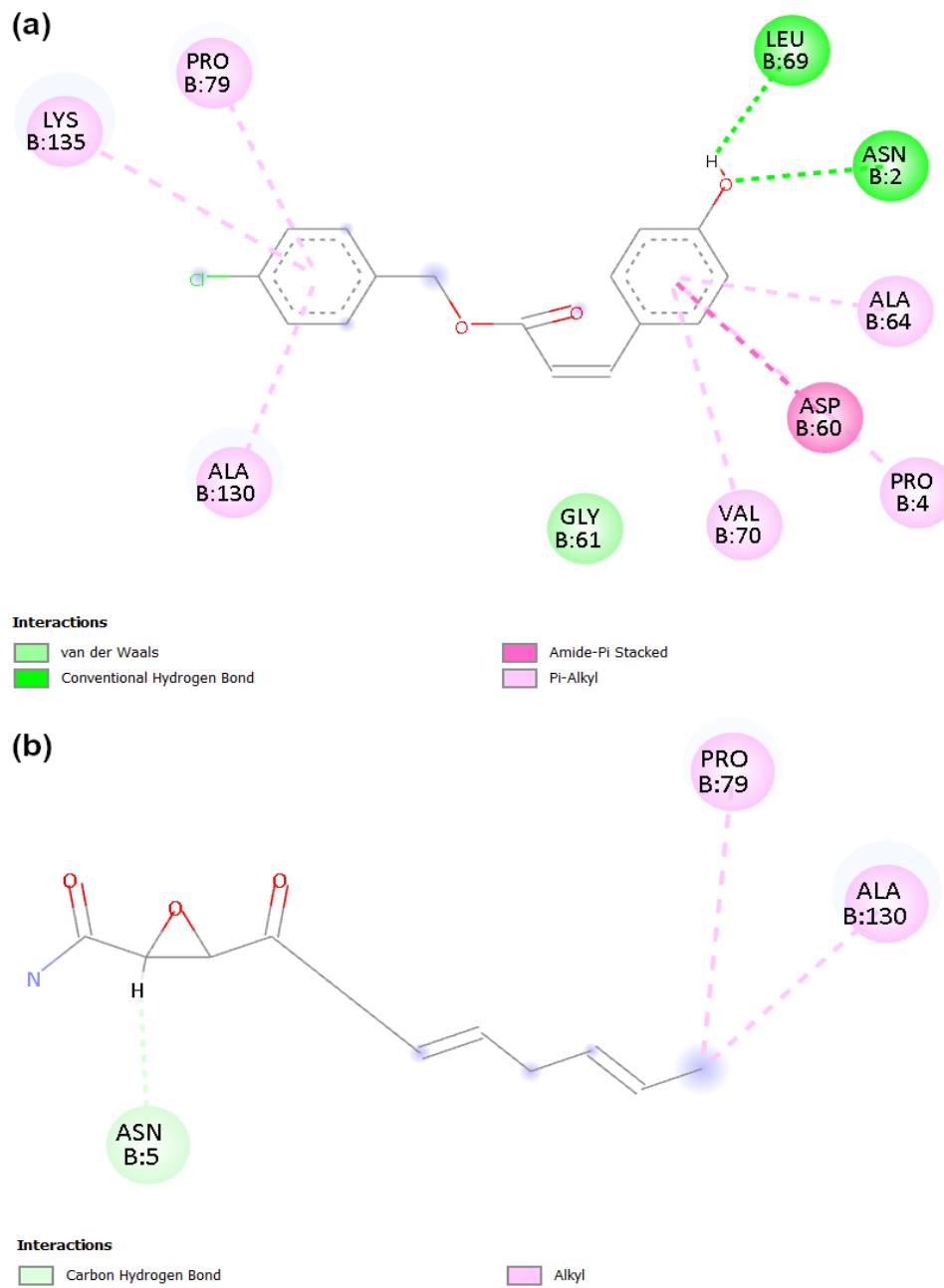
Os resultados demonstram que o composto *p*C4C apresentou valores negativos para todos os alvos em estudo, revelando interação, e que sua pose mais estável demonstrou valores menores quando comparado aos compostos controle em estudo para os alvos relacionados à membrana através da enzima fosfatidilglicerol fosfato sintase (PDB: 7DRJ), ao alvo relacionado ao DNA através da enzima DNA ligase dependente de NAD⁺ (PDB: 3JSN) e aos fatores de resistência relacionados às bombas de efluxo MepA e NorA. As Figuras 14 a 18 demonstram as interações moleculares do composto *p*C4C com os alvos em estudo.

Para PgsA, um alvo relacionado à membrana, observou-se que o composto *p*C4C apresentou a menor energia, correspondendo a -113,343 kJ.mol⁻¹ (Tabela 4), enquanto o composto controle cerulenina obteve valores de pontuação correspondentes a -102,591 kJ.mol⁻¹. A Figura 14 mostra que as interações do composto *p*C4C com o alvo relacionado à membrana ocorreram nos grupos mais volumosos da estrutura (anéis benzênicos), e observou-se que o composto estabeleceu interações críticas para a manutenção da atividade enzimática, como as interações hidrofóbicas π-alquila (linha tracejada em rosa claro) dos resíduos Lisina 135 (Lys135) e Alanina 64 (Ala64) (Yang *et al.*, 2021).

Para o domínio de adenilação do alvo relacionado ao processo de replicação do DNA, a DNA ligase dependente de NAD⁺, observou-se que o composto *p*C4C apresentou a menor energia correspondendo a -105,397 kJ.mol⁻¹ (Tabela 4), enquanto o composto controle levofloxacino obteve valores de pontuação correspondentes a -101,643 kJ.mol⁻¹. A Figura 15 demonstra que as interações do composto *p*C4C com o alvo estudado incluíram, além dos grupos volumosos, interações no grupo éster central, e observou-se que o composto também estabeleceu interações críticas para a manutenção da atividade enzimática, como a

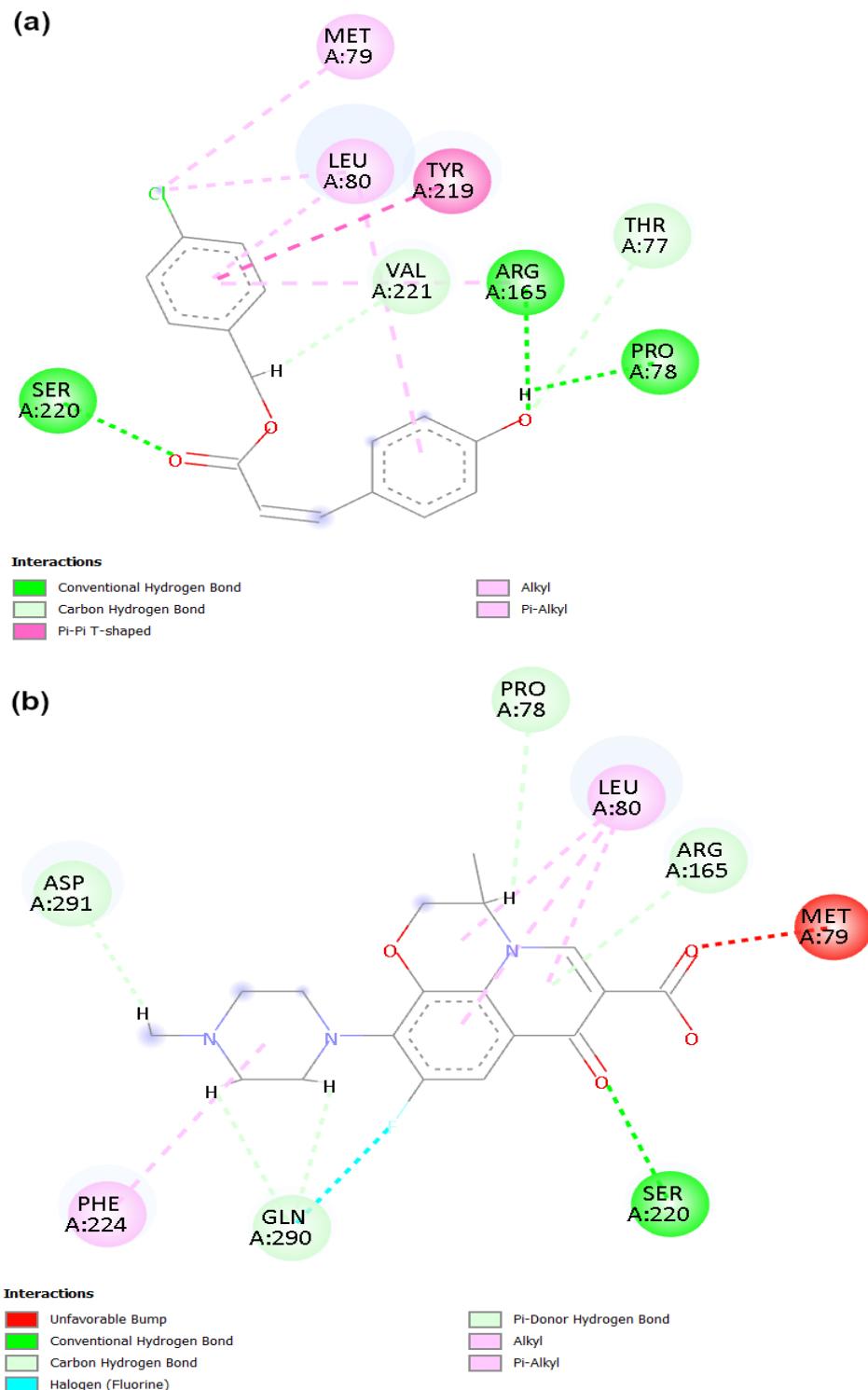
interação hidrofóbica do tipo alquila (linha tracejada em rosa claro) dos resíduos Leucina 80 (Leu80) com o grupo clorobenzeno (Han, Chang e Griffor, 2009).

Figura 14. Interações 2D dos compostos *p*C4C (a) e do controle positivo cerulenina (b) com o alvo PgsA. Resíduos: Lys (Lisina), Pro (Prolina), Leu (Leucina), Asn (Asparagina), Ala (Alanina), Asp (Ácido Aspártico) e Val (Valina).



Fonte: elaboração própria (2025).

Figura 15. Interações 2D dos compostos *p*C4C (a) e do controle positivo levofloxacino (b) com o alvo DNA ligase dependente de NAD⁺. Resíduos: Ser (Serina), Met (Metionina), Leu (Leucina), Tyr (Tirosina), Val (Valina), Arg (Arginina), Thr (Treonina), Pro (Prolina), Asp (Ácido Aspártico), Arg (Arginina), Gln (Glutamina) e Phe (Fenilalanina).



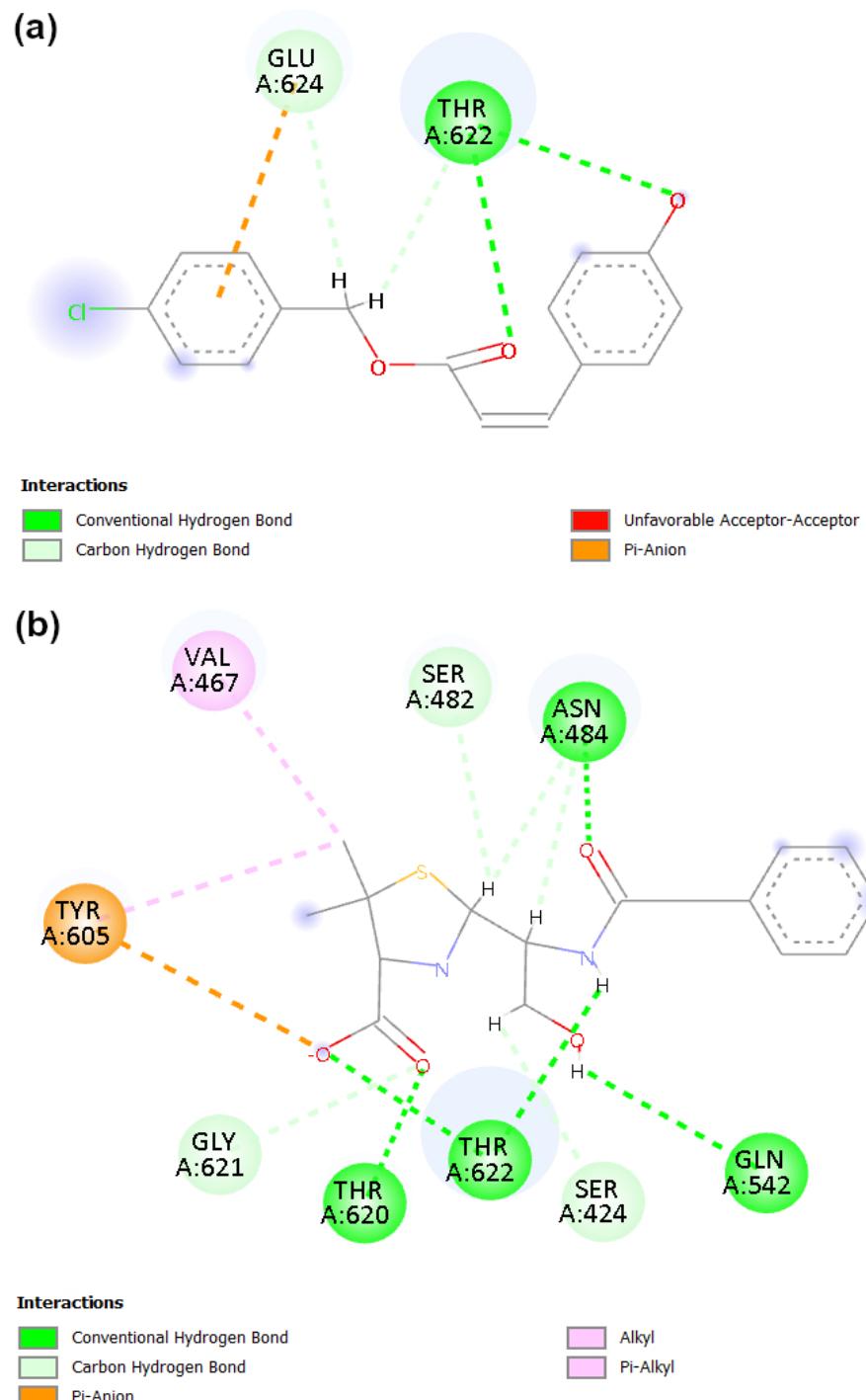
Fonte: elaboração própria (2025).

Para a PBP4, alvo relacionado à parede celular, observou-se que o ligante da PDB, penicilina G, apresentou a menor energia correspondendo a $-108,045\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, enquanto o composto *p*C4C apresentou valores de pontuação correspondentes a $-70,920\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Tabela 4). A Figura 16 demonstra que as interações do composto *p*C4C com o alvo relacionado à parede celular ocorreram nos grupos mais volumosos da estrutura (anéis benzênicos), e no grupo éster central, e observou-se que o composto estabeleceu uma interação crítica para a manutenção da atividade enzimática, como é o caso da interação carbono-hidrogênio (linha tracejada em verde claro) através do resíduo de Treonina 622 (Thr622) (Moon *et al.*, 2018).

Observou-se uma probabilidade de modulação da bomba de efluxo MepA uma vez que o composto *p*C4C apresentou valores de pontuação correspondentes a $-123,85\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, demonstrando uma maior afinidade quando comparado ao composto controle CCCP ($-86,926\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) (Tabela 4). Além disso, observou-se a ocorrência de interações críticas (Figura 17) que estão presentes no sítio ativo desta estrutura, como a interação no grupo halogênio (linha tracejada em azul) através do resíduo Alanina 161 (Ala161) e a interação carbono-hidrogênio (linha tracejada em verde claro) através do resíduo Metionina 291 (Met291) (Schindler *et al.*, 2013).

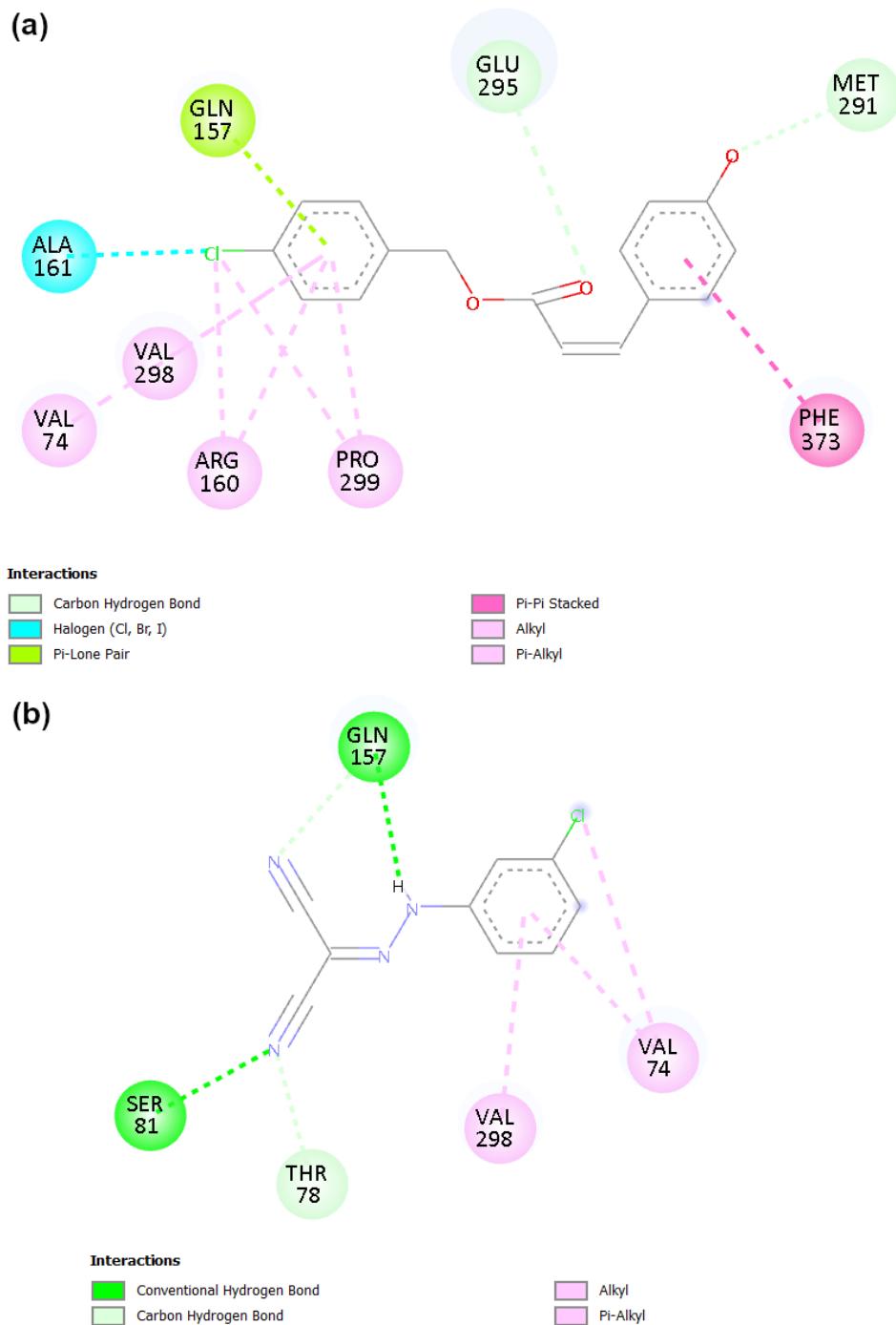
Observou-se também probabilidade de modulação da bomba de efluxo NorA, pois o composto *p*C4C apresentou valores de pontuação correspondentes a $-108,877\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, demonstrando maior afinidade quando comparado ao composto controle CCCP ($-93,487\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) (Tabela 4). Em relação às interações moleculares do composto *p*C4C com o alvo relacionado à região codificada da bomba de efluxo NorA (Figura 18), foram observadas interações carbono-hidrogênio (linha tracejada em verde claro) com o grupo éster através dos resíduos Triptofano 274 (Trp274), sendo esta interação também observada no composto controle CCCP e duas interações através do resíduo Phe 271. Interacções hidrofóbicas foram visualizadas no grupo clorobenzeno, sendo observadas duas interações π - π em forma de T (linha tracejada em rosa escuro) através dos resíduos Tirosina 278 (Tyr278) e Fenilalanina 262 (Phe 262) também observadas no CCCP e quatro interações alquila e π -alquila (linha tracejada em rosa claro) através dos resíduos Isoleucina 304 (Ile304), Metionina 308 (Met308), Fenilalanina 254 (Phe254) e Tirosina 278 (Tyr278) (Brawley *et al.*, 2022).

Figura 16. Interações 2D dos compostos *p*C4C (a) e do controle positivo penicilina G (b) com o alvo proteína de ligação à penicilina 4 (PBP4). Resíduos: Glu (Ácido Glutâmico), Gln (Glutamina), Thr (Treonina), Tyr (Tirosina), Val (Valina), Ser (Serina), Asn (Asparagina), Gln (Glutamina), Thr (Treonina) e Gly (Glicina).



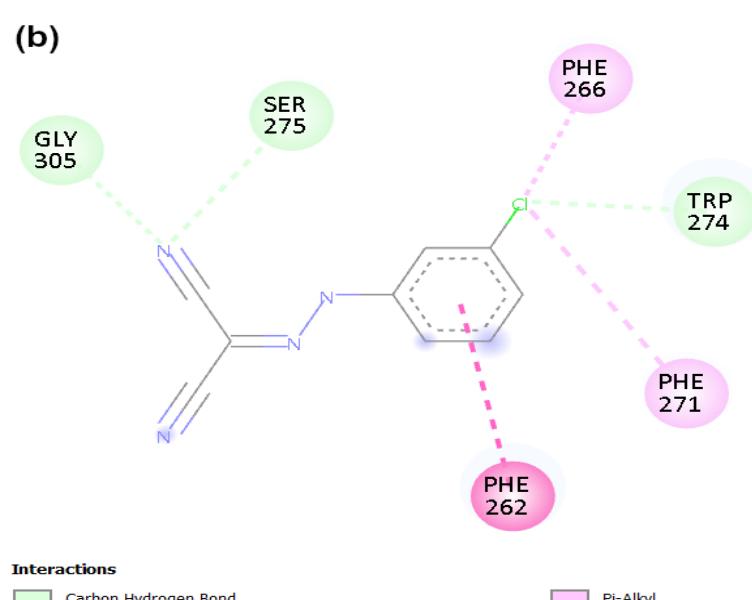
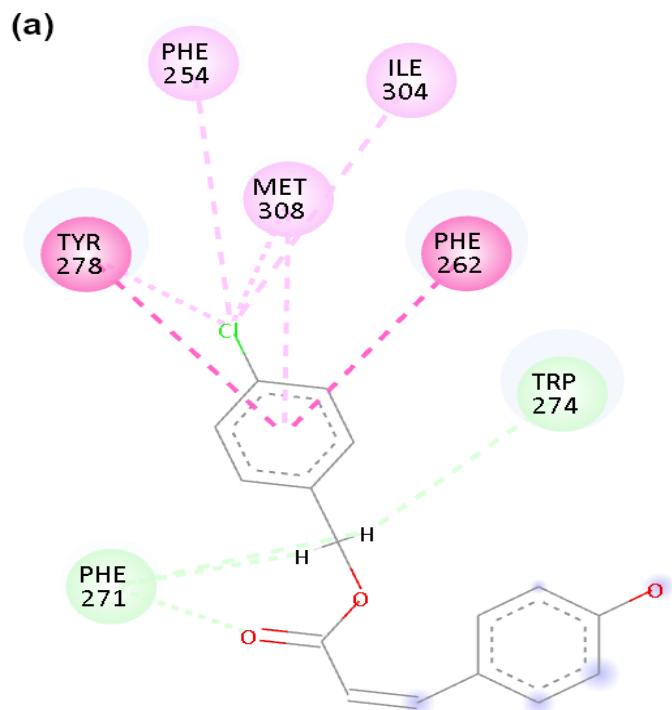
Fonte: elaboração própria (2025).

Figura 17. Interações 2D dos compostos *p*C4C (a) e do controle positivo CCCP (b) com a bomba de efluxo alvo MepA (da família MATE, em *Staphylococcus aureus*). Resíduos: Gln (Glutamina), Glu (Ácido Glutâmico), Met (Metionina), Phe (Fenilalanina), Pro (Prolina), Arg (Arginina), Val (Valina) e Ala (Alanina), Ser (Serina) e Thr (Treonina).



Fonte: elaboração própria (2025).

Figura 18. Interações 2D dos compostos *p*C4C (a) e do controle positivo CCCP (b) com a bomba de efluxo alvo NorA. Resíduos: Tyr (Tirosina), Phe (Fenilalanina), Met (Metionina), Ile (Isoleucina), Trp (Triptofano), Gly (Glicina) e Ser (Serina).



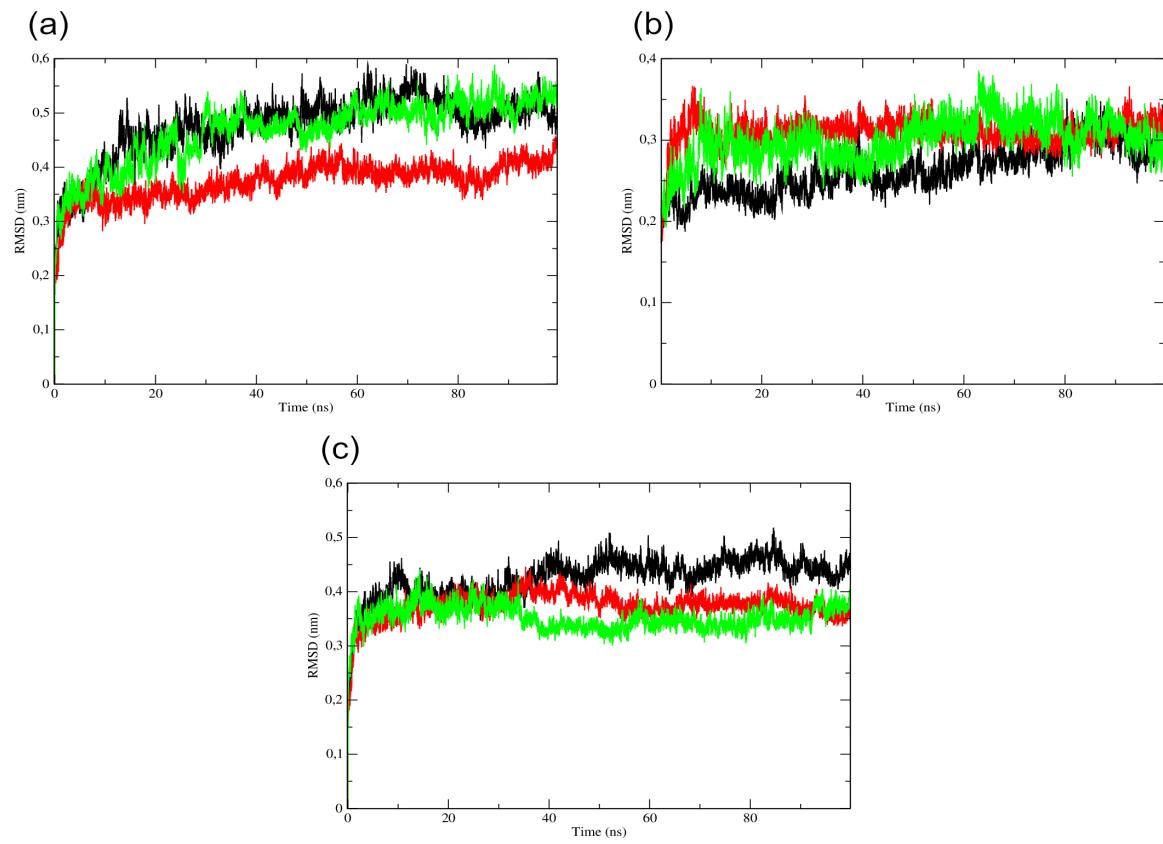
Fonte: elaboração própria (2025).

5.4.3 Dinâmica molecular

Simulações de Dinâmica Molecular (DM) têm sido conduzidas com o objetivo de investigar o comportamento de moléculas ao longo do tempo e fornecer informações detalhadas sobre seus movimentos, interações e estabilidade em nível atômico. Essa abordagem é amplamente utilizada para avaliar a estabilidade de complexos proteína-ligante, bem como para estimar a energia livre de ligação (Aghajani *et al.*, 2022).

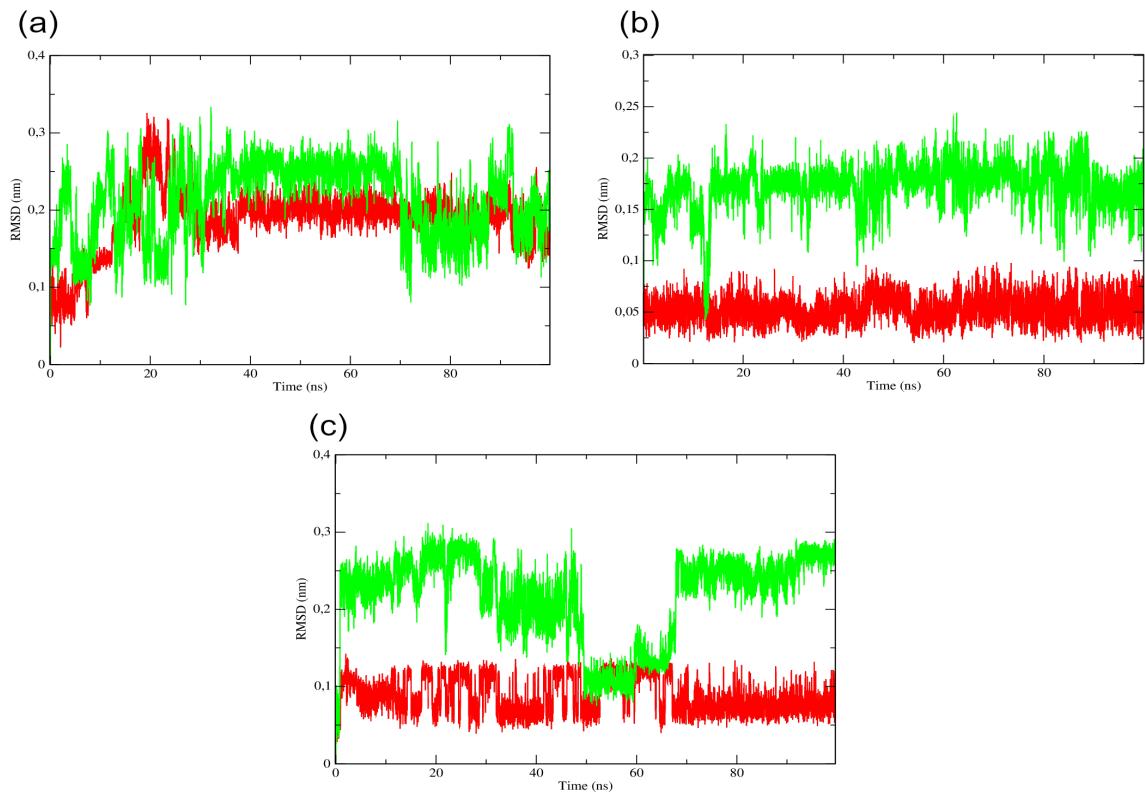
A Figura 19 apresenta os perfis de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) dos complexos formados com os compostos em estudo. Essa métrica avalia a média das diferenças nas posições dos átomos de carbono alfa (C_α) da proteína ao longo da simulação, em comparação a uma estrutura de referência (geralmente a estrutura inicial ou uma estrutura experimental, como as disponíveis no PDB) (Fukutani *et al.*, 2021). Os resultados indicaram maior estabilidade para os complexos envolvendo a enzima PgsA, um alvo associado à membrana, quando complexados com o ligante *p*C4C (linha vermelha), que apresentou menores valores de RMSD em comparação ao composto controle (linha verde) (Figura 19a). Esses dados sugerem que o *p*C4C tem maior propriedade de permanecer ligado ao sítio ativo da proteína mesmo na presença de solventes e diante de variações bruscas de temperatura e pressão, o que foi observado nas métricas relacionadas ao valor de RMSD do complexo relacionado ao ligante (Figura 20a-c), uma vez que os valores de RMSD do ligante para o *p*C4C permaneceram consistentemente menores do que aqueles observados para os controles positivos em todos os alvos estudados.

Figura 19. Desvio Quadrático Médio - Proteína (RMSD-Proteína) do Carbono- α . Proteína: (A) Enzima da membrana celular: PgsA; (B) Enzima envolvida na replicação do DNA: DNA ligase dependente de NAD $^{+}$; (C) Enzima da parede celular: PBP4. Complexo: proteína (linha preta); composto *p*C4C (linha vermelha) e controle positivo (linha verde).



Fonte: elaboração própria (2025).

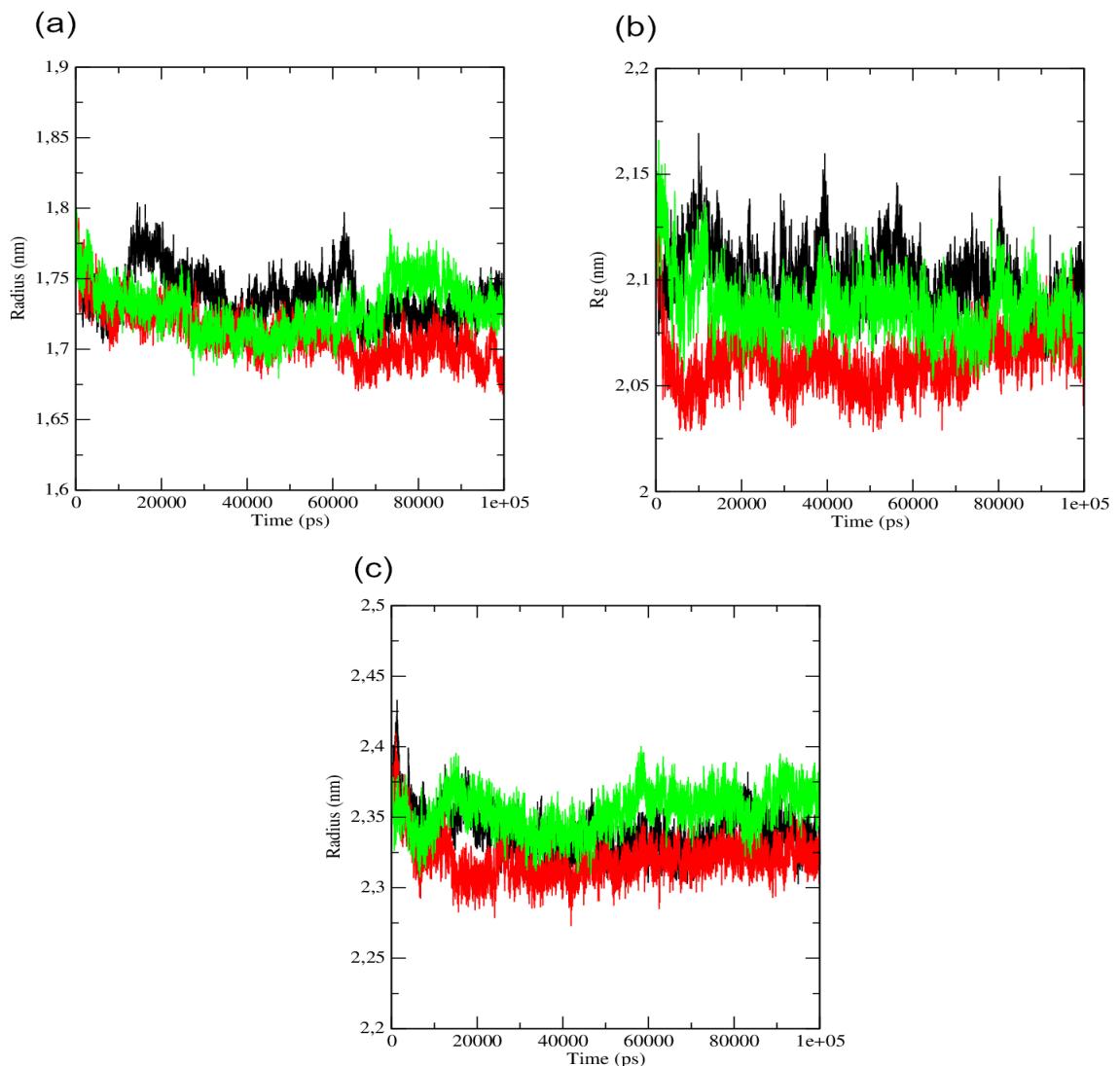
Figura 20. Desvio Quadrático Médio - Ligante (RMSD-Ligante) do Carbono- α . Proteína: (A) Enzima da membrana celular: PgsA; (B) Enzima envolvida na replicação do DNA: DNA ligase dependente de NAD $^{+}$; (C) Enzima da parede celular: PBP4. Complexo: composto pC4C (linha vermelha) e controle positivo (linha verde).



Fonte: elaboração própria (2025).

A avaliação do empacotamento estrutural da proteína através da análise do raio de giro (Figura 21), revelou pequenas flutuações nos valores desta métrica, com sobreposição de algumas trajetórias para todos os alvos em estudo, indicando a ocorrência de mudanças conformacionais discretas durante a simulação.

Figura 21. Raio de giro. Proteína: (A) Enzima da membrana celular: PgsA; (B) Enzima envolvida na replicação do DNA: DNA ligase dependente de NAD⁺; (C) Enzima da parede celular: PBP4. Complexo: proteína (linha preta); composto *pC4C* (linha vermelha) e controle positivo (linha verde).

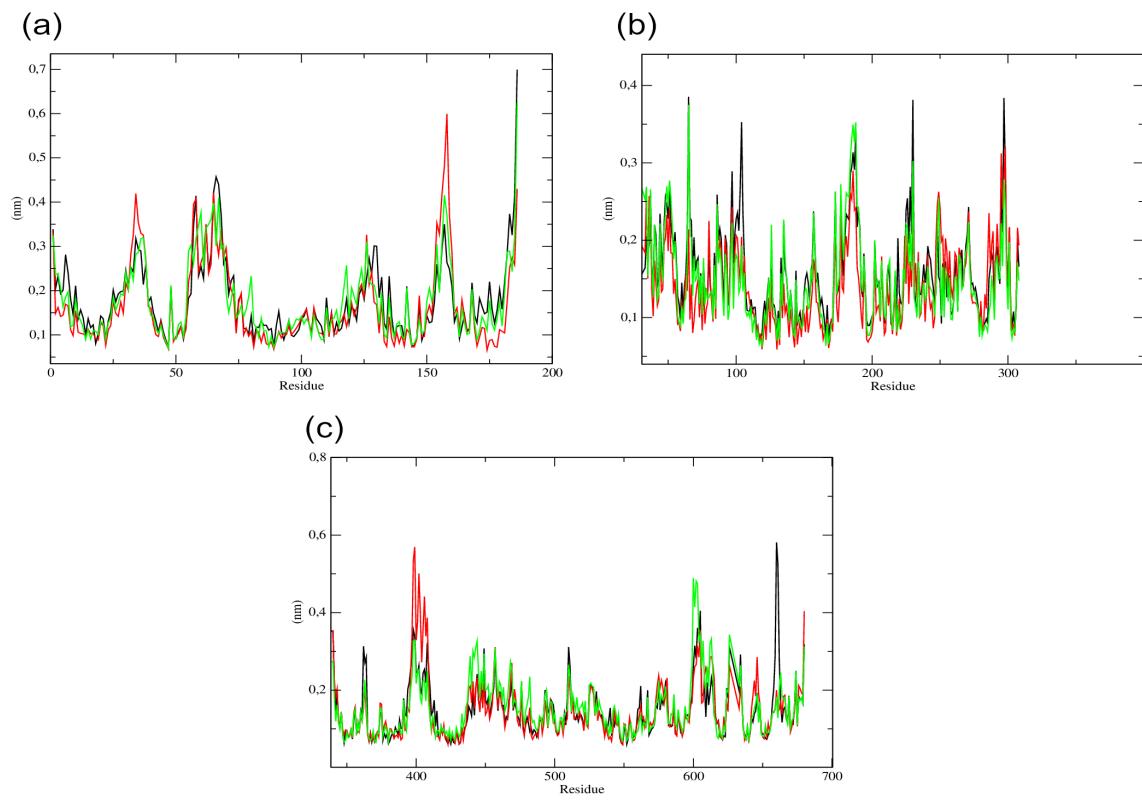


Fonte: elaboração própria (2025).

A análise RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*) (Figura 22), que quantifica a fluidez e a variação de cada átomo (geralmente os átomos de Ca da estrutura principal da proteína) em torno de sua posição média ao longo da simulação (Martínez, 2015; Shukla e Tripathi, 2020), demonstrou que flutuações maiores que 0,3 nm são indicativas de alta flexibilidade ou possíveis transições conformacionais e estas foram observadas nos alvos relacionados a mecanismos de membrana e parede celular. Para o alvo de membrana, PgsA (PDB: 7DRJ), as maiores flutuações foram identificadas nos resíduos Metionina 1 (Met1), Fenilalanina 58

(Phe58), Tirosina 62 (Tyr62), Arginina 65 (Arg65), Lisina 66 (Lys66), Leucina 157 (Leu157) e Arginina 186 (Arg186). Dentre estes, os resíduos Arg65 e Phe58, localizados no sítio ativo, podem estar associados a potenciais alterações conformacionais importantes para a interação ligante-proteína. Para o alvo relacionado à parede celular, PBP4 (PDB: 6BSR), flutuações significativas foram observadas nos resíduos Treonina 259 (Thr259), Lisina 260 (Lys260), Treonina 284 (Thr284), Ácido Glutâmico 286 (Glu286), Ácido Aspártico 287 (Asp287), Isoleucina 288 (Ile288), Ácido Glutâmico 289 (Glu289), Lisina 290 (Lys290), Glutamina 316 (Gln316) e Ácido Aspártico 317 (Asp317). É importante ressaltar que esses resíduos não fazem parte do sítio ativo da enzima, indicando que tais flutuações ocorrem em regiões periféricas ou estruturais.

Figura 22. Raiz Quadrática Média de Flutuação (RMSF). Proteína: (A) Enzima da membrana celular: PgsA; (B) Enzima envolvida na replicação do DNA: DNA ligase dependente de NAD⁺; (C) Enzima da parede celular: PBP4. Complexo: proteína (linha preta); composto *p*C4C (linha vermelha) e controle positivo (linha verde).



Fonte: elaboração própria (2025).

As Tabelas 5 a 7 apresentam as contribuições das energias de Coulomb e Lennard-Jones para os complexos analisados. Em todos os alvos estudados, as interações Coulombicas foram as principais responsáveis pela energia total de

interação. O *p*C4C apresentou valores de energia Coulomb mais negativos em comparação aos compostos controle, com -241,229 kJ/mol (*p*C4C) versus -102,851 kJ/mol (controle positivo) para o alvo de membrana, -258,000 kJ/mol (*p*C4C) versus -26,676 kJ/mol (controle positivo) para o alvo relacionado à replicação do DNA e -301,038 kJ/mol (*p*C4C) versus -124,426 kJ/mol (controle positivo) para o alvo de parede celular. Esses resultados indicam uma interação eletrostática mais favorável entre o *p*C4C e os respectivos alvos (Mehta e Levin, 2019).

Tabela 5. Contribuições das energias de Coulomb e Lennard-Jones para os compostos em estudo com a enzima alvo da membrana celular: PgsA.

Composto	Energia de Coulomb (kJ.mol ⁻¹)	Energia de Lennard-Jones (kJ.mol ⁻¹)
<i>p</i>C4C	-241.229	-96.147*
Controle	-102.851	-97.673

Legenda: A energia mais baixa é destacada em negrito e a energia do composto de teste é destacado em negrito com um asterisco quando seus valores de energia estão próximos aos do composto de controle.

Tabela 6. Contribuições das energias de Coulomb e Lennard-Jones para os compostos em estudo com a enzima alvo envolvida na replicação do DNA: DNA ligase dependente de NAD⁺.

Composto	Energia de Coulomb (kJ.mol ⁻¹)	Energia de Lennard-Jones (kJ.mol ⁻¹)
<i>p</i>C4C	-258.000	-113.223
Controle	-26.676	-190.275

Legenda: A energia mais baixa é destacada em negrito e a energia do composto de teste é destacado em negrito com um asterisco quando seus valores de energia estão próximos aos do composto de controle.

Tabela 7. Contribuições das energias de Coulomb e Lennard-Jones para os compostos em estudo com a enzima alvo da parede celular: PBP4.

Composto	Energia de Coulomb (kJ.mol ⁻¹)	Energia de Lennard-Jones (kJ.mol ⁻¹)
<i>p</i>C4C	-301.038	-98.6339
Controle	-124.426	-105.015

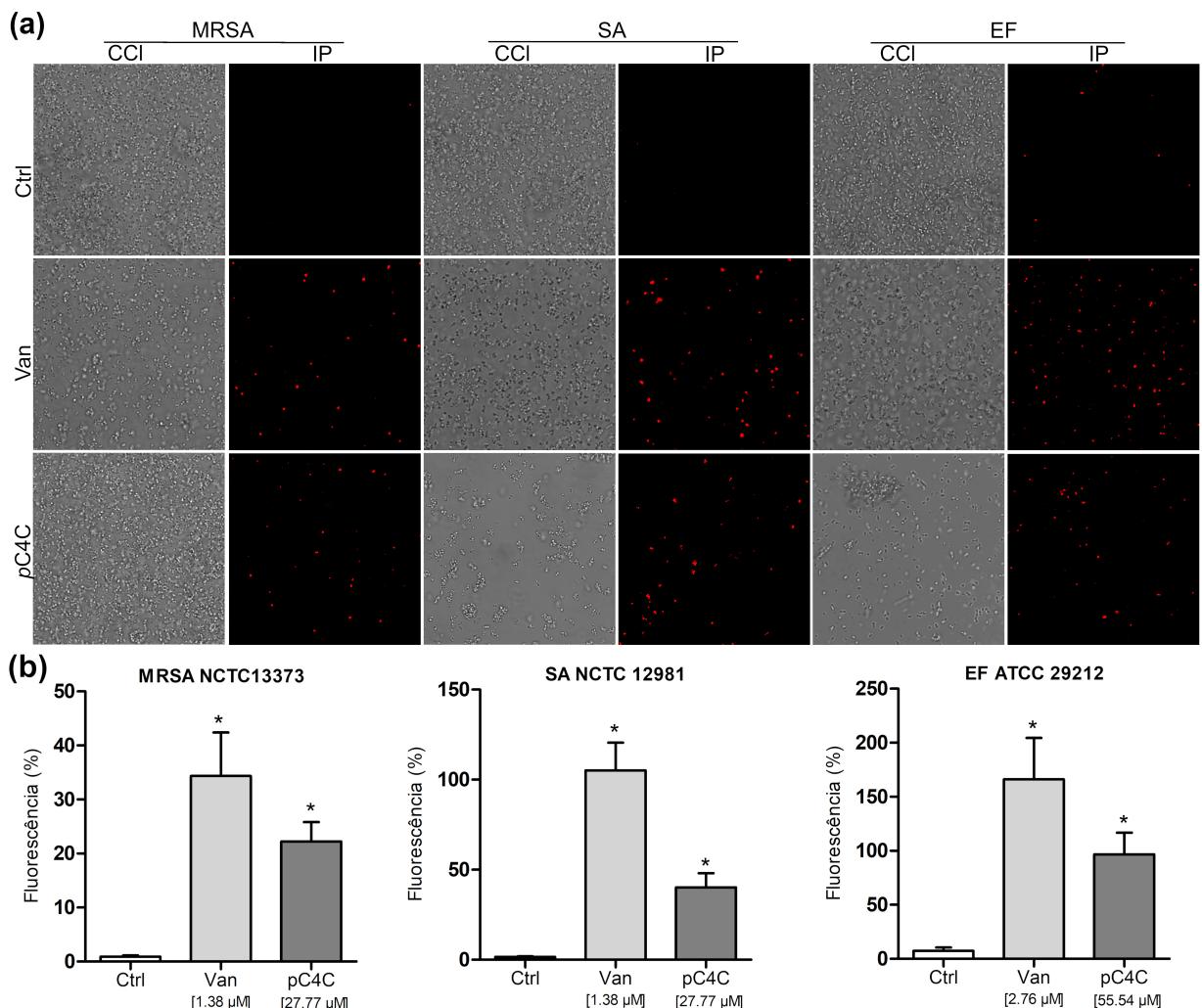
Legenda: A energia mais baixa é destacada em negrito e a energia do composto de teste é destacado em negrito com um asterisco quando seus valores de energia estão próximos aos do composto de controle.

5.5 Identificação do modo de ação do *pC4C*

5.5.1 Ensaio de integridade de membrana e viabilidade bacteriana

A Figura 23a apresenta micrografias de fluorescência de células bacterianas Gram-positivas antes e após o tratamento com *pC4C* e vancomicina em suas respectivas CIM conforme cada linhagem. As bactérias não tratadas emitiram baixos níveis de sinais de fluorescência indicando que a maioria das células permaneceu viável. Em comparação com os grupos controle negativo, observou-se uma maior penetração do IP nas células após os tratamentos com *pC4C* e vancomicina. A análise dos gráficos de percentual de intensidade de fluorescência celular (Figura 23b) evidencia que os tratamentos com *pC4C* e vancomicina apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos controle negativo. Considerando esses dados e o mecanismo de ação da vancomicina, os resultados obtidos pela MCVL sugerem que o tratamento com o *pC4C* poderia causar danos à membrana celular bacteriana.

Figura 23. (a) Imagens representativas da avaliação do dano à membrana por coloração com iodeto de propídio (IP) em células de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) NCTC13373, *Staphylococcus aureus* (SA) NCTC 12981 e *Enterococcus faecalis* (EF) ATCC 29212 incubadas com vancomicina e *p*C4C por 3 horas de tratamento. (b) Percentual de fluorescência das células bacterianas com membranas danificadas. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) de dois experimentos independentes realizados em duplo, analisados por ANOVA one-way seguida do teste de Dunnett (* indica $p < 0,05$ versus controle). Ctrl (Grupo não tratado), CCI (Campo claro).



Fonte: elaboração própria (2024).

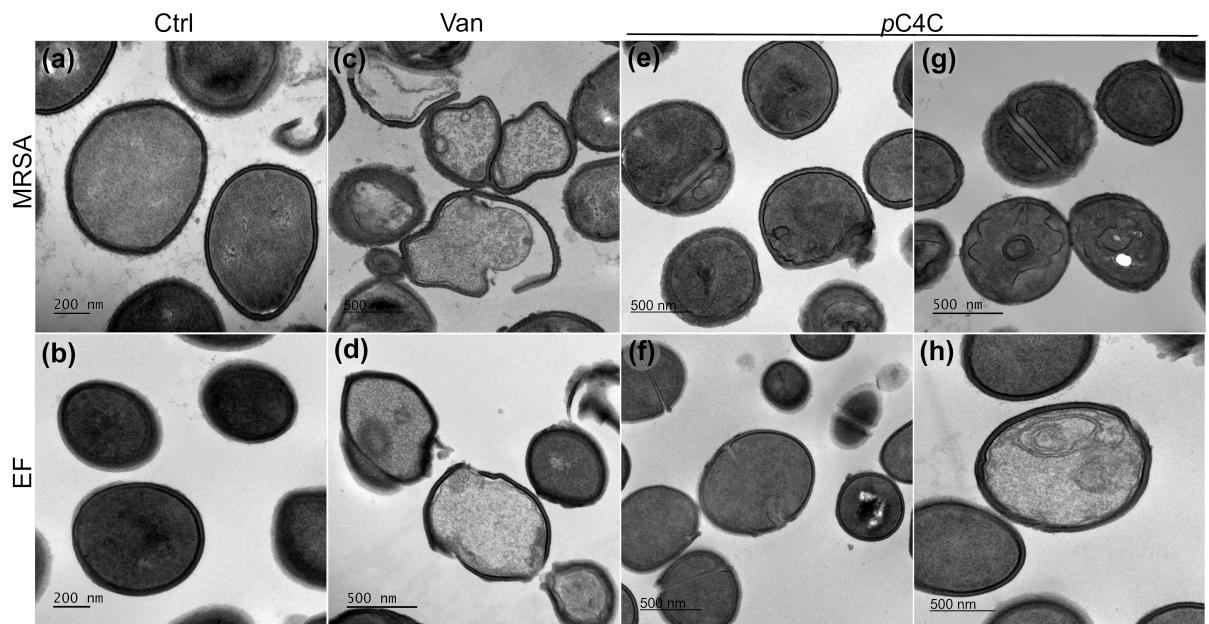
5.5.2 Avaliação de alterações morfológicas por MET

MRSA NCTC 13373 e EF ATCC 29212 expostas a 27.77 μ M e 55.54 μ M de *p*C4C e 1.38 μ M e 2.76 μ M de vancomicina, respectivamente, apresentaram alterações morfológicas quando comparadas às células não tratadas. As células submetidas ao tratamento com *p*C4C e vancomicina pareciam enrugadas e lisadas

em contraste com a morfologia das células não tratadas (Figuras 24a e b). As paredes celulares e as membranas citoplasmáticas das células tratadas com *pC4C* e vancomicina se mostraram rompidas em diferentes extensões acompanhadas por lise celular e extravasamento do conteúdo citoplasmático para a matriz extracelular (Fig. 24c, d, e, f). O material intracelular tornou-se desorganizado após o tratamento com *pC4C* evidenciando a formação de uma lacuna entre a parede celular e a membrana citoplasmática, a qual estava irregular com invaginações, indicando um impacto direto na integridade entre essas estruturas (Figuras 24g e h). Em contraste, as células não tratadas exibiram citoplasma homogêneo, superfície lisa e normal e paredes e membranas intactas (Figuras 24a e b).

Como esperado, as células tratadas com vancomicina tiveram ruptura total e lise com extravasamento e perda do conteúdo citoplasmático confirmando a sua ação bactericida. No entanto, esferoplastos, células enrugadas e vacuoladas com rupturas entre parede e membranas celulares com vazamento de material intracelular também foram observadas após o tratamento *pC4C* corroborados pela visualização de detritos celulares. A análise também sugere alterações no nucleoide com perda da organização e condensação evidenciando estresse severo ou danos irreversíveis ao material genético (Figuras 24g e h). Como visualizado nas Figuras 5e e 5f e considerando que o DNA desempenha um papel central em processos vitais como expressão gênica, transcrição gênica e mutagênese, tais alterações causadas pelos tratamentos podem conduzir a divisões celulares assimétricas e projeções anômalas na superfície bacteriana.

Figure 24. Micrografias de transmissão eletrônica de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) NCTC 13373 e *Enterococcus faecalis* (EF) ATCC 29212 (a e b) tratados com vancomicina (c e d) e *p*C4C (e, f, g e h) por 3 horas. Ctrl (grupos não tratados), Van (vancomicina), *p*C4C (*p*-cumarato de 4-clorobenzila).



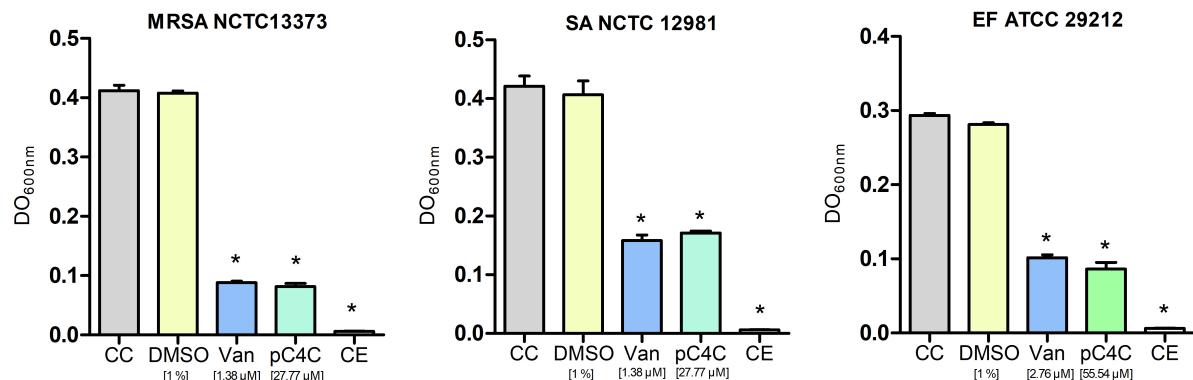
Fonte: elaboração própria (2024).

5.5.3 Ensaio de lise celular

Para auxiliar na investigação do mecanismo de ação do *p*C4C foi analisado o seu efeito lítico sobre células bacterianas. A lise celular é evidenciada por uma redução na DO e na turbidez da suspensão após a incubação. Após o tratamento com *p*C4C foi observada uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na DO das suspensões bacterianas tratadas em relação às suspensões bacterianas não tratadas (Figura 25), indicando, portanto, que composto provocou a lise das células bacterianas. Como reconhecido, o mecanismo de ação bactericida da vancomicina induz o efeito de lise. Portanto, como esperado, o mesmo fenômeno aconteceu após o tratamento com a vancomicina que apresentou diferença significativa em relação aos controles. O dissolvente do *p*C4C, DMSO, usado a 1%, não interferiu no crescimento bacteriano pois os valores obtidos foram estatisticamente iguais aos controles de crescimento ($p > 0,05$) conforme demonstrado nos gráficos. Os resultados obtidos no ensaio de lise são suportados

pelas imagens da MET que sugerem, também, danos estruturais na parede celular bacteriana induzidos pelo *pC4C*.

Figura 25. Avaliação da lise celular pelo espectro visível (DO_{600nm}) de células de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) NCTC13373, *Staphylococcus aureus* (SA) NCTC 12981 e *Enterococcus faecalis* (EF) ATCC 29212 incubadas com DMSO, vancomicina (Van) e *pC4C* por 24 horas de tratamento. O ensaio foi realizado em triplicata e os dados são expressos como média \pm EPM, analisados por ANOVA one-way seguida do teste de Dunnett (* indica $p < 0,05$). CC (controle de crescimento) refere-se ao grupo não tratado utilizado como controle negativo, DMSO (dimetilsulfóxido) foi empregado como controle veicular na maior concentração (1%), Van (vancomicina) foi utilizado como controle positivo, e CE (controle de esterilidade) corresponde ao controle de esterilidade do meio.



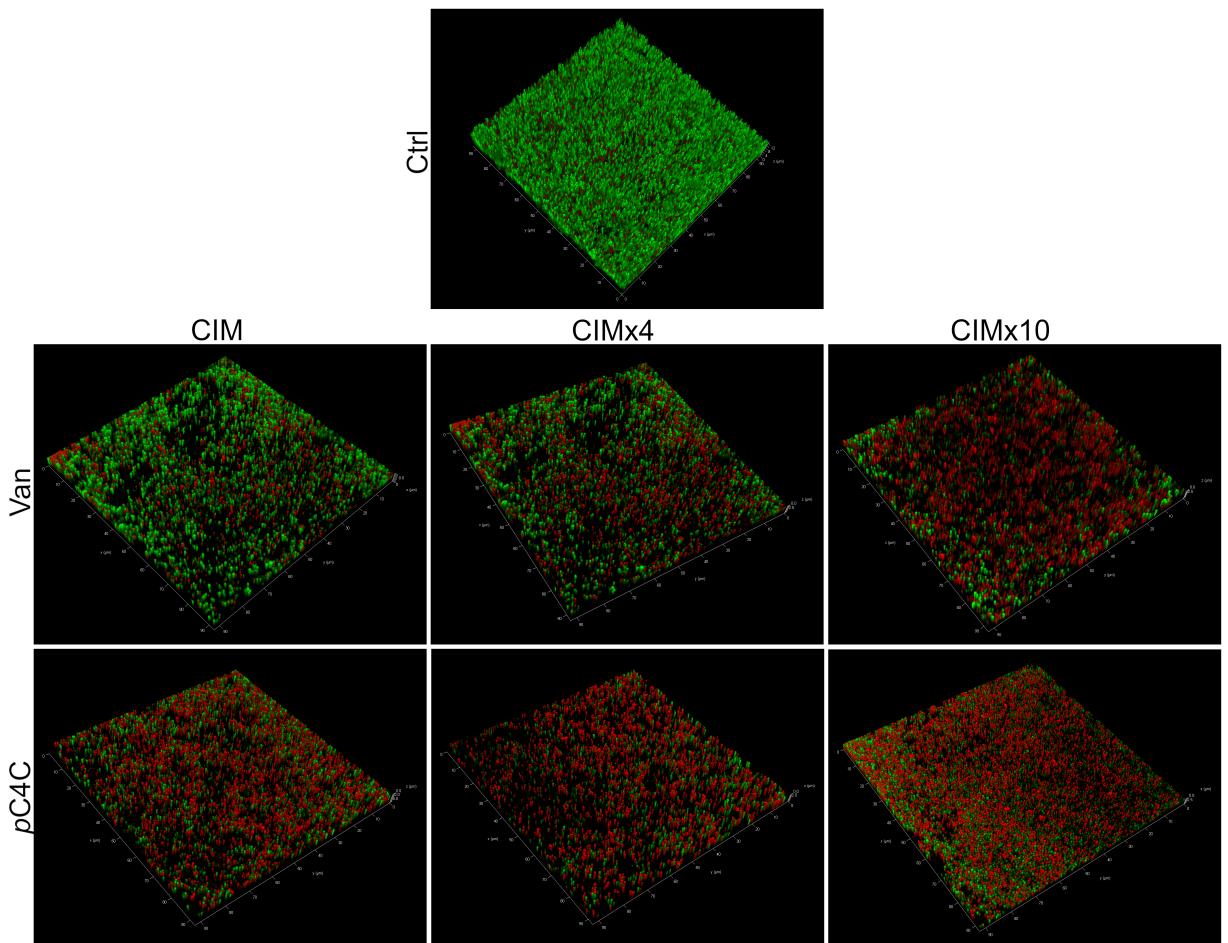
Fonte: elaboração própria (2025).

5.5.4 Análise da atividade antibiofilme por MCVL

A Figura 26 mostra uma fotomicrografia em fluorescência 3D analisada sob MCVL. No grupo controle não tratado, observa-se um biofilme confluente e coeso com células predominantemente emitindo fluorescência verde, indicando alta viabilidade celular. Ao comparar os tratamentos ao grupo controle não tratado, verifica-se que tanto a vancomicina como o *pC4C* interferiram na estrutura do biofilme formado por MRSA. A vancomicina promoveu uma desestruturação mais acentuada da arquitetura do biofilme em relação ao *pC4C*. Por outro lado, observa-se que o *pC4C* demonstrou maior habilidade de penetração na matriz extracelular polimérica (MEP) e de internalização nas células bacterianas presentes no biofilme. Embora a vancomicina apresente maior dificuldade de atravessar membranas celulares, foram observadas células coradas com IP devido ao seu mecanismo sobre a parede celular que pode gerar lise e disfunções de transporte na membrana facilitando a entrada do IP nas células com consequente ligação ao material

genético e emissão de fluorescência. Os achados desse experimento indicam que o *pC4C* atua de maneira contundente na disruptão do biofilme bacteriano.

Figura 26. Biofilmes bacterianos de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) NCTC13373 antes e após o tratamento com *pC4C* nas concentrações de 27,77, 111,09 e 277,73 μ M (8, 32 e 80 μ g/mL) e vancomicina (Van) nas concentrações de 1,38, 5,52 e 13,80 μ M (2, 8 e 20 μ g/mL), corados com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP), e analisados por MCVL. Ctrl (Grupo não tratado).



Fonte: elaboração própria (2025).

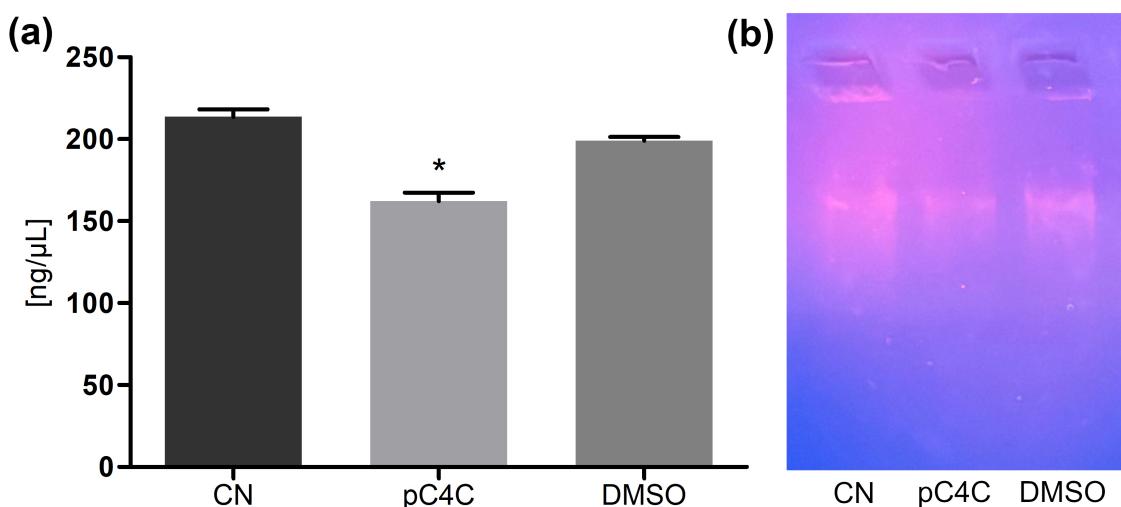
5.5.5 Análise do efeito do composto sobre o DNA

A quantificação da concentração de DNA nas amostras (Figura 27a) revelou diferença estatisticamente significativa ($p < 0.0001$) entre o grupo não tratado e o grupo tratado com o *pC4C*. A concentração de DNA foi reduzida após o tratamento com o composto, sugerindo perda de material genético ou prejuízo no processo de replicação. A concentração no grupo tratado com DMSO a 0,5% foi estatisticamente

equivalente à do grupo controle negativo, indicando que o veículo utilizado como solvente do composto não interferiu na análise.

Corroborando os dados obtidos na quantificação de DNA, a eletroforese no gel de agarose demonstrou uma redução na intensidade da banda de DNA na amostra tratada com o *p*C4C em relação ao grupo controle, possivelmente em decorrência da redução do número de células associado a algum possível cisalhamento do ácido nucleico (Figura 27b), sugerindo que o DNA ou o processo de replicação está sendo alvo do composto. Esses dados são sustentados pelas análises *in silico* realizadas via *docking* molecular e simulações de dinâmica molecular.

Figura 27. Impacto do *p*C4C na concentração de DNA (a); Eletroforese em gel de agarose do DNA genômico de *E. faecalis* (b). **p* < 0,0001 indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A significância estatística foi avaliada por ANOVA unidirecional, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. CN (controle negativo); *p*C4C (*p*-cumarato de 4-clorobenzila); DMSO (dimetilsulfóxido).



Fonte: elaboração própria (2025).

5.6 Modulação à resistência bacteriana

5.6.1 Ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

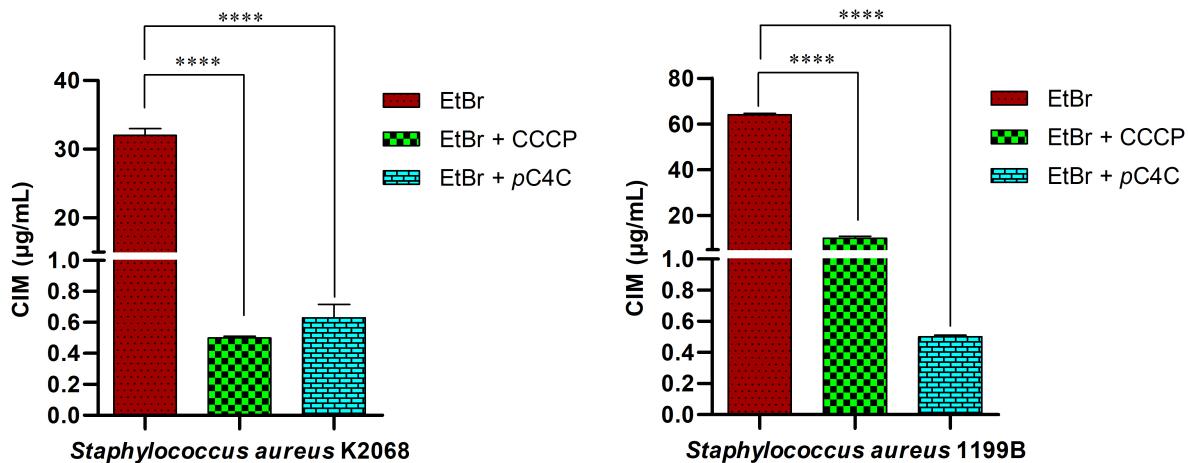
Os ensaios de Concentração Inibitória Mínima com o EtBr e com os antibióticos ciprofloxacino e norfloxacino frente às linhagens K2068 e 199B foram realizados para confirmar a presença de atividade da bomba de efluxo e sua contribuição para o fenótipo de resistência. Também foi realizado o ensaio com o composto *p*C4C e com o inibidor de bombas de efluxo, CCCP. *p*C4C testado

isoladamente apresentou CIM de 1024 µg/mL (3554,93 µM) contra *S. aureus* K2069 e *S. aureus* 1199B. Ciprofloxacino exibiu uma CIM de 32 µg/mL (96,57 µM) frente a linhagem K2068 (*Breakpoint* de resistência para *Staphylococcus* spp. \geq 4 µg/mL; CLSI, 2021) e o norfloxacino uma CIM de 128 µg/mL (400,83 µM) frente a linhagem 1199B (*Breakpoint* de resistência para *Staphylococcus* spp. \geq 16 µg/mL; CLSI, 2021). O CCCP apresentou valores de CIM de 8 µg/mL (39,09 µM) para ambas as linhagens bacterianas, confirmando sua função como inibidor das bombas.

5.6.2 Avaliação da inibição de bombas de efluxo MepA e NorA pelo método do brometo de etídio

O método baseia-se na verificação do efeito de redução da CIM do brometo de etídio quando associado ao composto teste. A Figura 28 demonstra a inibição das bombas de efluxo MepA e NorA, expressas pelas linhagens *S. aureus* K2068 e 1199B, respectivamente. O CCCP (controle de inibição) e o *p*C4C foram associados ao EtBr para avaliação da capacidade de aumentar o acúmulo intracelular do corante com redução na CIM. O *p*C4C reduziu a CIM do EtBr em ambas as linhagens de *S. aureus* testadas (de 32 µg/mL para 0,62 µg/mL; $p < 0.0001$ em *S. aureus* K2068 e de 64 µg/mL para 0,50 µg/mL; $p < 0.0001$ em *S. aureus* 1199B), destacando-se a redução sobre *S. aureus* 1199B, que excede a alcançada pelo inibidor CCCP. A redução da CIM do EtBr, em linhagens portadoras de bomba de efluxo, é um indicativo de inibição da atividade dessas bombas (Tintino *et al.*, 2017).

Figura 28. Ensaio do brometo de etídio para avaliação da inibição do efluxo. A CIM foi avaliada em culturas de *Staphylococcus aureus* K2068, portadora da bomba de efluxo MepA, e *S. aureus* 1199B, portadora da bomba NorA, tratadas com CCCP e *p*C4C em associação com brometo de etídio. *** p < 0,0001 indica diferenças significativas entre os grupos. Os resultados foram expressos em média geométrica ± desvio padrão, avaliados estatisticamente por ANOVA unidirecional seguido do teste post-hoc de Bonferroni.



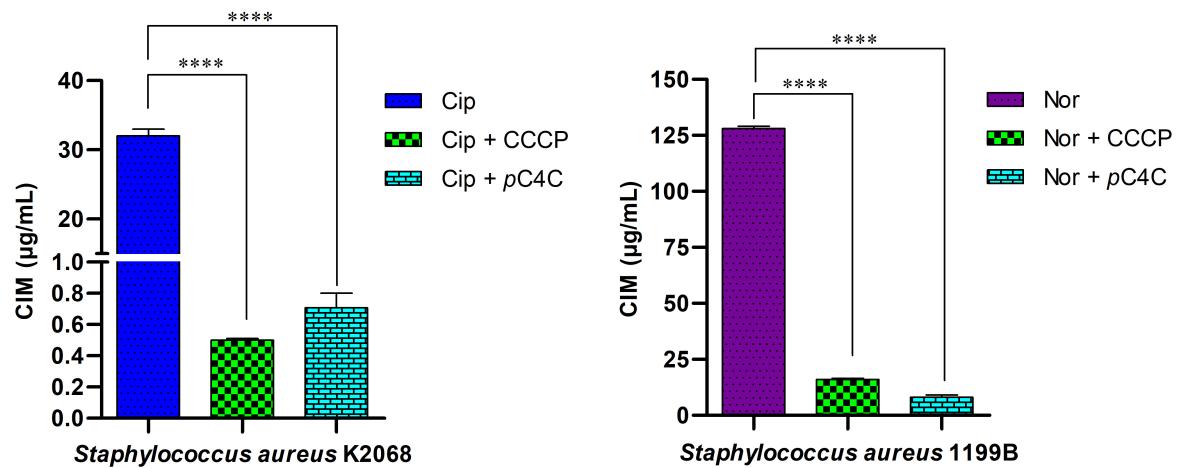
Fonte: elaboração própria (2025).

5.6.3 Análise da atividade modulatória de *p*C4C sobre a resistência antibiótica

Este ensaio avalia a habilidade do composto teste modular a resistência bacteriana a antibióticos. Considerando que as linhagens de *S. aureus* K2068 e 1199B carregam genes que codificam proteínas de efluxo associadas à resistência aos antibióticos ciprofloxacino e norfloxacino, uma redução na CIM do antibiótico quando associado a um composto de teste é interpretada como inibição da bomba de efluxo (Tintino *et al.*, 2017). *p*C4C reduziu significativamente a CIM do ciprofloxacino (de 32 µg/mL para 0,70 µg/mL; p < 0,0001) contra a linhagem *S. aureus* K2068, sugerindo inibição do efluxo de antibióticos mediado pela bomba MepA. Resultado ainda mais notável foi observado no teste com a linhagem de *S. aureus* 1199B, que superexpressa a bomba NorA, em que *p*C4C causou uma redução de 4 vezes a CIM do norfloxacino (de 128 µg/mL para 8 µg/mL; p < 0,0001), sendo uma redução maior que o controle de inibição CCCP, que reduziu em três vezes a CIM do norfloxacino (de 128 µg/mL para 16 µg/mL; p < 0,0001) como apresentado na Figura 29. Os dados obtidos neste ensaio indicam que *p*C4C

modula a resistência antibiótica do ciprofloxacino e norfloxacino sobre *S. aureus* K2068 e 1199B, respectivamente, atuando como inibidor do mecanismo de resistência de efluxo.

Figura 29. Modulação da atividade antibiótica contra linhagens portadoras de bomba de efluxo. 4CpC foi testado em combinação com ciprofloxacino e norfloxacino contra *Staphylococcus aureus* K2068 e 1199B carreadoras das proteínas de efluxo MepA e NorA, respectivamente. ****p < 0,0001 indica diferenças significativas entre os grupos. Os resultados foram expressos em média geométrica ± desvio padrão, avaliados estatisticamente por ANOVA unidirecional seguido pelo teste post-hoc de Bonferroni.



Fonte: elaboração própria (2025).

6 DISCUSSÃO

Primeiramente, é importante destacar que esse é um trabalho pioneiro com o composto *p*C4C abordando os objetivos desta pesquisa envolvendo as análises *in silico*, *in vitro* e *in vivo* aqui reportadas. O *p*C4C é uma molécula semissintética derivada do *p*CoA. Sua fórmula molecular é C₁₆H₁₃ClO₂ com massa molar de 288,72 g/mol. O *p*CoA (C₉H₈O₃), um isômero do ácido 4-hidroxicinâmico, possui massa molecular de 164,16 g/mol e se apresenta como um pó cristalino de coloração amarelo-esverdeada. Apresenta boa solubilidade em solventes orgânicos, como etanol e dimetilsulfóxido, porém é insolúvel em água, o que limita sua aplicação em sistemas aquosos. Devido ao seu aroma, pode gerar efeitos organolépticos indesejáveis (Ferreira *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2018).

A hipótese de que o *p*C4C possui atividade antibacteriana é justificada pelo fato de que já é reconhecido que o *p*CoA exerce efeito sobre microrganismos Gram-positivos, como *S. aureus*, e Gram-negativos, como *Proteus mirabilis* e *E. coli*. Essa ação pode estar relacionada à desestruturação da membrana e à sua ligação ao DNA bacteriano inibindo funções celulares e levando à morte celular (Lou *et al.*, 2012; Zulkarnain *et al.*, 2020). Singha *et al.* (2023) propuseram que a ação sobre a membrana ocorre pela interrupção da função normal da enzima CDP-diacilglicerol-glicerol-3-fosfato 3-fosfatidil transferase (PGPS), comprometendo a síntese de fosfatidilglicerol, um componente essencial para a integridade da membrana, resultando em fragilidade estrutural, lise e morte celular subsequente.

Foi verificado que o *p*C4C apresentou atividade antibacteriana significativa com uma CIM de 8 µg/mL (27,77 µM) contra ambas as linhagens de *S. aureus* NCTC 12981 e NCTC 13373 e 16 µg/mL (55,54 µM) contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, demonstrando efeitos bactericidas nos ensaios de CBM. O *p*C4C exibiu atividade relevante contra bactérias Gram-positivas, porém não apresentou atividade antibacteriana considerável para uso clínico futuro contra nenhuma das cinco espécies de bactérias Gram-negativas testadas. Estudos prévios identificaram que a atividade antibacteriana do *p*CoA contra microrganismos patogênicos humanos foi mais eficaz contra bactérias Gram-positivas do que contra Gram-negativas (Forero-Doria *et al.*, 2019; Singha *et al.*, 2023). O ácido *p*-cumárico e seus

derivados contêm um grupo fenólico que contribui para a ação antibacteriana, conforme relatado para outros compostos com subestruturas fenólicas. Dessa forma, essa porção da molécula deve interagir com *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp. (Alves *et al.*, 2013).

Em triagens para atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, diversos derivados sintéticos do *p*CoA demonstraram que, entre os compostos testados, ésteres e amidas ligados a grupos aromáticos, como o *p*C4C, sintetizado via reação de esterificação, potencializaram a atividade antibacteriana contra *S. aureus*. Para *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*, observou-se que cada grupo distinto de derivados do *p*CoA, com características estruturais específicas, apresentou variações na potência contra cada diferente espécie microbiana quando comparado a outros derivados. Ou seja, diferentes microrganismos e/ou diferentes alvos moleculares requerem características estruturais distintas para atingir a ação desejada e, consequentemente, o efeito esperado. Dessa forma, diferentes compostos, mesmo que derivados da mesma molécula, podem apresentar atividades distintas contra espécies microbianas variadas (Khatkar *et al.*, 2017).

Quando comparado à vancomicina, um fármaco amplamente utilizado na clínica e frequentemente empregado como uma das últimas alternativas para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias Gram-positivas, o *p*C4C apresentou valores mais elevados de CIM, CBM e CSM. Apesar desse fato e da falta de dados sobre possíveis reações adversas do composto, o *p*C4C representa uma opção promissora ainda em estudo que, em associação com a vancomicina, pode contribuir para a ampliação do arsenal terapêutico contra infecções por bactérias Gram-positivas.

Apesar de sua eficácia, a vancomicina está associada a efeitos adversos, como a síndrome do homem vermelho, caracterizada por prurido, eritema, congestão torácica e cervical, além de angioedema, podendo evoluir para choque (Alvarez-Arango *et al.*, 2021). Além disso, sua ototoxicidade pode resultar em perda auditiva, enquanto sua nefrotoxicidade, decorrente do acúmulo renal, pode levar à insuficiência renal (Peng *et al.*, 2020). Ademais, o fenótipo VRSA torna o uso da

vancomicina ineficaz, necessitando-se recorrer a outros fármacos para uma terapia viável (Michalik, Podbielska-Kubera e Dmowska-Koroblewska, 2025).

A ausência de diferenças no efeito do *pC4C* sobre *S. aureus* e MRSA sugere que a mutação causada pelo gene *mecA* nas proteínas de ligação à penicilina (PBPs) não influencia a ação do *pC4C*, indicando um possível mecanismo de ação distinto da ligação a essas enzimas, que comprometeria a síntese de peptidoglicano na parede celular bacteriana. Esse achado é relevante para a identificação de novos compostos com efeitos sobre MRSA.

Como os compostos antibacterianos atuam de diferentes formas, entende-se que os alvos microbianos apresentam distintas suscetibilidades à exposição antimicrobiana, dependendo da fase de crescimento. Dessa forma, o deslocamento do fármaco, sua interação com os sítios de ligação e o consequente início do efeito impactam a dinâmica de crescimento, uma vez que são processos dependentes do tempo e da fase de desenvolvimento do microrganismo (Lourenço e Pinto, 2011; Theophel *et al.*, 2014).

Os dados obtidos nos ensaios cinéticos indicam o efeito bactericida do *pC4C* e sugerem que, para o desenvolvimento de um potencial novo agente antibacteriano, a dosagem desse composto pode ser ajustada para administração diária. Na curva de *time-kill*, a análise estatística aponta que os efeitos do *pC4C* a 16 µg/mL e da vancomicina a 4 µg/mL, correspondentes aos respectivos valores de CIMx2 para MRSA, foram equivalentes após 24 horas de exposição, alcançando a máxima eliminação do microrganismo. Esses resultados apontam para a necessidade de estudos *in vivo* em modelos animais para a avaliação de parâmetros farmacocinéticos.

Por meio de um modelo cinético, Li *et al.* (2022) verificaram a inibição completa do crescimento de uma bactéria aeróbica acidofílica Gram-positiva pelo *pCoA* e demonstraram um efeito dependente da concentração por meio da avaliação de parâmetros medidos por densidade óptica.

A combinação de produtos antimicrobianos representa uma estratégia terapêutica que pode resultar em benefícios clínicos permitindo ajustes de dose, minimizando efeitos colaterais e auxiliando na reversão da resistência microbiana (Ong *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020).

O resultado indiferente no ensaio de combinação sugere possíveis mecanismos de ação distintos entre *pC4C* e vancomicina, sem interferência mútua, permitindo seu uso concomitante. A CIM individual da vancomicina apresentou melhora com a combinação, reduzindo a concentração necessária para inibir o microrganismo.

A combinação de dois antimicrobianos pode apresentar uma interação indiferente mesmo quando um deles exibe redução na CIM devido a uma interação que não resulta em benefício combinado significativo. De acordo com o *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (2000), a interação sinérgica ocorre quando ambos os fármacos atuam de forma complementar, produzindo um efeito combinado superior à soma de seus efeitos individuais. Se o segundo antimicrobiano não potencializa significativamente o efeito do primeiro, o FICI pode situar-se na faixa de indiferença. Esse fenômeno ocorre porque o impacto combinado não é suficiente para ultrapassar o limiar de sinergia que exige uma redução mais acentuada nas CIMs de ambos os agentes. Dois compostos podem atuar em diferentes alvos ou vias metabólicas sem que seus mecanismos se complementem de forma a potencializar suas atividades, logo, a interrupção de uma via pode não influenciar significativamente a eficácia da outra (Bognár, Spohn e Lázár, 2024; Oliveira *et al.*, 2022).

O fato de que bactérias contidas em biofilmes apresentam uma redução de 10 a 1000 vezes na suscetibilidade a agentes antibacterianos em comparação ao seu estado planctônico (Sharma *et al.*, 2023; Uruén *et al.*, 2021) sugere que o *pC4C* possui alta capacidade de destruição de biofilme. Especificamente, na concentração correspondente a 4 vezes a CIM (222,1 μ M) contra MRSA, o *pC4C* demonstrou um potencial significativo de redução do biofilme.

Forero-Doria *et al.* (2019) observaram que os sais de *pCoA* exibiram mais de 50% de atividade antibiofilme contra *S. aureus* na concentração de CIMx2 encontrada em seu estudo. De maneira semelhante, Bag e Chattopadhyay (2017), verificaram que o *pCoA* demonstrou mais de 60% de atividade antibiofilme contra *B. cereus* e mais de 50% contra *S. typhimurium*. A redução significativa do biofilme bacteriano pelo *pC4C* indica que esse composto pode ser utilizado em pacientes com infecções estabelecidas, nas quais a formação de biofilme já ocorreu.

Estudos toxicológicos, tanto *in vitro* como *in vivo*, fornecem uma base para antecipar potenciais reações adversas e suas consequências em humanos. Além disso, esses estudos permitem a identificação de doses iniciais seguras para futuras administrações em ensaios clínicos (Chapman *et al.*, 2010). A detecção de potencial atividade tóxica é um dos pilares centrais no processo de desenvolvimento de fármacos. Substâncias destinadas ao uso humano devem ser adequadamente triadas por meio de metodologias que envolvam tanto modelos celulares como modelos animais (Boos *et al.*, 2019; Wijesinghe *et al.*, 2020).

A linhagem celular HGF é uma linhagem primária humana estabelecida a partir de biópsias gengivais de pacientes normais e é amplamente utilizada na pesquisa científica. Os resultados de citotoxicidade em células HGF-1 indicaram que os tratamentos com valores da CIM do composto contra *S. aureus* e MRSA (27,77 μ M) e *E. faecalis* (55,54 μ M) apresentaram baixa toxicidade, sugerindo um uso seguro nessas concentrações. No entanto, foi observado um efeito citotóxico em concentrações a partir de 111,09 μ M. Assim, são necessários estudos adicionais em outras linhagens celulares para avaliar a citotoxicidade do pC4C. Para isto, foi incluída a avaliação de outro parâmetro de toxicidade para definir a segurança em um modelo *in vivo*.

Existem diferenças entre os modelos de toxicidade *in vitro* (baseados em células) e *in vivo*, sendo que o primeiro é uma metodologia mais limitada e não reproduz com precisão as condições do organismo. O modelo *in vivo* fornece uma melhor correlação com os níveis de toxicidade sistêmica (Silva *et al.*, 2021). No modelo *in vivo* utilizando larvas de *G. mellonella* não foi observada mortalidade larval significativa, mesmo na maior concentração testada, sugerindo a segurança sistêmica do composto. O uso de larvas de *G. mellonella* apresenta vantagens significativas para avaliações de toxicidade sistêmica de compostos como o pC4C. Trata-se de uma ferramenta econômica, eticamente aceitável e prática para triagens preliminares, evitando os altos custos e requisitos regulatórios associados a modelos com mamíferos. Esse modelo demonstrou confiabilidade em diversos estudos toxicológicos e gera dados que se correlacionam de forma consistente com modelos mamíferos, destacando seu valor para avaliações iniciais de toxicidade (Coates *et al.*, 2019; Freires *et al.*, 2023).

O sistema imunológico inato de *G. mellonella* compartilha semelhanças funcionais com o dos mamíferos, incluindo a presença de hemócitos (análogos aos leucócitos), produção de peptídeos antimicrobianos, respostas ao estresse oxidativo e uma cascata de melanização comparável ao sistema complemento dos mamíferos (Champion, Wagley e Titball, 2016). Essas semelhanças ampliam a relevância de *G. mellonella* como modelo para o estudo dos mecanismos imunológicos inatos e para a avaliação de efeitos toxicológicos. Embora não possa substituir completamente os modelos convencionais com mamíferos, sua forte capacidade preditiva e vantagens práticas tornam esse modelo indispensável para orientar pesquisas toxicológicas iniciais. Apesar de ser considerado um método alternativo ao uso de animais vertebrados, o experimento com larvas de *G. mellonella* foi conduzido de acordo com os princípios das boas práticas de pesquisa no uso de animais.

De forma semelhante, um estudo sobre seu precursor, *p*CoA, utilizando visualização morfológica por estereoscopia em embriões de *Danio rerio* (peixe-zebra), demonstrou que o composto possui baixa toxicidade, mesmo nas maiores concentrações testadas (72 μ M - 6000 μ M) durante 48 horas de exposição, apresentando desenvolvimento normal e manutenção da viabilidade dos embriões (Nasr *et al.*, 2023).

Além disso, o *p*CoA demonstrou efeitos protetores contra toxicidades induzidas por diferentes agentes em diversos tecidos e órgãos do corpo humano. Esses efeitos incluem proteção contra hepatotoxicidade induzida por cisplatina e adriamicina (Akdemir *et al.*, 2017; Rafiee *et al.*, 2021), nefrotoxicidade induzida por cisplatina (Akdemir *et al.*, 2017), controle da cardiototoxicidade mediada por doxorrbicina na linhagem celular H9c2 (Chacko *et al.*, 2015), restauração do sistema reprodutor e da capacidade reprodutiva em ratos tratados com etanol após tratamento oral com *p*CoA (Nishi *et al.*, 2018), e proteção dos tecidos ovarianos em ratos contra estresse oxidativo, inflamação e apoptose induzidos por cisplatina (Demir *et al.*, 2022).

Os parâmetros toxicológicos avaliados são favoráveis à realização de testes adicionais em modelos animais vertebrados. Assim, sugere-se a avaliação de ensaios como a determinação da DL₅₀ em roedores e embriões de peixe-zebra.

Com base nos resultados obtidos nas previsões toxicológicas da análise *in silico*, foi determinado que o *pC4C* não apresenta toxicidade pelo modelo AMES, obtendo um resultado negativo nesse teste. O modelo AMES avalia o potencial mutagênico do composto e, caso positivo, pode indicar também um potencial carcinogênico. Lesões hepáticas induzidas por compostos foram avaliadas por meio do teste de hepatotoxicidade, que indicou que *pC4C* apresenta baixo potencial hepatotóxico. Para avaliar o potencial de alergias por contato foi realizada uma análise de sensibilização dérmica, a qual demonstrou que o *pC4C* não induz sensibilização. Também foi verificado se o composto poderia atuar como um potencial inibidor dos canais de potássio codificados pelos genes *hERG I* e *hERG II*. A inibição desses canais pode levar a arritmias ventriculares fatais devido ao desenvolvimento da síndrome do QT longo. Os testes demonstraram que *pC4C* não atua como inibidor de *hERG I* e *hERG II*.

Tetrahymena pyriformis é uma protozoa bacteriana utilizada como método alternativo para avaliar a toxicidade de substâncias químicas. Esse método determina a concentração do composto na qual 50% do crescimento microbiano é inibido (IGC₅₀). O composto *pC4C* apresentou valores > -0,5 log µg/L, indicando toxicidade para o microrganismo. Para o objetivo deste estudo, esse é um resultado favorável, uma vez que se espera que o composto atue sobre células microbianas. O *Flathead minnow* (*Pimephales promelas*) é um peixe de água doce utilizado como indicador de toxicidade aquática, no qual se mede a concentração letal para 50% da população (CL₅₀). Os resultados indicaram que *pC4C* apresenta toxicidade aguda para essa espécie (log mM CL₅₀ < -0,3).

A Dose Máxima Recomendada Tolerada (DMRT) fornece uma estimativa do limiar de dose para compostos químicos em humanos. O valor obtido para *pC4C* foi superior a 0,477 log (mg/kg/dia), indicando um alto limiar de dose tolerada. É importante ressaltar que a determinação toxicológica é uma grande preocupação no desenvolvimento de fármacos, contribuindo significativamente para a pesquisa pré-clínica e o reconhecimento precoce dos potenciais efeitos adversos do composto (Durán-Iturbide, Díaz-Eufracio e Medina-Franco, 2020; Myung, Sá, De e Ascher, 2024).

As falhas farmacocinéticas constituem um dos principais obstáculos no desenvolvimento de novos fármacos, sendo a análise preditiva do perfil ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) essencial para antecipar limitações e aumentar a probabilidade de sucesso terapêutico (Durán-Iturbide, Díaz-Eufracio e Medina-Franco, 2020; Isyaku, Uzairu e Uba, 2020). As abordagens *in silico* têm se destacado por permitir a triagem eficiente de compostos com base em suas estruturas químicas, otimizando o processo de desenvolvimento e reduzindo falhas em fases posteriores. Ferramentas computacionais, como SwissADME e pkCSM, vêm sendo amplamente utilizadas por fornecerem modelos confiáveis para prever propriedades físico-químicas e farmacológicas, contribuindo significativamente para a seleção racional de candidatos promissores na química medicinal (Daina, Michielin e Zoete, 2017; Pires, Blundell e Ascher, 2015a).

Para verificar se o composto possui características que tornam possível sua administração e atividade por via oral foi observada a regra de Lipinski a qual determina que o composto deve ter massa abaixo de 500 daltons, não ter mais do que 5 doadores de ligações de hidrogênio, não ter mais do que 10 aceptores de ligações de hidrogênio, ter um coeficiente de partição octanol-água menor do que 5 ($\text{LogP}_{\text{o/w}} \leq 5$). Para o parâmetro químico-medicinal, a substância deve atender pelo menos 3 dos 4 critérios (Lipinski *et al.*, 2012). O 4CpC possui uma massa molecular de 288.73 da, 1 doador de ligações de hidrogênio, 3 aceptores de ligações de hidrogênio e um $\text{LogP}_{\text{o/w}}$ de consenso (que é a média aritmética dos valores previstos por cinco métodos propostos para lipofilicidade) = 3.49 cumprindo, portanto, todos os parâmetros da regra de Lipinski. Levando-se em consideração os três métodos de mensuração para análise de solubilidade em água (ESOL, Ali, SILICOS-IT), o composto apresenta LogS entre -6 e -4 indicando hidrossolubilidade moderada.

Boiled-Egg é um modelo de representação gráfica intuitivo que se baseia na combinação de dois parâmetros principais: logP (lipofilicidade) que descreve a afinidade de uma molécula com lipídios e TPSA (área de superfície polar) que fornece uma medida da polaridade da molécula (Daina, Michielin e Zoete, 2017). Através da análise a esse modelo o composto demonstra ter uma alta probabilidade

de ser absorvido pelo trato gastrointestinal (área gráfica físico-química representada pela “clara”) com uma taxa de 92.318%.

Células Caco-2 são linhagens de adenocarcinoma epitelial colorretal usadas como modelo para verificar a absorção de compostos administrados por via oral (Pires, Blundell e Ascher, 2015b). O resultado obtido ($\log P_{app}$, $\log \text{cm s}^{-1} = 1.341 > 0.9$) aponta que há grande probabilidade do composto ser absorvido no intestino delgado em consonância, também, com o resultado do *Topological Polar Surface Area* ($TPSA = 46.53 \leq 140 \text{ \AA}^2$).

Em relação à permeabilidade dérmica o composto demonstra ter baixo potencial de entrega por essa via ($\log K_p = -2.634 \text{ cm/h} > -2.5$).

A glicoproteína de permeabilidade (PgP) é uma importante estrutura de efluxo que reduz a biodisponibilidade de xenobióticos protegendo o organismo desses agentes, ao tempo que também dificulta a disponibilidade de fármacos em níveis terapêuticos no organismo (Grime, Barton e McGinnity, 2013; Mohamed e El-Kadi, 2012). Logo, é interessante que não haja interação de um fármaco com a proteína para não suceder implicações farmacocinéticas indesejadas. Observa-se, portanto, que o 4CpC não é um possível inibidor assim como não é substrato para a glicoproteína-P (PgP-) ou MDR1 (gene de resistência que expressa PgP).

Levando-se em consideração o modelo *Boiled-Egg*, o 4CpC pode traspassar a barreira hematoencefálica (área gráfica físico-química representada pela “gema”) sendo capaz de estar biodisponível no sistema nervoso central ($\log PS = -1.431 > -2$). Isso é importante, pois possibilitaria tratar infecções que atingissem o SNC.

O volume de distribuição no estado estacionário (VD_{ss}) indica o volume teórico no qual a dose total do medicamento é distribuída de forma a garantir a mesma concentração no plasma (Wang *et al.*, 2019). Em relação a esse parâmetro, o composto obteve um valor baixo ($\log L/Kg = 0.109 < 0.45$), não demonstrando alto volume de distribuição o que implica uma menor distribuição do fármaco no tecido em vez do plasma.

Um outro parâmetro analisado foi a predição metabólica. Dentre os principais sistemas de metabolização tem-se o sistema mitocondrial citocromo P450 (CYP450) que constitui uma superfamília de enzimas envolvidas no metabolismo de grande parte dos medicamentos. CYP2D6, CYP3A4, CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9 são

isoenzimas que integram o complexo CYP450 e foram utilizadas nas análises. Através das verificações com a ferramenta foi possível identificar que o composto é um potencial inibidor das isoformas CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9 o que conduz a uma menor taxa de biotransformação que, por um lado, pode melhorar o desempenho do fármaco ao deixá-lo disponível por mais tempo no organismo e, por outro lado, pode levar a um acúmulo da substância com possíveis efeitos indesejados. Identificou-se, também, que *p*C4C não é inibidor nem constitui substrato de CYP2D6 e CYP3A4. Essas informações são relevantes levando em consideração os aspectos das interações farmacocinéticas de substâncias que exerçam atividade como indutor ou inibidor enzimático com a identificação de quais isoformas específicas são afetadas (Daina, Michelin e Zoete, 2017; Zaretzki, Matlock e Swamidass, 2013).

Para avaliar a cinética do *p*C4C com relação à excreção, verificou-se o potencial do composto em ser substrato para a *Organic Cation Transporter 2* (OCT2), um transportador de absorção renal que desempenha uma importante função no processo de liberação de substâncias endógenas e exógenas, sendo observado que o *p*C4C não é substrato para o transportador. Isso é importante para evitar possíveis interações quando há administração concomitante a outras substâncias que são substratos de OCT2. Aliado a isso, o clearance total foi calculado (constante de proporcionalidade dada pela combinação de depuração hepática e renal, $\log \text{ ml/min/kg} = -0.196$) o que possibilita determinar doses do composto para se alcançar sua concentração em estado estacionário (Grime, Barton e McGinnity, 2013; Silva *et al.*, 2020).

Os estudos *in silico* têm se consolidado como ferramentas valiosas na pesquisa científica e no desenvolvimento farmacêutico, por permitirem a triagem eficiente de compostos e a redução de falhas técnicas em etapas posteriores (Agamah *et al.*, 2020). Esses métodos viabilizam a predição precisa de propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas, além de favorecerem o entendimento das interações biomoleculares e do reconhecimento ligante-receptor (Ryde e Söderhjelm, 2016; Torres *et al.*, 2019). Dentre essas abordagens, o *docking* molecular destaca-se por prever a afinidade de ligação entre ligantes e seus alvos moleculares, por meio de funções de pontuação que avaliam

as conformações mais estáveis energeticamente (McNutt *et al.*, 2021; Salmaso e Moro, 2018; Shivanika *et al.*, 2022). Com os avanços computacionais, essa técnica tem contribuído de forma significativa para a identificação de novas moléculas biologicamente ativas com abordagens cada vez mais confiáveis (Agamah *et al.*, 2020; Agarwal e Mehrotra, 2016; Bikiel *et al.*, 2006).

Através da realização do *docking* molecular as energias de ligação entre o *pC4C* e as substâncias padrões com os alvos selecionados foram comparadas para predição de acoplamento e afinidade. Com base nos alvos moleculares das substâncias padrões foram apontadas enzimas responsáveis pela síntese de parede celular bacteriana, envolvidas na replicação do DNA, presentes na membrana celular e alvos que conferem perfis de resistência bacteriana.

A proteína de ligação às penicilinas (PBP4) ligam novos fragmentos de NAG-NAMA-pentapeptídeo à parede celular bacteriana. Exercem atividades enzimáticas de transpeptidase e DD-carboxipeptidase na biossíntese de peptidoglicano e sua incorporação à parede celular em células em divisão (Moon *et al.*, 2018). A DNA ligase promove a união de fragmentos de cadeias de DNA catalisando a formação de ligações fosfodiéster entre nucleotídeos, o que é essencial para manter a integridade do genoma (Alomari *et al.*, 2021; Han, Chang e Griffor, 2009). Fosfatidilglicerol fosfato sintase (PgsA) catalisa a via de biossíntese do fosfatidilglicerol, um dos principais fosfolipídios que compõem a membrana citoplasmática das bactérias como *S. aureus* e *E. faecalis* (Yang *et al.*, 2021). MepA e NorA são bombas de efluxo que expelem uma variedade de compostos tóxicos, incluindo antibióticos, para fora da célula bacteriana, reduzindo a concentração intracelular desses compostos e, consequentemente, conferindo resistência microbiana (Brawley *et al.*, 2022; Schindler *et al.*, 2013).

No que se refere aos possíveis alvos de ação, a análise do *docking* molecular previu que o *pC4C* apresenta afinidade por todas as enzimas avaliadas, com destaque para a maior afinidade observada em relação ao alvo de membrana (PgsA), seguida da enzima envolvida no processo de replicação do DNA (DNA ligase). Esses resultados estão em concordância com os resultados de Zulkarnain *et al.*, 2020 que verificaram que o predecessor do *pC4C*, o ácido *p*-cumárico, exerce sua ação causando rupturas nas membranas celulares e ligando-se ao DNA

bacteriano interferindo em suas funções. No mesmo sentido, Singha *et al.* (2023) propuseram que o ácido *p*-cumárico impede a síntese de fosfatidilglicerol ao se ligar à CDP-diacilglicerol-glicerol-3-fosfato 3-fosfatidil transferase nas membranas celulares.

O *p*C4C é uma substância semissintética solúvel em solventes orgânicos e com hidrossolubilidade moderada. Isso nos traz a informação de que a molécula possui características químicas que tornam esses modos de ação possíveis e pertinentes. A lipofilicidade é essencial para conseguir agir nas membranas celulares e traspassá-las para penetrar nas células e, então, agir sobre um alvo intracelular como as enzimas ligadas à duplicação do DNA.

A inibição da enzima DNA ligase pelo *p*C4C, em bactérias, interrompe a replicação e reparo do DNA. Essa enzima é crucial para a síntese da fita descontínua de DNA durante a replicação e para a ligação de fragmentos de DNA (fragmentos de Okazaki) durante o reparo de quebras de fita simples. A interrupção desses processos levam à instabilidade genômica, o que torna as bactérias mais vulneráveis a condições ambientais adversas, e como resultado, morte celular. Esse é um potencial alvo ainda não explorado do ponto de vista terapêutico (Eijk *et al.*, 2017).

Os achados deste estudo indicam que o *p*C4C causa danos às membranas celulares em *S. aureus* e *E. faecalis* prejudicando o envoltório bacteriano e causando lise celular, além de ter sido observado desorganização do material genético. Esses achados amparam os resultados *in silico* aqui reportados. Ao se ligar à PgsA, o *p*C4C prejudica a biossíntese de fosfolipídeos estruturalmente fundamentais à integridade da membrana desencadeando alterações osmóticas importantes ao funcionamento normal da célula e ao interagir com a PBP, mesmo em menor grau, desestrutura o processo de síntese da parede celular conduzindo à lise e consequente morte celular.

Substâncias que possuem propriedades lipofílicas, como o *p*C4C, apresentam a habilidade de interagir com componentes estruturais da membrana plasmáticas, incluindo as bombas de efluxo que são proteínas transmembrana. A afinidade do composto teste pelas bombas de efluxo MepA e NorA, demonstrada pela análise de *docking* molecular, sugere que o composto pode se acoplar às

estruturas das bombas impedindo o seu funcionamento normal e, portanto, permitindo que outros antibióticos possam exercer sua ação mais eficazmente quando utilizados conjuntamente. Esses dados subsidiam os achados *in vitro* reportados nesse estudo.

A dinâmica molecular é usada para gerar uma simulação que investiga a estabilidade das ligações desde o contato inicial entre o ligante e a proteína até o acoplamento completo, ou o não acoplamento, em escala de nanosegundos. A dinâmica molecular calcula os movimentos dos átomos ao longo do tempo pela integração das equações de movimento de Newton (Salmaso e Moro, 2018; Shivanika *et al.*, 2022).

Essa análise revelou que houve estabilidade nas ligações do *p*C4C com os alvos estudados, destacando-se a estabilidade com a enzima PgsA que apresentou menores valores de desvios, indicando menos contatos entre ligante e proteína culminando mais rapidamente na manutenção das ligações. As flutuações entre os resíduos foram mais baixas na enzima DNA ligase, apontando para uma estrutura menos flexível, dentro de um padrão equilibrado que não gera muitas mudanças conformacionais com consequente maior permanência e estabilidade.

As energias de Coulomb e de Lennard-Jones são importantes na modelagem molecular, especialmente em simulações de dinâmica molecular e *docking*. Elas representam tipos distintos de interações não covalentes entre átomos ou moléculas, descrevendo interações entre cargas elétricas, interações de repulsão estérica e de atração de van der Waals, respectivamente. O *p*C4C estabeleceu energias de ligação eletrostáticas mais pronunciadas favorecendo a formação e a estabilidade do complexo ao longo do tempo, como observado no RMSD. As interações de Coulomb são específicas e, de forma seletiva, atrai um grupo selecionado ao alvo. Isso melhora o encaixe no sítio ativo e reduz a ligação a alvos não desejados que desencadearia mais efeitos colaterais.

Conjuntamente, os dados obtidos no *docking* e na dinâmica molecular sugerem um mecanismo de ação duplo do *p*C4C sobre as células bacterianas atuando sobre alvos ligados à síntese de membrana e à replicação de DNA. Além disso, se acopla com energia de ligação suficiente para inibir os mecanismos de resistência relacionados às proteínas de efluxo.

O iodeto de propídio (IP) é um corante amplamente utilizado para avaliação da viabilidade celular. Devido à sua natureza hidrofílica e ao seu tamanho molecular é impermeável a células vivas com membranas intactas. No entanto, em células com membranas danificadas ou comprometidas, o IP é capaz de atravessar a membrana e interagir com o DNA, emitindo fluorescência vermelha quando ligado ao material genético. A intensidade da fluorescência emitida é diretamente proporcional ao grau de dano à membrana celular. Dessa forma, o IP é um marcador de células mortas ou com membranas comprometidas. Quando o IP penetra em uma bactéria, a principal conclusão é que a membrana citoplasmática sofreu danos, uma vez que o IP não consegue atravessar membranas íntegras. A parede celular bacteriana, apesar de essencial para a proteção estrutural, não é a principal barreira que impede a entrada do IP. Mesmo que a parede celular esteja danificada, o IP só penetrará se a membrana citoplasmática estiver comprometida, pois é ela que controla o transporte de substâncias para dentro e fora da célula. Assim, a penetração do IP indica dano à membrana citoplasmática, o que pode ou não estar associado a danos na parede celular, dependendo do mecanismo de ação envolvido (Crowley, Marfell, *et al.*, 2016; Crowley, Scott, *et al.*, 2016; Tian *et al.*, 2024).

É bem estabelecido que a vancomicina exerce seu efeito ligando-se à porção terminal D-Ala-D-Ala do lipídio II, impedindo a ligação das PBPs, que realizam a reticulação do lipídio II durante a síntese do peptidoglicano para a formação da parede celular. Essa ação desestabiliza o equilíbrio osmótico, podendo levar à ruptura celular e consequente morte bacteriana (Stogios e Savchenko, 2020). Dessa forma, os danos e a ruptura causados pela vancomicina ao envelope celular facilitaram a entrada do IP nas células, resultando no aumento da emissão de fluorescência.

Na avaliação morfológica por MET observou-se que o *pC4C* induziu alterações em MRSA e *E. faecalis*. Os achados deste estudo indicam que o *pC4C* pode causar danos à parede celular bacteriana e desestruturar a membrana citoplasmática, resultando em lise celular e extravasamento do conteúdo intracelular para a matriz extracelular. A perda da integridade da membrana também foi evidenciada pela captação de IP pelas células tratadas com *pC4C* na MCLV. Com a

ruptura bacteriana, o *p*C4C pôde adentrar as células e interagir com macromoléculas intracelulares. Com a desorganização citoplasmática e do material genético mais DNA pode ter sido destruído, deixando poucos nucleotídeos para as moléculas de IP se anexarem.

Além disso, as descobertas deste estudo sugerem que o *p*C4C pode atuar por diferentes mecanismos para eliminar células bacterianas, atuando tanto no envelope bacteriano como em macromoléculas intracelulares envolvidas em processos genéticos. Nesse contexto, Lou et al. (2012) relataram que o ácido *p*-cumárico, precursor do *p*C4C, induz alterações irreversíveis na permeabilidade da membrana bacteriana, resultando na perda de conteúdo citoplasmático. Relatou, também, que o composto pode interagir com o DNA genômico bacteriano ligando-se ao ambiente hidrofóbico do DNA ou intercalando-se entre os pares de bases. A formação desse complexo pode ser estabilizada por meio de interações de empilhamento de bases (*base-stacking*).

No ensaio de lise celular o *p*C4C exibiu ação bactericida ao apresentar atividade lítica sobre as células bacterianas. Esse efeito é corroborado pelas curvas de crescimento e morte obtidas para os microrganismos testados. Compostos bactericidas são considerados mais versáteis do que aqueles com propriedades bacteriostáticas. Tratamentos com agentes bactericidas geralmente possuem menor duração e são recomendados no manejo de infecções graves e potencialmente letais, sendo indicados como agentes de primeira escolha para terapias em indivíduos imunocomprometidos (Herrera et al., 2022).

Para avaliar a penetração e os danos estruturais no biofilme de MRSA, foi utilizada coloração dupla com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP). O LA é um corante metacromático que atravessa as membranas celulares em sua forma neutra e, uma vez dentro da célula, converte-se em sua forma catiônica, tornando-se incapaz de permear para fora da célula. O LA possui afinidade por ácidos nucleicos e, ao se ligar ao material genético, emite fluorescência verde, indicando células viáveis (Kinoshita et al., 2016). O IP também possui afinidade aos ácidos nucleicos, porém apenas penetra nas células após a integridade da membrana ser comprometida, marcando células em necrose ou em estágios avançados de apoptose (Crowley, Scott, et al., 2016). A MCVL combinada à

coloração LA/IP permite avaliar a eficácia do composto, diferenciando células vivas e mortas, além de identificar alterações estruturais no biofilme. Essas informações são essenciais para a compreensão do mecanismo de ação do composto e dos possíveis mecanismos de resistência bacteriana.

A matriz extracelular polimérica (MEP), composta por polissacarídeos, proteínas, lipídios e DNA extracelular é essencial para a integridade do biofilme e pode apresentar características hidrofílicas ou anfipáticas, dependendo de sua composição molecular. Substâncias altamente hidrofílicas tendem a apresentar penetração limitada na matriz, enquanto compostos altamente lipofílicos podem ficar retidos na estrutura matricial. Dessa forma, um composto moderadamente lipofílico, como o *p*C4C, tem maior probabilidade de atravessar a matriz extracelular e se difundir intracelularmente sem ser retido nas camadas superficiais (Barna e Williams, 1984; Ruhal e Kataria, 2021; Sharma *et al.*, 2023).

A vancomicina, apresentando natureza hidrofílica devido à presença de múltiplas ligações de hidrogênio provenientes de grupos polares como hidroxila, amida e carboxila, apresenta baixa solubilidade lipídica, o que prejudica sua penetração na matriz extracelular e nas membranas bacterianas. Além disso, seu elevado peso molecular (PM) compromete ainda mais sua difusão através da MEP, reduzindo sua eficácia contra bactérias incorporadas no biofilme. O *p*C4C (PM = 288,05 g/mol) é consideravelmente menor que a vancomicina (PM = 1449,30 g/mol), o que provavelmente favorece sua mobilidade na matriz do biofilme e melhora seu alcance bacteriano (Pfeiffer, 1981; Stogios e Savchenko, 2020). Por outro lado, no ensaio de quantificação da biomassa do biofilme por cristal violeta, a vancomicina apresentou maior eficácia na redução da massa aderida. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que tal método avalia predominantemente a ação da substância sobre a superfície do biofilme, não contemplando sua capacidade de penetração nem os efeitos sobre a desestruturação da arquitetura tridimensional da matriz biofilme.

Devido à estrutura complexa e à maior resistência dos biofilmes, compostos atuam de maneira distinta na desestruturação de biofilmes em comparação à sua ação sobre bactérias planctônicas. Em células planctônicas, os agentes antibacterianos não encontram barreiras físicas, permitindo o acesso direto e

individual às bactérias, o que facilita a rápida ligação, penetração (quando aplicável) e ação. Em contraste, nos biofilmes, a MEP limita a difusão dos compostos, reduzindo sua concentração efetiva no interior da matriz. As bactérias planctônicas geralmente estão em estado de crescimento ativo, tornando-se mais suscetíveis a substâncias que atuam em processos durante a divisão celular, como a síntese da parede celular bacteriana. Entretanto, os biofilmes apresentam heterogeneidade metabólica, com células superficiais mais metabolicamente ativas e células mais profundas em estado quiescente, tornando-as menos responsivas a agentes que dependem da divisão celular ativa. Os mecanismos de resistência em células planctônicas geralmente surgem por mutações genéticas, mas não possuem a proteção adicional proporcionada pela matriz extracelular nos biofilmes. Além de atuar como barreira física, essa matriz facilita a troca genética, o sinal molecular dependente de densidade dentro da matriz (*quorum sensing*) e a presença de células persistentes, que sobrevivem ao tratamento antibiótico devido à sua inatividade metabólica. Dessa forma, os mecanismos pelos quais compostos atuam contra biofilmes exigem abordagens mais complexas do que aquelas eficazes contra bactérias planctônicas (Ruhal e Kataria, 2021; Sharma *et al.*, 2023).

Para verificar se o *p*C4C poderia comprometer o processo de síntese e a concentração de DNA, foram realizados os ensaios espectroscópico e a eletroforese em gel com brometo de etídio (EtBr). O EtBr é um corante fluorescente amplamente utilizado em microbiologia e biologia molecular para visualizar ácidos nucleicos em géis de eletroforese e age se intercalando entre os pares de bases do DNA que quando exposto à luz ultravioleta, emite fluorescência, permitindo a visualização das bandas dos ácidos nucleicos (Pal *et al.*, 2020).

A diminuição na concentração de DNA observada nas células tratadas com o *p*C4C pode ter sido relacionada a diferentes causas como pelo menor número de células vivas e consequente menor quantidade total de DNA extraído da amostra; pelo impedimento da duplicação do genoma bacteriano resultando na redução da concentração de DNA detectável; ou ainda pelo dano direto ao material genético como quebras na fita do ácido nucleico. Em qualquer das situações o tratamento com o composto representa prejuízo às células bacterianas. As alterações observadas por eletroforese na amostra tratada com o *p*C4C sugerem que o

composto atravessa a membrana celular e afeta a integridade do DNA. Ratificando esse achado, os ensaios com o IP mostraram que o *pC4C* pode penetrar na bactéria por causar danos à membrana celular. Esse modo de ação foi amparado pelos estudos de *docking* e dinâmica molecular aqui reportados.

O valor da CIM do *pC4C* frente às linhagens *S. aureus* K2068 e 1199B corroboram o alto nível de resistência bacteriana, consistente com a presença de mecanismos de efluxo ativos. Entretanto, o *pC4C* exibiu atividade antibacteriana contra linhagens de *S. aureus* 12981 e 13373 com CIM igual a 8 µg/mL para ambas as linhagens. Essas cepas não são carreadoras de proteínas de efluxo, porém, a linhagem 13373 é portadora de alteração de molécula-alvo por codificação genética como mecanismo de resistência. Consistente com o presente estudo, em investigação envolvendo o ácido *p*-cumárico, precursor do *pC4C*, Silveira *et al.* (2025) verificaram que o composto apresentou CIM maior de 1024 µg/mL contra as linhagens *S. aureus* 1199, 1199B, carreadoras de bombas de efluxo NorA, e contra a linhagem IS-58, produtora da bomba MepA.

Bombas de efluxo são proteínas transportadoras ligadas à membrana celular que expulsam substâncias potencialmente ofensivas à célula como mecanismo de defesa. No contexto terapêutico, a expulsão de compostos pela célula através dessas proteínas pode resultar em falha ou ineficácia da terapia medicamentosa (Sinha, Aggarwal e Singh, 2024). Com base nas análises *in silico* realizadas neste estudo, em conjunto com os resultados já apresentados, propõe-se que o *pC4C* também exerça sua atividade em nível intracelular, interagindo com alvos moleculares no interior das células, possivelmente interferindo no processo de replicação do DNA. Esse mecanismo de ação intracelular poderia tornar o *pC4C* passível aos sistemas de efluxo.

O EtBr é um agente tóxico e mutagênico que se intercala entre os pares de bases do DNA e que sofre resistência apenas pelo mecanismo de extrusão por bombas de efluxo (Sousa, de *et al.*, 2024). Embora possa ter um efeito tóxico sobre células, incluindo células bacterianas, não é considerado nem utilizado como um agente antimicrobiano. É empregado em pesquisas para avaliar a capacidade da bactéria de remover o EtBr do seu interior, indicando a presença de bombas de

efluxo, pois atua mobilizando as bombas, sendo a atividade de efluxo relativamente proporcional à concentração do EtBr no interior da célula (Pal *et al.*, 2020).

A MepA, da família MATE, codificada pelo gene cromossômico *mepA*, é uma importante bomba de efluxo expressa em algumas linhagens de *S. aureus*, como a K2068. Ela expulsa múltiplos fármacos, dentre os quais se destacam as fluoroquinolonas, como o ciprofloxacino, e outras substâncias, como EtBr (Freitas *et al.*, 2024; Sinha, Aggarwal e Singh, 2024). A bomba de efluxo NorA, da família MFS, sintetizada pela expressão do gene *norA*, superexpressa pela linhagem de *S. aureus* 1199B, confere resistência contra os compostos quaternários de amônio, o cloranfenicol e às fluoroquinolonas hidrofílicas, além de proteger a célula de substâncias lipofílicas e monocatiónicas como o EtBr (Almeida, de *et al.*, 2024; Tintino *et al.*, 2017).

O *pC4C*, em concentração subinibitória, exibiu atividade promissora ao reduzir a CIM do EtBr em ambas as linhagens testadas com um padrão mais eficiente contra *S. aureus* 1199B. Esses achados sugerem que as variações estruturais entre os sistemas de efluxo bacterianos podem influenciar significativamente a interação e a atividade dos moduladores. Os resultados obtidos sugerem um potencial efeito inibitório do *pC4C* sobre os mecanismos de efluxo do EtBr, resultando em maior retenção dentro da célula bacteriana e potencialização da sua atividade.

Os compostos que atuam na inibição do efluxo pode ter atividade relacionada ao bloqueio direto da bomba de efluxo, à competição pela ligação à proteína para impedir a ação do fármaco ou à inibição da expressão gênica (Freitas *et al.*, 2024). Portanto, a identificação de inibidores eficazes, naturais ou sintéticos, representa um avanço promissor no enfrentamento da resistência antimicrobiana, pois reduz a pressão seletiva por novos agentes e oferece uma alternativa viável ao desenvolvimento de novos fármacos. Dessa forma, reduzem a resistência intrínseca e revertem a resistência adquirida aos antibióticos transmudando o transporte de substâncias para permitir terapias antibióticas exitosas (Sousa, de *et al.*, 2024; Tintino *et al.*, 2017). Contudo, a preocupação preeminente causada pelas bombas de efluxo que causam múltipla resistência à drogas é que elas podem exportar uma grande diversidade de substratos estruturalmente diferentes (Tintino *et al.*, 2017).

A modulação da resistência bacteriana a antibióticos é observada pela capacidade de certos compostos restaurarem ou potencializarem a eficácia de antimicrobianos frente a linhagens resistentes. Experimentalmente, esse fenômeno pode ser verificado pela redução da CIM de um antibiótico quando associado a uma substância moduladora, indicando que o composto interfere positivamente para escapar dos mecanismos de resistência da bactéria. Nesse sentido, o estudo de moduladores se destaca como uma estratégia complementar essencial no combate à crescente ameaça das infecções bacterianas multirresistentes, permitindo, inclusive a reutilização de antibióticos clinicamente limitados.

Considerando os efeitos do *p*C4C no ensaio com EtBr, foi realizada a avaliação da modulação da atividade do ciprofloxacino e do norfloxacino em linhagens de *S. aureus* resistentes. Os resultados indicam que o *p*C4C é um agente modulador da resistência ao ciprofloxacino e ao norfloxacino em *S. aureus* atuando, possivelmente, como um inibidor das proteínas de efluxo MepA e NorA. A associação de antibacterianos com inibidores de bombas de efluxo pode desencadear um comportamento de sinergia entre os compostos. Esse efeito pode reduzir os valores de CIM dos antibacterianos indicando uma reversão do fenótipo de resistência bacteriana melhorando a atividade dos antibióticos.

Em estudo *in silico*, ácidos fenólicos foram submetidos a análises de *docking* molecular com o objetivo de avaliar o potencial de interação com a bomba de efluxo NorA. Dentre os compostos avaliados, o ácido *p*-cumárico apresentou uma das melhores energias de ligação (-6,3 kcal/mol), indicando afinidade pela proteína-alvo, superando, inclusive, o ciprofloxacino (-4,9 kcal/mol), fármaco de referência utilizado no estudo. Subsequentemente, por meio de simulações de dinâmica molecular, uma análise de estabilidade conformacional e flexibilidade dos complexos formados na ligação entre NorA e os ácidos fenólicos indicou que o ácido *p*-cumárico ancorou NorA de forma mais estável do que o complexo com o ciprofloxacino (Singh *et al.*, 2022). Esses achados reforçam a potencial atividade do derivado *p*C4C como agente modulador sobre o mecanismo da bomba.

Visto que linhagens portadoras da proteína de efluxo NorA podem extrudar compostos de amônio quaternário conferindo resistência a antissépticos e desinfetantes (Sinha, Aggarwal e Singh, 2024), o *p*C4C, baseado nos resultados

obtidos, poderia ser incluído em formulações de desinfetantes e antissépticos visando eliminar cepas de *S. aureus* produtoras da bomba NorA em ambientes hospitalares.

Em conjunto, os dados apresentados neste estudo sugerem que o *pC4C* possui um modo de ação dual sobre as bactérias, o que representa uma vantagem, uma vez que compostos com alvo único podem ter seus efeitos mais facilmente contornados pelos mecanismos de resistência bacteriana. Assim, o *pC4C* se mostra uma molécula promissora como alternativa para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas.

7 CONCLUSÃO

O *p*-cumarato de 4-clorobenzila (*p*C4C) apresentou atividade antibacteriana contra as linhagens de bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* NCTC 12981, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina NCTC 13373 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 com inibição do crescimento microbiano e cinética de morte observada dentro de 24 horas de contato. A molécula desestruturou biofilmes maduros quando aplicado em concentrações quatro vezes superiores à sua CIM contra o microrganismo testado, penetrando de forma eficaz na matriz extracelular polimérica para alcançar e atuar contra as células presentes no biofilme.

O composto apresentou parâmetros toxicológicos favoráveis na análise *in silico*, exibiu baixa toxicidade sistêmica *in vivo* em larvas de *Galleria mellonella* e resposta citotóxica limitada *in vitro* em células de fibroblastos gengivais humanos. O *p*C4C ainda foi avaliado por meio de abordagens de *docking* molecular e simulações de dinâmica molecular apresentando afinidade de ligação e estabilidade com as enzimas fosfatidilglicerol fosfato sintase e DNA ligase dependente de NAD⁺, bem como com as bombas de efluxo MepA e NorA.

Os resultados também sugerem que o *p*C4C pode exercer seu efeito por meio da desestabilização do envelope bacteriano, levando à lise celular, além de induzir a desorganização genética das células, evidenciando certa atividade sobre o DNA bacteriano. Adicionalmente, os achados demonstram que a molécula apresenta atividade antiefluxo ao inibir o funcionamento das bombas MepA e NorA, contribuindo para a modulação da resistência aos antibióticos ciprofloxacino e norfloxacino em linhagens de *Staphylococcus aureus* K2068 e 1199B, carreadoras de sistemas de efluxo MepA e NorA.

Considerando seus efeitos reportados nesta pesquisa, o *p*C4C se mostrou um composto com potencial para fundamentar novas hipóteses investigativas de aplicação futura na farmacoterapia de infecções bacterianas causadas por agentes Gram-positivos.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M. J. *et al.* Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, 2015.
- AGAMAH, F. E. *et al.* Computational/in silico methods in drug target and lead prediction. **Briefings in Bioinformatics**, v. 21, n. 5, p. 1663–1675, 2020.
- AGARWAL, S.; MEHROTRA, R. An Overview of Molecular Docking. **JSM Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 1024, 2016.
- AGHAJANI, J. *et al.* Molecular Dynamic Simulations and Molecular Docking as a Potential Way for Designed New Inhibitor Drug without Resistance. **Tanaffos**, v. 21, n. 1, p. 1–14, 2022.
- AHMED, M. O.; BAPTISTE, K. E. Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 5, p. 590–606, 2018.
- AKDEMIR, F. N. E. *et al.* The protective effects of *p*-coumaric acid on acute liver and kidney damages induced by cisplatin. **Biomedicines**, v. 5, n. 2, p. 1–11, 2017.
- ALMEIDA, R. S. DE *et al.* Liposomal formulation with thiazolic compounds against bacterial efflux pumps. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 180, 2024.
- ALOMARI, A. *et al.* Identification of novel inhibitors of *Escherichia coli* DNA ligase (Liga). **Molecules**, v. 26, n. 9, 2021.
- ALVAREZ-ARANGO, S. *et al.* Vancomycin immediate skin responses in vancomycin-naïve subjects. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 51, n. 7, p. 932–935, 2021.
- ALVES, M. J. *et al.* Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 346–357, 2013.
- ANDREI, S.; DROC, G.; STEFAN, G. FDA approved antibacterial drugs: 2018-2019. **Discoveries**, v. 7, n. 4, p. e102, 2019.
- ARCHAMBAUD, C. *et al.* *Enterococcus faecalis*: an overlooked cell invader. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2024.
- BAG, A.; CHATTOPADHYAY, R. R. Synergistic antibacterial and antibiofilm efficacy of nisin in combination with *p*-coumaric acid against food-borne bacteria

Bacillus cereus and *Salmonella typhimurium*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 366–372, 2017.

BARAN, A.; KWIATKOWSKA, A.; POTOCKI, L. Antibiotics and Bacterial Resistance-A Short Story of an Endless Arms Race. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 6, 2023.

BARNA, J. C. J.; WILLIAMS, D. H. The Structure and Mode of Action of Glicopeptide Antibiotics of the Vancomycin Group. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 38, n. 28, p. 339–357, 1984.

BERENDSEN, H. J. C.; SPOEL, D. VAN DER; DRUNEN, R. VAN. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, v. 91, n. 1–3, p. 43–56, 1995.

BEUTLER, J. A. Natural Products as a Foundation for Drug Discovery. **Current protocols in pharmacology**, v. 86, n. 1, p. e67, 2019.

BIKIEL, D. E. *et al.* Modeling heme proteins using atomistic simulations. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 8, n. 48, p. 5611–5628, 2006.

BOECK, P. *et al.* A simple synthesis of kaurenoic esters and other derivatives and evaluation of their antifungal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6 B, p. 1360–1366, 2005.

BOGNÁR, B.; SPOHN, R.; LÁZÁR, V. Drug combinations targeting antibiotic resistance. **antimicrobials & resistance**, v. 2:29, p. 1–8, 2024.

BONDI, A. van der Waals Volumes and Radii. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 441–451, 1964.

BOOS, J. A. *et al.* Microfluidic Multitissue Platform for Advanced Embryotoxicity Testing In Vitro. **Advanced Science**, v. 6, n. 13, p. 1900294, 2019.

BRASIL. **Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2017.

_____. **Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (PNPCIRAS) 2021 a 2025**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2021.

BRAWLEY, D. N. *et al.* Structural basis for inhibition of the drug efflux pump NorA from *Staphylococcus aureus*. **Nature Chemical Biology**, v. 18, n. 7, p. 706–712, 2022.

BRDOVÁ, D.; RUML, T.; VIKTOROVÁ, J. Mechanism of staphylococcal resistance to clinically relevant antibiotics. **Drug Resistance Updates**, v. 77, n. August, 2024.

BUSH, N. G. *et al.* Contributions to Antibiotic Resistance. **Molecules**, v. 25, n. 23, p. 5662, 2020.

CANIÇA, M. *et al.* Antibiotic resistance in foodborne bacteria. **Trends in Food Science and Technology**, v. 84, n. May 2018, p. 41–44, 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Antibiotic Resistance Threats in The United States 2019. **CDC. US Department of Health and Human Services**, v. 10, n. 1, 2019.

CHACKO, S. M. *et al.* Protective effect of *p*-coumaric acid against doxorubicin induced toxicity in H9c2 cardiomyoblast cell lines. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 1213–1221, 2015.

CHAMPION, O. L.; WAGLEY, S.; TITBALL, R. W. *Galleria mellonella* as a model host for microbiological and toxin research. **Virulence**, v. 7, n. 7, p. 840–845, 2016.

CHAPMAN, K. *et al.* The value of acute toxicity studies to support the clinical management of overdose and poisoning: A cross-discipline consensus. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 58, n. 3, p. 354–359, 2010.

CHENG, G. *et al.* Antimicrobial drugs in fighting against antimicrobial resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. APR, p. 1–11, 8 abr. 2016.

CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547–569, 2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition. **CLSI**, v. 32, n. 2, 2012.

_____. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing - 31st Edition. **CLSI**, 2021.

COATES, C. J. *et al.* The insect, *Galleria mellonella*, is a compatible model for evaluating the toxicology of okadaic acid. **Cell Biology and Toxicology**, v. 35, n. 3, p. 219–232, 2019.

COLLINS, J. A.; OSHEROFF, N. Gyrase and Topoisomerase IV: Recycling Old Targets for New Antibacterials to Combat Fluoroquinolone Resistance. **ACS Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1097–1115, 2024.

CONTARDI, M. *et al.* Combining dietary phenolic antioxidants with polyvinylpyrrolidone: Transparent biopolymer films based on p-coumaric acid for controlled release. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 9, p. 1384–1396, 2019.

CORRÊA, J. S. *et al.* Antimicrobial resistance in Brazil: an integrated research agenda. **Revista da Escola de Enfermagem**, v. 56, p. 2021–2023, 2022.

CRAFT, K. M. *et al.* Methicillin-resistant: *Staphylococcus aureus* (MRSA): Antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. **MedChemComm**, v. 10, n. 8, p. 1231–1241, 2019.

CROWLEY, L. C.; SCOTT, A. P.; *et al.* Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 7, p. 647–651, 2016.

CROWLEY, L. C.; MARFELL, B. J.; *et al.* Dead cert: Measuring cell death. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 12, p. 1064–1072, 2016.

CUI, P. *et al.* Characterization of two new aromatic amino acid lyases from actinomycetes for highly efficient production of *p*-coumaric acid. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 7, p. 1287–1298, 2020.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. October 2016, p. 1–13, 2017.

DALLAKYAN, S.; OLSON, A. J. Small-molecule library screening by docking with PyRx. **Methods in Molecular Biology**, v. 1263, p. 243–250, 2015.

DEMIR, E. *et al.* *p*-Coumaric acid alleviates cisplatin-induced ovarian toxicity in rats. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 48, n. 2, p. 411–419, 2022.

DURÁN-ITURBIDE, N. A.; DÍAZ-EUFRACIO, B. I.; MEDINA-FRANCO, J. L. In Silico ADME/Tox Profiling of Natural Products: A Focus on BIOFACQUIM. **ACS Omega**, v. 5, n. 26, p. 16076–16084, 2020.

EIJK, E. VAN *et al.* DNA replication proteins as potential targets for antimicrobials in drug-resistant bacterial pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 5, p. 1275–1284, 2017.

EPAND, R. M. *et al.* Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 5, p. 980–987, 2016.

EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. **EUCAST. Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, n. 9, p. 503–508, 2000.

FERREIRA, P. S. *et al.* A Review of Analytical Methods for p-Coumaric Acid in Plant-Based Products, Beverages, and Biological Matrices. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 21–31, 2 jan. 2019.

FOIRE, E.; TYNE, D. VAN; GILMORE, M. S. Pathogenicity of enterococci. **Gram-Positive Pathogens**, v. 7, n. 4, p. 378–397, 2019.

FORERO-DORIA, O. *et al.* N-alkylimidazolium Salts Functionalized with *p*-Coumaric and Cinnamic Acid: A Study of Their Antimicrobial and Antibiofilm Effects. **molecules**, v. 24, p. 3484, 2019.

FREIRES, I. A. *et al.* Progress and promise of alternative animal and non-animal methods in biomedical research. **Archives of Toxicology**, v. 97, n. 9, p. 2329–2342, 2023.

FREITAS, P. R. *et al.* Thiazine-derived compounds in inhibiting efflux pump in *Staphylococcus aureus* K2068, mepA gene expression, and membrane permeability alteration. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 179, n. August, 2024.

FUKUTANI, T. *et al.* G-RMSD: Root mean square deviation based method for three-dimensional molecular similarity determination. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 94, n. 2, p. 655–665, 2021.

GANDHI, R. G. *et al.* Multitargeted molecular docking and dynamics simulation studies of flavonoids and volatile components from the peel of *Citrus sinensis* L. (Osbeck) against specific tumor protein markers. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 42, n. 6, p. 3051–3080, 2024.

GAROY, E. Y. *et al.* Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Prevalence and Antimicrobial Sensitivity Pattern among Patients - A Multicenter Study in Asmara, Eritrea. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2019, 2019.

GARRAIT, G. *et al.* Gastrointestinal absorption and urinary excretion of trans-cinnamic and *p*-coumaric acids in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2944–2950, 2006.

GERGOVA, R.; BOYANOV, V.; MUHTAROVA, A. A Review of the Impact of Streptococcal Infections and Antimicrobial Resistance on Human Health. 2024.

GOH, H. M. S. *et al.* Model systems for the study of Enterococcal colonization and infection. **Virulence**, v. 8, n. 8, p. 1525–1562, 2017.

GRAY, D. A.; WENZEL, M. More than a pore: A current perspective on the *in vivo* mode of action of the lipopeptide antibiotic daptomycin. **Antibiotics**, v. 9, n. 1, 2020.

GREIN, F. *et al.* Ca²⁺-Daptomycin targets cell wall biosynthesis by forming a tripartite complex with undecaprenyl-coupled intermediates and membrane lipids. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2020.

GRIME, K. H.; BARTON, P.; MCGINNITY, D. F. Application of *in silico*, *in vitro* and preclinical pharmacokinetic data for the effective and efficient prediction of human pharmacokinetics. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, p. 1191–1206, 2013.

GROMACS DEVELOPMENT TEAM. **GROMACS 2023.1 Manual - release notes**. GROMACS Development Team, 2023. Disponível em: <<https://manual.gromacs.org/2023.1/release-notes/2023/2023.1.html>>. Acesso em: 18 abr. 2025

HAN, S.; CHANG, J. S.; GRIFFOR, M. Structure of the adenylation domain of NAD⁺-dependent DNA ligase from *Staphylococcus aureus*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 65, n. 11, p. 1078–1082, 2009.

HEIDARY, M. *et al.* Daptomycin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 1, p. 1–11, 2018.

HERRERA, K. M. S. *et al.* A 3-alkylpyridine-bearing alkaloid exhibits potent antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with no detectable resistance. **Microbiological Research**, v. 261, n. February, p. 127073, 2022.

HU, W. *et al.* Antibacterial activity and mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Industrial Crops and Products**, v. 130, n. November 2018, p. 34–41, 2019.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. **International Standard**, v. 3, 2009.

ISYAKU, Y.; UZAIRU, A.; UBA, S. Computational studies of a series of 2-substituted phenyl-2-oxo-, 2-hydroxyl- and 2-acylloxyethylsulfonamides as potent anti-fungal agents. **Heliyon**, v. 6, n. 4, p. e03724, 2020.

JACKSON, N.; CZAPLEWSKI, L.; PIDDOCK, L. J. V. Discovery and development of new antibacterial drugs: Learning from experience? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 6, p. 1452–1459, 2018.

JONKMAN, J. *et al.* Tutorial: guidance for quantitative confocal microscopy. **Nature Protocols**, v. 15, n. 5, p. 1585–1611, 2020.

JOSSE, J.; LAURENT, F.; DIOT, A. Staphylococcal adhesion and host cell invasion: Fibronectin-binding and other mechanisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. DEC, p. 1–8, 2017.

KARAGEORGIS, G. *et al.* Pseudo Natural Products—Chemical Evolution of Natural Product Structure. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 60, n. 29, p. 15705–15723, 2021.

KATHIRAVAN, M. K. *et al.* Topoisomerase as target for antibacterial and anticancer drug discovery. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 419–435, 2013.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 2–3, p. 155–176, 2016.

KHATKAR, A. *et al.* Synthesis, antimicrobial evaluation and QSAR studies of *p*-coumaric acid derivatives. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S3804–S3815, 2017.

KIM, K. D. *et al.* Melanogenesis inhibition by mono-hydroxycinnamic ester derivatives in B16 melanoma cells. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 31, n. 1, p. 181–184, 2010.

KINOSHITA, T. *et al.* Electrochemical response of acridine orange in bacterial cell. **Electrochemistry**, v. 84, n. 5, p. 334–337, 2016.

KOLÁŘ, M. Bacterial Infections, Antimicrobial Resistance and Antibiotic Therapy. **Life**, v. 12, n. 4, p. 10–13, 2022.

KONAKLIEVA, M. I. Molecular targets of β -lactam-based antimicrobials: Beyond the usual suspects. **Antibiotics**, v. 3, n. 2, p. 128–142, 2014.

KONISHI, Y.; HITOMI, Y.; YOSHIOKA, E. Intestinal Absorption of *p*-Coumaric and Gallic Acids in Rats after Oral Administration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 2527–2532, 2004.

LANCET. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 400, p. 2221–2248, 2022.

_____. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. **The Lancet**, v. 404, p. 1199–226, 2024.

LAU, Q. Y. *et al.* Elucidating the bactericidal mechanism of action of the linear antimicrobial tetrapeptide BRBR-NH₂. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1860, n. 8, p. 1517–1527, 1 ago. 2018.

LEITÃO, J. H. Microbial virulence factors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 1–6, 2020.

LEME, R. C. P.; BISPO, P. J. M.; SALLES, M. J. Community-genotype methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections in Latin America: a systematic review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, n. 1, p. 1–9, 2021.

LEMKUL, J. From Proteins to Perturbed Hamiltonians: A Suite of Tutorials for the GROMACS-2018 Molecular Simulation Package [Article v1.0]. **Living Journal of Computational Molecular Science**, v. 1, n. 1, p. 1–53, 2019.

LI, J. *et al.* Deciphering the antibacterial activity and mechanism of *p*-coumaric acid against *Alicyclobacillus acidoterrestris* and its application in apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 378, n. June, p. 109822, 2022.

LI, W. *et al.* Biological activity evaluation and structure-activity relationships analysis of ferulic acid and caffeic acid derivatives for anticancer. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 19, p. 6085–6088, 2012.

LI, Y. *et al.* De novo biosynthesis of *p*-coumaric acid in *E. coli* with a trans-Cinnamic Acid 4-Hydroxylase from the Amaryllidaceae Plant *Lycoris aurea*. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 3185, 3 dez. 2018.

LIMA, W. G. *et al.* In-depth characterization of antibacterial activity of melittin against *Staphylococcus aureus* and use in a model of non-surgical MRSA-infected skin wounds. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 156, p. 105592, 2021.

LINDORFF-LARSEN, K. *et al.* Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. **Proteins**, n. 78, p. 1950–1958, 2010.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 4–17, 2012.

LOPES, S. P. **Derivados p-Cumaratos Sintéticos: Estudo Antiparasitário, Antimicrobiano, Antienzimático e in silico**. João Pessoa, Brasil: 2022. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) - Universidade Federal da Paraíba, 2022.

LOU, Z. *et al.* *p*-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 550–554, jun. 2012.

LOURENÇO, F. R.; PINTO, T. DE J. A. Antibiotic microbial assay using kinetic-reading microplate system. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 573–584, 2011.

MALDE, A. K. *et al.* An Automated force field Topology Builder (ATB) and repository: Version 1.0. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 12, p. 4026–4037, 2011.

MARTIN-LOECHES, I.; BRUNO, C. J.; DERYKE, C. A. Perspectives on the use of ceftolozane/tazobactam: a review of clinical trial data and real-world evidence. **Future Microbiology**, v. 19, n. 6, p. 465–480, 2024.

MARTÍNEZ, L. Automatic identification of mobile and rigid substructures in molecular dynamics simulations and fractional structural fluctuation analysis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–10, 2015.

MASTERS, E. A. *et al.* Skeletal infections: microbial pathogenesis, immunity and clinical management. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 7, p. 385–400, 2022.

MCNUTT, A. T. *et al.* GNINA 1.0: molecular docking with deep learning. **Journal of Cheminformatics**, v. 13, n. 1, p. 1–20, 2021.

MEHTA, N. A.; LEVIN, D. A. Electrospray molecular dynamics simulations using an octree-based Coulomb interaction method. **Physical Review E**, v. 99, n. 3, p. 1–19, 2019.

MELO, A. K. V. *et al.* Antifungal Activity, Mode of Action, and Cytotoxicity of 4-Chlorobenzyl p-Coumarate: A Promising New Molecule. **Chemistry and Biodiversity**, v. 21, n. 7, p. e202400330, 2024.

MICHALIK, M.; PODBIELSKA-KUBERA, A.; DMOWSKA-KOROBLEWSKA, A. Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* Strains—Searching for New Antimicrobial Agents—Review. **Pharmaceuticals**, v. 18, n. 1, 2025.

MILLER, W. R.; ARIAS, C. A. ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 22, n. 10, p. 598–616, 2024.

MILLER, W. R.; MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 12, n. 10, p. 1221–1236, 2014.

MISBA, L.; ZAIDI, S.; KHAN, A. U. A comparison of antibacterial and antibiofilm efficacy of phenothiazinium dyes between Gram positive and Gram negative bacterial biofilm. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 24–33, 2017.

MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, B. *et al.* Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, 2022.

MOHAMED, A. A.; EL-KADI, A. P-Glycoprotein Effects on Drugs Pharmacokinetics and Drug-Drug- Interactions and Their Clinical Implications. **The Libyan Journal of Pharmacy and Clinical Pharmacology**, v. 1, p. 1–13, 2012.

MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1581–1588, 2007.

MOON, T. M. *et al.* The structures of penicillin-binding protein 4 (PBP4) and PBP5 from Enterococci provide structural insights into -lactam resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 48, p. 18574–18585, 2018.

MORA-OCHOMOGO, M.; LOHANS, C. T. β -Lactam antibiotic targets and resistance mechanisms: From covalent inhibitors to substrates. **RSC Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1623–1639, 2021.

MORENO-GÁMEZ, S.; HOCHBERG, M. E.; DOORN, G. S. VAN. Quorum sensing as a mechanism to harness the wisdom of the crowds. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 2023.

MULLER, A. E.; THEURETZBACHER, U.; MOUTON, J. W. Use of old antibiotics now and in the future from a pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 10, p. 881–885, 2015.

MURTHANNAGARI, V. R.; THUMPATI, V. P.; GNK, G. Combatting Antibiotic Resistance: Regulatory Exclusivities for New Antibiotic Development in the United States and Europe. **Infectious Diseases and Immunity**, v. 4, n. 2, p. 79–85, 2024.

MYUNG, Y.; SÁ, A. G. C. DE; ASCHER, D. B. Deep-PK: deep learning for small molecule pharmacokinetic and toxicity prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. W1, p. W469–W475, 2024.

NASR, G. *et al.* *p*-Coumaric acid in poly(amidoamine) G4 dendrimer: Characterization and toxicity evaluation on zebrafish model. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 79, n. November 2022, p. 104039, 2023.

NISHI, K. *et al.* Protective effects of *p*-coumaric acid on ethanol induced male reproductive toxicity. **Life Sciences**, v. 209, p. 1–8, 2018.

O'NEILL, J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. The Review on Antimicrobial Resistance. n. December, p. 1–16, 2014.

_____. Tackling Drug-Resistance Infections Globally: Final Report and Recommendations. The review on Antimicrobial Resistance. n. May, p. 1–84, 2016.

OLIVEIRA, D.; BORGES, A.; SIMÕES, M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. **Toxins**, v. 10, n. 6, 2018.

OLIVEIRA, V. M. L. DE *et al.* Application of the checkerboard method to evaluate antibacterial synergism in essential oils: a review. **Journal of Biology & Pharmacy**, v. 17, n. 4, p. 881–907, 2022.

ONG, T. H. *et al.* Cationic chitosan-propolis nanoparticles alter the zeta potential of *S. epidermidis*, inhibit biofilm formation by modulating gene expression and exhibit synergism with antibiotics. **PLoS ONE**, v. 14, n. 2, p. 1–13, 2019.

ORHAN, G. *et al.* Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 140–143, 2005.

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

PARVEKAR, P. *et al.* The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. **Biomaterial Investigations in Dentistry**, v. 7, n. 1, p. 105–109, 2020.

PENG, Y. *et al.* Adverse reactions of vancomycin in humans: A protocol for meta-analysis. **Medicine**, v. 99, n. 38, p. e22376, 2020.

PETERSON, E.; KAUR, P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. NOV, p. 1–21, 2018.

PFEIFFER, R. R. Structural features of vancomycin. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 3, n. December, p. S205–S209, 1981.

PIRES, D. E.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 2015a.

_____. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic properties using graph-based signatures (Theory- How to Interpret pkCSM Result). **pKCSM**, p. 4, 2015b.

POPOFF, M. R. Bacterial toxins, current perspectives. **Toxins**, v. 12, n. 9, p. 10–13, 2020.

QADRI, H. *et al.* Immunotherapies against human bacterial and fungal infectious diseases: A review. **Frontiers in Medicine**, v. 10, n. April, p. 1135541, 2023.

RAFIEE, Z. *et al.* *p*-Coumaric acid alleviates adriamycin-induced hepatotoxicity in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 11, n. 3, p. 115–121, 2021.

RAJASEKHARAN, S. K. *et al.* Antibiofilm and anti- β -lactamase activities of burdock root extract and chlorogenic acid against *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 542–551, 2017.

RIBAUDO, G. Natural Products Chemistry: Advances in Synthetic, Analytical and Bioactivity Studies. **Molecules**, v. 28, n. 14, p. 10–11, 2023.

RUHAL, R.; KATARIA, R. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. **Microbiological Research**, v. 251, n. July, p. 126829, 2021.

RYDE, U.; SÖDERHJELM, P. Ligand-Binding Affinity Estimates Supported by Quantum-Mechanical Methods. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 9, p. 5520–5566, 2016.

SALMASO, V.; MORO, S. Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. AUG, p. 1–16, 2018.

SANCHES, C. V. G. *et al.* Diacetylcurcumin: a new photosensitizer for antimicrobial photodynamic therapy in *Streptococcus mutans* biofilms. **Biofouling**, v. 35, n. 3, p. 340–349, 2019.

SAZONOVA, E. V. *et al.* Drug toxicity assessment: cell proliferation versus cell death. **Cell Death Discovery**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2022.

SCHAENZER, A. J.; WRIGHT, G. D. Antibiotic Resistance by Enzymatic Modification of Antibiotic Targets. **Trends in Molecular Medicine**, v. 26, n. 8, p. 768–782, 2020.

SCHINDLER, B. D. *et al.* Mutagenesis and modeling to predict structural and functional characteristics of the *Staphylococcus aureus* MepA multidrug efflux pump. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 3, p. 523–533, 2013.

SHAH, D.; VARAHAN, S. *Enterococcus faecalis*. **Trends in Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 925–926, 2024.

SHARMA, A. K. *et al.* Bacterial Virulence Factors: Secreted for Survival. **Indian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 1–10, 2017.

SHARMA, S. *et al.* Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1614, 2023.

SHIVANIKA, C. *et al.* Molecular docking, validation, dynamics simulations, and pharmacokinetic prediction of natural compounds against the SARS-CoV-2 main-protease. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 40, n. 2, p. 585–611, 2022.

SHUKLA, R.; TRIPATHI, T. Molecular Dynamics Simulation of Protein and Protein–Ligand Complexes. In: Singh, D.B. (eds). *In: Computer-Aided Drug Design*. Singapore: Springer, 2020. .

SILVA, M. G. DA *et al.* The importance of toxicity tests for development and phytotherapy registration. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e538101220137, 2021.

SILVA, P. *et al.* (E)-2-Cyano-3-(1H-Indol-3-yl)-N-phenylacrylamide, a hybrid compound derived from indomethacin and paracetamol: Design, synthesis and evaluation of the anti-inflammatory potential. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 1–17, 2020.

SILVEIRA, Z. DE S. *et al.* Evaluation of the antibacterial and inhibitory activity of the NorA and TetK efflux pumps of *Staphylococcus aureus* by *p*-coumaric acid. **Microbial Pathogenesis**, v. 200, n. 107318, 2025.

SINGH, K. *et al.* Computational Insights and In Vitro Validation of Antibacterial Potential of Shikimate Pathway-Derived Phenolic Acids as NorA Efflux Pump Inhibitors. **Molecules**, v. 27, n. 8, 2022.

SINGHA, K. *et al.* Molecular exposition of broad-spectrum antibacterial efficacy by *p*-coumaric acid from an edible mushroom *Termitomyces heimii*: in vitro and in silico approach. **Systems Microbiology and Biomanufacturing**, v. 3, n. 4, p. 750–764, 2023.

SINHA, S.; AGGARWAL, S.; SINGH, D. V. Efflux pumps: gatekeepers of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* biofilms. **Microbial Cell**, v. 11, n. 1, p. 368–377, 2024.

SONI, J.; SINHA, S.; PANDEY, R. Understanding bacterial pathogenicity: a closer look at the journey of harmful microbes. **Frontiers in Microbiology**, 2024.

SOUSA, J. N. DE *et al.* ADMET study and inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by a synthetic p-aminochalcone. **Results in Chemistry**, v. 7, n. March,

2024.

SPENCER, A. C.; PANDA, S. S. DNA Gyrase as a Target for Quinolones. **Biomedicines**, v. 11, n. 2, 2023.

SPOEL, VAN DER D. *et al.* GROMACS Documentation. **GROMACS 2024.1 Manual**, p. 1–877, 2024.

STOGIOS, P. J.; SAVCHENKO, A. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. **Protein Science**, v. 29, n. 3, p. 654–669, 2020.

STROET, M. *et al.* Automated Topology Builder Version 3.0: Prediction of Solvation Free Enthalpies in Water and Hexane. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 14, n. 11, p. 5834–5845, 2018.

TACCONELLI, E. *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318–327, 2018.

TAYLOR, S. D.; PALMER, M. The action mechanism of daptomycin. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 24, p. 6253–6268, 2016.

TERRENI, M.; TACCANI, M.; PREGNOLATO, M. New antibiotics for multidrug-resistant bacterial strains: Latest research developments and future perspectives. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2671, 2021.

THEOPHEL, K. *et al.* The importance of growth kinetic analysis in determining bacterial susceptibility against antibiotics and silver nanoparticles. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. NOV, p. 1–10, 2014.

THOMFORD, N. E. *et al.* Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, 2018.

TIAN, C. *et al.* The antibacterial activity and mechanism of a novel peptide MR-22 against multidrug-resistant *Escherichia coli*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 14, n. January, p. 1–13, 2024.

TINTINO, S. R. *et al.* Cholesterol and ergosterol affect the activity of *Staphylococcus aureus* antibiotic efflux pumps. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 133–136, 2017.

TORRES, P. H. M. *et al.* Key topics in molecular docking for drug design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 1–29, 2019.

URUÉN, C. *et al.* Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. **Antibiotics**, v. 10, n. 1, p. 1–36, 2021.

WANG, S. *et al.* Antibacterial activity and synergy of antibiotics with sanguisorbigenin isolated from *Sanguisorba officinalis* L. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 238–244, 2020.

WANG, Y. *et al.* In Silico Prediction of Human Intravenous Pharmacokinetic Parameters with Improved Accuracy. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 59, n. 9, p. 3968–3980, 2019.

WIJESINGHE, G. K. *et al.* Effect of *Cinnamomum verum* leaf essential oil on virulence factors of *Candida* species and determination of the in-vivo toxicity with *Galleria mellonella* model. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, n. 8, p. 1–13, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antibiotic resistance**, 2020a. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>>. Acesso em: 21 abr. 2023

_____. **The top 10 causes of death**, 2020b. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Acesso em: 21 abr. 2023

_____. **Lack of new antibiotics threatens global efforts to contain drug-resistant infections**, 2020c. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections>>. Acesso em: 15 maio. 2023

_____. **Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022**. Geneva, 2022.

_____. **WHO bacterial priority pathogens list, 2024. Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance**, 2024. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/item/9789240093461>>

WRIGHT, G. D. Opportunities for natural products in 21st century antibiotic discovery. **Natural Product Reports**, v. 34, n. 7, p. 694–701, 2017.

WU, L.; LUO, Y. Bacterial Quorum-Sensing Systems and Their Role in Intestinal Bacteria-Host Crosstalk. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. January, p. 1–11, 2021.

YAMBA, K. *et al.* The Burden of Invasive Bacterial Disease and the Impact of 10-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in Children <5 years hospitalized for Meningitis in Lusaka, Zambia, 2010-2019. **Journal of Infectious Diseases**, v. 224, p. S275–S284, 2021.

YANG, B. *et al.* The phosphatidylglycerol phosphate synthase PgsA utilizes a trifurcated amphipathic cavity for catalysis at the membrane-cytosol interface. **Current Research in Structural Biology**, v. 3, n. July, p. 312–323, 2021.

ZARETZKI, J.; MATLOCK, M.; SWAMIDASS, S. J. XenoSite: Accurately predicting cyp-mediated sites of metabolism with neural networks. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 12, p. 3373–3383, 2013.

ZENG, D. *et al.* Approved glycopeptide antibacterial drugs: Mechanism of action and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 12, p. 1–16, 2016.

ZHAO, A.; SUN, J.; LIU, Y. Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, n. April, p. 1–23, 2023.

ZHOU, J. *et al.* Breaking down the cell wall: Still an attractive antibacterial strategy. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. September, p. 1–21, 2022.

ZHU, Y. *et al.* Incidence and trends of 17 notifiable bacterial infectious diseases in China, 2004-2019. **BMC infectious diseases**, v. 23, n. 1, p. 273, 2023.

ZHYDZETSKI, A. *et al.* Agents Targeting the Bacterial Cell Wall as Tools to Combat Gram-Positive Pathogens. **Molecules**, v. 29, n. 17, p. 4065, 2024.

ZULKARNAIN, M. Z. *et al.* *p*-coumaric acid quantum dots inhibit beta lactam resistant foodborne microorganisms. **Materials Today: Proceedings**, v. 31, p. 48–53, 2020.

APÊNDICE A – Perfil de resistência a fármacos apresentado pelo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) NCTC 13373. Leitura realizada no sistema Siemens® MicroScan® WalkAway®96 Plus

Fármaco	CIM (μ g/mL)	Interpretação
Amoxicilina + Clavulanato Potássico	> 412	R
Ampicilina	> 8	R
Ceftriaxona	> 32	R
Ciprofloxacino	<= 1	I
Clindamicina	> 4	R
Daptomicina	<= 0.5	S
Eritromicina	> 4	R
Gentamicina	> 8	R
Levofloxacino	<= 1	I
Linezolida	<= 2	S
Oxacilina	> 2	R
Penicilina	> 8	R
Cefoxitina (Triagem)	> 4	POS
Teicoplanina	<= 2	S
Vancomicina	1	S

CIM: Concentração Inibitória Mínima; **S:** Sensível; **I:** Intermediário; **R:** Resistente; **POS:** Positivo.

APÊNDICE B – Perfil de resistência a fármacos apresentado pela *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) NCTC 13809. Leitura realizada no sistema Siemens® MicroScan® WalkAway®96 Plus

Fármaco	CIM (μ g/mL)	Interpretação
Amicacina	> 16	R
Aztreonan	> 4	R
Cefepima	> 8	R
Cefotaxima	> 16	R
Cefotaxima + Clavulanato Potássico	> 4	
Cefoxitina	> 8	
Ceftazidima	> 8	R
Ceftazidima + Clavulanato Potássico	> 2	
Cefuroxima	> 8	R
Ciprofloxacino	> 1	R
Cloranfenicol	> 8	R
Colistina	<= 2	S
Ertapenem	> 1	R
Gentamicina	4	R
Imipenem	8	R
Levofloxacino	> 1	R
Meropenem	> 8	R
Piperacilina + Tazobactam	> 16	R
Tobramicina	> 4	R

CIM: Concentração Inibitória Mínima; **S:** Sensível; **I:** Intermediário; **R:** Resistente.

APÊNDICE C – Artigo publicado

The screenshot shows the homepage of the Journal of Applied Microbiology. At the top, there are navigation links for 'JOURNALS' and 'BOOKS'. On the right, there is a sign-in option for institutional users. A sidebar on the right side of the header is titled 'Applied Microbiology International'. The main content area features a research article with the title 'Synthesis, antimicrobial activity and toxicological evaluation of a p-coumaric acid derivative as a potential new antibacterial agent'. The article is marked as an 'ACCEPTED MANUSCRIPT'. Below the title, the authors listed are Éverton Paredes Falcão, Danielle da Nóbrega Alves, Susiany Pereira Lopes, Josy Goldoni Lazarini, Pedro Luiz Rosalen, Damião Pergentino de Sousa, and Ricardo Dias de Castro. The article was published on 18 April 2025. The journal's logo, 'LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY', is visible on the right. The bottom of the page shows a standard Windows taskbar with various application icons.

Journal of Applied Microbiology, 2025, 136(4), lxaf065
<https://doi.org/10.1093/jambo/lxaf065>
 Advance access publication date: 18 April 2025
 Research Article

JOURNAL OF
 APPLIED
 MICROBIOLOGY

OXFORD
 UNIVERSITY PRESS

Synthesis, antimicrobial activity, and toxicological evaluation of a *p*-coumaric acid derivative as a potential new antibacterial agent

Éverton Paredes Falcão^{1,2}, Danielle da Nóbrega Alves^{2,3}, Susiany Pereira Lopes^{2,4}, Josy Goldoni Lazarini⁵, Pedro Luiz Rosalen⁶, Damião Pergentino de Sousa^{1,2}, Ricardo Dias de Castro  ^{1,2,3,*}

¹Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Federal University of Paraíba, 58051-970 João Pessoa, Paraíba, Brazil

²Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, Campus I, 58051-970 João Pessoa, Paraíba, Brazil

³Department of Clinical and Social Dentistry, Federal University of Paraíba, 58051-970 João Pessoa, Paraíba, Brazil

⁴PostGraduation Program in Technological Development and Innovation in Medicines, Federal University of Paraíba, 58051-970 João Pessoa, Paraíba, Brazil

⁵Department of Agri-Food Industry, Food, and Nutrition, “Luiz de Queiroz” College of Agriculture, University of São Paulo, Pádua Dias Avenue, 13418-900 Piracicaba, SP, Brazil

⁶School of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas, 37130-000 Alfenas, Minas Gerais, Brazil

*Corresponding author. Department of Clinical and Social Dentistry, Federal University of Paraíba, Campus I, 58051-900 João Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail: rcastro@ccs.ufpb.br

Journal of Applied Microbiology, lxaf065, <https://doi.org/10.1093/jambo/lxaf065>

APÊNDICE D – Artigo submetido

The screenshot shows the ScienceDirect website. At the top, there is a banner for the 'EPIDEMICS 10' conference, which is the 10th International Conference on Infectious Disease Dynamics, taking place from 30 November to 3 December 2025 at Paradise Point, San Diego, USA. The banner includes a QR code, the conference logo, and a call to action: 'SUBMIT YOUR ABSTRACTS BY 11 JULY 2025'. Below the banner, the ScienceDirect logo is visible. The main navigation bar includes links for 'Journals & Books', 'Help', 'Search', 'My account', and 'Sign in'. The main content area features the 'Microbial Pathogenesis' journal, which is described as 'Supports open access'. It shows an impact factor of 6.7 (CiteScore) and 3.5 (Impact Factor). Below this, there are links for 'Articles & Issues', 'About', 'Publish', 'Order journal', 'Search in this journal', 'Submit your article', and 'Guide for authors'.

Microbial Pathogenesis

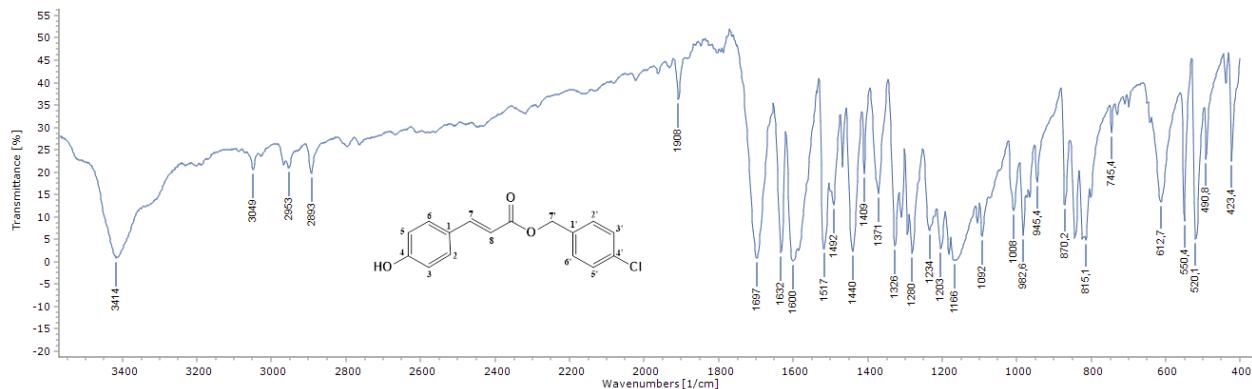
Mode of action and evaluation of MepA and NorA efflux pump inhibition by a p-coumaric acid derivative: in silico and in vitro studies

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	YMPAT-D-25-02362
Article Type:	Research Article
Keywords:	4-chlorobenzyl p-coumarate; targets; docking; dynamics; ADME; antimicrobial resistance; modulatory activity.
Corresponding Author:	Ricardo Castro Federal University of Paraíba Brazil
First Author:	Éverton Paredes Falcão
Order of Authors:	Éverton Paredes Falcão Jeremias Justo Emídio Natália Ferreira de Sousa Karinne Kelly Gadelha Marques Janaina Esmeraldo Rocha Wellington Lima da Silva Sobrinho João Felipe Bezerra Luciana Scotti Marcus Tullius Scotti Juan Carlos Ramos Gonçalves Henrique Douglas Melo Coutinho Damião Pergentino de Sousa Ricardo Dias de Castro

ANEXO A – Espectros do *pC4C*

Espectro infravermelho KBr cm^{-1}

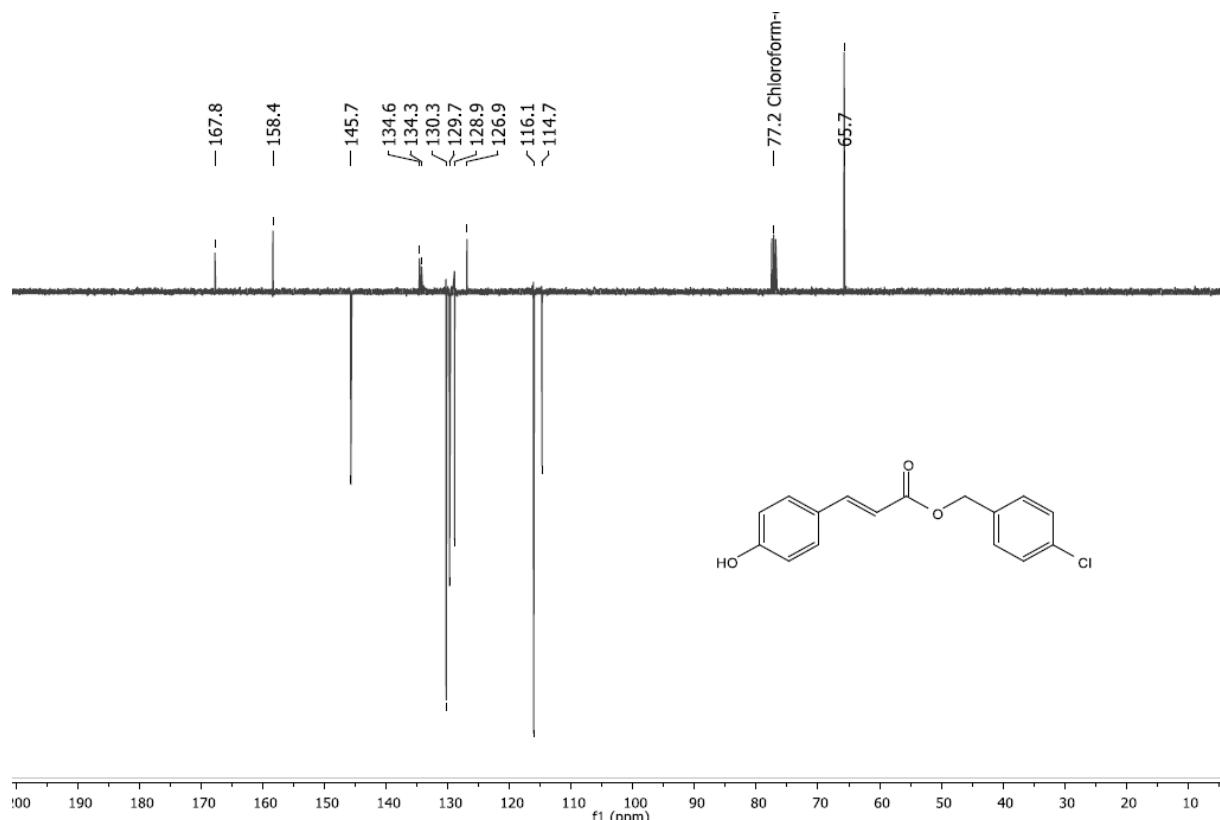


Fonte: Lopes (2022).

Espectro RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz)



Fonte: Lopes (2022).

Espectro RMN ^{13}C -APT (CDCl_3 , 100MHz)

Fonte: Lopes (2022).