



Universidade Federal do Piauí  
Rede Nordeste de Biotecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
-Ponto Focal-

**Potencialidades farmacológicas de riparinas sintéticas como agentes  
antimicrobianos**

Luciana Muratori Costa

Teresina, PI  
2018

LUCIANA MURATORI COSTA

**Potencialidades farmacológicas de riparinas sintéticas como agentes antimicrobianos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da RENORBIO como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Giovanny Rebouças Pinto.

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas (*in memoriam*).

Co-orientador: Prof. Dr. Humberto Medeiros Barreto.

Teresina, PI

2018

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco  
Serviço de Processamento Técnico

C837p Costa, Luciana Muratori.  
Potencialidades farmacológicas de riparinas sintéticas  
como agentes antimicrobianos. / Luciana Muratori Costa. --  
2018.  
110 f. il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí,  
RENOBIO – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia,  
Teresina, 2018.

“Orientação: Prof. Dr. Giovanny Rebouças Pinto”.  
“Coorientação: Humberto Medeiros Barreto”.

1. Farmacologia. 2. Resistência microbiana. 3. Aniba  
riparia (NESS) Mez. 4. Alcamidas. 5. Leishmania. I. Título.






CDD: 615.1

## FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

**ALUNA:** Luciana Muratori Costa

**TÍTULO DO PROJETO:** “Potencialidades farmacológicas de riparinas sintéticas como agentes antimicrobianos.”

**PROFESSOR ORIENTADOR:** Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto

<b>BANCA EXAMINADORA:</b>	<b>CONCEITO</b>	<b>ASSINATURA</b>
Prof. Dr. Humberto Medeiros Barreto - UFPI (Coorientador-Presidente)	<u>APROVADA</u>	<u></u>
Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo - UFPI (Examinador)	<u>APROVADA</u>	<u></u>
Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho - UFPI (Examinador)	<u>Aprovada</u>	<u></u>
Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz – UFPI (Examinadora)	<u>APROVADA</u>	<u></u>
Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho - URCA (Examinador)	<u>APROVADA</u>	<u></u>

**DATA DA AVALIAÇÃO:** 19 de dezembro de 2018.

**HORÁRIO:** 14h30

**LOCAL:** Auditório do Curso de Farmacia

## Agradecimentos

Sem dúvidas o doutorado foi um dos maiores desafios que enfrentei. Muitos foram os obstáculos, mas também graças a eles pude descobrir que sou capaz de conquistar muitas coisas. Entretanto, esta conquista eu devo a muitas pessoas e instituições.

Agradeço à Universidade Federal do Piauí por fornecer a infraestrutura e os recursos humanos para a minha formação desde a graduação. Entre esses recursos humanos estão os vários professores, secretários, técnicos, zeladores, entre outros servidores...obrigada a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para essa conquista.

Aos professores que me acompanharam nessa batalha, agradeço pela confiança e pelo aprendizado, especialmente aos meus três orientadores. Agradeço ao Professor Dr. Rivelilson Mendes de Freitas *in memoriam* por ter me incentivado a me inscrever no programa, pelas oportunidades, por acreditar e confiar no meu potencial e por sempre me estimular a ser melhor.

Ao Professor Dr. Humberto Medeiros Barreto, por ter me acolhido no seu laboratório, por assumir minha orientação no período da enfermidade do Professor Rivelilson e após seu falecimento. Obrigada pela confiança e pela paciência na hora de corrigir os trabalhos e repensar os experimentos e pela dedicação e zelo à profissão.

Ao Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto, que mesmo sem saber ao certo o que vinha por aí aceitou ser meu orientador após o falecimento do Prof Rivelilson.

À equipe do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia, pelas conversas e cooperação.

Agradeço ao Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho por ceder seu laboratório e material para que eu desenvolvesse alguns dos experimentos da minha tese, aprendi muito com sua equipe, da qual cito Lucas Brito e Michel Muálem que me acompanharam e ajudaram na execução dos testes.

Ao Prof Dr. Stanley Juan Chávez Gutierrez, agradeço pela parceria ao longo dos anos que trabalhamos juntos com as riparinas. Muito obrigada pelo apoio em momentos cruciais da graduação em Farmácia e no doutorado.

Agradeço às professoras Erika Abi-Chacra e Débora Braz por me introduzirem na técnica da citometria de fluxo e me ajudarem incansavelmente em todas as etapas da execução dos experimentos. Sou imensamente grata pelas palavras amigas, pelo apoio e motivação!

Aos meus colegas do LAPNEX, pelo tempo que passamos juntos no laboratório, chorando e rindo juntos. A presença de vocês com certeza aliviou bastante a tensão nos momentos de estresse com experimentos.

Aos meus colegas de turma do RENORBIO pelos momentos de descontração e também pelo apoio mútuo na hora de fazer os trabalhos nas disciplinas.

A todos os meus amigos, pelas risadas e momentos de descontração, que me ajudaram a manter o equilíbrio emocional durante essa fase.

Ao Thalison, pela cumplicidade, apoio e carinho durante toda essa jornada, por me incentivar sempre a crescer profissionalmente. Obrigada pela compreensão nos momentos de estresse. Agradeço também à sua família, por torcerem por mim, pelo carinho e acolhimento.

A todos os meus familiares que, mesmo de longe, torceram pelo meu sucesso.

À minha cunhada, Gerlane Costa, pela amizade e apoio nesse período, por compartilhar das angústias durante o processo de escrita da tese.

Todos contribuíram de alguma forma, mas o agradecimento mais especial é para a minha família! Agradeço aos meus pais, pelo amor e apoio incondicionais. Por terem sempre acreditado em mim e incentivado a confiar em mim mesma, por terem investido tempo, paciência e tudo o que podiam oferecer na minha educação e na minha formação como pessoa. Enfim, se eu for justa nos meus agradecimentos a eles teria que escrever outra tese! Agradeço ao meu irmão, Fernando Muratori, pelo amor e pelo companheirismo durante toda a vida, que me deram ânimo e adoçaram as amarguras do doutoramento.

COSTA, L. M. **Potencialidades farmacológicas de riparinas sintéticas como agentes antimicrobianos.** Orientador: Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto. 2018. 110p. Tese – Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí.

## RESUMO

A pesquisa de novos antimicrobianos faz-se necessária devido ao surgimento de cepas multirresistentes, incluindo micro-organismos que não possuem sensibilidade a nenhum dos fármacos disponíveis. Além disso, as leishmanioses possuem alta endemicidade no Brasil. Entretanto, os medicamentos disponíveis possuem graves limitações, por toxicidade e alto custo, além da via de administração ser parenteral. Outro aspecto relevante é a baixa taxa de lançamento de novos agentes, por esse motivo, é urgente que pesquisas sejam realizadas para desenvolvimento de novos antimicrobianos. Nesse contexto, as riparinas são moléculas promissoras, pois há relatos na literatura da atividade de alguns dos análogos sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Schistosoma mansoni*. Dessa forma, com este trabalho objetivou-se investigar o potencial das riparinas no combate a doenças infecciosas. Para isso, primeiramente foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) das riparinas A, B, C, D e E contra *S. aureus* e foi avaliado seu potencial modulador no co-tratamento com ciprofloxacino e norfloxacino. Rip-E foi a que apresentou maior atividade intrínseca (CIM = 32 µg/mL) e, Rip-B foi a com maior atividade moduladora. Rip-B teve seu mecanismo de modulação da resistência investigado por ensaios de efluxo com brometo de etídio, no qual reduziu o CIM do brometo de etídio no co-tratamento, sugerindo inibição do efluxo. Esse mecanismo confirmado por ancoragem, onde Rip-B foi a molécula com mais provável encaixe com a bomba NorA de *S. aureus*. A partir da determinação do CIM de *S. aureus*, a riparina com maior atividade antimicrobiana intrínseca teve seu CIM avaliado para outras cepas de bactérias Gram positivas (*S. aureus* and *S. epidermidis*) e Gram negativas (*E. coli*, *Salmonella Typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*), leveduras (*Candida albicans* e *C. tropicalis*). As cepas tratadas com Rip-E foram analisadas por citometria de fluxo com 7-AAD para determinar se a atividade antimicrobiana da Rip-E está relacionada com lesão à membrana celular. Os testes de microdiluição mostraram que a riparina A não apresentou atividade antibacteriana significativa contra todas as cepas testadas. Por outro lado, a riparina E foi ativa contra as espécies Gram-positivas e Gram-negativas (exceto *P. aeruginosa*), e também apresentou atividade contra as duas espécies de leveduras testadas. O efeito inibitório apresentado pela riparina E foi microbicida para todas as cepas testadas. Análises de citometria de fluxo com as cepas tratadas com riparina E na presença do corante 7-AAD indicaram que a atividade antibacteriana e antifúngica da riparina E são decorrentes da lesão à membrana citoplasmática. Os resultados obtidos neste estudo apontam para a possibilidade do uso da riparina E como agente microbicida na prevenção ou no tratamento de doenças infecciosas. Em relação à atividade antileishmania, a riparina E possui um bom potencial no combate a *L. amazonensis* e demonstrou redução na infecção em concentrações mais baixas, nas quais não apresentou toxicidade *in vitro* aos macrófagos. Além disso, promoveu a ativação dos macrófagos por aumento da fagocitose e aumento da atividade lisossomal, porém sem interferir na liberação de óxido nítrico. Diante desses resultados pode-se concluir que as riparinas possuem um grande potencial antimicrobiano para tratamento de doenças infecciosas ou em co-tratamento associadas à ciprofloxacino e norfloxacino, além de a riparina E apresentar bom potencial para tratamento da leishmaniose cutânea.

Palavras chave: Resistência microbiana. Doenças infecciosas. *Aniba riparia*. Alcamidas. *Leishmania*

Costa, L. M. **Pharmacological potentials of synthetic riparins as antimicrobial agents.** Advisor: Prof. PhD. Giovanni Rebouças Pinto. 2018. 110p. Thesis – Post-Graduate Studies in Biotechnology, Rede Nordeste (Northeast Network) of Biotechnology, Federal University of Piauí (UFPI), Teresina, Piauí.

### ABSTRACT

Research into new antimicrobials is necessary because of the emergence of multi-resistant antimicrobial strains, including microorganisms that have no sensitivity to any of the available drugs. In addition, diseases caused by *Leishmania* are highly endemic in Brazil. However, the antileishmanial drugs have serious limitations due to toxicity, high cost and the route of administration (parenteral). Another relevant aspect is the rate of release of new drugs, therefore, it is urgent for the development of new antimicrobials. In this context, riparins are promising molecules, there are some reports in the literature on the activity of some of its analogues on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Schistosoma mansoni*. Thus, this work aimed to investigate the potential of riparins of fighting infectious diseases. For this, the minimum inhibitory concentration (MIC) of riparins A, B, C, D and E against *S. aureus* was determined and their modulatory potential was evaluated in the co-treatment with ciprofloxacin and norfloxacin. Rip-E presented the best intrinsic activity (MIC = 32 µg / mL) and Rip-B presented the highest modulating activity. Rip-B had its mechanism of resistance modulation investigated by ethidium bromide efflux trials, in which it reduced the MIC of ethidium bromide at co-treatment, suggesting inhibition of efflux. This mechanism confirmed by molecular docking, in which Rip-B was the most likely molecule to fit with the NorA pump of *S. aureus*. From the determination of MIC for *S. aureus*, the riparin with the highest intrinsic antimicrobial activity had its MIC evaluated for other strains of Gram positive (*S. aureus* and *S. epidermidis*) and Gram negative bacteria (*E. coli*, *Salmonella* Typhimurium and *Pseudomonas aeruginosa*) and yeasts (*Candida albicans* and *C. tropicalis*). The Rip-E treated samples were then analyzed by flow cytometry with 7-AAD staining to determine whether Rip-E's antimicrobial activity is related to cell membrane damage. Microdilution tests showed that riparin A showed no significant antibacterial activity against all strains tested. On the other hand, riparin E was active against Gram-positive and Gram-negative species (except *P. aeruginosa*), and also presented activity against the two species of yeasts tested. Riparin E was microbicidal for all strains tested. Flow cytometric analysis with strains treated with riparin E in the presence of 7-AAD dye indicated that the antibacterial and antifungal activity of riparin E are due to cytoplasmic membrane injury. The results obtained in this study point to the possibility of using riparine E as a microbicidal agent in the prevention or treatment of infectious diseases. Regarding the antileishmania activity, the riparin E presented a good activity against the two evolutionary forms of *L. amazonensis* and demonstrated a reduction in the infection in lower concentrations, in which Rip-E did not present toxicity in vitro to the macrophages. In addition, Rip-E promoted the activation of macrophages by increased phagocytosis and increased lysosomal activity, but without interfering with the release of nitric oxide. Therefore, it can be concluded that riparins have a great antimicrobial potential for the treatment of infectious diseases, alone or in combination with ciprofloxacin and norfloxacin. Besides, riparine E also presents good potential for treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Microbial resistance. Infectious diseases. *Aniba riparia*. Alkamides. *Leishmania*



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Referencial teórico:</b>	<b>Página</b>
Figura 1: Ciclo biológico dos protozoários do gênero <i>Leishmania</i> .	20
Figura 2: Incidência da leishmaniose tegumentar no Brasil inserida no contexto das Américas e incidência da leishmaniose tegumentar nas Américas no contexto mundial em 2015	21
Quadro 1: Distribuição das espécies de <i>Leishmania</i> spp mais prevalentes no Novo Mundo e Velho Mundo e as formas clínicas de LT associadas a essas. As espécies em negrito são as de maior ocorrência no Brasil	22
Quadro 2: Principais medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose tegumentar	25
Figura 3: Estrutura molecular das riparinas	28
<b>Capítulo 1:</b>	
Figura 1: Diferenças estruturais e atividade antimicrobiana qualitativa das riparinas sintéticas contra <i>S. aureus</i> SA-1199B	45
Figura 2: Valores da Concentração Inibitória Mínima (médias geométricas de três experimentos simultâneos) de norfloxacina (A) e norfloxacina (B) na ausência e na presença dos análogos de riparinas para <i>Staphylococcus aureus</i> SA-1199B.	47
Figura 3: Valores da Concentração Inibitória Mínima (médias geométricas de três experimentos simultâneos) de brometo de etídio na ausência e na presença dos análogos de Riparinas para <i>Staphylococcus aureus</i> SA-1199B.	48
Figura 4. Efeito de Rip-B no acúmulo de EtBr para as cepas SA-1199 ou SA-1199B de <i>S. aureus</i> . As suspensões bacterianas foram incubadas com EtBr (8 µg/ml) na ausência e na presença de concentrações crescentes de Rip-B por 60 minutos a 37°C.	49
Figura 5. (a) Interação de Rip-B no sítio de ligação da NorA. A formação de ligações de hidrogênio entre Rip-B, GLN51 e ASN340 confere estabilidade ao complexo proteína/ligante. (b) Orientação relativa dos sítios de ligação em relação às hélices transmembrana da projeção tridimensional de NorA. (c) Orientação de Rip-B dentro do sítio de ligação (visão girada). Rip-B está ligada à cavidade central da proteína	51
<b>Capítulo 2:</b>	
Figura 1: Análise morfológica e efeito sobre a integridade da membrana plasmática de <i>S. aureus</i> . A, C, E e G: <i>plots</i> de FSC (tamanho relativo das células) e SSC (complexidade relativa das células); B, D, F e H: <i>plots</i> entre SSC e a intensidade de fluorescência de 7-AAD no canal do PerCP-Cy5. A e B: controle negativo; C e D: Tratamento com Rip-E no CIM por 1h; E e F: Tratamento com Rip-E a 2 CIM por 1h; G e H: controle positivo (amostras esterilizadas em autoclave)	66

Figura 2: Análise morfológica e efeito sobre a integridade da membrana plasmática de *E. coli*. A, C, E e G: *plots* de FSC (tamanho relativo das células) e SSC (complexidade relativa das células); B, D, F e H: *plots* entre SSC e a intensidade de fluorescência de 7-AAD no canal do PerCP-Cy5. A e B: controle negativo; C e D: Tratamento com Rip-E no CIM por 1h; E e F: Tratamento com Rip-E a 2 CIM por 1h; G e H: controle positivo (amostras esterilizadas em autoclave) 68

Figura 3: Análise morfológica e efeito sobre a integridade da membrana plasmática de *C. albicans*. A, C, E e G: *plots* de FSC (tamanho relativo das células) e SSC (complexidade relativa das células); B, D, F e H: *plots* entre SSC e a intensidade de fluorescência de 7-AAD no canal do PerCP-Cy5. A e B: controle negativo; C e D: Tratamento com Rip-E no CIM por 1h; E e F: Tratamento com Rip-E a 2 CIM por 1h; G e H: controle positivo (amostras esterilizadas em autoclave) 69

### Capítulo 3:

Figura 1: Efeitos da Rip-E na inibição do crescimento de promastigotas de *L. amazonensis*. (A): Efeito após incubação por 24, 48 e 72h, obtidos pelo método de contagem; (B): Efeito de Rip-E após incubação de 48h, obtidos pelo método colorimétrico: 84

Figura 2: Efeito da Rip-E sobre a infecção de macrófagos murinos por *L. amazonensis*. Os gráficos representam a proporção de células infectadas em relação ao todo (A) e o número médio de amastigotas por macrófago (B). O grupo controle foi composto por células não tratadas. 87

Figura 3: Viabilidade de macrófagos murinos após 48h de exposição a Rip-E. O grupo controle foi composto por células não tratadas. 88

Figura 4: Fotomicrografia de macrófagos com amastigotas internalizadas após exposição a Rip-E após 48h de incubação. 89

Figura 5: Efeito da Rip-E na capacidade fagocítica (A) e na atividade lisossomal (B) de macrófagos murinos após incubação de 48h. O grupo controle foi composto por células não tratadas. 90

Figura 6: Efeito da Rip-E na produção de óxido nítrico por macrófagos murinos após incubação por 48h na presença (+) ou na ausência (-) de infecção por *L. amazonensis*. O grupo controle foi composto por células não tratadas e o grupo LPS corresponde às células expostas a lipopolissacarídeo (LPS). 91

## LISTA DE TABELAS

<b>Capítulo 1:</b>	Página
Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM) das riparinas testadas contra cepas de <i>S. aureus</i> e seus respectivos valores teóricos de Log P	44
<b>Capítulo 2:</b>	
Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM) demonstrada pelas riparinas sintéticas contra os micro-organismos testados (médias geométricas de três testes simultâneos)	65
Tabela 2: Avaliação do efeito da Rip-E sobre a viabilidade de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i> após incubação por uma hora a 37 °C	64
Tabela 3: Estrutura química e Log P teórico estimado para os compostos testados	71
<b>Capítulo 3:</b>	
Tabela 1: Valores de CI <sub>50</sub> atividade contra promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> com seus respectivos limites de confiança 95% dos tratamentos com Rip-E a 24, 48 e 72h	85
Tabela 2: Efeito anti-leishmania e de Rip-E sobre <i>L. amazonensis</i> (promastigotas e amastigotas internalizadas) e sua citotoxicidade em macrófagos murinos após 48h de incubação	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>7-AAD</b>	7-amino actinomicina D
<b>ANVISA</b>	Agência de Vigilância Sanitária
<b>BDNF</b>	Fator neurotrófico derivado do cérebro
<b>BHI</b>	<i>Brain heart infusion</i> (Infusão de cérebro e coração)
<b>BOD</b>	Estufa de Demanda Biológica de Oxigênio
<b>CAPES</b>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<b>CBM</b>	Concentração Bactericida Mínima
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CC<sub>50</sub></b>	Concentração Citotóxica Média
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração Inibitória Média
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CMM</b>	Concentração Microbicida Mínima
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EC</b>	Era Comum
<b>ERN</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>EPI</b>	<i>Efflux pump inhibitor</i> (Inibidor de Bomba de Efluxo)
<b>ERO</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>EtBr</b>	Brometo de etídio
<b>FBS</b>	Soro Fetal Bovino
<b>FFR</b>	Fluorescência Relativa Final
<b>FSC</b>	Forward Scatter
<b>iNOS</b>	Sintase induzível de óxido nítrico
<b>IRA</b>	Insuficiência renal aguda
<b>IS</b>	índice de seletividade
<b>LCD</b>	Leishmaniose Cutânea Difusa
<b>LCL</b>	Leishmaniose Cutânea Localizada
<b>LD</b>	Leishmaniose Cutânea Disseminada
<b>LM</b>	Leishmaniose Cutaneomucosa
<b>LPG</b>	Lipofosfoglicano
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral

<b>LT</b>	Leishmaniose Tegumentar
<b>LTA</b>	Leishmaniose Tegumentar Americana
<b>MAC</b>	Complexo de ataque à membrana
<b>MFS</b>	<i>Major facilitator superfamily</i> (Superfamília dos Facilitadores Majoritários)
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>ONU</b>	Organização das Nações Unidas
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E2
<b>PI</b>	Iodeto de propídio
<b>RH</b>	molécula neutra
<b>Rip</b>	Riparina
<b>SDA</b>	Ágar Sabouraud Dextrose
<b>SDB</b>	Caldo Sabouraud Dextrose
<b>SSC</b>	Side Scatter
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	14
<b>2. Objetivos</b>	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
<b>3. Referencial teórico</b>	17
3.1. Resistência bacteriana aos antibióticos	17
3.1.1 Mecanismos de resistência	18
3.2. Leishmaniose	19
3.2.1. Leishmaniose Tegumentar Americana	21
3.3. <i>Aniba riparia</i> (Ness) Mez	26
3.3.1. Bioatividades das riparinas	29
3.3.1.1. Atividades sobre o Sistema Nervoso Central (SNC)	29
3.3.1.2. Inflamação e dor	30
3.3.1.3. Atividade antimicrobiana	31
<b>Capítulo 1:</b> Inibição da bomba de efluxo NorA de <i>Staphylococcus aureus</i> por riparinas sintéticas	38
<b>Capítulo 2:</b> Atividade antimicrobiana intrínseca do análogo sintético Riparina E	58
<b>Capítulo 3:</b> Atividade anti- <i>Leishmania</i> de riparina E	76
<b>6. Conclusões</b>	84
<b>7. Perspectivas</b>	85
<b>ANEXO</b>	99

## 1. Introdução

A resistência antimicrobiana constitui-se um problema de saúde pública objeto de grande preocupação por parte das autoridades sanitárias, representadas pela ANVISA no Brasil e OMS mundialmente. Essas organizações publicaram relatórios mostrando a necessidade de pesquisa para o desenvolvimento de novos medicamentos para que haja um maior arsenal no combate a infecções multirresistentes (BRASIL, 2016a; OMS 2017b). Além disso, há doenças causadas por *Leishmania* contra as quais o atual arsenal terapêutico ainda é restrito. É uma doença de alta endemicidade, sendo que grande parte dos casos relatados em 2015 foram provenientes do Brasil, demonstrando a importância dessa doença na saúde pública brasileira (BRASIL, 2017c; OMS, 2017c). Entretanto, os medicamentos disponíveis possuem graves limitações, por toxicidade e alto custo, além da via de administração ser parenteral. Considerando que a maior parte dos casos ocorre em áreas de difícil acesso, o tratamento conduzido dessa forma torna-se difícil ou inviável de ser seguido apropriadamente. (BRASIL et al, 2016c).

As riparinas são alcaloides do tipo alcalamida encontrados nos frutos verdes da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae). Na literatura são descritas várias atividades biológicas para esse grupo de compostos, como atividades sobre o sistema nervoso central, efeitos ansiolíticos e antidepressivos, atividade anti-inflamatória e nociceptiva, além de possuir um grande potencial antimicrobiano (MELO et al., 2006; SOUSA et al., 2007; ARAÚJO et al., 2009; CATÃO et al., 2010; LEITE et al., 2011; SOUSA et al., 2011). Diante do potencial terapêutico das riparinas, houve um maior interesse pela pesquisa de atividades biológicas dessas. Entretanto, logo se percebeu que os métodos extrativos e de isolamento desses compostos tinham baixo rendimento, fato que motivou a busca de formas de obtenção das riparinas por síntese química (BARBOSA-FILHO et al, 1990). Com a descoberta da rota de síntese, novos análogos sintéticos foram produzidos, entre esses as Riparinas A, B, C, D e E, que são objeto deste estudo (GUTIERREZ, 2007).

Visando atender às necessidades apresentadas e levando em consideração o potencial antimicrobiano relatado para as riparinas, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana das riparinas A, B, C, D e E. Foi avaliado o potencial modulador da resistência de *Staphylococcus aureus* contra fluoroquinolonas, com determinação do mecanismo de ação modulador por ensaios de efluxo com brometo de etídio e estudos computacionais de ancoragem molecular. Foi também avaliado o potencial antimicrobiano intrínseco das riparinas contra vários micro-organismos: bactérias Gram positivas, Gram

negativas, leveduras e uma espécie de *Leishmania*, com avaliação do possível mecanismo de ação. Além disso, a atividade anti-leishmania da riparina E contra *Leishmania amazonensis* foi avaliada por testes suscetibilidade desse parasita contra as amastigotas e promastigotas, bem como a capacidade imunomodulatória da riparina E sobre macrófagos murinos de BALB/c.

Esta tese está organizada em três capítulos, sendo o primeiro intitulado “Inibição da bomba de efluxo NorA de *Staphylococcus aureus* por riparinas sintéticas”, que já foi publicado na revista *Journal of Applied Microbiology* com Fator de Impacto 2,16 (ISI 2017), avaliada como B1 na área de biotecnologia da CAPES no quadriênio 2013-2016. O segundo capítulo, intitulado “Atividade antimicrobiana intrínseca do análogo sintético Riparina E”, será submetido para publicação a um periódico ainda não definido, com Qualis B1 ou superior na área de Biotecnologia. Por fim, o terceiro capítulo, “Atividade anti-*Leishmania* de riparina E”, foi submetido à revista *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, com fator de impacto 2,659 (ISI 2017) e qualis A2 em Biotecnologia.



## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral:

Realizar estudos pré-clínicos com as riparinas sintéticas quanto à modulação da resistência microbiana e atividade antimicrobiana intrínseca sobre diferentes micro-organismos, visando avaliar seu potencial uso na prevenção e terapia de doenças infecciosas.

### 2.2. Objetivos específicos:

- Avaliar a atividade antimicrobiana intrínseca das riparinas através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) destas para *Staphylococcus aureus*.
- Avaliar a atividade moduladora da resistência de *Staphylococcus aureus* a fluoroquinolonas.
- Investigar o mecanismo de modulação das riparinas, por meio de ensaios de efluxo com brometo de etídio e dano à membrana por citometria de fluxo.
- Avaliar a atividade antimicrobiana intrínseca da riparina E, por meio da determinação da concentração inibitória mínima desta para várias classes de micro-organismos (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*).
- Avaliar a atividade antileishmania da riparina E contra *L. amazonensis*, por meio da determinação da sua CI<sub>50</sub> para promastigotas e amastigotas internalizadas em macrófagos murinos de camundongos BALB/c.
- Avaliar a citotoxicidade da riparina E sobre macrófagos murinos de camundongos BALB/c.
- Avaliar a capacidade imunomoduladora da riparina E, através de ensaios de ativação de macrófagos murinos.

### 3. Referencial teórico

#### 3.1. Resistência aos antimicrobianos

Os antimicrobianos são utilizados no tratamento de doenças infecciosas desde a antiguidade na forma de unguentos, infusões, entre outras formas de produtos feitos à base de plantas, e muito eram tratamentos intuitivos e empíricos. Mesmo que nessa época não fosse conhecida a existência de micro-organismos como são conhecidos atualmente, havia o conhecimento que para determinados males, certas plantas, argilas, entre outros materiais eram apropriados para sanar esse quadro. Há diversas evidências disso, como por exemplo, moléculas de tetraciclina encontradas em restos ósseos datados do ano 550 EC, possivelmente indicando a presença de moléculas desse tipo na alimentação; outro exemplo é a Medicina Tradicional Chinesa, que é milenar, e utilizava extratos de plantas do gênero *Artemisia* sp. para tratar infecções e, hoje já são conhecidas as propriedades antimaláricas da artemisina (AMINOV, 2010).

As sulfonamidas e as penicilinas estão entre os primeiros antimicrobianos produzidos e distribuídos amplamente no período de 1930 a 1945. Poucos anos após o lançamento da penicilina já foi detectado que havia cepas resistentes, devido à presença de enzimas capazes de inativar o anel beta-lactâmico (beta-lactamases, no caso da penicilina, penicilinases), que é responsável pela atividade antimicrobiana dessa classe de antibióticos. Evento semelhante ocorreu às sulfonamidas, cuja resistência já era conhecida desde seu lançamento (DAVIES; DAVIES, 2010).

Desde a descoberta, isolamento, industrialização e distribuição de antimicrobianos muitas doenças passaram a ter um tratamento eficaz. Este fato contribuiu para o aumento da expectativa de vida, especialmente nos tempos em que não se sabia muito da relação de higiene e prevenção de doenças infecciosas. Além disso, o surgimento desses medicamentos (antibióticos) permitiu que procedimentos como cirurgias, tratamento de câncer e transplante de órgãos fossem muito mais seguros (O'NEILL, 2016). Dessa forma, a resistência a antibióticos tem um impacto profundo na saúde pública, pois não só inviabiliza o tratamento de infecções, como também outros usos profiláticos, que tornavam os tratamentos mais seguros.

O uso de antimicrobianos provavelmente promoveu uma adaptação seletiva dos micro-organismos, tornando as cepas resistentes mais prevalentes. À medida que se observava a resistência, iam-se desenvolvendo análogos para contornar o problema e novas classes foram surgindo, mas a luta constante seguiu entre lançamento de novidades e descobrimento de cepas

cada vez mais resistentes (AMINOV, 2010; DAVIES; DAVIES, 2010). A resistência aos antimicrobianos não era vista como hoje, e após a fase de ouro do descobrimento de antibióticos, houve uma diminuição na taxa de lançamento de novos medicamentos e/ou busca de novos mecanismos de ação.

### 3.1.1 Mecanismos de resistência

Resistência antimicrobiana é o nome para o evento em que micro-organismos (bactérias, fungos, protozoários) perdem a sensibilidade a um fármaco e, este, portanto, torna-se ineficaz no combate a uma infecção por esse agente (OMS, 2017a). Há vários mecanismos de resistência a antimicrobianos. Entre esses, falta de acesso ao alvo por redução da permeabilidade da membrana ou pela extrusão do antibiótico da célula (mediado por bombas de efluxo). As bactérias também podem expressar enzimas que modifiquem a molécula do antibiótico, por hidrólise ou por transferência de grupamentos químicos, tornando-o inativo diante do alvo (ex.:  $\beta$ -lactamases). Outro mecanismo é a mutação do alvo na célula bacteriana, que leva a perda da afinidade pelo antimicrobiano e este perde sua eficácia (BLAIR et al., 2015).

Pode, também, ocorrer à transferência horizontal de material genético codificante de resistência antimicrobiana entre diferentes cepas bacterianas ou mesmo diferentes espécies. É a forma mais frequente de resistência “adquirida”. Classicamente, as bactérias adquirem material genético externo por três principais estratégias: transformação (incorporação de DNA “nu”), transdução (mediada por bacteriófagos) e conjugação (transferência de plasmídios e transposons). O aparecimento de cepas multirresistentes em ambiente hospitalar está frequentemente associado à conjugação (MUNITA; ARIAS, 2016).

Em 2014 se estimava que 700.000 pessoas morressem por ano por infecções com cepas multirresistentes, porém provavelmente o valor real é mais elevado, devido à subnotificação. Estima-se que haja cerca de 200.000 mortes/ano por tuberculose nos Estados Unidos e que 60.000/ano neonatos na Índia morrem por infecções. Caso esse padrão continue, até 2050 esse valor pode aumentar para 10 milhões de mortes/ano ou uma pessoa a cada três segundos. Além da repercussão social, o custo financeiro previsto é que cada pessoa doente custe 10 mil dólares (O’NEILL, 2016).

A OMS divulgou em 2017 uma nova lista dos patógenos prioritários para o desenvolvimento de novos antimicrobianos, devido à alta prevalência de cepas multirresistentes aos atuais agentes anti-infecciosos. Nessa lista os micro-organismos são classificados como prioridade crítica, alta e média. Os micro-organismos de prioridade crítica incluem

*Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos, e Enterobacteriaceae resistente a carbapenêmicos ou a cefalosporinas de 3ª geração. Entre os patógenos de prioridade alta estão: *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina ou a meticilina, *Helicobacter pylori* resistente a claritromicina, espécies de *Campylobacter* e sorotipos de *Salmonella* resistentes a fluoroquinolonas, *Neisseria gonorrhoeae* resistente a cefalosporinas de 3ª geração. Média prioridade: *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina, *Haemophilus influenzae* resistente a ampicilina e espécies de *Shigella* resistentes a fluoroquinolonas (OMS, 2017b).

Reconhecendo a gravidade da situação da resistência antimicrobiana, representantes da Organização das Nações Unidas (ONU) e OMS reuniram-se em 2017 com os representantes governamentais de diversos países da América do Sul para discutir a questão e elaborar estratégias. O Brasil esteve nessa reunião representado pelos diretores-presidentes da ANVISA e do Ministro da Saúde, os quais afirmaram o compromisso do Brasil com a causa (BRASIL, 2017a). Os dados mostram a dimensão do problema da resistência microbiana e a necessidade do incremento de pesquisas nessa área, objeto do presente estudo.

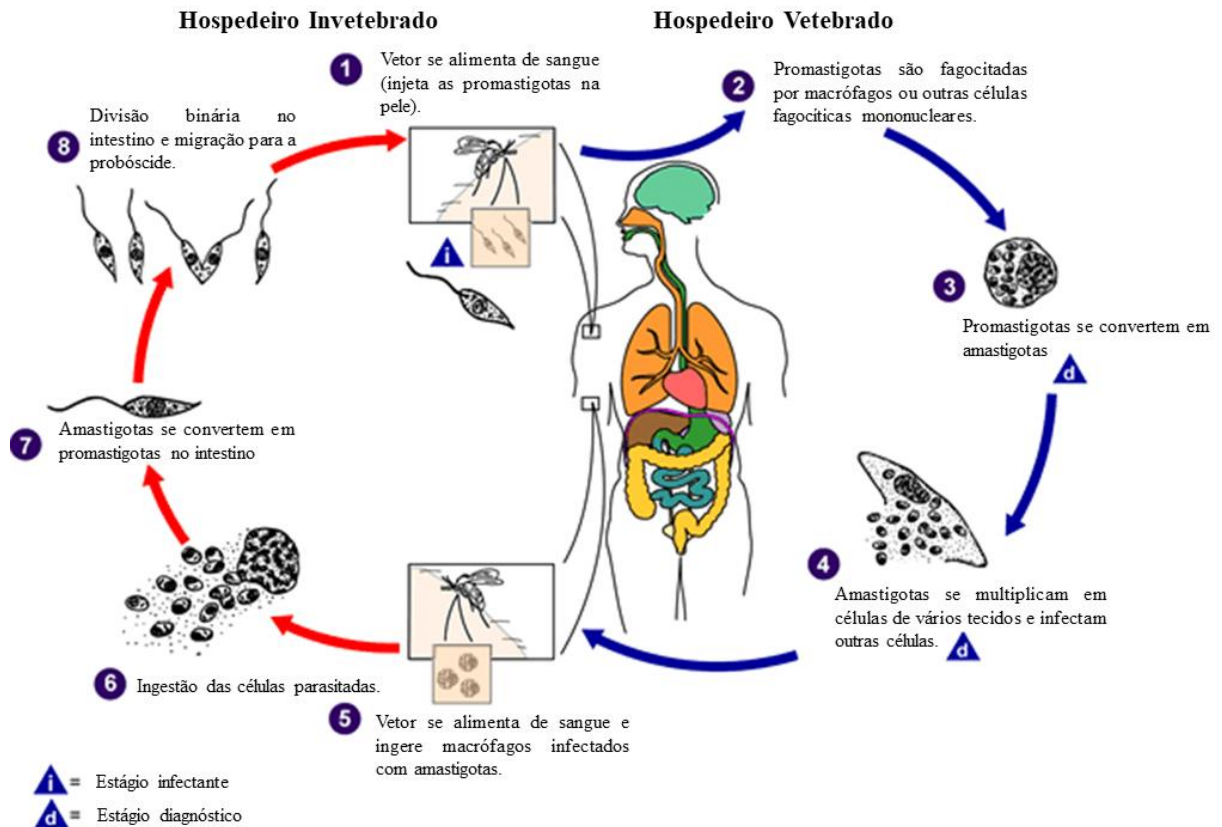
### 3.2 Leishmaniose

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Protozoa, Kinetoplastida, Trypanosomatidae). A infecção em humanos é causada por aproximadamente 21 das 30 espécies que infectam mamíferos. As leishmanioses têm caráter antroponótico, mas sem contágio direto, a transmissão se dá pela picada de flebotomíneos (dípteros da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae), conhecidos popularmente como “mosquito-palha” ou “birigui”. Os flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* são os principais transmissores dessa doença no Brasil (BRASIL, 2017b; CDC, 2017), cujo o ciclo biológico está representado na Figura 1.

A leishmania é um parasita intracelular obrigatório, de ciclo heteroxênico e possui duas formas evolutivas. O ciclo começa com a picada do inseto vetor no hospedeiro humano, no qual regurgita, junto à saliva, na pele o parasita na forma promastigota (flagelada). O estímulo inflamatório atrai células fagocitárias (macrófagos, neutrófilos e células dendríticas), que fagocitam as promastigotas. Uma vez dentro do meio intracelular, as promastigotas convertem-se rapidamente em amastigotas, nos fagossomas. A forma de amastigota tem a capacidade de resistir ao conteúdo tóxico liberado dos lisossomas na formação no fagolisossoma e é capaz de reproduzir-se nesse ambiente, romper a célula hospedeira e infectar outras células. Instalada a

infecção, o hospedeiro torna-se também um reservatório do parasita, que pode ser ingerido após a picada de outro flebotomíneo (KEVRIK et al, 2015; ROSSI et al, 2017).

Figura 1: Ciclo biológico dos protozoários do gênero *Leishmania*.



Fonte: Modificado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC), (2017).

Diferentes espécies de *Leishmania* podem levar a diferentes apresentações clínicas. A principal classificação relativa às diferentes formas de manifestação de leishmaniose é a divisão entre a doença que acomete a pele e mucosas, Leishmaniose Tegumentar (LT) e a que afeta os órgãos internos, Leishmaniose Visceral (LV). Esta última caracteriza-se por um amplo espectro clínico nos seres humanos, variando de sinais leves ou moderados até manifestações graves com evolução para óbito. A LV ativa manifesta-se como enfermidade sistêmica, crônica, caracterizada por febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, emagrecimento, edema e estado de debilidade, associada a alterações laboratoriais, tais como citopenias, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia. No Brasil, a principal espécie causadora de LV é a *Leishmania (Leishmania) infantum* (BRASIL, 2016b).

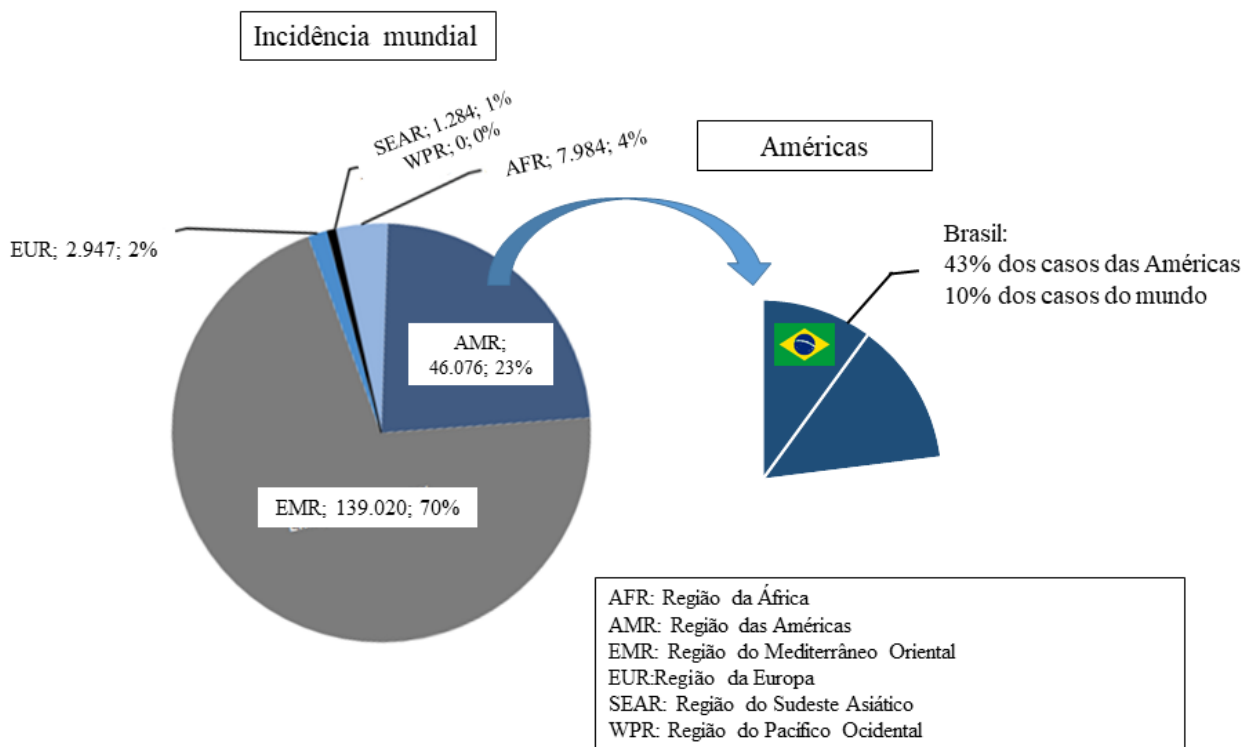
A LV, devido ao acometimento de órgãos vitais, é uma doença de maior letalidade que LT. Entretanto, a LT é mais prevalente no mundo, conforme mostram os dados da OMS de

2015, quando foram notificados 197.552 novos casos de LT e 23.804 novos casos de LV (OMS, 2017c). Além disso, apesar da baixa letalidade, ainda assim é uma doença de grande importância na saúde pública, devido ao risco de ocorrência de deformidades, que afeta a qualidade de vida e a autoestima dos pacientes, com reflexos na vida social e profissional.

### 3.2.1 Leishmaniose tegumentar americana

De acordo com a OMS, em 2015, dos 200 países e territórios declarantes, 87 (44%) foram considerados endêmicos para Leishmaniose tegumentar (LT), estando a maior parte desses países na região do Mediterrâneo Oriental e nas Américas. Os países com maior incidência são: Afeganistão, Brasil, Irã, Iraque e Síria, que sozinhos representam 75% dos casos reportados no mundo. No contexto mundial, o Brasil representa 10% dos casos e 43% dos casos notificados nas Américas (Figura 3), demonstrando a importância dessa doença na saúde pública brasileira (BRASIL, 2017c; OMS, 2017c)

Figura 2: Incidência de leishmaniose tegumentar do Brasil inserida no contexto das Américas e do incidência nas Américas e do mundo em 2015.



Fontes: BRASIL, 2017c; OMS, 2017c

A LT pode ser causada por várias espécies de leishmania, porém existem espécies que são mais prevalentes em determinadas regiões que em outras. As regiões são classificadas entre Novo Mundo (Américas) e Velho Mundo (Ásia, África e Europa oriental). Nas Américas existe a denominação de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (KEVRIK et al, 2015), representando as doenças causada pelas espécies predominantes nessa região (Quadro 1).

Quadro 1: Distribuição das espécies de *Leishmania* spp mais prevalentes no Novo Mundo e Velho Mundo e as formas clínicas de LT associadas a essas. As espécies em negrito são as de maior ocorrência no Brasil.

	Leishmaniose cutânea localizada	Leishmaniose disseminada	Leishmaniose cutânea difusa	Leishmaniose mucocutânea
Novo Mundo (Américas)	<i>L. (L.) mexicana</i> , <b><i>L. (L.) amazonensis</i></b> , <i>L. (V.) braziliensis</i> , <b><i>L. (V.) guyanensis</i></b> , <i>L. (V.) shawi</i> , <i>L. (V.) lainsoni</i> , e <i>L. (V.) naiff</i> , <i>L. (V.) panamensis</i>	<b><i>L. (V.) braziliensis</i></b> e <b><i>L. (L.) amazonensis</i></b>	<i>L. (L.) mexicana</i> e <b><i>L. (L.) amazonensis</i></b>	<b><i>L. (V.) braziliensis</i></b> , <b><i>L. (L.) amazonensis</i></b> , <b><i>L. (V.) guyanensis</i></b> e <i>L. (V.) panamensis</i>
Velho Mundo	<i>L. (L.) major</i> , <i>L. (L.) aethiopica</i> , <i>L. (L.) tropica</i>	-	<i>L. (L.) aethiopica</i>	<i>L. (L.) major</i>

(CONCEIÇÃO-SILVA et al, 2018; LINDOSO et al, 2016)

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença que afeta a pele e mucosas, que pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de leishmania e da imunidade do paciente. As principais formas clínicas são: cutânea localizada (LCL), cutânea disseminada (LD), cutânea difusa (LCD) ou leishmaniose cutaneomucosa (LM). A forma cutânea localizada é a mais comum de LT, caracterizada por úlceras únicas ou múltiplas de diâmetro variado, com bordas altas e bem delimitadas, geralmente é indolor e aparecem onde houve a inoculação do parasita. Essas úlceras ocasionalmente regridem espontaneamente podendo também permanecer ativas por vários anos e coexistir com lesões mucosas de surgimento posterior. As duas formas clínicas mais raras são a cutânea disseminada e a difusa, sendo que a primeira se apresenta como diversas pápulas de aspecto variado, em grande número, frequentemente com aparência acneiforme; a segunda se caracteriza por múltiplas lesões nodulares não ulceradas, com aspecto verrucoso ou de placas, podendo atingir amplas porções do corpo. Indivíduos

acometidos com a forma difusa não são reativos ao teste de Montenegro, por não apresentarem resposta imune celular aos antígenos de *Leishmania* spp., e tem resposta fraca às terapias adotadas. Por último, a leishmaniose mucosa (ou cutaneomucosa) é a forma mais grave. Na sua forma clássica é considerada secundária à forma cutânea, pois pode aparecer anos após a lesão cutânea. Afeta principalmente mucosas e cartilagens das vias aéreas superiores e orofaringe, causando lesões destrutivas, que podem levar a complicações respiratórias (BRASIL, 2017b; CONCEIÇÃO-SILVA et al, 2018).

Como já foi frisado, em todas as formas clínicas, a imunidade do paciente é um fator determinante para a cura ou cronicidade da doença. Nas infecções por leishmania, há uma tendência à cronificação ou à ocorrência recidivas após a cicatrização da lesão primária e/ou cura clínica. Isso acontece devido às características do parasita e a sua relação com a imunidade do hospedeiro. Este protozoário é um parasita intracelular obrigatório, que pode infectar diferentes tipos celulares, porém reside principalmente em macrófagos (OLIVEIRA 2012).

Além disso, esse parasita possui muitos mecanismos de sobrevivência no hospedeiro. As leishmanias são revestidas de lipofosfoglicano (LPG), que é parte de vários desses mecanismos. Essa estrutura é bastante imunogênica, ativando o sistema complemento, mas também dificulta a formação do complexo de ataque à membrana (MAC). As promastigotas que sobreviveram à lise no meio extracelular são fagocitadas e, mais uma vez o LPG tem grande contribuição para que as leishmanias resistam às espécies reativas de nitrogênio e oxigênio no interior do fagolisossoma. Inicialmente, por atrasar a completa formação deste, permitindo assim a conversão de promastigota em uma forma mais resistente (amastigota) que possui uma camada mais espessa de LPG. Além disso, essa estrutura também pode diminuir a produção de óxido nítrico (NO) e liberação desse no fagolisossoma. Isso porque induz a produção de arginase, que interfere na via da L-arginina para síntese de NO pela enzima sintase induzível de NO (iNOS). O lipofosfoglicano também contribui para a diminuição dos níveis de ânion superóxido aos quais as leishmanias estarão expostas, reduzindo consideravelmente o potencial leishmanicida dos macrófagos. Assim posto, a importância da eficiência da resposta imune celular no controle da infecção por esse parasita reveste-se de importância (ROSSI et al, 2017).

As células dendríticas, macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos após a fagocitose processam os antígenos de leishmania e ativam os linfócitos T auxiliares (T *helper*, T CD4+ ou Th), que por sua vez diferenciam-se e passam a expressar distintas respostas de acordo com o padrão de citocinas liberadas (SOONG et al, 2012). Quando as células T CD4 são ativadas e produzem citocinas como IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , os mesmos, ativam macrófagos (resposta Th1), que, então, fagocitam e matam o protozoário. Em contrapartida, as células T-



reg, quando ativadas, modulam a resposta imune em curso para limitar o dano tecidual ao hospedeiro. Porém, se houver predomínio da resposta Th2, com predominância de citocinas como IL-10 e IL-4, a resposta Th1 é inibida e, predominando uma resposta imune humoral, com altos níveis de anticorpos não protetores e, por consequência, a infecção persiste e se expande (KEVRIC et al, 2015). Assim, o balanço entre a resposta Th1 e Th2 é um fator determinante de como será a evolução da doença, se será auto-limitada ou se será mais grave. Uma resposta Th1 exagerada pode levar a dano tecidual e tem sido relacionada com a imonopatogênese da leishmaniose mucocutânea. (CONCEIÇÃO-SILVA et al, 2018)

A leishmaniose é uma doença de difícil tratamento por diversos fatores inerentes ao parasita e como este interage com o sistema imune do hospedeiro humano, o estado de saúde do paciente e aos medicamentos disponíveis no mercado atualmente. Referentes aos fármacos utilizados, os tratamentos apresentam várias limitações que incluem: longo período de utilização do medicamento, a via de administração invasiva (exceto miltefosina) e os efeitos colaterais, que em conjunto contribuem para a baixa adesão ao tratamento. Além disso, devido ao uso das mesmas drogas por muitos anos, favoreceu o desenvolvimento de resistência da leishmania contra os medicamentos utilizados na “monoterapia” e até mesmo aos esquemas de terapia combinada/co-tratamento com outras drogas (PONTE-SUCRE et al, 2017).

Os medicamentos de primeira linha são geralmente antimoniais, anfotericina B ou pentamidina, dependendo da forma clínica e se há contra-indicação do tratamento. Dentre os antimoniais, no mercado internacional estão disponíveis o estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumina, porém, só este último é utilizado no Brasil. O antimoniato de meglumina é o fármaco de primeira escolha para a maioria das formas clínicas de LTA (exceto para a leishmaniose cutânea disseminada). Devido ao potencial nefrotóxico, hepatotóxico e ocorrência de arritmias cardíacas (Quadro 2), esse medicamento está contraindicado para gestantes e não é recomendado a pacientes com doença renal, hepática ou em tratamento para arritmias (a menos que os potenciais benefícios superem os riscos e deve haver monitoração médica). Nesses casos a primeira escolha é a anfotericina B lipossomal, pois é menos tóxica que o desoxicolato de anfotericina B. Já na leishmaniose cutânea disseminada e nas infecções por *Leishmania guyanensis* recomenda-se iniciar o tratamento por administração de pentamidina. Também estão disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS) o desoxicolato de anfotericina B (mais efeitos adversos que a forma lipossomal), pentamidina (primeira escolha no tratamento da infecção por *L. guyanensis* e na Leishmaniose Cutânea Difusa) e pentoxifilina (imunomodulador usado como adjuvante do tratamento da LM em associação com antimionato de meglumina) (BRASIL, 2017b)

Quadro 2: Principais medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose tegumentar.

<b>Tratamento</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Reações adversas/Toxicidade</b>
Antimoniais pentavalentes:	Mecanismo exato é desconhecido, provavelmente está relacionado à inibição da via glicolítica e/ou da oxidação dos ácidos graxos; efluxo ativo de tióis (ex.: glutatona, cisteína e tripanotona) e/ou inibição da tripanotona redutase, causando estresse oxidativo no parasita.	Artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema, alterações hepáticas e insuficiência renal aguda (IRA). O efeito adverso mais grave é decorrente de ação sobre o aparelho cardiovascular. Este efeito é dose e tempo-dependente, traduzindo-se por distúrbio de repolarização (inversão e achatamento da onda T e aumento do intervalo QTc).
Anfotericina B	Formação de poros ao longo da bicamada lipídica da membrana celular através da interação com esteróis de membrana (ergosterol). Isso altera a permeabilidade a cátions, água e glicose, além de afetar enzimas ligadas à membrana.	Os efeitos adversos mais frequentes são febre, cefaleia, tremores, cianose, hipotensão, hipomagnesemia, distúrbio de comportamento, calafrios, náuseas, vômitos, hipocalcemia e flebite no local da infusão. Também pode ocorrer nefrotoxicidade (diminuição da filtração glomerular), alterações hepáticas e depressão/supressão da medula óssea.
Pentamidina	Liga-se ao cinetoplasto do parasita, causando alterações estruturais profundas.	As reações adversas mais frequentes são dor, náuseas, tontura, mialgias, cefaleia, hipotensão, hipoglicemia ou hiperglicemia, arritmia e diabetes. Podem ocorrer reações adversas graves, como pancreatite, arritmias cardíacas, leucopenia, trombocitopenia, insuficiência renal aguda, hipocalcemia e taquicardia ventricular e choque anafilático.
Miltefosina	Induz a apoptose por inibição da via de sobrevivência celular PI3K–Akt/PKB (que inibe a apoptose) de forma dose dependente.	Alterações no aparelho gastrointestinal (principalmente diarreia e vômitos). Podem ocorrer anormalidades transitórias nas funções renal e hepática. É teratogênico.

Fonte: OLIVEIRA et al, 2017

Entretanto, esses tratamentos possuem graves limitações, os medicamentos de primeira linha são muito agressivos. Além disso, a administração desses fármacos é feita pela via parenteral e exige acompanhamento médico dos efeitos adversos, especialmente quando

administrados na dose mais alta, como é o caso do tratamento da LD, LM e LCD. A recomendação para o tratamento dessas formas clínicas mais raras e graves é que seja feito em centros de referência mais próximos, devido à maior dificuldade de cura, bem como maior toxicidade decorrente dos efeitos adversos. Considerando que a maior parte dos casos ocorre em áreas de difícil acesso, o tratamento conduzido dessa forma torna-se difícil ou inviável de ser seguido apropriadamente. Assim, a incorporação da miltefosina para LTA no SUS vem sendo considerada, por ser um medicamento disponibilizado na forma de comprimidos. Embora seja uma alternativa mais prática, esse medicamento é mais caro que os outros tratamentos já disponibilizados (BRASIL et al, 2016c).

Curiosamente, grande parte dos fármacos disponíveis para o tratamento de leishmaniose foram desenvolvidos para outros fins, como a própria anfotericina B, tradicionalmente é um antifúngico; a miltefosina, inicialmente utilizada como antineoplásico, a pentamidina, um hipoglicemiante, entre outros. Somente os antimoniais pentavalentes foram introduzidos com o intuito de tratar infecções por protozoários em 1945. Isso denota o pouco investimento em pesquisas no tratamento dessa doença ao longo da sua história, apesar de sua importância clínica e epidemiológica (HALDAR et al, 2011; OLIVEIRA et al, 2017)

Embora haja vários grupos buscando novas bases para o tratamento da leishmaniose no Brasil, esses compostos ainda se encontram em fase de estudos pré-clínicos ou clínicos, porém sem previsão para o seu lançamento no mercado. Assim, os tratamentos utilizados no sistema de saúde continuam sendo os mesmos.

Diante do quadro exposto, é importante a constante pesquisa de agentes com atividade antileishmania visando o desenvolvimento de novos medicamentos para combater a LTA, de forma que haja mais opções terapêuticas para serem selecionadas de acordo com as condições locais. Além de que sempre que uma doença infecciosa utiliza um único princípio ativo, há a seleção de cepas resistentes.

### **3.3. *Aniba riparia* (Ness) Mez**

A *Aniba riparia* (Ness) Mez, árvore da família Lauraceae, considerada uma das mais primitivas famílias pode ser destacada pela sua importância econômica, sendo algumas espécies utilizadas na medicina popular e nas indústrias de cosméticos e produtos químicos, bem como na alimentação e marcenaria (MARQUES, 2001). A família Lauraceae é uma grande família vegetal encontrada principalmente nos trópicos e subtropicais da América e Ásia, com algumas

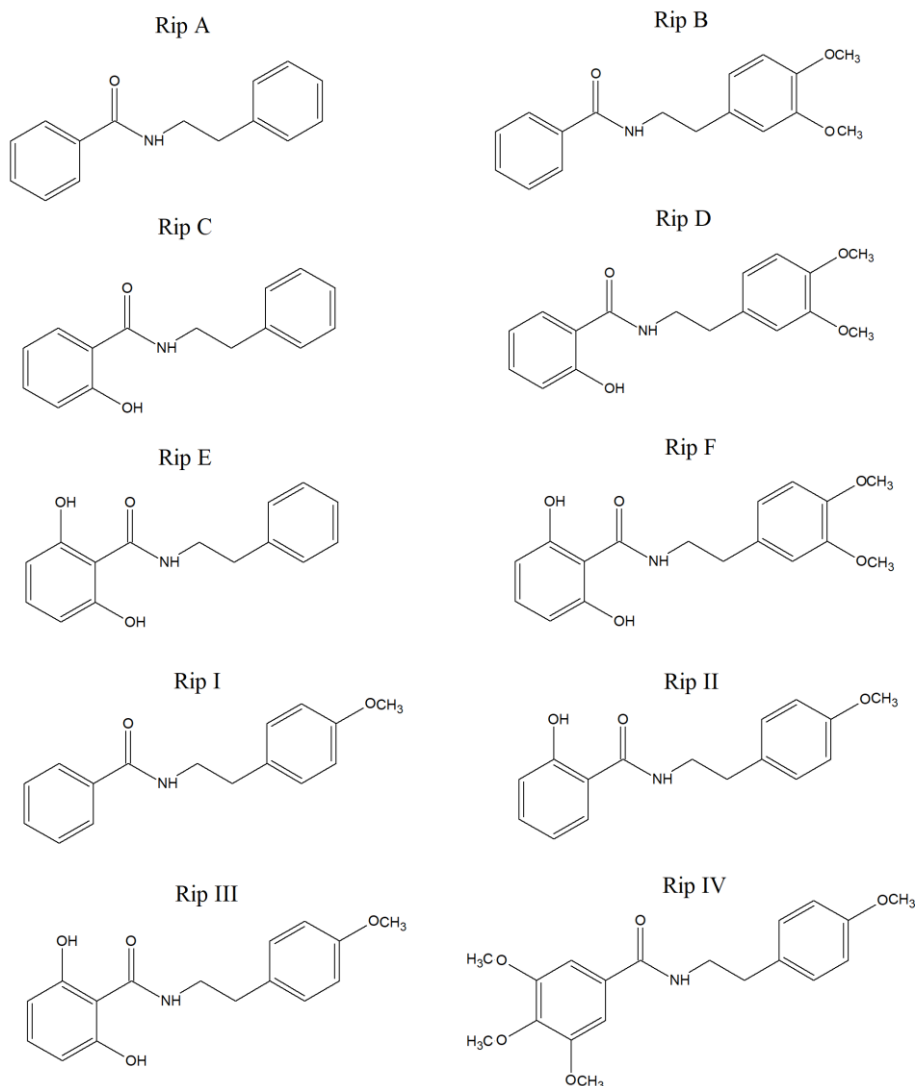
espécies na Austrália, Madagascar e África (REIS-ÁVILA et al., 2017). Em especial, a *A. riparia*, conhecida popularmente como “louro”, é encontrada principalmente na Amazônia e nas Guianas, podendo estender-se para os Andes, para as montanhas do norte da Venezuela, leste e sul do Brasil. (SOUSA et al., 2008).

Há uma forte correlação fitoquímica entre os gêneros *Aniba*, *Pinus* e *Alpia*, especialmente no conteúdo de pironas, flavonoides, neolignananas e cinnamamidas. (FERNANDES et al., 1978). Após análise fitoquímica do caule de *A. riparia* foi visto que esta parte era composta de benzil benzoatos, benzaldeídos, terpenos e flavonoides. Essa composição era considerada pouco usual com o padrão de metabólitos secundários de espécies do gênero *Aniba*, que costumam apresentar 2-pironas e neolignananas, tornando a *A. riparia* uma exceção. Apesar de seus metabólitos secundários terem rota biossintética semelhante aos de outras espécies de *Aniba* (FRANCA et al., 1976).

O óleo essencial das folhas, galhos finos, casca do caule e da madeira do troco foram analisados e, embora muitos dos mesmos elementos sejam encontrados, há uma variação grande na composição dos óleos entre essas partes da planta. Por exemplo, o óleo da folha é constituído principalmente de  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno; dos galhos finos (E)-nerolidol; e a casca do caule e tronco de benzil benzoato e benzil salicilato (LUZ et al., 2002). Estudos posteriores revelaram que o fruto verde da *A. riparia* continha as neolignananas e pironas, benzilbenzoatos, flavonoides, fenetilamidas de ácidos benzoicos, entre outros. Este último é uma classe alcaloides, do tipo alcanida (Figura 1). A partir de então, essas alcanidas se tornaram o objeto de estudo principal entre os elementos encontrados na *A. riparia*, e passaram a ser chamados de riparinas em homenagem à planta onde foram encontrados pela primeira vez (FERNANDES et al., 1978; FRANCA et al., 1976; BARBOSA-FILHO et al., 1987).

Foram realizados estudos preliminares de atividade antimicrobiana com extratos do fruto e cálice *A. riparia*, bem dos seus componentes isolados. Nesses ensaios observou-se um potencial antimicrobiano com sua ação atribuída às riparinas (BARBOSA-FILHO et al., 1987; BARBOSA et al., 1988). Da mesma maneira, foram conduzidos estudos preliminares de atividade espasmolítica das riparinas extraídas e isoladas dos frutos de *A. riparia*, nos quais foram encontrados resultados promissores (THOMAS et al., 1994; CASTELO-BRANCO et al., 2000).

Figura 3: Estrutura molecular das riparinas estudadas até o momento



Fonte: arquivo pessoal

Mesmo com os resultados promissores das três primeiras riparinas a serem estudadas, riparinas I, II e III, que são encontradas na natureza, logo se percebeu que a extração desses compostos em quantidade apreciável para seguir com as avaliações de atividades biológicas era um processo dispendioso e demorado. Dessa forma, a alternativa encontrada foi sintetizá-las em laboratório e foi a forma como passaram a ser obtidas a partir de então (BARBOSA-FILHO et al., 1990). Após o domínio da síntese das riparinas, outros análogos sintéticos foram sendo produzidos ao longo dos anos, entre eles, as riparinas IV, A, B, C, D, E e F (GUTIERREZ, 2007).

### 3.3.1. Bioatividades das riparinas

#### 3.3.1.1. Atividades sobre o Sistema Nervoso Central (SNC)

Vários estudos têm relacionado às riparinas com efeitos sobre o Sistema Nervoso Central, principalmente atividade ansiolítica e antidepressiva. As riparinas I, II e III foram testadas em modelos animais comportamentais (labirinto em cruz elevado, tempo de sono induzido por barbitúricos, suspensão pela cauda e nado forçado, placa perfurada, entre outros) e demonstraram potencial ansiolítico e antidepressivo. Rip-A foi avaliada quanto ao seu potencial ansiolítico e demonstrou atividade com provável envolvimento do sistema GABAérgico, porém não relacionado ao sítio de benzodiazepínicos. O efeito dessas riparinas sobre a locomoção e coordenação motora foi avaliado para descartar um falso positivo nos experimentos comportamentais. Foi demonstrado que essas não interferiram na locomoção dos animais, sugerindo que os efeitos ansiolíticos e antidepressivos observados são resultado de psicoestimulação dessas moléculas (ARAÚJO et al, 2018; MELO et al., 2006; NUNES et al, 2015; SOUSA et al., 2004; SOUSA et al., 2005; SOUSA et al., 2007).

O mecanismo do efeito antidepressivo observado para Rip-I, Rip-II e Rip-III foi investigado realizando os mesmos testes comportamentais, utilizando antagonistas específicos de receptores de agentes simpatomiméticos. Os resultados demonstraram que a ação das três riparinas envolveu a ativação de receptores adrenérgicos (Rip-I e Rip-III -  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ; Rip-II -  $\alpha_1$ ) dopaminérgicos (Rip-I e Rip-II -  $D_1$  e  $D_2$ ; Rip-III -  $D_2$ ) e serotoninérgicos (Rip-I - 5-HT<sub>2A/2C</sub>; Rip-II - 5-HT<sub>1A</sub>) (MELO et al., 2013; SOUSA et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2013).

Posteriormente, o efeito antidepressivo de Rip-III foi novamente avaliado. Dessa vez com indução dos aspectos neuroquímicos da depressão antes e durante o tratamento com Rip-III. Esse estudo corrobora com os achados anteriores e reforça o potencial antidepressivo da Rip-III, pois foi capaz de reverter os comportamentos associados ao quadro de depressão nos camundongos, além de normalizar também os parâmetros de ansiedade. Rip-I e Rip-III foram testadas em um modelo de indução de estresse semelhante, porém com avaliação do efeito dessas sobre a cognição e memória. Ambas promoveram a recuperação da memória de curto prazo, bem como a memória operacional (VASCONCELOS et al., 2014; VASCONCELOS et al., 2015).

Recentemente a atividade antidepressiva de Rip-II foi avaliada pelo modelo de depressão induzida por tratamento com corticosterona. Essa alcaloide foi capaz de reverter o comportamento depressivo e o estresse oxidativo cerebral induzido por corticosterona, além de

restabelecer os níveis de BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), uma proteína endógena responsável por regular a sobrevivência neuronal e a plasticidade sináptica do sistema nervoso periférico e central (LOPES et al, 2018)

### 3.3.1.2. Inflamação e dor

Várias das riparinas tiveram seu potencial anti-inflamatório avaliado, entre essas, Rip-I, Rip-II, Rip-A, Rip-B e Rip-IV. Cada estudo foi conduzido de forma distinta, porém foram seguidos os mesmos parâmetros, com medição do edema de pata induzido por distintos agentes, seguida de indução de peritonite para contagem de leucócitos e dosagem de citocinas no exsudato peritoneal.

No modelo de edema de pata é avaliada a atividade anti-edematogênica. No modelo induzido por carragenina, todas as riparinas foram capazes de reduzir o volume da pata, porém a mais potente foi Rip-B e as outras seguiram a ordem Rip-I>Rip-IV>Rip-A>Rip-II. Já no edema induzido por dextrana somente as Rip-I, II e B foram testados, sendo todos capazes de reduzir o edema, na seguinte ordem Rip-B>Rip-II>Rip-I. Somente Rip-A e B foram avaliadas no modelo de edema pelo composto 48/80, no qual ambas tiveram inibição do edema em proporção semelhante. Foram também avaliados os edemas induzidos por histamina e serotonina. No primeiro, todas reduziram o edema (Rip-A>Rip-I>Rip-B>Rip-II), porém somente Rip-A e Rip-B reduziram o edema induzido por serotonina (Rip-A>Rip-B). Rip-B também inibiu a formação de edema induzido por PGE<sub>2</sub> e bradicinina (CARVALHO et al., 2013; LEITE et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2016; SANTIAGO et al., 2015; SILVA et al., 2015).

Em relação aos parâmetros inflamatórios, Rip-A, B e II diminuíram a migração de leucócitos no exsudato peritoneal (Rip-B>Rip-A>Rip-II;), sendo que também diminuíram a atividade da mieloperoxidase (MPO, enzima presente nos grânulos de neutrófilos, é um indicador de migração de neutrófilos) seguindo a mesma ordem (Rip-B>Rip-A>Rip-II). Rip-A, B e II também diminuíram os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e diminuíram o estresse oxidativo produzido pelo processo inflamatório, porém Rip-IV não teve efeito sobre a concentração dessas citocinas nem sobre o estresse oxidativo (CARVALHO et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2016; SANTIAGO et al., 2015; SILVA et al., 2015;).

As riparinas B, I, II e IV foram avaliadas quanto a sua capacidade antinociceptiva. Em modelo de ácido acético, Rip-I, Rip-II e Rip-B diminuíram significativamente o número de contrações abdominais (via intraperitoneal: Rip-B>Rip-I; via oral: Rip-II>Rip-I). Já no teste da

formalina, Rip-I, Rip-II, Rip-B e Rip-IV reduziram o tempo de lambadura da pata traseira, sendo que com Rip-I, Rip-B e Rip-IV esse efeito foi observado tanto na primeira fase (neurogênica) quanto na segunda fase (inflamatória), sendo o efeito mais pronunciado na segunda fase. Rip-II, por sua vez, promoveu redução no comportamento relacionado a nocicepção somente na segunda fase. No teste da placa quente Rip-I aumentou o tempo de latência de retirada de pata, mas Rip-II e Rip-B não apresentaram efeito. Rip-IV foi avaliado por outro ensaio de nocicepção envolvendo calor (retirada de cauda) e também não teve efeito sobre o tempo de latência. Foi proposto como um possível mecanismo antinociceptivo de Rip-II o envolvimento do sistema glutamatérgico no efeito antinociceptivo de Rip-II, relacionado com a interação com os receptores TRP (ARAÚJO et al., 2009; CARVALHO et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2016; SANTIAGO et al., 2015).

### 3.3.1.3. Atividade antimicrobiana

Um estudo preliminar com extratos hidroalcolóico, hexânico e clorofórmico dos frutos e cálices de *A. riparia* foi feito para avaliar sua atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* sp., *Salmonella Gallinarum* e *Staphylococcus aureus*. Entre os extratos avaliados, somente o hexânico e o clorofórmico demonstraram atividade antimicrobiana. Estes foram capazes de inibir o crescimento das espécies Gram positivas e de *C. albicans*, mas não das Gram negativas (BARBOSA et al., 1988).

Após a determinação da composição fitoquímica desses extratos, foi conduzida a avaliação da atividade antimicrobiana dos principais constituintes. As alcanidas, entre outros componentes, tiveram sua atividade antimicrobiana testada contra cepas de *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *B. cereus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella Gallinarum* e *S. aureus*. As amidas (alcanidas, as riparinas), especialmente a di-hidroxilada (a que passou a ser conhecida como Riparina III) (Figura 1) foram capazes de inibir o crescimento dos microorganismos utilizados. Da mesma forma que em Barbosa (1988), em outro estudo, foi observada maior ação contra as bactérias Gram positivas e leveduras. Foi determinada também, a concentração inibitória mínima (CIM) das amidas para espécies de fungo do gênero *Cladosporium* sp. (*C. sphaerospermum*, *C. cladosporioides* e *C. cucumerinum*), das quais a Rip-III foi a que teve menor CIM para todas as espécies (BARBOSA-FILHO et al., 1987).

No trabalho de Barbosa-Filho et al. (1987) foi observado ainda que entre as cepas Gram positivas, Rip-III teve maior ação sobre *S. aureus*, enquanto que das Gram negativas *E. coli* foi



a mais sensível a Rip-III. Em face desses resultados, Catão et al. (2005), fizeram novos testes de atividade antimicrobiana de Rip-I, Rip-III e Rip-IV contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. As três riparinas tiveram um perfil de inibição semelhante, embora Rip-III tenha apresentado melhor atividade antimicrobiana. Rip-III inibiu o crescimento de maior número de cepas de *S. aureus* (11 das 12 avaliadas) que de *E. coli* (3/14), confirmando a tendência encontrada nos estudos anteriores. O perfil de sensibilidade das cepas de *S. aureus* indica que estas são resistentes à penicilina, ampicilina e lincomicina. Ainda assim, as riparinas inibiram o seu crescimento.

Posteriormente, Catão et al. (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana de Rip-I, Rip-II e Rip-III contra as cepas 319U e 122U de *S. aureus*, ambas resistentes a penicilina. Somente Rip-III inibiu o crescimento dessas cepas, com halo de inibição de 10 mm para 122U e 14 mm para 319U (CIM = 200 µg/mL). Neste estudo verificou-se que Rip-III, em concentração subinibitória reduziu o CIM da penicilina frente à linhagem 319U, na qual eliminou a marca de resistência numa frequência de 61,7%. Rip-III demonstrou também, atividade antiplasmidial, já que reverteu o fenótipo de resistência à penicilina.

## Referências

AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Front Microbiol**, v. 1, n. 134, p. 1-6, 2010.

ARAÚJO, F. L.; MELO, C. T.; ROCHA, N.F.; MOURA, B.A.; LEITE, C.P.; AMARAL, J.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; SOUSA, F.C.F. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (Riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 380, p. 337-344, 2009.

ARAÚJO, E. J. F.; REZENDE-JÚNIOR, L. M.; LIMA, L. K. F.; SILVA-JÚNIOR, M. P.; SILVA, O. A.; SOUSA-NETO, B. P.; ALMEIDA, A. A. C.; GUTIERREZ, S. J. C.; TOMÉ, A. R.; LOPES, L. S.; FERREIRAA, P. M. P. LIMA, F. C. A. Pathophysiological investigations, anxiolytic effects and interaction of a semisynthetic riparin with benzodiazepine receptors. **Biomed Pharmacother**, v. 103, p. 973–981, 2018

BARBOSA, R. C. S. B. C.; GIESBRECHT, A. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Avaliação da atividade antibiótica de extratos de Lauraceae. **Acta Amazon**, v. 18, n. 1-2, p. 91-94, 1988. Suplemento.

BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. C.; BHATTACHARYYA, J. Synthesis of several new phenylethylamides of substituted benzoic acids. **Quim Nova**, v. 13, p. 332–334, 1990.

BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; BARBOSA, R. C. S. B. C.; GIESBRECHT, A. M.; YOUNG, M. C. M. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2615-2617, 1987.

BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, p. 42–51, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14**: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e resistência microbiana no ano de 2015, 2016a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC). **Proposta de elaboração protocolo clínico e diretrizes terapêuticas: Leishmaniose Visceral**, 2016b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC). **Relatório de recomendação: Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar**, 2016bc.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Continentes unem-se contra resistência antimicrobiana**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/rss/-/asset\\_publisher/Zk4q6UQCj9Pn/content/id/3336366](http://portal.anvisa.gov.br/rss/-/asset_publisher/Zk4q6UQCj9Pn/content/id/3336366)>. Acesso em: 20 jun. 2017a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. Brasília, 2017b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan): **Leishmaniose Tegumentar Americana - casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação** – Brasil. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/ltabr.def>>. Acesso em: 02 nov. 2017c.

CARVALHO, A. M. R.; ROCHA, N. F. M.; VASCONCELOS, L. F.; RIOS, E. R. V.; DIAS, M. L.; SILVA, M. I. G.; FONTELES, M. M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; SOUSA, F. C. F. Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. **Chem Biol Interact**, v. 205, p. 165–172, 2013.

CARVALHO, A. M. R.; VASCONCELOS, L. F.; ROCHA, N. F. M.; RIOS, E. R. V.; DIAS, M. L.; FONTELES, M. M. F.; GASPAR, D. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; SOUSA, F. C. F. Antinociceptive activity of Riparin II from *Aniba riparia*: Further elucidation of the possible mechanisms. **Chem Biol Interact**, v. 287, p. 49–56, 2018

CASTELO-BRANCO, U. V.; CASTELO-BRANCO, U. J. V.; THOMAS, G.; ARAÚJO, C. C.; BARBOSA-FILHO, J. M. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides, constituents of *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae). **Acta Farm Bonaerense**, v. 19, p 197-202, 2000.

CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. **Rev Bras Anal Clin**, v. 37, p. 247-249, 2005.

CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; SILVA, M. A. R.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Rev Bras Anal Clin**, v. 42, p. 9-14, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Parasites – Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/disease.html>>. Acesso em: 02 nov. 2017.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; LEITE-SILVA, J.; MORGADO, F. N. The Binomial Parasite-Host Immunity in the Healing Process and in Reactivation of Human Tegumentary Leishmaniasis. **Front Microbiol**, v. 9, n. 1308, p. 1-17, 2018.

DAVIES, J; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Microbiol Mol Biol Ver*, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

FERNANDES, J. B.; GOTTHEB, O. R.; XAVIER, L. M. Chemosystematic implications of flavonoids in *Aniba riparia*. **Biochem Syst Ecol**, v. 6, p.55-58, 1978.

FRANCA, N. C.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T.; MENDES, P. H.; MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L.; GOTTLIEB, H. E. Tri-o-methylgalangin from *Aniba riparia*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 572-573, 1976

GUTIERREZ, S. J. C. **Síntese do Bowdenol, um dihidrobenzofuranoide isolado de *Bowdichia virgilioides* e preparação de derivados da Riparina isolada de *Aniba riparia* com potencial atividade biológica**. 2007. 134f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). UFPB/CCS. João Pessoa, 2007

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. **Mol Biol Int**, v. 2011, 2011.

KEVRIC, I; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections - A Practical Review. **Dermatol Clin**, v. 33, p. 579–593, 2015.

LEITE, C. P.; ARAUJO, F. L. O.; MELO, C. T. V.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SOUSA, F. C. F. Antiinflammatory activity of riparin I (O-methyl N-benzoyl tyramine) on paw edema models in mice **Inflammat Res**, v. 60, p. 202-202, 2011.

LINDOSO, J. A. L.; CUNHA, M. A.; QUEIROZ, I. T.; MOREIRA, C. H. V. Leishmaniasis–HIV coinfection: current challenges. **HIV AIDS (Auckl)**, v. 8, p. 147–156, 2016.

LOPES, I. S.; OLIVEIRA, I. C. M.; CAPIBARIBE, V. C. C.; VALENTIM, J. T.; SILVA, D. M. A.; SOUZA, A. G.; ARAÚJO, M. A.; CHAVES, R. C.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA FILHO, J. M.; MACÊDO, D. S.; SOUSA, F. C. F. Riparin II ameliorates

corticosterone-induced depressive-like behavior in mice: Role of antioxidant and neurotrophic mechanisms. **Neurochem Int**, v. 120, p. 33-42, 2018.

LUZ, A. I. R.; SILVA, J. D.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Essential Oil from *Aniba riparia* (Nees) Mez. **J Essent Oil Res**, v. 14, p. 218-219, 2002.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta Ambient**, v. 8, n.1, p.195, 2001.

MELO, C. T. V.; CARVALHO, A. M. R.; MOURA, B. A.; TEIXEIRA, C. P. L.; VASCONCELOS, L. F.; FEITOSA, M. L.; OLIVEIRA, G. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CHAVEZ GUTIERREZ, J. C.; FONTELES, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; SOUSA, F. C. F. Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 27, p. 104-112, 2013.

MELO, C. T. V.; LIMA, V. T. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S.; SOUSA, F. C. F. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)- N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (Riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biol Pharm Bull**, v. 29, n. 3, p. 451-454, 2006.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiol Spectr**, v. 4, n. 2, 2016.

NASCIMENTO, O. A.; ESPÍRITO-SANTO, R. F.; OPRETZKA, L. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J.; VILLARREAL, C. F.; SOARES, M. B. Pharmacological Properties of Riparin IV in Models of Pain and Inflammation. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1-14, 2016.

OLIVEIRA, C. A.; BRODSKYN, C. I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Front Immunol**, v. 3, n. 145, 2012.

OLIVEIRA, L. F. G.; PEREIRA, B. A. S.; GILBERT, B.; CORRÊA, A. L.; ROCHA, L.; ALVES, C. R. Natural products and phytotherapy: an innovative perspective in leishmaniasis treatment. **Phytochem Rev**, v. 16, n. 2, p. 219-233, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Antibacterial agents in clinical development: An analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis**. Disponível em: < <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/258965/1/WHO-EMP-IAU-2017.11-eng.pdf?ua=1>>. Acesso em: 15 nov. 2017a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Antimicrobial resistance - Fact sheet**. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>>. Acesso em: 04 jun. 2017b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance**. In: Weekly epidemiological record v. 92, n. 38, p. 557–572, 2017c.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **AMR Review**, 2016.

PONTE-SUCRE, A.; GAMARRO, F.; DUJARDIN, J. C.; BARRETT, M. P.; VÉLEZ, R. L.; HERNÁNDEZ, R. G.; POUNTAIN, A. W.; MWENECHANYA, R.; PAPADOPOULOU, B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 12, 2017.

REIS-AVILA, G.; OLIVEIRA, J. M. Lauraceae: A promising family for the advance of neotropical Dendrochronology. **Dendrochronologia**, v. 44, 103–116, 2017.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! **Int Immunol**, v. 30, n. 3, p. 103-111, 2017.

SANTIAGO, R. F.; BRITO, T. V.; DIAS, J. M.; DIAS-JÚNIOR, G. J.; CRUZ-JUNIOR, J. S.; BATISTA, J. A.; SILVA, R. O.; SOUZA, M. H. L. P.; RIBEIRO, R. A.; GUTIERREZ, S. J. C.; FREITAS, R. M.; MEDEIROS, J. V. R.; BARBOSA, A. L. R. Riparin B, a Synthetic Compound Analogue of Riparin, Inhibits the Systemic Inflammatory Response and Oxidative Stress in Mice. **Inflammation**, v. 38, n. 6, p. 2203-2215 2015.

SILVA, R. O.; DAMASCENO, S. R. B.; SILVA, I. S.; SILVA, V. G.; BRITO, C. F. C.; TEIXEIRA, A. E. A.; NUNES, G. B. L.; CAMARA, C. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P.; BARBOSA, A. L. R.; FREITAS, R. M.; MEDEIROS, J. V. R. Riparin A, a compound from *Aniba riparia*, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. **Chem Biol Interact**, v. 229, p. 55–63, 2015.

SOONG, L.; HENARD, C. A; MELBY, P. C. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. **Semin Immunopathol**, v. 34, p. 735–751, 2012.

SOUSA, F. C. F.; CARVALHO, A. M. R.; LEITE, C. P.; ROCHA, N. F. M.; RIOS, E. R. V.; VASCONCELOS, L. F.; MELO, C. T. V.; LIMA, S. T.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, S. M. M. Anti-inflammatory activity of riparin II (N-2-hydroxybenzoyl tyramine) in rats. **Inflammat Res**, v. 60, p. 206-206, 2011.

SOUSA, F. C. F.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, M. F.; VIANA, G. S. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 78, n. 1, p. 27-33, 2004.

SOUSA, F. C. F.; LEITE, C. P.; MELO, C. T. V.; ARAÚJO, F. L. O.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B. Evaluation of effects of N-(2-hydroxybenzoyl)tyramine (riparin II) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in anxiety models in mice. **Biol Pharm Bull**, v. 30, p. 1212- 1216, 2007.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; BARBOSA FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios

nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Rev Bras Anal Clin**, v. 18, n. 4, p. 642-654, 2008.

SOUSA, F. C. F.; MONTEIRO, A. P.; MELO, C. T. V.; OLIVEIRA, G. R.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B. Antianxiety effects of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Phytother Res**, v. 19, p. 1005–1008, 2005.

SOUSA, F. C. F.; OLIVEIRA, I. C. M.; SILVA, M. I. G.; MELO, C. T. V.; SANTIAGO, V. R.; CHAVES, R. C.; FERNANDES, M. L.; GUTIERREZ, S. J. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; MACÊDO, D. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 28, p. 95–103, 2014.

TEIXEIRA, C. P. L.; MELO, C. T. V.; ARAÚJO, F. L. O.; CARVALHO, A. M. R.; SILVA, M. I. G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MACÊDO, D. S.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 27, p. 129–137, 2013.

THOMAS, G.; CASTELO-BRANCO, U. J. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BACHELET, M.; VARGAFTIG, B. B. Studies on the mechanism of spasmolytic activity of (O-methyl)-N-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine, a constituent of *Aniba riparia* (Nees) Mez. (Lauraceae), in rat uterus, rabbit aorta and guinea-pig alveolar leucocytes. **J Pharm Pharmacol**, v. 46, p. 103-107, 1994.

VASCONCELOS, A. S.; OLIVEIRA, I. C. M.; VIDAL, L. T. M.; RODRIGUES, G. C.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; GASPAR, D. M.; SOUSA, F. C. F. Subchronic administration of riparin III induces antidepressant-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus **Fundam Clin Pharmacol**, v. 29, p. 394–403, 2015.

VASCONCELOS, S. M. M.; VASCONCELOS, A. S.; OLIVEIRA, I. C. M.; RODRIGUES, F. A. P.; CASTRO, L. A.; PONTES, M. C. D.; AGUIAR, J. A. C.; LIMA, A. E. L.; GUTIERREZ, S. J. C.; SOUSA, F. C. F. Effects of riparins I and III on corticosterone-induced working and alerting memory impairment in mice. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 24, p. S270, 2014. Suplemento 2.

## Capítulo 1

Inibição da bomba de efluxo NorA de *Staphylococcus aureus*  
por riparinas sintéticas

## Capítulo 1: Inibição da bomba de efluxo NorA de *Staphylococcus aureus* por riparinas sintéticas

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de riparinas sintéticas, isolados ou em combinação com fluoroquinolonas, contra uma cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolonas devido a superexpressão da bomba de efluxo NorA. Os testes de microdiluição demonstraram que as Riparinas A e B não possuem significativa atividade antibacteriana contra as cepas de *S. aureus* testadas. Por outro lado, a atividade antibacteriana intrínseca aumentou com o aumento da lipofilicidade dos compostos, na seguinte ordem: Riparina D (CIM 256 µg/mL; Log P 2.95) < Riparina C (CIM 102 µg/mL; Log P 3.22) < Riparina E (CIM 32 µg/mL; Log P 3.57). O acréscimo de concentrações subinibitórias das Riparinas ao meio de cultura causou um aumento da atividade antibacteriana contra a cepa com superexpressão de NorA. A Riparina B, que tem dois grupos metoxila na porção fenil, teve o melhor efeito modulador. Riparina E é um bom agente antiestafilocócico, enquanto a Riparina B é um inibidor da bomba de efluxo NorA.

Palavras-Chave: Antibióticos, resistência, doenças infecciosas, fluoroquinolonas.

### 1. Introdução

As riparinas são alcanidas naturais encontradas nos frutos e cálice da *Aniba riparia*, uma espécie da família Lauraceae (BARBOSA-FILHO et al., 1987; TAKAKU et al., 2007). Várias atividades biológicas desses compostos foram descritas, em particular no sistema nervoso central, como atividade ansiolítica e antidepressiva (SOUSA et al., 2004; SOUSA et al., 2005; MELO et al., 2006; SOUSA et al., 2007). Foi também descrita atividade anti-inflamatória (CARVALHO et al., 2013) e antinociceptiva (ARAÚJO et al., 2009). As riparinas também possuem atividade antimicrobiana contra cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (CATÃO et al., 2005), além de modular a resistência a penicilina (CATÃO et al., 2010).



A extração e isolamento de compostos a partir de plantas medicinais normalmente apresenta um rendimento muito baixo e, por essa razão, foi pesquisada a síntese das riparinas. Com essa descoberta, a rota sintética tornou-se o principal meio de obtenção desse grupo de compostos e, vários análogos foram produzidos, sendo alguns destes as Riparinas A, B, C, D e E (BARBOSA-FILHO et al., 1990). Algumas atividades biológicas foram observadas nesses análogos, como atividade citotóxica e antioxidante *in vitro* (NUNES et al., 2014). Além disso, as salicilamidas sintéticas, que têm similaridade estrutural com as riparinas demonstraram bioatividade contra *Plasmodium falciparum* (FRITZSON et al., 2011).

O *S. aureus* resistente à metilicilina (MRSA) é um patógeno associado a várias doenças infecciosas adquiridas em ambiente hospitalar e comunitário em todo o mundo (RAZERA et al., 2009; SHITTU et al., 2009; SISIRAK et al., 2010). Alguns dos exemplos incluem infecções cutâneas e de tecidos moles, bacteremia, artrite séptica, osteomielite e pneumonia necrosante (SEYMOUR, 2009; OTTO, 2010). A terapia dessas infecções pode ser bastante complicada, pois muitas cepas MRSA são carreadoras de vários genes de resistência aos antibióticos (OTTO, 2012), incluindo aqueles codificantes de proteínas transmembrana conhecidas como bombas de efluxo, que promovem a extrusão de antibióticos da célula bacteriana (KUMAR; VARELA, 2012; ANDERSEN et al., 2015). As fluoroquinolonas têm sido utilizadas no tratamento de MRSA (BHOPALE 2014), mas a resistência a essa classe de antibióticos está ficando mais comum e disseminada (GADE; QAZI, 2013; LASTOURS et al., 2014).

A alta prevalência de doenças infecciosas causadas por bactérias multirresistentes tem levado a uma busca por novos antibióticos (CÉLIZ et al., 2011; DUDA-CHODAK, 2012; KUMAR; CHOPRA, 2013) ou em esforços para melhorar a eficácia dos antibióticos disponíveis de uso corrente (LAXMINARAYAN, 2014). A resistência a fluoroquinolonas é frequentemente mediada por bombas de efluxo capazes de expulsar esses antibióticos da célula bacteriana (COSTA et al., 2013). Terapias de combinação de antibióticos associados a inibidores da bomba de efluxo (*Efflux Pump Inhibitor*, EPI) podem ser uma estratégia inovadora para reverter a resistência antibacteriana mediada por bombas de efluxo (SCHINDLER et al., 2013; BHARATE et al., 2015; CHOVANOVÁ et al., 2015).

Estudos anteriores evidenciam que metabólitos secundários oriundos de plantas, incluindo flavonoides (WANG et al., 2014), flavonas (CHAN et al., 2011), cumarinas (ROY et al., 2013; JOSHI et al., 2014), acil floroglucinóis (SHIU et al., 2013), curcuminoides (JOSHI et al., 2014) e alcaloides (MARKHAN et al., 1999) podem ser inibidores em potencial da NorA, um transportador multidrogas (bomba de efluxo) de *S. aureus*. Neste trabalho, foi feita a avaliação da atividade antimicrobiana dos análogos sintéticos das riparinas contra *S. aureus*

isoladamente ou em combinação com fluoroquinolonas, de forma a avaliar o potencial daqueles como inibidores da NorA.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Soluções

A norfloxacin e a ciprofloxacina foram adquiridas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Os antibióticos foram dissolvidos em água destilada esterilizada. Soluções estoque de N-fenetilbenzamida (Riparina A), N-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)etil]-benzamida (Riparina B), 2-hidroxi-N-fenetilbenzamida (Riparina C), 2-hidroxi-N-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)etil]-benzamida (Riparina D) e 2,6-dihidroxi-N-fenetilbenzamida (Riparina E) foram preparadas em Dimetilsulfóxido (DMSO – MERCK) puro e, posteriormente diluídas em água destilada estéril nas concentrações de 1.024 (10% DMSO; Rip-A, Rip-C e Rip-D) ou 4.096 µg/mL (40% DMSO; Rip-B e Rip-E).

### 2.2 Cepas bacterianas e condições de crescimento

Todos os testes foram realizados com *S. aureus* SA-1199B, que superexpressa o gene *norA* codificante da proteína NorA. Esta pode realizar o efluxo de fluoroquinolonas hidrofílicas e outras drogas como corantes intercalantes de DNA (KAATZ; SEO, 1993). A cepa SA-1199, que expressa *norA* em um nível basal foi usada como controle negativo para os testes de modulação e de efluxo de brometo de etídio (KAATZ; SEO, 1995). *S. aureus* ATCC 25923 foi usada como controle somente nos ensaios de avaliação de atividade antibacteriana intrínseca. As cepas foram mantidas em placas de ágar nutriente (Himedia, Índia) a 4 °C. Antes do uso em testes as bactérias foram incubadas *overnight* a 37°C em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI, Himedia, Índia).

### 2.3 Avaliação da atividade antibacteriana intrínseca

Soluções estoque de Riparina A, B, C, D e E (10 mg/mL cada uma) foram preparadas em DMSO e, em seguida, foram diluídas em água destilada esterilizada até concentração final de 1.024 ou 4.096 µg/mL. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram determinadas

pelo teste de microdiluição (CLSI, 2013), utilizando caldo BHI (BARRETO et al., 2014) e suspensões bacterianas de aproximadamente  $10^5$  UFC/mL e as soluções de cada riparina com concentrações variando desde 2.048 a 8  $\mu\text{g/mL}$ . As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h e, então, foram acrescidos 20  $\mu\text{L}$  de resazurina (0,01% m/v em água destilada estéril) a cada poço para detectar crescimento bacteriano (HUSSAIN et al., 2011) pela mudança da cor do azul para o róseo. Os CIM foram definidos como a concentração mais baixa na qual não foi observado crescimento bacteriano.

#### 2.4 Teste de modulação da atividade antibiótica

Para a avaliação das riparinas como moduladores da resistência a fluoroquinolonas, os CIM de norfloxacin e ciprofloxacina foram determinados na presença e na ausência de concentrações subinibitórias (1/8 CIM) de cada composto (COUTINHO et al., 2010). As concentrações dos antibióticos ou do brometo de etídio (EtBr) variaram de 0,125 a 128  $\mu\text{g/mL}$ . As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h e as leituras foram feitas com resazurina como descrito anteriormente.

#### 2.5 Ensaio de efluxo de brometo de etídio

O potencial das riparinas como EPI (efflux pump inhibitor; inibidor de bomba de efluxo) foi avaliado utilizando um método semi-automatizado (KAATZ et al., 2000) com modificações. As cepas SA-1199B e SA-1199 foram cultivadas em 2,0 mL de caldo BHI até que foi atingida a densidade óptica de 600 nm, seguida de centrifugação a 5.000 g por cinco minutos. Os precipitados foram ressuspensos em 2,0 mL de salina. As suspensões bacterianas foram homogeneizadas no vórtex e transferidas a uma placa de 96 poços seguida pela adição de solução salina contendo EtBr (8,0  $\mu\text{g/mL}$ ) e Riparina B (128 ou 256  $\mu\text{g/ml}$ ). Uma suspensão bacteriana contendo somente EtBr (8,0  $\mu\text{g/mL}$ ) foi usada como controle positivo. O branco para cada teste foi preparado em solução salina. A fluorescência relativa relacionada à acumulação de EtBr pela bactéria foi lida no termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System™ (Applied Biosystems) após 60 min. A fluorescência relativa final (FFR) das amostras foi calculada pela subtração dos valores dos respectivos brancos. Diferenças de FFR entre os poços com os compostos testados e os do controle positivo foram consideradas indicativas de atividade do composto de inibir o efluxo de EtBr.

## 2.6 Distribuição das espécies e estimativa do Log P

A estimativa da distribuição das diferentes espécies das riparinas estudadas em equilíbrio ( $\text{RH}_2^+ \rightleftharpoons \text{RH} \rightleftharpoons \text{R}^-$ ) como uma função do pH e Log P foram feitas usando os programas ACD/LabD e ACD/LogP (Advanced Chemistry Development Inc. 1994-2002). O Log P foi calculado no pH=7 para a molécula neutra (RH) devido à variação típica de pka das hidroxilas aromáticas, que é cerca de 8,0-10,0. A distribuição das espécies em relação ao pH (0 a 14) também foi calculada no mesmo programa para todos os compostos estudados para corroborar que no pH fisiológico as espécies neutras predominam.

## 2.7 Predição da estrutura de NorA e ancoragem molecular

Todos os estudos de ancoragem foram feitos no programa de modelagem molecular Schrodinger Suite 2015. A estrutura bidimensional de Rip-B foi construída com Maestro. A estrutura foi convertida em sua forma tridimensional, incluindo vários tautômeros, conformações e estados de ionização usando as funções LigPrep e ConfGen. Um modelo tridimensional da proteína NorA foi construído usando ITASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). O modelo melhor avaliado foi usado como receptor na ancoragem receptor-ligante. O receptor foi preparado para ancoragem empregando o *Protein Preparation Wizard*, e o sítio de ligação foi gerado. A ancoragem receptor-ligante foi feita com o módulo Glide e, então, realizou-se a ancoragem flexível para todas as conformações para determinar a afinidade do ligante ao receptor. A função *Extra Precision scoring* foi aplicada.

## 2.8 Análise estatística

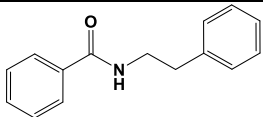
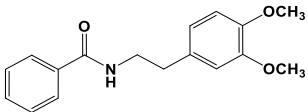
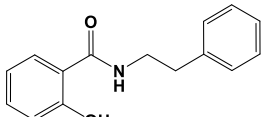
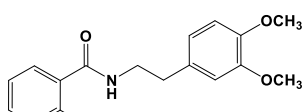
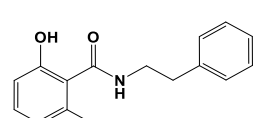
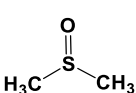
Os experimentos foram feitos em triplicata e os resultados foram normalizados por meio do cálculo da média geométrica das três repetições. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 5.02. Diferenças entre os tratamentos com os antibióticos na ausência ou presença dos compostos-teste foram avaliadas pelo método de análise de variância *One-way*. A significância das diferenças foi determinada pelo pós-teste de Bonferroni, e foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1 Atividade antibacteriana intrínseca

A atividade antibacteriana intrínseca das riparinas foi testada pelo método de microdiluição contra cepas de *S. aureus* e os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM) das riparinas testadas contra cepas de *S. aureus* e seus respectivos valores teóricos de Log P

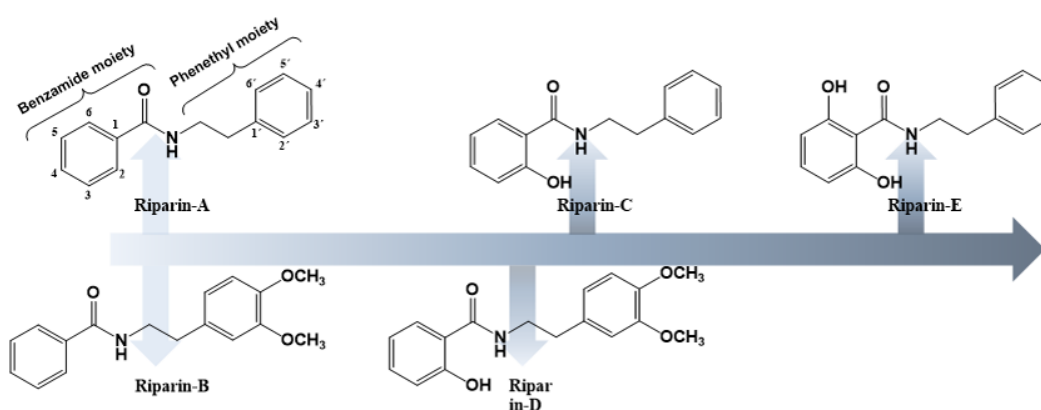
Compostos	Estrutura química	Log P	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) *	
			SA-1199B	ATCC 25923
Rip-A		2,87	$\geq 1.024$	$\geq 1.024$
Rip-B		2,61	1.024	1.024
Rip-C		3,22	102	102
Rip-D		2,95	256	813
Rip-E		3,57	32	25
DMSO		-	2.048	2.048

\*Média geométrica de três experimentos simultâneos.

Rip-A, o núcleo fundamental das riparinas, bem como Rip-B não demonstraram atividade antibacteriana contra as cepas testadas (HOLETZ et al., 2002), enquanto Rip-D teve um efeito inibitório moderado. Por outro lado, Rip-C e Rip-E, os análogos mais lipofílicos, tiveram um bom efeito inibitório (Tabela 1 e Figura 1). A atividade antimicrobiana intrínseca das riparinas contra *S. aureus* e *Escherichia coli* foi descrita anteriormente (CATÃO et al., 2005). Neste estudo, verificou-se que o nível de atividade está ligado às diferentes estruturas químicas e lipofilicidade de cada análogo sintético.

Riparinas com uma hidroxila em C2 (Ripar-C) ou duas hidroxilas em C2 e C6 (Ripar-E) apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus*, indicando que a adição de grupamentos hidroxila na porção benzamida aumenta a reatividade desses compostos com biomoléculas bacterianas, portanto, melhorando sua atividade contra *S. aureus* (itens 3 e 5 na Tabela 1 e Figura 1). Por outro lado, não foi observado efeito inibitório para Ripar-B, sugerindo que a presença de dois grupamentos metóxi nos carbonos C3 e C4 da porção fenetil não modificou sua atividade intrínseca contra *S. aureus* (item 2, Tabela 1). A presença de grupos metóxi (em C3 e C4 da porção fenetil) também atenuou a atividade antibacteriana de Ripar-D. Esses resultados indicam que grupamentos metóxi ligados à porção fenetil das riparinas é um fator que reduz a atividade antibacteriana intrínseca desses compostos contra *S. aureus* (Figura 1).

Figura 1: Diferenças estruturais e atividade antimicrobiana qualitativa das riparinas sintéticas contra *S. aureus* SA-1199B.



A distribuição das espécies (catiônica, aniônica ou neutra) das riparinas foi calculada a valores de pH de 0,0 a 14,0, para verificar quais espécies predominam, onde estas irão executar suas ações farmacológicas, e se são capazes de interagir com a membrana celular. Em todos os

casos, as estruturas neutras das riparinas predominaram na faixa de pH de 6,5 a 7,5. Esse resultado é pertinente porque a permeabilidade da membrana celular bacteriana é fortemente dependente da polaridade das moléculas e pH médio. Apenas para as riparinas hidroxiladas (Rip-C, Rip-D e Rip-E), as espécies mono-ionizadas aniônicas se tornam significativas em pH superior a 9,5. Isso permite concluir que mesmo que haja mudanças de pH ( $\text{pH } 7,0 \pm 1,0$ ), as espécies predominantes continuarão as mesmas.

Estudos de lipofilicidade são relevantes para saber se a molécula pode interagir com membranas celulares. O valor de Log P do metoprolol ( $\text{Log P} = 1,72$ ), que é 95% absorvido no trato intestinal, é usado como referência na estimativa da permeabilidade de várias drogas (KASIM et al., 2004). Considerando este composto como referência, o Log P de todas as riparinas estudadas foi calculado (Tabela 1). Todas apresentaram valores entre 2,61 e 3,57, demonstrando características bastante hidrofóbicas.

Compostos hidrofóbicos podem intercalar a membrana plasmática, afetando a cadeia respiratória e a produção de energia (NICOLSON et al., 1999). Esses compostos também podem aumentar a permeabilidade da membrana celular, levando à perda de íons inorgânicos como  $\text{K}^+$  (SOUZA et al., 2013). Os resultados deste estudo confirmam essa observação, já que mostraram que a atividade antimicrobiana intrínseca é mais expressiva nos compostos mais lipofílicos (Tabela 1). Isso indica que a atividade antimicrobiana intrínseca de riparinas hidroxiladas pode estar relacionada à lesão da membrana celular.

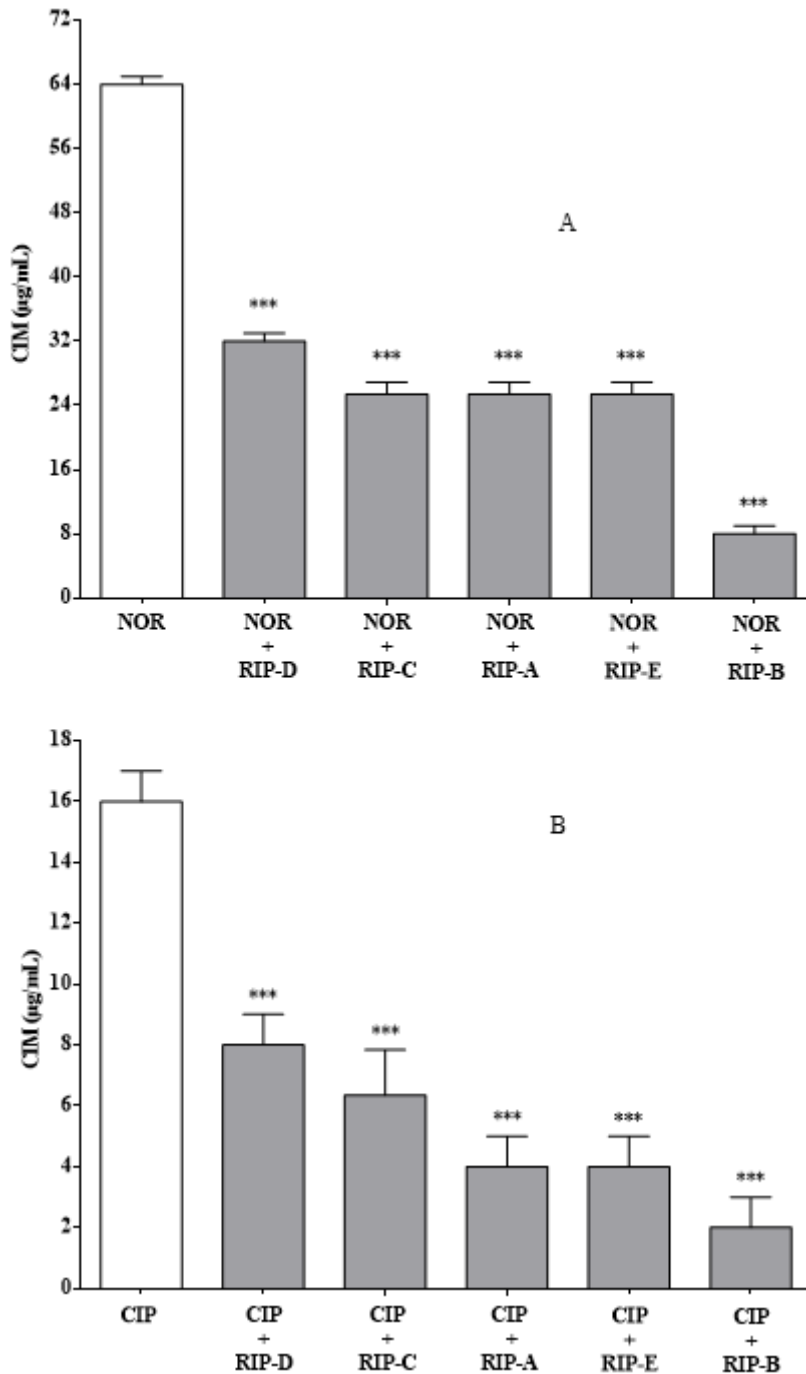
### 3.2 Modulação da atividade antibiótica

A atividade moduladora dos compostos sobre a resistência a norfloxacin e ciprofloxacina foi avaliada com as cepas SA-1199 e SA-1199B, que são, respectivamente, a cepa selvagem e a que superexpressa norA. Essa atividade é atribuída aos compostos teste que quando adicionados em concentração subinibitória ao meio de cultura são capazes de diminuir o CIM da ciprofloxacina, norfloxacin ou EtBr, indicando modulação da resistência a esses agentes antibacterianos.

Todas as riparinas apresentaram modulação da atividade de norfloxacin e ciprofloxacina (Figura 2), sendo Rip-B a mais ativa. Somente Rip-B demonstrou atividade moduladora sobre EtBr, que é sabidamente um substrato da bomba NorA (Figura 3). Por outro lado, não foi observada mudança do CIM quando os antibióticos foram testados, sozinhos ou

em combinação com as riparinas, contra a cepa SA-1199 (o CIM para norfloxacina e ciprofloxacina foi 0,5 µg/mL; na presença das riparinas variou de 0,25 a 0,5 µg/mL).

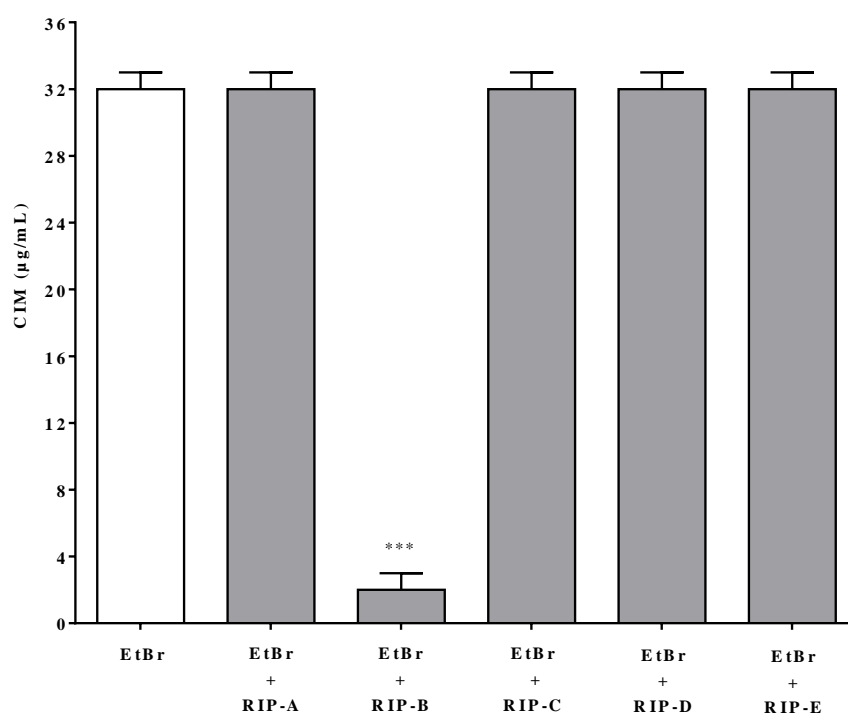
Figura 2: Valores da Concentração Inibitória Mínima (médias geométricas de três experimentos simultâneos) de norfloxacina (A) e ciprofloxacina (B) na ausência e na presença dos análogos de riparinas para *Staphylococcus aureus* SA-1199B. \*\*\*Valores com diferença significativa em relação ao grupo NOR ( $p < 0,001$ ).





Foi verificado um efeito modulador da atividade de antibióticos fluoroquinolonas, aumentando sua atividade contra SA-1199B, com todas as riparinas. Rip-B diminuiu significativamente o CIM de norfloxacina e ciprofloxacina para a cepa testada, modificando o fenótipo de resistente para moderadamente resistente. Nesse contexto, os testes de modulação foram conduzidos na presença e ausência de cada riparina para determinar se seu efeito modulador foi consequência da inibição de NorA. Somente Rip-B foi capaz de reduzir o CIM de EtBr contra SA-1199B (Figura 3), sugerindo que esse composto poderia ser um potencial EPI.

Figura 3: Valores da Concentração Inibitória Mínima (médias geométricas de três experimentos simultâneos) de brometo de etídio na ausência e na presença dos análogos de Riparinas para *Staphylococcus aureus* SA-1199B. \*\*\*Valores com diferença significativa em relação ao grupo EtBr ( $p < 0,001$ ).

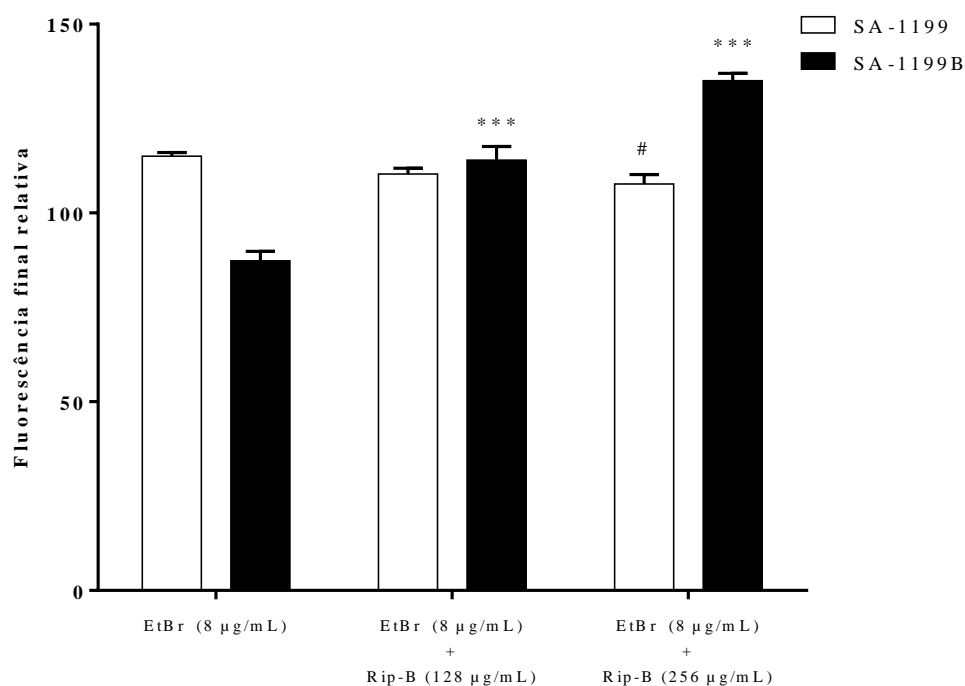


### 3.3 Inibição do efluxo de brometo de etídio por Rip-B

Para verificar se Rip-B foi uma EPI para NorA, foram feitos ensaios de inibição do efluxo usando tanto SA-1199 e SA-1199B (Figura 4). EtBr fluoresce apenas após intercalar o DNA bacteriano e, dessa forma, um aumento na fluorescência é um indicador de acúmulo

intracelular devido à inibição do efluxo. A adição de concentrações subinibitórias de Rip-B causou um acúmulo significativo de EtBr na cepa SA-1199B, que pode ser observado pelo aumento no sinal de fluorescência como resultado da intercalação de EtBr na dupla hélice de DNA (Figura 4). Esse efeito inibitório foi similar ao encontrado para reserpina, um inibidor da NorA (Brincat et al., 2011). Por outro lado, o acúmulo intracelular de EtBr em SA-1199 não se modifica tanto na ausência quanto na presença de Rip-B.

Figura 4. Efeito de Rip-B no acúmulo de EtBr para as cepas SA-1199 ou SA-1199B de *S. aureus*. As suspensões bacterianas foram incubadas com EtBr (8 µg/ml) na ausência e na presença de concentrações crescentes de Rip-B por 60 minutos a 37°C. #Diferença estatística em relação ao grupo EtBr (SA-1199), com  $p < 0,05$ ; \*\*\* Diferença estatística em relação ao grupo EtBr (SA-1199B), com  $p < 0,001$ .



Portanto, o análogo di-metoxilado Rip-B mostrou possuir o maior efeito modulador quando associado com as fluoroquinolonas empregadas e foi capaz de inibir o efluxo de EtBr em uma cepa de *S. aureus* com superexpressão de norA. Esses resultados permitem concluir que a inibição de NorA por Rip-B teve maior influência da di-metoxilação da porção fenetil do que a hidroxilação da porção benzamida das riparinas. Em outras palavras, a ausência de grupos metoxila (Rip-A, Rip-C e Rip-E) ou a presença de hidroxilas (Rip-C, Rip-D e Rip-E) diminuem

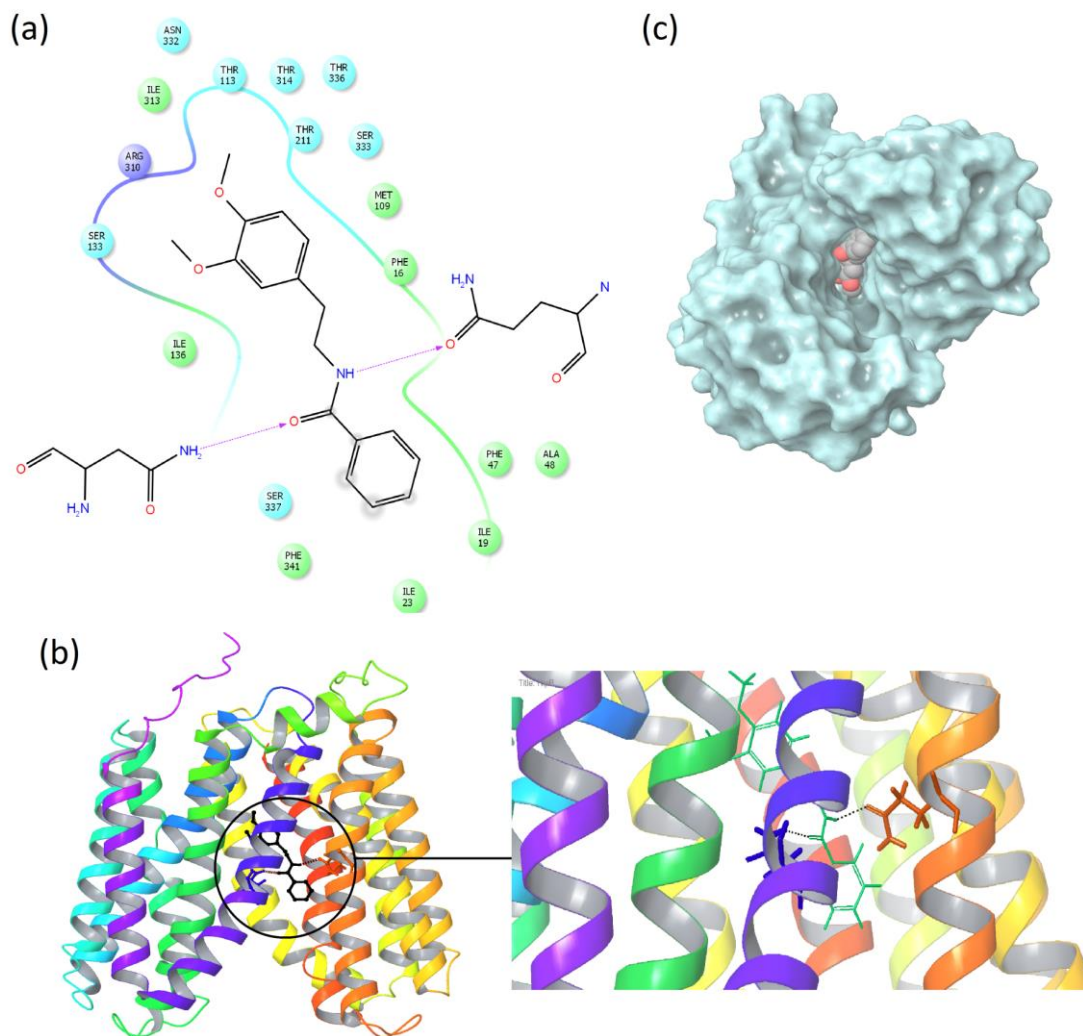
o efeito das riparinas como EPI (Figura 5), sendo Rip-B a única capaz de reduzir o CIM de EtBr contra SA-1199B.

Compostos metoxilados têm sido descritos como moduladores da resistência antimicrobiana (SILVA et al., 2009; GOMES et al., 2011). A inclusão de grupos metoxila em flavonas aumentou tanto a lipofilicidade quanto o efeito modulador da resistência a fluoroquinolonas em SA1199-B (MAIA et al., 2011). A lipofilicidade de Rip-B (Log P 2,61) foi similar à descrita por esses pesquisadores para o 40,5,6,7-tetrametoxiflavona (Log P 2,57). A lesão celular causada pela intercalação de compostos lipofílicos pode inibir sistemas de efluxo dependentes da força próton-motora, como NorA, levando ao acúmulo de antibióticos na célula bacteriana (HOLLER et al., 2012). Além disso, hidrofobicidade é um requisito importante na garantia da afinidade de um composto com bombas de efluxo, inclusive NorA (NORA et al., 2012). Entretanto, lipofilicidade não é o único fator envolvido na inibição de NorA, já que algumas riparinas com maior lipofilicidade que Rip-B não modularam a resistência a EtBr (Tabela 1). Assim, outras características estruturais das riparinas podem estar envolvidas na interação molecular superior entre Rip-B e componentes de membrana celular como a proteína NorA.

#### 3.4 Ancoragem molecular de Rip-B no sítio ativo de NorA

O estudo de ancoragem molecular de Rip-B com NorA mostrou que Rip-B se encaixa na cavidade formada por ILE19, ILE23, PHE26, PHE47, ALA48, GLN51, MET109, THR113, SER133, ILE136, THR211, ARG310, ILE313, THR314, ASN332, SER333, THR336, SER337, ASN340, PHE341 (Figura 5). O grupamento amida de Rip-B também foi capaz de formar uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio da cadeia lateral amida do resíduo ASN340 e o nitrogênio da amida de GLN51.

Figura 5. (a) Interação de Rip-B no sítio de ligação da NorA. A formação de ligações de hidrogênio entre Rip-B, GLN51 e ASN340 confere estabilidade ao complexo proteína/ligante. (b) Orientação relativa dos sítios de ligação em relação às hélices transmembrana da projeção tridimensional de NorA. (c) Orientação de Rip-B dentro do sítio de ligação (visão girada). Rip-B está ligada à cavidade central da proteína.



Os resultados da ancoragem de Rip-B e NorA mostram que a orientação de Rip-B dentro do sítio de ligação estendendo à da fenda hidrofóbica, é o mesmo sítio de ligação de outros inibidores da NorA (ZHANG et al., 2014). O grupamento amida de Rip-B também formou uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio da cadeia lateral amida de ASN340 e o nitrogênio de GLN51 (Figura 6). Múltiplos alinhamentos de sequência de NorA com outras proteínas pertencentes à Superfamília do Facilitadores Majoritários (MFS) mostraram que GLN51 e ASN340 estão dentro de um domínio conservado da família de transportadores MFS (KALIA

et al., 2012). Apesar de não existir estudos de mutação dirigida pelo local desses resíduos confirmando seu papel na proteína, vários estudos de ancoragem mostraram sua importância nas interações com diversos ligantes (KALIA et al., 2012; THAI et al., 2015).

Considerando todos os resultados, as riparinas tem um potencial promissor na modulação da resistência a fluoroquinolonas. Uma delas foi capaz de aumentar o influxo de antibióticos, pela interação com componentes permeabilizadores da membrana. É possível que este mecanismo esteja envolvido nos casos em que os análogos das riparinas não foram capazes de modular a resistência ao EtBr, apesar terem modulado a resistência às fluoroquinolonas. Por outro lado, Rip-B demonstrou um efeito modulador relevante, bem como inibiu o efluxo de EtBr de forma significativa, dois achados que corroboram com os parâmetros obtidos na ancoragem, fortalecendo a conclusão que Rip-B é um EPI. É possível que esse efeito modulador seja causado pela competição dinâmica entre Rip-B e o antibiótico durante o transporte pela bomba de efluxo ou pela inibição do funcionamento da bomba, por meio da ligação do agente modulador dentro da cavidade da bomba de efluxo.

Do ponto de vista molecular, Rip-E e Rip-B aparentam ser os agentes mais completos, com um deles possuindo a melhor atividade antimicrobiana intrínseca e a outra melhor atividade como EPI, respectivamente. Embora Rip-B não apresente atividade antimicrobiana intrínseca contra *S. aureus*, é um promissor adjuvante para fluoroquinolonas no tratamento de infecções causadas por cepas de *S. aureus* que superexpressem bomba de efluxo NorA. Entretanto, são necessários estudos adicionais para verificar sua eficácia *in vivo* quando administrada em associação com fluoroquinolonas.

## Referências

ANDERSEN, J. L.; HE, G. -X.; KAKARLA, P.; KC, R.; KUMAR, S.; LAKRA, W. S.; MUKHERJEE, M. M.; RANAWEERA, I.; SHRESTHA, U.; TRAN, THUY; VARELA, M.F. Multidrug efflux pumps from Enterobacteriaceae, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens. **Int J Environ Res Public Health**, v. 12, p. 1487–1547, 2015.

ARAÚJO, F. L. O.; MELO, C. T. V.; ROCHA, N. F. M.; MOURA, B. A.; LEITE, C. P.; AMARAL, J. F.; BARBOSA FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; VASCONCELOS, S. M. M; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyltyramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 380, p. 337–344, 2009.

BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; BARBOSA, R. C. S. B. C.; GIESBRECHT, A. M.; YOUNG, M. C. M. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2615–2617, 1987.

- BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. C.; BHATTACHARYYA, J. Synthesis of several new henylethylamines of substituted benzoic acids. **Quim Nov**, v. 13, p. 332–334, 1990.
- BARRETO, H. M.; FONTINELE, F. C.; OLIVEIRA, A. P.; ARCANJO, D. D. R.; SANTOS, B. H. C.; ABREU, A. P. L.; COUTINHO, H. D. M.; SILVA, R. A. C.; SOUSA, T. O.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. Phytochemical prospection and modulation of antibiotic activity in vitro by *Lippia organoides* H.B.K. in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **BioMed Res Int**, v. 2014, p. 1–7, 2014.
- BHARATE, J. B.; SINGH, S.; WANI, A.; SHARMA, S.; JOSHI, P.; KHAN, I. A.; KUMAR, A.; VISHWAKARMA, R. A.; BHARATE, S. B. Discovery of 4-acetyl-3-(4-fluorophenyl)-1-(p-tolyl)-5-methylpyrrole as a dual inhibitor of human P-glycoprotein and *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump. **Org. Biomol Chem**, v. 13, p. 5424–5431, 2015.
- BHOPALE, G.M. Importance of Fluoroquinolones in Human Healthcare: A Comprehensive Review. **IJPSR**, v. 5, p. 5097–5103, 2014.
- BRINCAT, J. P.; CAROSATI, E.; SABATINI, S.; MANFRONI, G.; FRAVOLINI, A.; RAYGADA, J. L.; PATEL, D.; KAATZ, G. W.; CRUCIANI, G. Discovery of novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. **J Med Chem**, v. 54, p. 354–65, 2011.
- CARVALHO, A.M.R.; ROCHA, N.F.M.; VASCONCELOS, L.F.; RIOS, E.R.V.; DIAS, M.L.; SILVA, M.I.G.; FONTELES, M.M.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; SOUSA, F.C.F. Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. **Chem Biol Interact**, v. 205, p. 165–172, 2013.
- CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. Avaliação da atividade antimicrobiana de Riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. **Rev Bras Anal Clin**, v. 37, p. 247–249, 2005.
- CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; ARRUDA, T. A.; MIRANDA, R. P. A. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Rev Bras Anal Clin**, v. 42, p. 9–14, 2010.
- CÉLIZ, G.; DAZ, M.; AUDISIO, M. C. Antibacterial activity of naringin derivatives against pathogenic strains. **J Appl Microbiol**, v. 111, p. 731–738, 2011.
- CHAN, B. C. L.; IP, M.; LAU, C. B. S.; LUI, S. L.; JOLIVALT, C.; GANEM-ELBAZ, C.; LITAUDON, M.; REINER, N.E.; GONG, H.; SEE, R. H.; FUNG, K. P.; LEUNG, P. C. Synergistic effects of baicalein with ciprofloxacin against NorA overexpressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and inhibition of MRSA pyruvate kinase. **J Ethnopharmacol**, v. 137, p. 767–773, 2011.
- CHOVANOVÁ, R.; MEZOVSKÁ, J.; VAVERKOVÁ, Š.; MIKULÁŠOVÁ, M. The inhibition the Tet(K) efflux pump of tetracycline resistant *Staphylococcus epidermidis* by essential oils from three *Salvia* species. **Lett Appl Microbiol**, v. 61, p. 58–62, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: CLSI. 2013

COSTA, S. S.; VIVEIROS, M.; AMARAL, L.; COUTO, I. Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. **Open Microbiol J**, v. 7, p. 59–71, 2013.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; LIMA, E. O. Potentiation of antibiotic activity by *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum*. **J. Med. Food**, v. 13, p. 1024–1026, 2010.

DUDA-CHODAK, A. The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota. **J Physiol Pharmacol**, v. 63, p. 497–503, 2012.

FRITZSON, I.; BEDINGFIELD, P. T. P.; SUNDIN, A. P.; MCCONKEY, G.; NILSSON, U. J. N-substituted salicylamides as selective malaria parasite dihydroorotate dehydrogenase inhibitors. **Med Chem Commun**, v. 2, p. 895–898, 2011.

GADE, N.; QAZI, M. Fluoroquinolone therapy in *Staphylococcus aureus* infections: Where do we stand? **J Lab Physicians**, v. 5, p. 109–112, 2013.

GOMES, R. A.; RAMIREZ, R. R. A.; MACIEL, J. K. S.; AGRA, M. D. F.; SOUZA, M. DE F. V. Phenolic Compounds from *Sidastrum micranthum* (A. St.-Hil.) Fryxell and Evaluation of acacetin and 7,4'-di-*o*-methylisoscutearein as modulators of bacterial drug resistance. **Quim Nov**, v. 34, p. 1385–1388, 2011.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027–1031, 2002.

HOLLER, J. G.; SLOTVED, H. C.; MOLGAARD, P.; OLSEN, C. E.; CHRISTENSEN, S. B. Chalcone inhibitors of the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus* whole cells and enriched everted membrane vesicles. **Bioorg Med Chem**, v. 20, p. 4514–4521, 2012.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; NIGAM, P. S.; SARKER, S. D.; MOORE, J. E.; RAO, J. R.; MAZUMDAR, A. Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. **Food Sci Technol**, v. 44, p. 1199–1206, 2011.

JOSHI, P.; SINGH, S.; WANI, A.; SHARMA, S.; JAIN, S. K.; SINGH, B.; GUPTA, B. D.; SATTI, N. K.; KOUL, S.; KHAN, I. A.; KUMAR, A.; BHARATE, S. B.; VISHWAKARMA, R. A. Osthol and curcumin as inhibitors of human Pgp and multidrug efflux pumps of *Staphylococcus aureus*: reversing the resistance against frontline antibacterial drugs. **Med Chem Comm**, v. 5, p. 1540–1547, 2014.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 37, p. 1086–1094, 1993.

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

KAATZ, G. W.; SEO, S. M.; BRIEN, L. O.; FOSTER, T. J.; WAHIDUZZAMAN, M. Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, p. 1404–1406, 2000.

KALIA, N. P.; MAHAJAN, P.; MEHRA, R.; NARGOTRA, A.; SHARMA, J. P.; KOUL, S.; KHAN, I. A. Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, p. 2401–2408, 2012.

KASIM, N. A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNA, H.; HUSSAIN, A. S.; JUNGINGER, H. E. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. **Mol Pharm**, v. 1, p. 85–96, 2004.

KUMAR, S.; VARELA, M. F. Biochemistry of Bacterial Multidrug Efflux Pumps. **Int J Mol Sci**, v. 13, p. 4484–4495, 2012.

KUMAR, K.; CHOPRA, S. New drugs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an update. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, p. 1465–1470, 2013.

LASTOURS, V.; CHAU, F.; ROY, C.; LARROQUE, B.; FANTIN, B. Emergence of quinolone resistance in the microbiota of hospitalized patients treated or not with a fluoroquinolone. **J Antimicrob Chemother**, v. 69, p. 3393–3400, 2014.

LAXMINARAYAN, R. Antibiotic effectiveness: balancing conservation against innovation. **Science**, v. 345, p. 1299–1301, 2014.

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

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

MELO, C. T. V.; MONTEIRO, A. P.; LEITE, C. P.; ARAÚJO, F. L. O.; LIMA, V. T. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biol Pharm Bull**, v. 29, p. 451–454, 2006.

NICOLSON, K.; EVANS, G.; O'TOOLE, P. W. Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. **FEMS Microbiol Lett**, v. 179, p. 233–239, 1999.

NORA, S.; BRINCAT, J. P.; BROCCATELLI, F.; SABATINI, S.; FROSINI, M.; NERI, A.; KAATZ, G. W.; CRUCIANI, G.; CAROSATI, E. Ligand promiscuity between the efflux pumps human P-glycoprotein and *S. aureus* NorA. **ACS Med Chem Lett**, v. 3, p. 248–251, 2012.



NUNES, G. B. L.; POLICARPO, P. R.; COSTA, L. M.; SILVA, T. G.; MILITÃO, G. C. G.; CÂMARA, C. A.; BARBOSA FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; ISLAM, M. T.; FREITAS, R. M. In Vitro Antioxidant and Cytotoxic Activity of Some Synthetic Riparin-Derived Compounds. **Molecules**, v. 19, p. 4595–4607, 2014.

OTTO, M. Basis of Virulence in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Annu Rev Microbiol**, v. 64, p. 143–162, 2010.

OTTO, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with increased mortality. **Futur Microbiol**, n. 7, p. 189–91, 2012.

RAZERA, F.; STEFANI, S.; BONAMIGO, R. R.; OLM, G. S.; DIAS, C. A. G.; NARVAEZ, G. A. CAMRSA em furunculose: Relato de caso do sul do Brasil. **An Bras Dermatol**, v. 84, p. 515–518, 2009.

ROY, S. K.; KUMARI, N.; PAHWA, S.; AGRAHARI, U. C.; BHUTANI, K. K.; JACHAK, S. M.; NANDANWAR, H. NorA efflux pump inhibitory activity of coumarins from *Mesua ferrea*. **Fitoterapia**, v. 90, p. 140–150, 2013.

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

SEYMOUR, P. Hospital-Acquired and Community- Acquired MRSA. **Emerg Med**, v. 41, 36–41. (2009)

SHITTU, A.; NÜBEL, U.; UDO, E.; LIN, J.; GAOGAKWE, S. Characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals in KwaZulu-Natal province, Republic of South Africa. **J Med Microbiol**, v. 58, p. 1219–1226, 2009.

SHIU, W. K. P.; MALKINSON, J. P.; RAHMAN, M. M.; CURRY, J.; STAPLETON, P.; GUNARATNAM, M.; NEIDLE, S.; MUSHTAQ, S.; WARNER, M.; LIVERMORE, D. M.; EVANGELOPOULOS, D.; BASAVANNACHARYA, C.; BHAKTA, S.; SCHINDLER, B. D.; SEO, S. M.; COLEMAN, D.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S. A new plant-derived antibacterial is an inhibitor of efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 42, p. 513–518, 2013.

SILVA, D. A.; FALCÃO-SILVA, V. S.; GOMES, A. Y. S.; COSTA, D. A.; LEMOS V. S.; AGRA, M. F.; BRAZFILHO, R.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; SOUZA, M. F. V. Triterpenes and phenolic compounds isolated from the aerial parts of *Herissantia tiubae* and evaluation of 5,4,-dihydroxy-3,6,7,8,3- pentamethoxyflavone as a modulator of bacterial drug resistance. **Pharm Biol**, v. 47, p. 279–284, 2009.

SISIRAK, M.; ZVIZDIC, A.; HUKIC, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as a cause of nosocomial wound infections. **Bosn J Basic Med Sci**, v. 10, p. 32–37, 2010.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; MONTEIRO, A. P.; LIMA, V. T. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; PEREIRA, B. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES,

M. F., VIANA, G. S. B. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 78, p. 27–33, 2004.

SOUSA, F. C. F.; MONTEIRO, A. P.; MELO, C. T. V.; OLIVEIRA, G. R.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. D. F.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VIANA, G. S.B. Antianxiety Effects of Riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in Mice. **Phytother Res**, v. 19, p. 1005–1008, 2005.

SOUSA, F. C. F.; LEITE, C. P.; MELO, C. T. V.; ARAÚJO, F. L. O.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S.B. Evaluation of effects of N-(2-hydroxybenzoyl) tyramine (riparin II) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauracea) in anxiety models in mice. **Biol Pharm Bull**, v. 30, p. 1212–1216, 2007.

SOUZA, E. L.; OLIVEIRA, C. E. V.; STAMFORD, T. L. M.; CONCEIÇÃO, M. L.; GOMES NETO, N. J. Influence of carvacrol and thymol on the physiological attributes, enterotoxin production and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **Brazilian J Microbiol**, v. 44, p. 29–35, 2013.

TAKAKU, S.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. **Biochem Syst Ecol**, v. 35, p. 525–532, 2007.

THAI, K.; NGO, T.; PHAN, T.; TRAN, T.; NGUYEN, N.; NGUYEN, T.; LE, M. Virtual screening for novel *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors from natural products. **Med Chem**, v. 11, p. 135–155, 2015.

WANG, S.-Y.; SUN, Z.-L.; LIU, T.; GIBBONS, S.; ZHANG, W.-J.; QING, M. Flavonoids from *Sophora moorcroftiana* and their synergistic antibacterial effects on MRSA. **Phytother Res**, v. 28, p. 1071–1076, 2014.

ZHANG, J.; SUN, Y.; WANG, Y.; LU, M.; HE, J.; LIU, J.; CHEN, Q.; ZHANG, X.; ZHOU, F.; WANG, G.; SUN, X. Nonantibiotic agent ginsenoside 20(S)-Rh2 enhanced the antibacterial effects of ciprofloxacin *in vitro* and *in vivo* as a potential NorA inhibitor. **Eur J Pharmacol**, v. 740, p. 277–284, 2014.

## **Capítulo 2**

Atividade antimicrobiana do análogo sintético Riparina E

## Capítulo 2: Atividade antimicrobiana do análogo sintético Riparina E

### Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana intrínseca da riparina A e seu análogo di-hidroxilado riparina E contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615), Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) e leveduras (*Candida albicans* ATCC 10231 e *C. tropicalis* ATCC 28707). Teve-se também por objetivo avaliar se a atividade antimicrobiana da riparina E envolve alteração da permeabilidade da membrana celular. Os testes de microdiluição mostraram que a riparina A não apresentou atividade antibacteriana significativa contra todas as cepas testadas. Por outro lado, a riparina E foi ativa contra as espécies Gram-positivas e Gram-negativas (exceto *P. aeruginosa*), e também apresentou atividade contra as duas espécies de leveduras testadas. O efeito inibitório apresentado pela riparina E foi microbicida para todas as cepas testadas. Análises de citometria de fluxo das cepas tratadas com riparina E na presença do corante 7-AAD indicaram que a atividade antibacteriana e antifúngica da riparina E é decorrente da lesão à membrana citoplasmática. Os resultados obtidos neste estudo apontam para o promissor uso da riparina E como agente microbicida na prevenção ou no tratamento de doenças infecciosas.

**Palavras-chave:** Atividade antimicrobiana intrínseca, doenças infecciosas, Citometria, Permeabilidade celular.

### 1. Introdução

As riparinas são alcanoides naturais encontradas nos frutos e no cálice da *Aniba riparia*, uma espécie da família Lauraceae (BARBOSA-FILHO et al. 1987; TAKAKU; HABER;SETZER, 2007). Várias atividades biológicas já foram observadas nesses compostos, especialmente sobre o sistema nervoso central, como atividade ansiolítica e antidepressiva (SOUSA et al. 2004; SOUSA et al. 2005; MELO et al. 2006; SOUSA et al. 2007). Além disso, também foram relatadas atividade anti-inflamatória (CARVALHO et al. 2013) e

antinociceptiva (ARAÚJO et al. 2009). As riparinas também apresentaram potencial antimicrobiano contra cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (CATÃO et al. 2005), bem como a capacidade de reduzir a resistência contra penicilina (CATÃO et al. 2010).

Os processos de extração e isolamento de ativos a partir de plantas têm um rendimento muito baixo. Dessa forma, a rota sintética tornou-se a principal forma de obtenção dos compostos desse grupo. Assim, vários análogos sintéticos foram produzidos, entre eles, as riparinas A, B, C, D e E (BARBOSA-FILHO; SILVA; BHATTACHARYYA, 1990). Nunes et al. (2014) realizaram triagem com estas riparinas, como atividade citotóxica e antioxidante *in vitro*.

A riparina B foi capaz de inibir a bomba de efluxo NorA de *Staphylococcus aureus* demonstrando que este composto poderia ser usado como adjuvante de fluoroquinolonas no tratamento de infecções causadas por cepas de *S. aureus* que superexpressam bombas de efluxo. Por outro lado, a riparina E apresentou uma potente atividade antimicrobiana, contra *Staphylococcus aureus* (COSTA et al., 2016).

Em virtude desses resultados e da alta prevalência de doenças infecciosas causadas por bactérias e fungos multirresistentes, o presente estudo teve como objetivos avaliar a atividade da riparina E contra diferentes cepas de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e de leveduras.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Riparinas**

As riparinas utilizadas foram sintetizadas no Laboratório de Química de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal do Piauí, seguindo a metodologia de Gutierrez (2007). Foram preparadas as soluções estoque de N-fenetilbenzamida (Riparina A) e 2,6-dihidroxi-N-fenetilbenzamida (Riparina E) em dimetilsulfóxido (DMSO – MERCK) e a seguir, diluídas em água destilada esterilizada.

### **2.2 Cepas microbianas e condições de crescimento**

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram utilizadas bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC

12228), Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) e leveduras (*Candida albicans* ATCC 10231 e *C. tropicalis* ATCC 28707). As cepas bacterianas foram mantidas em placas de ágar nutriente (BHI, Himedia, India) e as leveduras em ágar Sabouraud Dextrose (SDA, Himedia, India) a 4°C. No dia anterior aos testes, as cepas bacterianas foram semeadas *overnight* a 37°C em caldo cérebro-coração (BHI, Himedia, India) e as leveduras em caldo Sabouraud Dextrose (SDB, Himedia, India).

### 2.3 Estimativa do Log P

A estimativa do Log P foi feita usando o programa ACD/Log P (Advanced Chemistry Development Inc. 1994-2002). O Log P foi calculado no pH 7,0 para molécula neutra (RH) devido à faixa típica de pKa de hidroxilas aromáticas, que se encontra entre 8,0 a 10,0.

### 2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana intrínseca

Esse ensaio teve por objetivo a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração microbicida mínima (CMM) para cada micro-organismo, a fim de conhecer o espectro de ação da Rip-E. As soluções estoque das riparinas A e E (10 mg/mL cada uma) foram preparadas em DMSO e, em seguida, foram diluídas em água destilada esterilizada para uma concentração final de 1.024 µg/mL para Rip-A e 4.096 µg/mL para Rip-E.

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram determinadas pelo teste de microdiluição (CLSI, 2013), utilizando caldo BHI para bactérias e caldo Sabouraud para leveduras (BARRETO et al., 2014), suspensões de células com aproximadamente 10<sup>5</sup> UFC/mL e soluções de cada riparina com concentrações variando desde 8 a 2.048 µg/mL. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h e, então, foram acrescidos 20 µL de resazurina (0.01% m/v em água destilada esterilizada) em cada poço para detectar crescimento bacteriano pela mudança da cor do azul para o róseo (HUSSAIN et al., 2011).

As CIM foram definidas como a concentração mais baixa na qual não foi observado crescimento microbiano. A inibição do crescimento microbiano foi confirmada transferindo uma alíquota de cada poço da microplaca utilizada no ensaio de CIM para uma placa com ágar BHI para as bactérias e ágar Sabouraud Dextrose para as leveduras. Após 24h de incubação a 37 °C foi verificado o crescimento dos micro-organismos. As riparinas foram consideradas como tendo uma boa atividade inibitória quando apresentaram CIM ≤100 µg/mL, uma atividade

inibitória moderada quando apresentaram CIM variando de 100 a 500  $\mu\text{g/mL}$ , a atividade inibitória foi considerada fraca quando apresentaram CIM de 500-1000  $\mu\text{g/mL}$ , e sem nenhuma atividade inibitória se apresentaram CIM  $>1000 \mu\text{g/mL}$  (HOLETZ et al., 2002).

## 2.5 Citometria de Fluxo

Esse ensaio foi para avaliar a ação de Rip-E sobre viabilidade da membrana citoplasmática das células de bactérias e leveduras e correlacionar esse achado com o ensaio de viabilidade microbiana por microdiluição. Para este estudo, foram selecionadas a cepa Gram positiva, Gram negativa e a espécie de levedura que se mostraram mais suscetíveis à Rip-E no ensaio anterior (*S. aureus* SA-25923, *E. coli* EC-25922 e *C. albicans* CA-10231). As cepas foram semeadas em tubos com caldo BHI 3% no dia anterior ao experimento e incubadas em estufa BOD a 37 °C *overnight* (bactérias) e por 24h (*Candida albicans*). Após a incubação, os semeios foram padronizados a  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL em salina (0,85% NaCl) esterilizada, as cepas bacterianas foram padronizadas primeiro a  $10^8$  UFC/mL utilizando a escala 0,5 de McFarland e diluídas 10x em um tubo com 3 mL de salina esterilizada. O semeio de *C. albicans* foi padronizado por contagem em câmara de Neubauer a  $1,0 \times 10^7$  células/mL. As soluções teste de Rip-E foram preparadas pela diluição de um estoque a 10,5 mg/mL em meio BHI 10% nas concentrações testadas (CIM e 2 CIM).

As soluções teste foram distribuídas em tubos eppendorf (900  $\mu\text{L}$  por tubo) e inoculadas com 100  $\mu\text{L}$  das suspensões microbianas padronizadas. Em seguida os tubos foram agitados em vórtex e incubados por 1 h a 37 °C. Após esse tempo de incubação as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em salina esterilizada. Esse processo foi repetido duas vezes e os tubos foram centrifugados novamente e o sobrenadante foi parcialmente removido, restando 100  $\mu\text{L}$  de líquido no tubo. A seguir 2  $\mu\text{L}$  de 7-amino Actinomicina D (7-AAD; BD Pharmingen 50  $\mu\text{g/mL}$ ) foi adicionado a cada tubo e foi feita incubação em câmara escura por 30 minutos. Após esse período, 500  $\mu\text{L}$  de salina esterilizada foram adicionados para proceder à leitura no citômetro de fluxo (BD FACSCanto II) a 10.000 eventos, com posterior análise dos dados adquiridos no programa FACSDiva 6.1.3, onde o 7-AAD foi lido no canal do PerCeP

Os controles positivos para marcação com 7-AAD foram preparados pela esterilização da suspensão de células padronizadas em autoclave por 15 minutos. A concentração final de

DMSO nos tubos não excedeu 5% v/v, na qual não se considera que haja alterações na permeabilidade celular à água,  $\text{Ca}^{2+}$  e outros eletrólitos (MÉNORVAL et al, 2012)

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Ensaio de viabilidade celular

Utilizando as técnicas de microdiluição (tópico 2.4) e citometria de fluxo, foi avaliada a ação da Rip-E sobre a viabilidade celular das bactérias e leveduras testadas. Os resultados obtidos pela microdiluição permitiram a determinação do espectro de ação de Rip-E, bem como as concentrações nas quais esse composto é capaz de inibir o crescimento microbiano de cada cepa e a partir de qual concentração há morte de todas as células

Quanto à atividade antimicrobiana intrínseca, a riparina A, cuja estrutura química é o núcleo fundamental do grupo, não apresentou atividade contra nenhuma das cepas microbianas testadas, já que apresentou CIM superior a 1.000  $\mu\text{g/mL}$  (HOLETZ et al, 2002). Por outro lado o análogo di-hidroxilado Rip-E, apresentou um bom efeito inibitório contra as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *S. epidermidis* e contra as leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis* (Tabela 1). Demonstrou, também, atividade moderada contra as espécies Gram-negativas *E. coli* e *S. Typhimurium*, mas foi inativo contra *P. aeruginosa*. O efeito inibitório da Rip-E, quando presente, foi microbicida contra todas as cepas.



Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM) demonstrada pelas riparinas sintéticas contra os micro-organismos testados (médias geométricas de três testes simultâneos)

Composto (Log P)	Cepas	(µg/mL)			Efeito
		CIM	CMM	CMM/CIM	
Rip-A (2,87)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	≥1.024	-	-	Inativo
	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	≥1.024	-	-	Inativo
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	≥1.024	-	-	Inativo
	<i>S. Typhymurium</i> ATCC 14028	≥1.024	-	-	Inativo
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	≥1.024	-	-	Inativo
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	≥1.024	-	-	Inativo
	<i>C. tropicalis</i> ATCC 28707	≥1.024	-	-	Inativo
Rip-E (3,57)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	32	64	2,0	Bactericida
	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	80	128	1,6	Bactericida
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	256	256	1,0	Bactericida
	<i>S. Typhymurium</i> ATCC 14028	256	812,7	3,2	Bactericida
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1.024	2.048	-	Inativo
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	64	128	2	Fungicida
	<i>C. tropicalis</i> ATCC 28707	128	128	1,0	Fungicida

LogP: coeficiente de partição; Rip-A: riparina A; Rip-E: riparina E; MMC/MIC<4: bactericida/fungicida; MMC/MIC>4: bacteriostático/fungistático (ALSHAIBANI et al 2016)

Os corantes não vitais de ácido nucléico são muito usados em estudos de viabilidade celular, pois não atravessam a membrana plasmática íntegra. Essas moléculas emitem fluorescência ao ligar-se aos ácidos nucléicos da célula. Dessa forma, a emissão de fluorescência está relacionada com a permeabilização ou ruptura da membrana, que indica um decréscimo de viabilidade ou morte. Os corantes mais utilizados para esse fim são o iodeto de propídio (PI) e o 7-AAD. Embora o PI seja o corante mais utilizado para avaliação de viabilidade de micro-organismos, o 7-AAD também serve esse fim, pois devido à alta massa molar, requer que a membrana esteja permeabilizada ou mesmo lesionada para que entre na

célula (SCHMID et al, 1992). Como um consenso geral, as células 7-AAD positivas são consideradas mortas ou em processo de morte celular, já que normalmente a perda da viabilidade da membrana representa dano irreparável, levando à morte celular (SHARKEY et al, 2015)

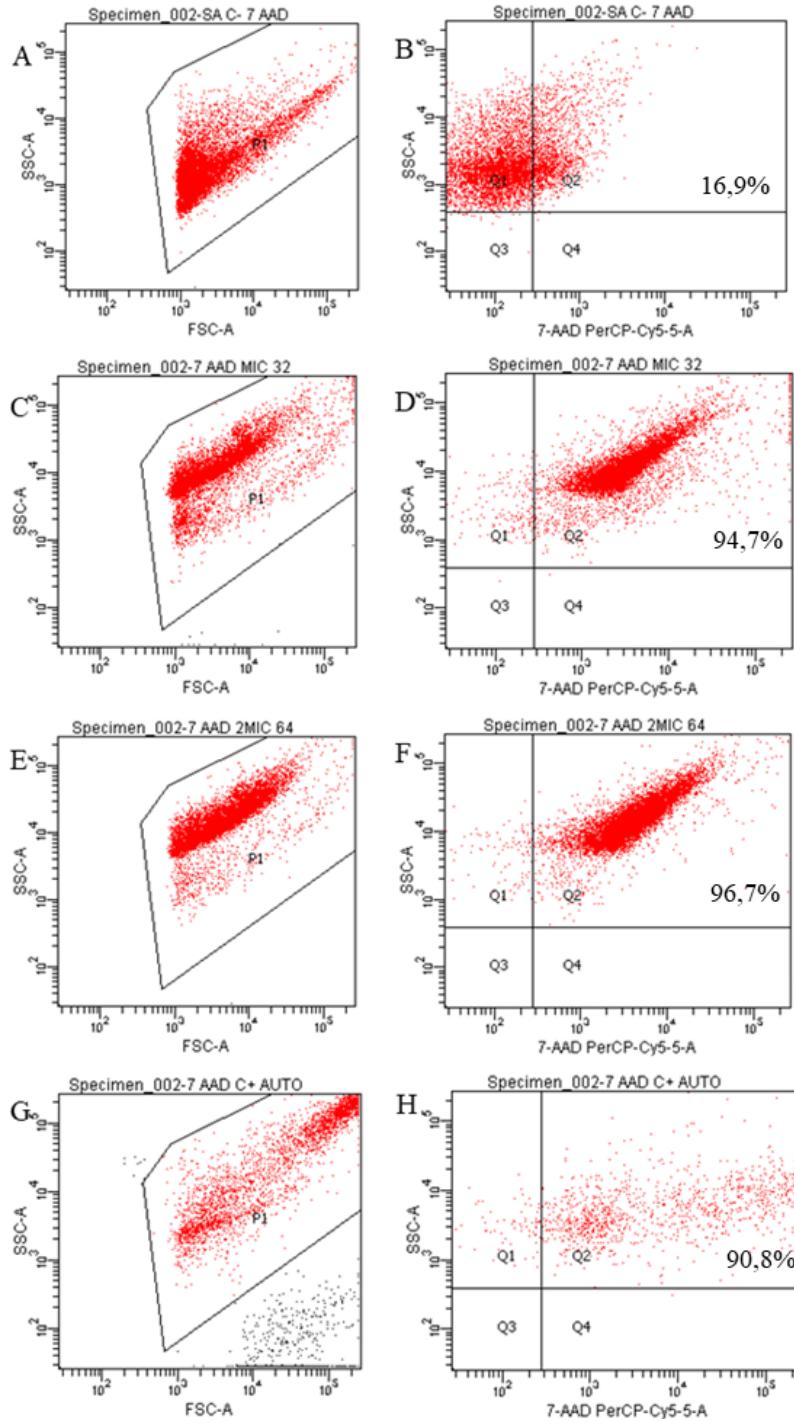
A partir da análise da Tabela 2, observa-se que há expressiva marcação das células bacterianas com 7-AAD, ultrapassando 90% da população na primeira hora de exposição. As células de *C. albicans* também foram marcadas, demonstrando que na primeira hora de exposição a Rip-E já é capaz de provocar morte nesses micro-organismos.

Tabela 2: Avaliação do efeito da Rip-E sobre a viabilidade de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* após incubação de 1h a 37 °C.

Micro-organismo	Grupo	% marcação 7-AAD	FSC	SSC
<i>S. aureus</i>	Controle negativo	16,9	6.223	3.431
	Controle positivo	90,8	97.631	94.304
	CIM (32 µg/mL)	94,7	9.910	16.314
	2 CIM (64 µg/mL)	96,7	8.409	19.360
<i>E. coli</i>	Controle negativo	6,2	1.722	1.422
	Controle positivo	89,2	58.557	44.288
	CIM (256 µg/mL)	96,1	7.273	15.107
	2 CIM (512 µg/mL)	94,5	8.344	17.395
<i>C. albicans</i>	Controle negativo	22,1	55.473	20.641
	Controle positivo	99,4	18.334	3.771
	CIM (64 µg/mL)	34,6	41.204	21.066
	2 CIM (128 µg/mL)	59,3	38.154	23.049

FSC (Forward Scatter): tamanho relativo; SSC (Side Scatter): complexidade relativa

Figura 1: Análise morfológica e efeito sobre a integridade da membrana plasmática de *S. aureus*. A, C, E e G: *plots* de FSC (tamanho relativo das células) e SSC (complexidade relativa das células); B, D, F e H: *plots* entre SSC e a intensidade de fluorescência de 7-AAD no canal do PerCP-Cy5. A e B: controle negativo; C e D: Tratamento com Rip-E no CIM por 1h; E e F: Tratamento com Rip-E a 2 CIM por 1h; G e H: controle positivo (amostras esterilizadas em autoclave).



No estudo de microdiluição pelo método do CLSI (CLSI, 2013) com *S. aureus*, Rip-E na CIM (32  $\mu\text{g/mL}$ ) não é bactericida (Tabela 1), mas na avaliação por citometria de fluxo,

cerca de 95% dos eventos foram positivos para 7-AAS (Tabela 2, Figura 1). Isso demonstra que as células tiveram sua permeabilidade celular alterada, o que provavelmente impediu a reprodução celular na presença do agente estressante (Rip-E), mas não levou à morte de todas as bactérias, corroborado pelo crescimento bacteriano observado após transferência de uma alíquota dessa suspensão bacteriana em condições favoráveis de crescimento. Um estudo prévio verificou que bactérias, após exposição a agente permeabilizante de membranas, dependendo do grau de lesão, excepcionalmente, são capazes de reparar o dano e continuarem vivas, apesar de serem positivas para PI (KIRCHHOFF; CYPIONKA, 2017). Quando atinge-se a concentração bactericida mínima (CBM; 64 µg/mL), que corresponde a 2 CIM, a lesão à membrana torna-se irreversível, levando à morte celular (Tabelas 1 e 2).

Diferentemente de *S. aureus*, os valores de CIM e CBM para *E. coli* coincidem, e a positividade de 7-AAD em 96% representa a ruptura da membrana, ocasionando o vazamento do conteúdo celular e a morte das células (Tabela 2, Figura 2).

A célula de levedura avaliada teve comportamento distinto das bactérias frente a Rip-E. *C. albicans* exposta a Rip-E na CIM teve 35% de células positivas para 7-AAD, indicando 35% de mortalidade na primeira hora de tratamento, corroborando com os dados de suscetibilidade por microdiluição. Em 2 CIM, que coincide com a concentração fungicida mínima (CFM) esse valor subiu para 59% em 1h de incubação (Tabela 3, Figura 3), mas indica que o dano à membrana e consequente lise da célula pode não ser o único mecanismo que causou a morte dessa levedura na incubação por 24h (Tabela 2). Da mesma forma que visto por Schenk e colaboradores (2011), a entrada de 7-AAD nas células reflete a permeabilização celular devido ao dano à membrana, mas não deve ser o único parâmetro de viabilidade avaliado.

Figura 2: Análise morfológica e efeito sobre a integridade da membrana plasmática de *E. coli*. A, C, E e G: *plots* de FSC (tamanho relativo das células) e SSC (complexidade relativa das células); B, D, F e H: *plots* entre SSC e a intensidade de fluorescência de 7-AAD no canal do PerCP-Cy5. A e B: controle negativo; C e D: Tratamento com Rip-E no CIM por 1h; E e F: Tratamento com Rip-E a 2 CIM por 1h; G e H: controle positivo (amostras esterilizadas em autoclave).

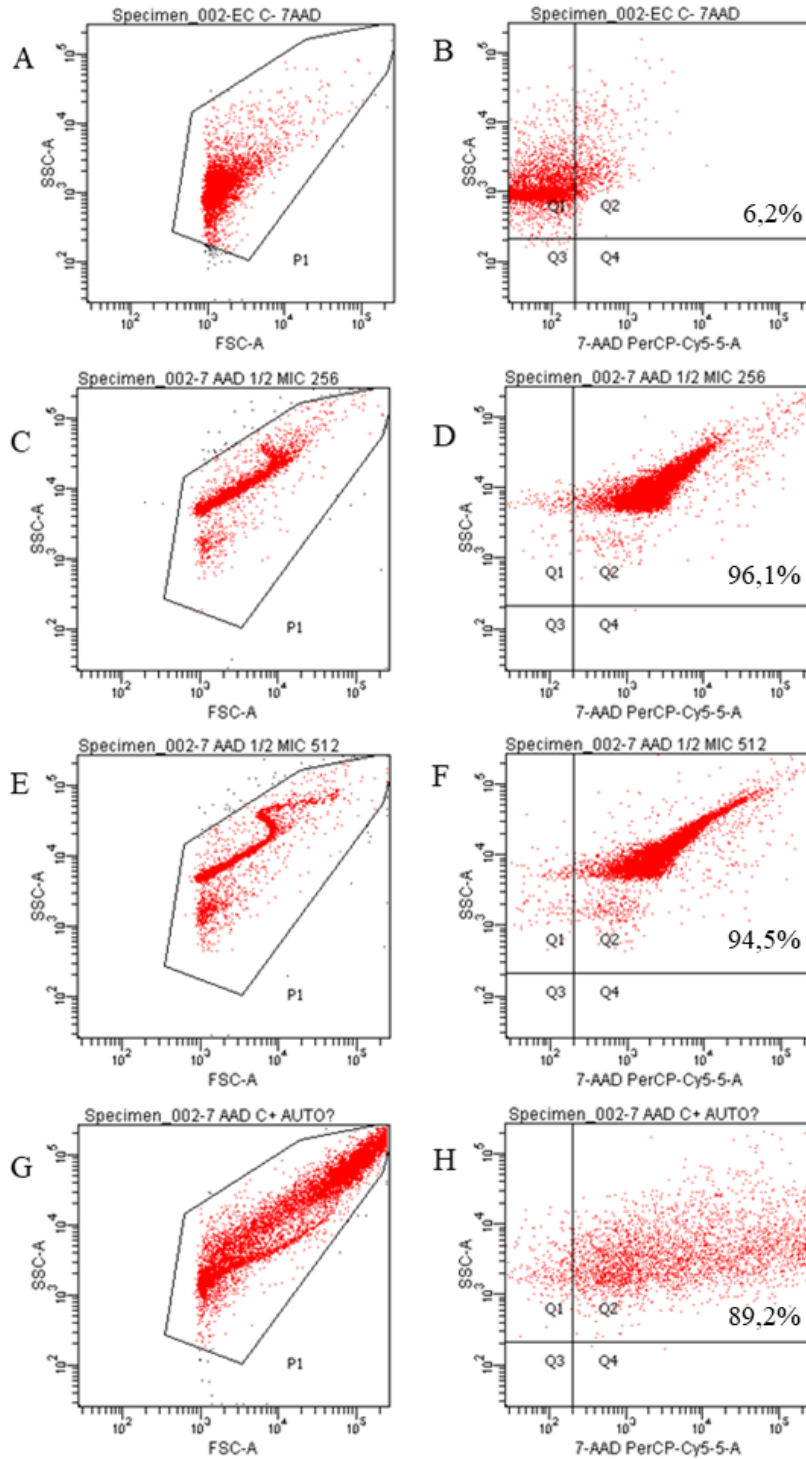
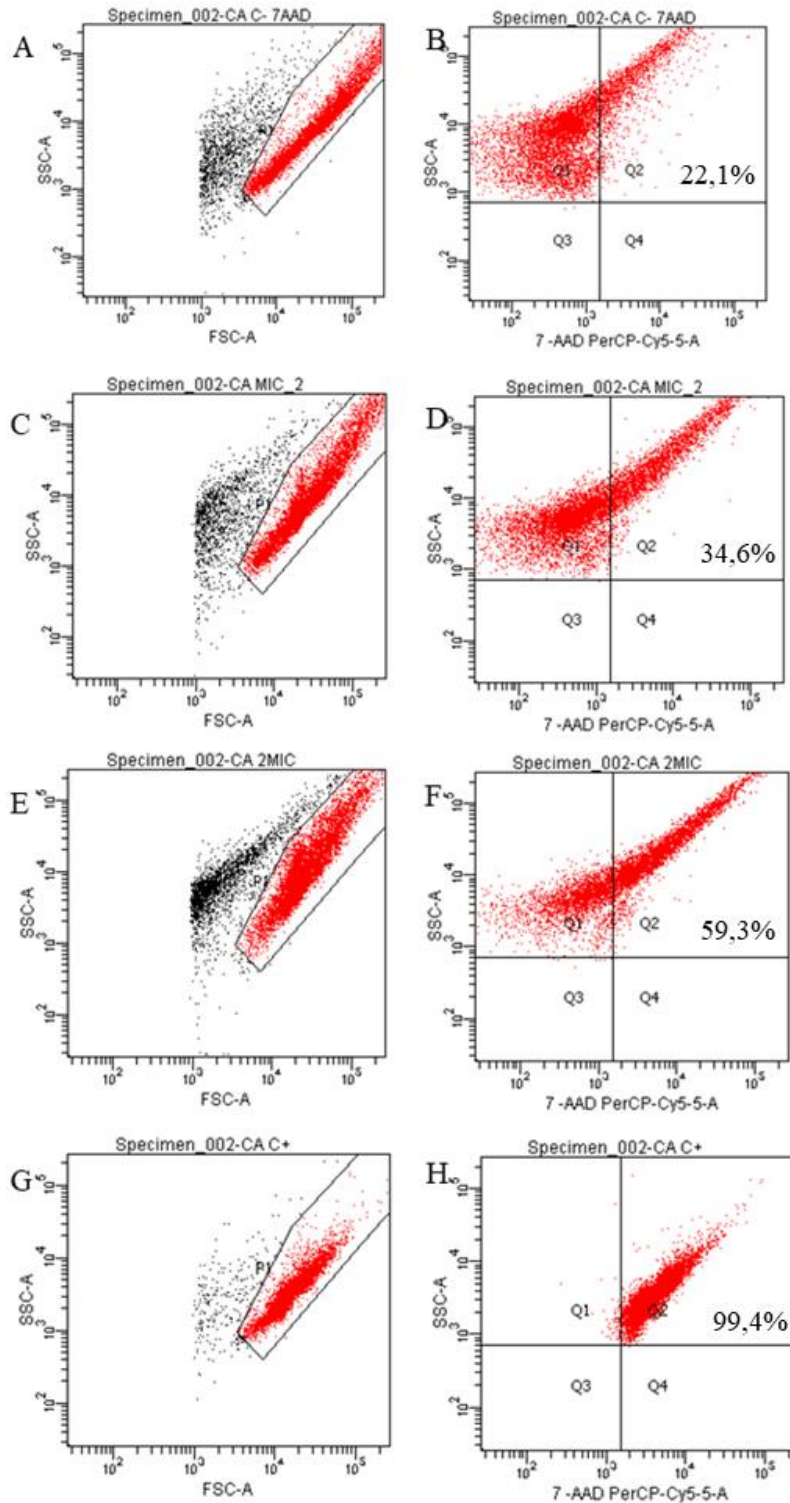


Figura 3: Análise morfológica e efeito sobre a integridade da membrana plasmática de *C. albicans*. A, C, E e G: *plots* de FSC (tamanho relativo das células) e SSC (complexidade relativa das células); B, D, F e H: *plots* entre SSC e a intensidade de fluorescência de 7-AAD no canal do PerCP-Cy5. A e B: controle negativo; C e D: Tratamento com Rip-E no CIM por 1h; E e F: Tratamento com Rip-E a 2 CIM por 1h; G e H: controle positivo (amostras esterilizadas em autoclave).



### 3.2 Análise morfológica

A fração de luz dispersada coletada na mesma direção da luz incidente é conhecida como *Forward Scatter* (FSC). Essa medida é uma função complexa do tamanho da célula com o índice de refração, mas para partículas de dimensões de uma bactéria tem relação estreita com o volume celular. A fração de luz dispersada lateralmente e a fluorescência são coletadas e divididas por uma lente a 90° do eixo de incidência do laser. A fração de luz dispersa em ângulo reto chama-se *Side Scatter* (SSC). Esse sinal está relacionado à complexidade celular resultante da granulosidade da superfície celular, membrana, núcleo ou do conteúdo citoplasmático (LEONARD et al, 2016; WILLIAMS et al, 1999).

A esterilização em autoclave provocou a diminuição de tamanho das células de *C. albicans* e aumento da sua granulosidade. Esse efeito foi acompanhado da quase totalidade das células marcadas por 7-AAD (99,4%) (Tabela 2, Figura 3). A esterilização em autoclave produziu uma resposta distinta nas cepas bacterianas. Pela análise do *plot* SSCxFSC e SSCx7-AAD (Figuras 1 e 2), observa-se que houve uma grande variação no tamanho e granulosidade das células, com grande parte da população no extremo superior do gráfico SSCxFSC, indicando aumento expressivo do volume das células, acompanhado de aumento de granulosidade. Da mesma forma que com *C. albicans*, a maior parte da população foi deslocada para o quadrante do 7-AAD.

Houve também alteração morfológica (Tabela 2) nos três micro-organismos testados. Rip-E provocou aumento do volume celular (FSC) de *S. aureus* e *E. coli* acompanhado de aumento na complexidade celular (SSC; granulosidade) (Figura 1 e 2). Por outro lado, as células de *C. albicans* sofreram redução de tamanho e aumento na granulosidade celular.

O aumento no valor de FSC para as duas espécies de bactérias testadas corrobora com a lesão ao envoltório celular indicado pela marcação com 7-AAD. A maior permeabilidade celular causou alterações na osmolaridade do meio intracelular, levando ao influxo de água e causando o aumento da célula, que leva a lise da célula (CUSHNIE; O'DRISCOLL; LAMB, 2016). Esse efeito foi fruto da lesão ao envoltório celular bacteriano, da membrana plasmática e/ou parede celular, pois agentes que causam dano à parede celular de peptidoglicano também causam lise da célula, devido à pressão do turgor do citoplasma. (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010)

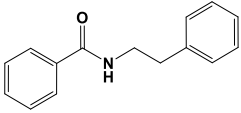
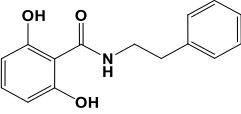
A incubação de *C. albicans* com Rip-E também causou alterações morfológicas, porém com mecanismo distinto de morte celular. As leveduras tiveram redução no tamanho das células

e aumento da granulose celular, que pode ser resultado de formação de corpos apoptóticos no interior da célula, ou da ondulação da membrana plasmática. Em ambos os casos esse resultado pode ser um indicativo de que Rip-E induz apoptose em células de *Candida albicans*. (BAYLES, 2014)

### 3.3 Relação estrutura- atividade

As estruturas químicas e os valores de Log P das riparinas sintéticas são apresentados na Tabela 3. Rip-E é muito hidrofóbica (log P 3,57) e compostos hidrofóbicos podem intercalar a membrana plasmática e afetar a cadeia respiratória de elétrons (NICOLSON, EVANS; O'TOOLE, 1999). Estes compostos também podem aumentar a permeabilidade da membrana, levando ao vazamento de íons inorgânicos como  $K^+$  (SOUZA et al. 2013).

Tabela 3: Estrutura química e Log P teórico estimado para os compostos testados

Riparinas	Estrutura	Log P
Riparina A		2,7
Riparina E		3,7

Apesar de Rip-A ser uma molécula hidrofóbica e, provavelmente, ser capaz de permear a membrana citoplasmática, foi inativa no combate aos micro-organismos avaliados. Isso implica que a hidrofobicidade não é o único fator envolvido na atividade de Rip-E. A atividade antimicrobiana de outras riparinas (Rip-I, Rip-II e Rip-III) foi testada anteriormente. Nessa avaliação, Rip-III foi a mais ativa e teve um perfil de inibição semelhante ao de Rip-E, com maior atividade contra cepas Gram positivas e leveduras. Entre as cepas Gram positivas, teve maior atividade contra *S. aureus* e entre as Gram negativas, *E. coli* (BARBOSA et al, 1988; BARBOSA-FILHO et al, 1987), característica também vista com Rip-E na Tabela 1. Rip-III também foi ativa contra cepas multirresistentes de *S. aureus* e *E. coli*. (CATÃO et al, 2005). Entre as riparinas naturais, Rip-III é a que possui maior semelhança estrutural com Rip-E, pois ambas possuem dois grupamentos OH na porção benzamida em C-2 e C-6, diferindo-se apenas



pela presença de grupamento metóxi na porção fenetil de Rip-III em C-4'. Dessa forma, a presença de grupos hidroxila na porção benzamida é um fator crucial na capacidade das riparinas em inibir o crescimento de bactérias e leveduras e, no caso de Rip-E, a capacidade de causar dano à membrana e morte das células microbianas.

#### 4. Conclusão

A riparina E apresenta atividade contra bactérias, especialmente as Gram-positivas, e leveduras. Neste estudo demonstrou-se que o mecanismo de ação antimicrobiano é de lesão à membrana, levando à lise celular. Há indícios que Rip-E induza apoptose em *C. albicans*, além do efeito direto sobre a membrana, porém mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese. Este estudo indica a possibilidade da Riparina E ser utilizada como agente antimicrobiano na prevenção e tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias e leveduras.

#### Referências

ALSHAIBANI, M. M.; JALIL, J.; SIDIK, N. M.; EDRADA-EBEL, R.; ZIN, N. M. Isolation and characterization of cyclo-(tryptophanyl-prolyl) and chloramphenicol from *Streptomyces* sp. SUK 25 with antimethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity. **Drug Des Devel Ther**, v. 10, p. 1817–1827, 2016.

ARAÚJO, F. L. O.; MELO, C. T. V.; ROCHA, N. F. M.; MOURA, B. A.; LEITE, C. P.; AMARAL, J. F.; BARBOSA FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyltyramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 380, p. 337–344, 2009.

BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; BARBOSA, R. C. S. B. C.; GIESBRECHT, A. M.; YOUNG, M. C. M. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry** v. 26, p. 2615–2617, 1987.

BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. C.; BHATTACHARYYA, J. Synthesis of several new henylethylamines of substituted benzoic acids. **Quim Nov**, v. 13, p. 332–334, 1990.

BARBOSA, R. C. S. B. C.; GIESBRECHT, A. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Avaliação da atividade antibiótica de extratos de Lauraceae. **Acta Amazon**, v. 18, n. 1-2, p. 91-94, 1988. Suplemento.

BARRETO, H. M.; FONTINELE, F. C.; OLIVEIRA, A. P.; ARCANJO, D. D. R.; SANTOS, B. H. C.; ABREU, A. P. L.; COUTINHO, H. D. M.; SILVA, R. A. C.; SOUSA, T. O.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. Phytochemical prospection and modulation of antibiotic activity in vitro by *Lippia origanoides* H.B.K. in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **BioMed Res Int**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

BAYLES, K. W. Bacterial programmed cell death: making sense of a paradox. **Nat Rev Microbiol**, v. 12, n. 1, p. 63–69, 2014.

CARVALHO, A. M. R.; ROCHA, N. F. M.; VASCONCELOS, L. F.; RIOS, E. R. V.; DIAS, M. L.; SILVA, M. I. G.; FONTELES, M. M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; SOUSA, F. C. F. Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. **Chem Biol Interact**, v. 205, p. 165–172, 2013.

CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. Avaliação da atividade antimicrobiana de Riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. **Rev Bras Anal Clin**, v. 37, p. 247–249, 2005.

CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; ARRUDA, T. A.; MIRANDA, R. P. A. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Rev Bras Anal Clin**, v. 42, p. 9–14, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: CLSI. 2013

COSTA, L. M.; MACEDO, E. V.; OLIVEIRA, F. A. A.; FERREIRA, J. H. L.; GUTIERREZ, S. J. C.; PELÁEZ, W. J.; LIMA, F. C. A.; SIQUEIRA JUNIOR, J. P.; COUTINHO, H. D. M.; KAATZ, G. W.; FREITAS, R. M.; BARRETO, H. M.. Inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by synthetic riparins. **J Appl Microbiol**, v. 12, p. 1312–1322, 2016.

CUSHNIE, T. P. T.; O'DRISCOLL, N. H.; LAMB, A. J. Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action. **Cell Mol Life Sci**, v. 73, n. 23, p. 4471–4492, 2016.

GUTIERREZ, S. J. C. **Síntese do Bowdenol, um dihidrobenzofuranoide isolado de *Bowdichia virgilioides* e preparação de derivados da Riparina isolada de *Aniba riparia* com potencial atividade biológica**. 2007. 134f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). UFPB/CCS. João Pessoa, 2007

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027–1031, 2002.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; NIGAM, P. S.; SARKER, S. D.; MOORE, J. E.; RAO, J. R.; MAZUMDAR, A. Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. **Food Sci Technol**, v. 44, p. 1199–1206, 2011.

KIRCHHOFF, C; CYPIONKA, H. Propidium ion enters viable cells with high membrane potential during live-dead staining. **J Microbiol Methods**, v. 142, p.79-82, 2017.

LÉONARD, L.; CHIBANE, L. B.; BOUHEDDA, B. O.; DEGRAEVEAND, P.; OULAHAL, N. Recent Advances on Multi-Parameter Flow Cytometry to Characterize Antimicrobial Treatments. **Front Microbiol**, v. 7,n. 1225, p. 1-16, 2016.

MELO, C. T. V.; MONTEIRO, A. P.; LEITE, C. P.; ARAÚJO, F. L. O.; LIMA, V. T. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, M. M. F; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B, SOUSA, F. C. F. Anxiolytic-like effects of (Omethyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biol Pharm Bull**, v. 29, p. 451–454, 2006.

MÉNORVAL, M. A.; MIR, L. M.; FERNÁNDEZ, M. L.; REIGADA, R. Effects of Dimethyl Sulfoxide in Cholesterol-Containing Lipid Membranes: A Comparative Study of Experiments In Silico and with Cells. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. 1-12, 2012.

NICOLSON, K.; EVANS, G.; O'TOOLE, P. W. Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. **FEMS Microbiol Lett**, v. 179, p. 233–239, 1999.

NUNES, G. B. L.; POLICARPO, P. R.; COSTA, L. M.; SILVA, T. G.; MILITÃO, G. C. G.; CÂMARA, C. A.; BARBOSA FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; ISLAM, M. T.; FREITAS, R. M. In Vitro Antioxidant and Cytotoxic Activity of Some Synthetic Riparin-Derived Compounds. **Molecules**, v. 19, p. 4595–4607, 2014.

SCHENK, M.; RAFFELLINI, S.; GUERRERO, S.; BLANCO, G. A.; ALZAMORA, S. M. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* by UV-C light: Study of cell injury by flow cytometry. **LWT-Food Sci Technol**, v. 44, n. 1, p. 191–198, 2011.

SCHMID, I.; KRALL, W.J.; UITTENBOGAART, C.H.; BRAUN, J.; GIORGI, J.V. Dead Cell Discrimination With 7-Amino-Actinomycin D in Combination With Dual Color Immunofluorescence in Single Laser Flow Cytometry. **Cytometry**, v. 13, n. 2, p. 204-208, 1992.

SHARKEY, M. A.; CHEBBI, A.; MCDONNELL, K. A.; STAUNTON, C.; DOWLING, D. P. Evaluation of the sensitivity of bacterial and yeast cells to cold atmospheric plasma jet treatments. **Biointerphases**, v. 10, n. 2, 2015

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The Bacterial Cell Envelope. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 2, n. 5, p. 1-16, 2010.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; MONTEIRO, A. P.; LIMA, V. T. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; PEREIRA, B. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. F., VIANA, G. S. B. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 78, p. 27–33, 2004.

SOUSA, F. C. F.; MONTEIRO, A. P.; MELO, C. T. V.; OLIVEIRA, G. R.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. D. F.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-

FILHO, J. M.; VIANA, G. S.B. Antianxiety Effects of Riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in Mice. **Phytother Res**, v. 19, p. 1005–1008, 2005.

SOUSA, F. C. F.; LEITE, C. P.; MELO, C. T. V.; ARAÚJO, F. L. O.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S.B. Evaluation of effects of N-(2-hydroxybenzoyl) tyramine (riparin II) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauracea) in anxiety models in mice. **Biol Pharm Bull**, v. 30, p. 1212–1216, 2007.

SOUZA, E. L.; OLIVEIRA, C. E. V.; STAMFORD, T. L. M.; CONCEIÇÃO, M. L.; GOMES NETO, N. J. Influence of carvacrol and thymol on the physiological attributes, enterotoxin production and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **Brazilian J Microbiol**, v. 44, p. 29–35, 2013.

TAKAKU, S.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. **Biochem Syst Ecol**, v. 35, p. 525–532, 2007.

WILLIAMS, I.; PAUL, F.; LLOYD, D.; JEPRAS, R.; CRITCHLEY, I.; NEWMAN, M.; WARRACK, J.; GIOKARINI, T.; HAYES, A. J.; RANDERSON, P. F.; VENABLES, W. A. Flow cytometry and other techniques show that *Staphylococcus aureus* undergoes significant physiological changes in the early stages of surface-attached culture. **Microbiology**, v. 145, p. 1325–1333, 1999.

## **Capítulo III**

Atividade antileishmania de riparina E

### Capítulo 3: Atividade antileishmania de riparina E

#### Resumo:

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, podendo apresentar diferentes manifestações clínicas. Os tratamentos de primeira linha consistem em medicamentos de alto custo e com graves efeitos colaterais, os quais requerem acompanhamento médico. Nesse contexto de busca por novas alternativas terapêuticas, as riparinas são compostos com grande potencial terapêutico, que inclui as atividades antimicrobiana e antiparasitária. Assim, este trabalho teve como objetivo a avaliação da atividade antileishmania *in vitro* da riparina E contra promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* internalizadas de em macrófagos. Para isso, realizou-se a avaliação da viabilidade de promastigotas *L. amazonensis* após exposição por 24, 48 e 72 h a Rip-E (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 800 µg/mL), bem como a avaliação da viabilidade de macrófagos murinos após 48h de tratamento nas mesmas concentrações de Rip-E. A seguir, foi realizada a infecção de macrófagos por promastigotas de *L. amazonensis* e, após a verificação da infecção, as células foram incubadas com Rip-E (2, 4 e 8 µg/mL) e, após 48h realizou-se a contagem do número de células infectadas e o número de amastigotas internalizadas por macrófago. Por fim, avaliou-se a capacidade de Rip-E de ativar macrófagos, após incubação com Rip-E (6,25; 12,5 e 25 µg/mL), segundo os parâmetros: capacidade fagocítica, atividade lisossomal e produção de óxido nítrico. A riparina E foi capaz de inibir o crescimento das promastigotas (CI<sub>50</sub> 4,7 µg/mL) e de reduzir o percentual de macrófagos infectados com amastigotas, bem como de reduzir a infectividade dessas células (CI<sub>50</sub> 1,3 µg/mL). Avaliou-se a citotoxicidade contra macrófagos murinos de BALB/c e verificou-se CC<sub>50</sub> de 50,6 µg/mL e índice de seletividade de 38,9. A riparina E também demonstrou atividade imunomoduladora, evidenciada pelo aumento da capacidade fagocítica e da atividade lisossomal. Entretanto, a riparina E não induziu aumento da produção de óxido nítrico nos macrófagos. Dessa forma, esses resultados demonstram que a riparina E possui atividade antileishmania contra as duas formas evolutivas de *Leishmania amazonensis*, e que além da ação direta sobre a célula do parasita, induz ativação da fagocitose em macrófagos.

**Palavras-chave:** Doenças negligenciadas, *Aniba riparia*, doenças infecciosas, ativação de macrófagos, Alcamidas.

## 1. Introdução

As leishmanioses são doenças, cujos agentes etiológicos são os protozoários do gênero *Leishmania* (Família: Trypanosomatidae). Essas enfermidades têm caráter antroponótico, mas sem contágio direto, transmitidas pela picada de flebotomíneos (CDC, 2017). A Leishmaniose Tegumentar (LT) possui ampla prevalência: dos 200 países e territórios notificantes, 87 (44%) foram considerados endêmicos. Dentre eles, o Brasil é um dos cinco países com maior incidência mundial, assinalada por 43% dos casos reportados nas Américas e 10% no mundo, caracterizando a relevância dessa doença para a saúde pública brasileira (OMS, 2017; BRASIL, 2017a)

A LT pode ter diferentes formas de manifestação clínica, dependendo da espécie de *Leishmania* e da imunidade do paciente, que são: cutânea, cutânea disseminada, cutaneomucosa e cutânea difusa, podendo haver uma ou múltiplas ulcerações. Essas formas são causadas normalmente pelas espécies *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) lainsoni* e *L. (Leishmania) amazonensis*. A LT pode assumir uma forma clínica mais branda e autolimitada, como a cutânea localizada, mas pode tender à cronificação e se tornar deformante. As formas mais graves e mais difíceis de tratar são a cutaneomucosa e a difusa. A forma cutaneomucosa é caracterizada por lesões agressivas envolvendo mucosas e cartilagens, na qual a região nasofaríngea é a mais afetada. Diferente das outras formas, a cutânea difusa apresenta lesões por toda a pele, não ulceradas. No Brasil, a forma cutânea difusa é causada por *L. amazonensis* e está estreitamente relacionada a uma deficiência da resposta imune celular do paciente (MURBACK et al, 2011).

O tratamento de primeira escolha da LT consiste na administração de antimoniato de meglumina e a anfotericina B lipossomal é indicada nos casos em que os antimoniais pentavalentes são contra-indicados. Também estão disponíveis o desoxicolato de anfotericina B e pentamidina (BRASIL, 2017b). Entretanto, esses tratamentos possuem graves limitações, por serem muito agressivos, com potencial hepato, cardio e nefrotóxico. Além disso, a administração desses fármacos é feita pela via parenteral e exige acompanhamento médico dos efeitos adversos (BRASIL et al, 2016). Dessa forma, opções terapêuticas menos tóxicas devem ser pesquisadas, para aumentar o arsenal de fármacos contra as leishmanioses

Diante desse contexto, tem-se buscado alternativas entre produtos derivados de plantas. Entre esses, as riparinas vêm sendo alvo de diversas pesquisas e são candidatas promissoras devido ao seu potencial terapêutico. Essas alcaloides são encontradas nos frutos verdes da *Aniba*

*riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) e há várias atividades biológicas descritas para esse grupo de compostos, como atividades sobre o sistema nervoso central (com efeitos ansiolíticos e antidepressivos), atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, além de possuir potencial antimicrobiano (MELO et al., 2013 SOUSA et al., 2007; ARAÚJO et al., 2009; CATÃO et al., 2010; LEITE et al., 2011; SOUSA et al., 2011). Foi relatada também a atividade antileishmania da riparina A, que é considerada o núcleo fundamental desse grupo de compostos (ARAÚJO et al, 2016). Dessa forma, este trabalho destinou-se a avaliar a atividade antileishmania *in vitro* do análogo sintético riparina E (Rip-E) contra promastigotas e amastigotas internalizadas de *Leishmania amazonensis* e atividade imunomoduladora sobre macrófagos murinos.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Parasitas e células

Para testar a atividade antileishmania *in vitro* do análogo sintético riparina E (Rip-E) foram utilizadas formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) internalizadas em macrófagos murinos. As formas promastigotas foram cultivadas em meio de Schneider suplementado (10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, incubadas em estufa B.O.D. a 26 °C) (CARNEIRO et al., 2012).

Os macrófagos murinos foram coletados das cavidades peritoneais de camundongos BALB/c machos e fêmeas (4 a 5 semanas de idade), após elicitção prévia (72h) pela aplicação de 2 mL de tioglicolato a 3% via intraperitoneal. Os animais foram provenientes do biotério setorial do NPPM/UFPI. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEEA-UFPI nº 256/16).

### 2.2 Atividade antileishmania de Riparina E sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*

Formas promastigotas em fase logarítmica de crescimento foram semeadas em placas de cultivo celular com 96 poços contendo meio Schneider's suplementado (1,0 x 10<sup>6</sup> leishmanias por poço). Em seguida, as soluções-mãe de riparina E foram adicionadas aos poços



em triplicata e realizadas diluições seriadas, atingindo as concentrações finais desejadas (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 800 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa a 26 °C e os parasitos foram observados e contados em Câmara de Neubauer em microscópio óptico após 24, 48 e 72 h de incubação para o acompanhamento do respectivo crescimento e da viabilidade dos parasitos. O controle negativo foi realizado com meio de Schneider a 0,2% de DMSO e considerado como 100% de viabilidade das leishmanias (CARNEIRO et al., 2012).

### 2.2.1 Método colorimétrico

Foram utilizadas células de *L. amazonensis*, na forma de promastigotas obtidas do cultivo em fase logarítmica de crescimento. Antes da inoculação com o parasita, o meio de cultura foi distribuído nos poços, já contendo riparina E. As soluções de riparina E em meio de cultura foram preparadas por diluição seriada em 8 concentrações: 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; e 800 µg/mL. As promastigotas foram adicionadas nos poços de uma microplaca de 96 poços numa quantidade de  $1,0 \times 10^6$  leishmanias em cada poço e a placa foi incubada por 48 h. Seis horas antes do final do período de incubação, foram adicionados 20 µl da solução de resazurina (1,0 mM).

Ao término da incubação, foi realizada a leitura a 550 nm, utilizando leitor de placa BioTek (modelo ELx800). Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em inibição do crescimento (%). A leitura do branco (meio de Schneider junto à solução) para cada concentração das soluções foi necessária para desprezar a absorbância influenciada pelo meio. O controle negativo foi realizado com meio de Schneider (a 0,2% DMSO) adicionado  $1,0 \times 10^6$  de leishmania, sendo considerado como 100% de viabilidade do parasita. O controle positivo foi realizado com 2 µg/mL de anfotericina B (Anf B) diluído em meio de Schneider contendo  $1,0 \times 10^6$  promastigotas (OLIVEIRA et al., 2017).

### 2.4 Citotoxicidade sobre macrófagos e Índice de Seletividade (IS).

A avaliação da citotoxicidade foi realizada em placas de 96 poços utilizando o ensaio com o MTT. Foram incubados  $2,0 \times 10^5$  macrófagos por poço em 100 µL de meio RPMI 1640 (suplementado com 10% de SFB e 10.000 UI de penicilina e 1.000 UI de estreptomicina) em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, durante quatro horas para a adesão celular. Após esse período retirou-se o sobrenadante para descartar as células não aderidas. A Rip-E foi diluída em meio RPMI suplementado e essa mistura foi adicionada à placa contendo os macrófagos, de forma a

ter concentrações seriadas (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; e 800 µg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 h.

Após esse período, a citotoxicidade foi avaliada pela adição de 10 % MTT (5 mg/mL) diluído em 100 µL de meio RPMI e incubou-se novamente a placa durante quatro horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Passado esse período, o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram dissolvidos por adição de 100 µL de DMSO. Finalmente, a absorbância (550 nm) foi medida utilizando um leitor de placas Biotek (ELx800). O índice de seletividade de cada tratamento foi calculado dividindo a concentração citotóxica média (CC<sub>50</sub>) observada para macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c pela concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>), calculada para formas promastigotas e amastigotas internalizadas em macrófagos (OLIVEIRA et al., 2017).

## 2.5 Atividade da Rip-E sobre macrófagos infectados por *L. amazonensis*

Os macrófagos foram plaqueados em placas de cultura de 24 poços na concentração de  $2 \times 10^5$  células/poço em 500 µL de RPMI suplementado, contendo uma lamínula redonda (13 mm) estéril em cada poço. As placas de cultura foram incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> durante quatro horas para a adesão celular. Os macrófagos aderidos foram então incubados com meio contendo promastigotas na fase estacionária de crescimento, onde predominava a forma metacíclica infectante (razão de 10 promastigotas para um macrófago) a 5% de CO<sub>2</sub> e 37 °C, *overnight*. Passado esse período, o meio foi aspirado para remover parasitas não internalizados. A cultura infectada foi incubada com os valores correspondentes de 2, 4 e 8 µg/mL de Rip-E (concentrações correspondentes a  $\frac{1}{2}$  CI<sub>50</sub>; CI<sub>50</sub> e  $2 \times$  CI<sub>50</sub> sobre as formas promastigotas) e anfotericina na concentração de 0,2 µg/mL (SOUZA et al., 2017). Após este período, as lamínulas foram removidas e coradas utilizando o panótico rápido®. Para cada tratamento, contou-se o número de macrófagos infectados (infecção) e a número de amastigotas por macrófago (infectividade) percorrendo os campos das amostras até atingir a contagem de 100 macrófagos, utilizando microscopia de luz no aumento de 1000x (CARNEIRO et al., 2012).

## 2.6 Avaliação de parâmetros de ativação de macrófagos.

### 2.6.1 Preparo das soluções

A solução estoque de corante vermelho neutro (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi preparada pela solubilização de 0,002 g do corante em 1 mL de DMSO. A solução de extração utilizada nos itens 2.6.2 e 2.6.3 constitui-se de ácido acético glacial 96% (1% v/v) e etanol PA (50% v/v) dissolvidos em água bidestilada. A solução de zimosan corado utilizada no ensaio de capacidade fagocítica foi obtida pela diluição de 0,3 mL da solução estoque de vermelho neutro e 0,02 g de zimosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em 3 mL de PBS. O fixador utilizado foi o de Baker formol-cálcio constituído por formaldeído 4% (v/v), cloreto de sódio 2% (p/v) e acetato de cálcio 1% (p/v) em água destilada (GRANDO et al., 2009).

#### 2.6.2 Avaliação da atividade lisossomal

Macrófagos peritoneais foram plaqueados na quantidade de  $2,0 \times 10^5$  por poço numa placa de 96 poços e incubados com Rip-E e realizadas diluições seriadas, atingindo cinco faixas de concentrações finais (6,25; 12,5; 25; 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ). Após 48 h de incubação em estufa a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$ , acrescentou-se 10  $\mu\text{L}$  de solução de vermelho neutro a 2% de DMSO e a placa foi incubada por 30 min. Transcorrido esse tempo, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com salina 0,9% a 37 °C e adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro presente no interior das vesículas de secreção lisossomal. Após 30 min em agitador de Kline a placa foi lida no leitor Biotek (ELx800) a 550 nm. (BONATTO et al., 2004).

#### 2.6.3 Determinação da capacidade fagocítica

Macrófagos peritoneais foram plaqueados na quantidade de  $2 \times 10^5$  células/poço numa placa de 96 poços e incubados com Rip-E e realizadas diluições seriadas, atingindo cinco faixas de concentrações finais (6,25; 12,5; 25; 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ). Após 48 h de incubação em estufa a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$ , acrescentou-se 10  $\mu\text{L}$  de solução de zimosan corado e incubou-se por 30 min a 37 °C. Após este procedimento, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de fixador de Baker para interromper o processo de fagocitose e, 30 min depois, a placa foi lavada com salina 0,9 % a fim de remover o zimosan e o vermelho neutro não fagocitados pelos macrófagos. Removeu-se o sobrenadante, e adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de solução de extração e após solubilização em agitador de Kline a placa foi lida no leitor de placas Biotek (ELx800) a 550 nm (GRANDO et al., 2009).

#### 2.6.4 Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico

Macrófagos peritoneais foram plaqueados na quantidade de  $2 \times 10^5$  por poço numa placa de 96 poços e incubados com Rip-E e realizadas diluições seriadas, atingindo quatro faixas de concentrações finais (6,25; 12,5; 25; 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ), na presença ou na ausência de formas promastigotas de *L. amazonensis* na concentração de  $1,0 \times 10^6$  células/poço. Transcorridas 24 h de incubação a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$ , os sobrenadantes foram transferidos do cultivo celular para outra placa de 96 poços para a dosagem de nitrito. A curva-padrão foi preparada com nitrito de sódio em meio RPMI a concentrações variadas de 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 e 150,0  $\mu\text{M}$  diluídos em meio RPMI. No momento da dosagem misturou-se partes iguais das amostras (sobrenadantes) ou das soluções preparadas para obtenção da curva-padrão com o mesmo volume do reagente de Griess (1% Sulfanilamida em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  10% v/v em água Milli-Q®, adicionados em partes iguais a 0,1% naftilenodiamino em água Milli-Q®) e fez-se a leitura das absorbâncias em leitor de placas Biotek (ELx800) a 550 nm. O resultado foi expresso em porcentagem de produção de nitrito (SOARES et al., 2007).

## 2.7 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes. Para o cálculo da concentração inibitória para 50% das células ( $\text{CI}_{50}$ ) e concentração citotóxica média ( $\text{CC}_{50}$ ) com limite de confiança de 95%, foi utilizado o modelo de regressão Probit do programa SPSS 22.0. Foram realizadas análises de variância *two-way* (no ensaio do item 2.2, método de contagem) e *one-way* seguidas pelo teste de Bonferroni, utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.0, tomando-se o valor de  $p < 0,05$  com nível mínimo de significância estatística.

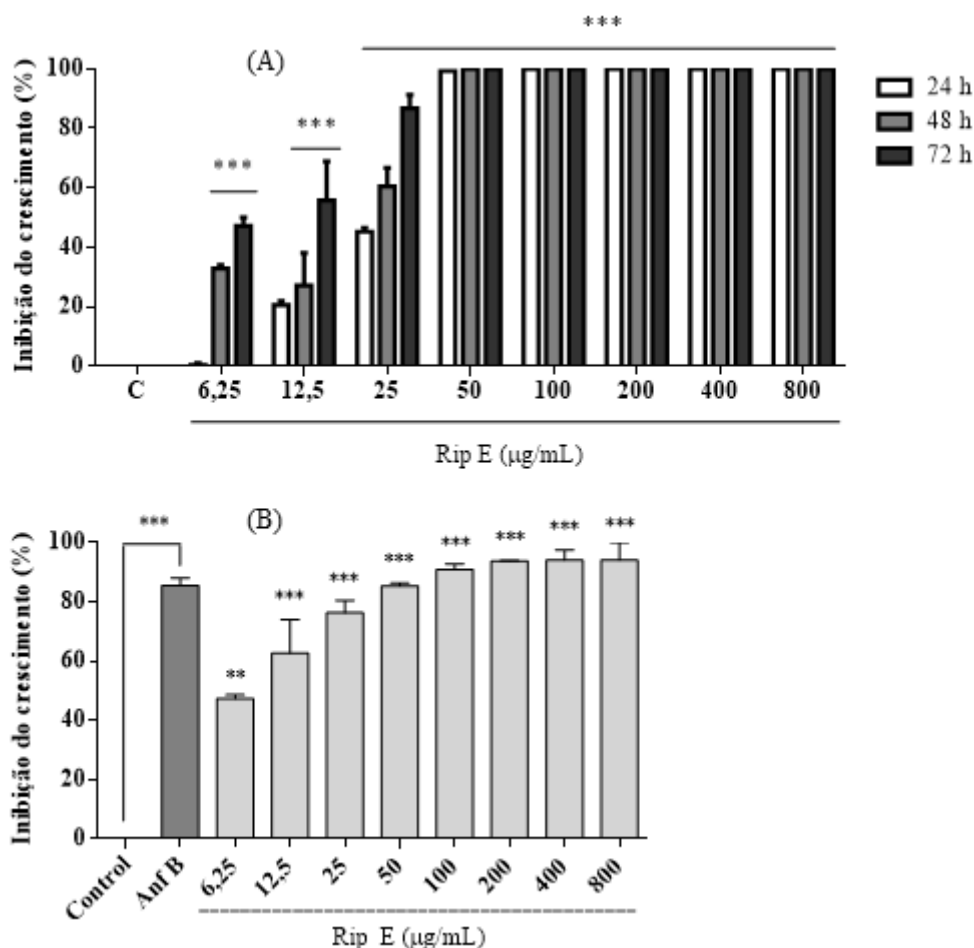
## 3. Resultados e discussão

Diante da demanda por novos agentes quimioterápicos para o tratamento da LT e da existência de relatos na literatura de atividade antimicrobiana das riparinas contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes (CATÃO et al., 2005), bem como da sua capacidade de modulação da resistência (CATÃO et al., 2010), neste trabalho foi avaliada a ação antileishmania da riparina E.

Além disso já foi demonstrado o potencial antiparasitário desse grupo de moléculas em ensaios *in vitro* contra *Schistosoma mansoni*, inclusive a riparina E foi mais ativa (MAFUD et al., 2018). Assim, dado o histórico desses compostos quanto à atividade antimicrobiana e antiparasitária, havia boas perspectivas para sua ação anti-leishmania.

Inicialmente foi avaliada sua atividade contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, com dois métodos diferentes de avaliação da viabilidade celular, via contagem em microscopia de luz e por análise colorimétrica com resazurina (Figura 1).

Figura 1: Efeitos da Rip-E na inibição do crescimento de promastigotas de *L. amazonensis*. (A): Efeito após incubação por 24, 48 e 72h, obtidos pelo método de contagem; (B): Efeito de Rip-E após incubação de 48h, obtidos pelo método colorimétrico: \*\*\*Diferença significativa em relação ao controle, com  $p < 0,001$ ; \*\*Diferença significativa em relação ao controle, com  $p < 0,01$ .



As concentrações mais baixas (6,25 e 12,5  $\mu\text{g/mL}$ ) de Rip-E, iniciaram a inibição do crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* após 48h de exposição. A partir da concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$ , o efeito inibitório pode ser observado a partir de 24h de incubação. Esse efeito

foi completo (100%) nos grupos de 50 a 800  $\mu\text{g/mL}$  em todos os tempos de incubação avaliados (Figura 1 A). Esse padrão de resposta se repete no ensaio colorimétrico (Figura 1 B), no qual as promastigotas foram expostas às diferentes concentrações de Rip-E por 48h e também ocorre diferença significativa em relação ao controle desde a concentração de 6,25  $\mu\text{g/mL}$ , indicando que há inibição do crescimento em todas as concentrações testadas. A partir de 25  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 1 B) não há diferença significativa no efeito inibitório entre os tratamentos. Além disso, observou-se que a partir da concentração de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  não houve mais diferença significativa entre os tratamentos com Rip-E e Anf B, demonstrando que a partir dessa concentração o nível de inibição do crescimento foi semelhante à observada para a anfotericina a 2,0  $\mu\text{g/mL}$ .

Os valores de  $\text{CI}_{50}$  são apresentados na Tabela 1. Os resultados mostram que a inibição sobre o crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* aumenta com o tempo de exposição, já que a  $\text{CI}_{50}$  diminui sucessivamente entre os intervalos de 24, 48 e 72h. Tomando o mesmo intervalo de incubação (48h), verificou-se que houve uma variação na  $\text{CI}_{50}$  de promastigotas obtida pelo método de contagem e pelo método colorimétrico (Tabela 1). Essa diferença provavelmente ocorre devido à forma de percepção de cada método. Na contagem, somente é possível observar a toxicidade aos parasitas quando essa se torna visualmente perceptível por alterações morfológicas. Na colorimetria a detecção de viabilidade ocorre pela proporção da conversão da resazurina em resofurina na cadeia de transporte de elétrons e pela ação do citocromo (XU; McCANNA; SIVAK, 2015). Dessa forma, esse método detecta alterações no metabolismo, que precedem alterações morfológicas visíveis, justificando o menor valor de  $\text{CI}_{50}$  obtido.

Tabela 1: Valores de  $\text{CI}_{50}$  atividade contra promastigotas de *Leishmania amazonensis* com seus respectivos limites de confiança 95% dos tratamentos com Rip-E a 24, 48 e 72h.

Método	$\text{CI}_{50}$ e intervalo de confiança 95% ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	24h	48h	72h
Contagem	20,21 (17,31-25,80)	14,58 (12,30-17,22)	8,65 (7,25-10,19)
Colorimetria	-	4,70 (1,37-9,25)	-

$\text{CI}_{50}$ : Concentração inibitória média

A atividade antileishmania da Rip-A cuja estrutura representa o núcleo fundamental das riparinas foi avaliada em um estudo anterior, tendo-se verificado que este composto foi capaz

de inibir o crescimento de *L. amazonensis* com  $CI_{50}$  de  $307,0 \pm 79,6$ ;  $193,7 \pm 44,3$ ; e  $81,8 \pm 11,2$   $\mu\text{g/mL}$  após 24, 48 e 72h, respectivamente (ARAÚJO et al., 2016). Os resultados obtidos no presente estudo indicam que o derivado di-hidroxiado Rip-E apresenta um maior potencial como agente antileishmania do que a Rip-A (Tabela 1), sugerindo que as duas hidroxilas na porção benzamida têm um papel importante na inibição desse micro-organismo.

Neste estudo foi utilizado o modelo de infecção de macrófagos com amastigotas porque é o modelo *in vitro* que mais se aproxima da infecção no hospedeiro mamífero. Os macrófagos foram selecionados como célula hospedeira para esse teste porque tem um papel fundamental na patogenia da leishmaniose tegumentar, bem como na resolução da infecção (CARNEIRO et al, 2016). Após realização do protocolo de infecção de macrófagos, quase a totalidade das células foram infectadas (98%), com número médio de seis amastigotas por macrófago. Todos os grupos experimentais de Rip-E reduziram a proporção de macrófagos infectados por *L. amazonensis* (Figura 2). Houve redução da infecção em 43,7%, 70,7% e 78,3% nas concentrações de 2,0; 4,0 e 8,0  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A resposta obtida na concentração 8,0  $\mu\text{g/mL}$  não teve diferença significativa em relação ao tratamento com Anf B 0,2  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 3 A). Em relação à infectividade (carga parasitária por célula), o grupo controle apresentou uma média de seis amastigotas por macrófago, representando 100% de sobrevivência das amastigotas. Entretanto, nas concentrações de 2,0; 4,0 e 8,0  $\mu\text{g/mL}$  de Rip-E, o percentual de parasitas por célula foi reduzido para: 28,9; 15,9 e 12,2% de sobrevivência, respectivamente (Figura 3 B). Não houve diferença significativa para a redução da infectividade observada para Anf B para os grupos 4,0 e 8,0  $\mu\text{g/mL}$ .

Figura 2: Fotomicrografia de macrófagos com amastigotas internalizadas após exposição a Rip-E após 48h de incubação. (A) Controle (não tratadas); (B) Grupo tratado com anfotericina B; (C) Grupo tratado com Rip-E 2  $\mu\text{g/mL}$ ; (D) Grupo tratado com Rip-E 4  $\mu\text{g/mL}$ ; (E) Grupo tratado com Rip-E 8  $\mu\text{g/mL}$ . As setas apontam macrófagos com amastigotas de *L. amazonensis* internalizadas Aumento de 1000x.

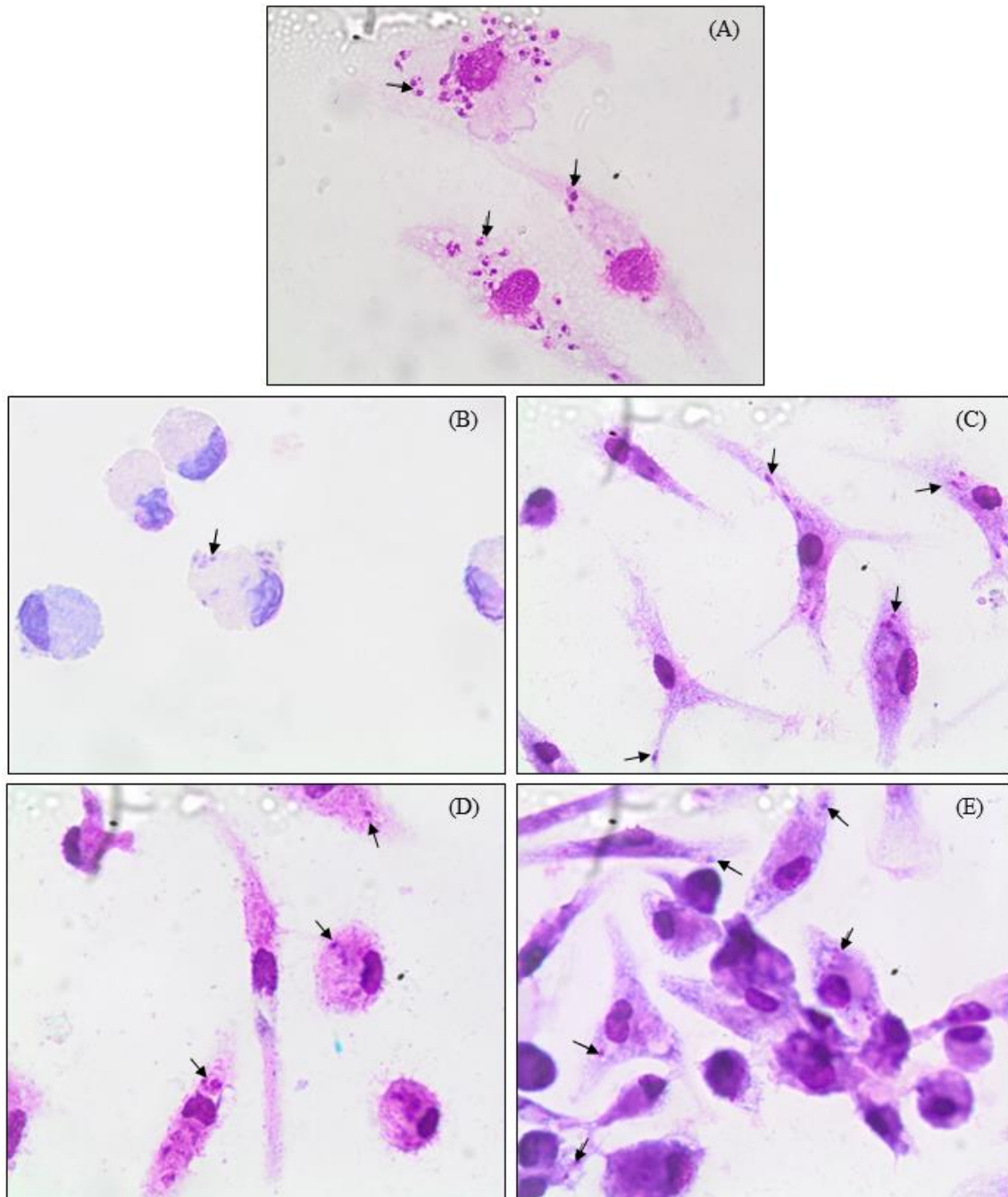
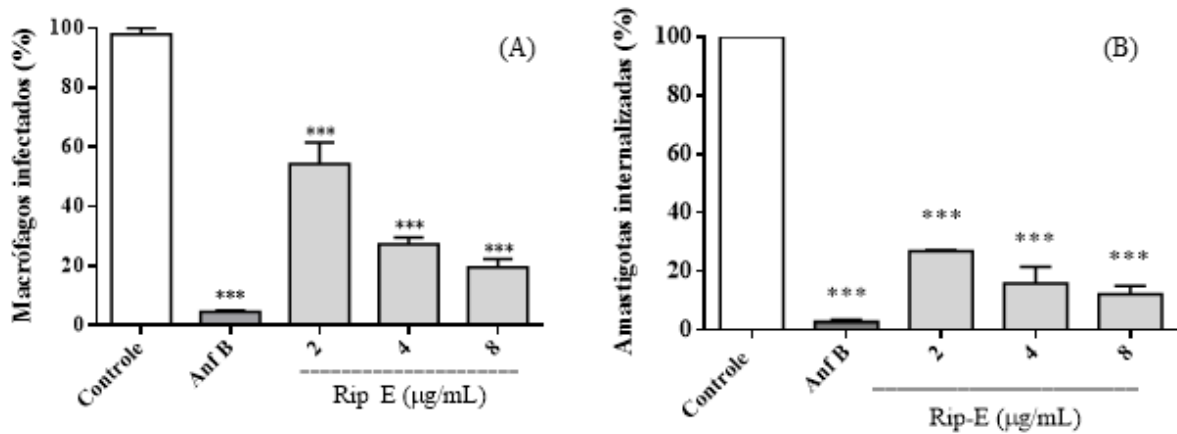




Figura 3: Efeito da Rip-E sobre a infecção de macrófagos murinos por *L. amazonensis*. Os gráficos representam a proporção de células infectadas em relação ao todo (A) e o percentual de amastigotas internalizadas por macrófago (B). O grupo controle foi composto por células não tratadas. \*\*\*Diferença significativa em relação ao controle, com  $p < 0,001$ .

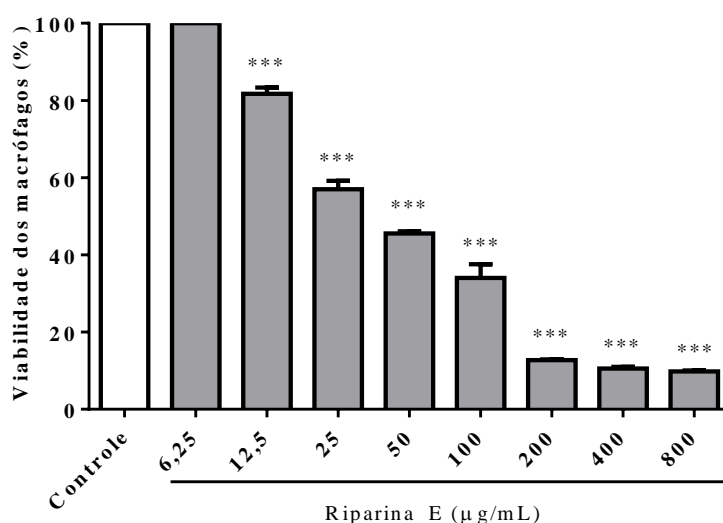


A toxicidade é um fator comum entre os fármacos anti-leishmania, inclusive porque o tratamento consiste na destruição ou inviabilização das células de leishmania. Assim, é importante avaliar a citotoxicidade contra as células de mamífero hospedeiras a fim de mensurar a seletividade da ação citotóxica do fármaco. Para esse fim, após o teste de MTT com macrófagos, realizou-se a avaliação da atividade anti-leishmania contra amastigotas internalizadas em concentrações não tóxicas ou minimamente tóxicas para macrófagos

Após 48h de incubação com Rip-E, a concentração de 6,25 µg/mL não causou toxicidade aos macrófagos. A partir da concentração de 12,5 µg/mL de Rip-E ocorreu 18,3% de redução de viabilidade dos macrófagos. O aumento da concentração reduziu progressivamente a viabilidade dos macrófagos (houve diferença significativa entre 12,5; 25,0; 50,0 e 100,0 µg/mL), até que esse efeito estabilizou nas concentrações de 200,0 a 800,0 µg/mL, atingindo 90% de redução de viabilidade (Figura 4). A concentração citotóxica média (CC<sub>50</sub>) da Rip-E foi 50,6 µg/mL (Tabela 2), mais alta do que o valor encontrado na literatura para anfotericina B, 21,1 µg/mL, demonstrando menor toxicidade da Rip-E contra macrófagos (OLIVEIRA et al., 2017).

Nas concentrações onde houve inibição mais imediata do crescimento há toxicidade mais expressiva, porém nas concentrações mais baixas e de menor toxicidade o efeito é mais tardio, embora aconteça. Como o efeito tende a aumentar com o tempo de incubação, o mesmo grau de inibição pode ser obtido com um tempo maior de tratamento que apenas 24h, com o benefício de preservar as células hospedeiras.

Figura 4: Viabilidade de macrófagos murinos após 48h de exposição a Rip-E. O grupo controle foi composto por células não tratadas. \*\*\*Diferença significativa em relação ao controle, com  $p < 0,001$ .



Com respeito ao índice de seletividade (IS), verifica-se na Tabela 3 que a  $CI_{50}$  para amastigotas internalizadas é 38,8 vezes menor que a  $CC_{50}$ , demonstrando uma maior seletividade da ação da Rip-E para as células de *Leishmania* que para macrófagos de mamíferos. Isso é importante porque pode caracterizar menor toxicidade no tratamento da leishmaniose. Os mesmos parâmetros foram estudados para Anf B em outro trabalho, no qual a  $CC_{50}$  para macrófagos murinos foi 21,1 µg/mL, a  $CI_{50}$  para amastigotas 0,65 µg/mL e a IS 32,3 (OLIVEIRA et al., 2017). Embora a Anf B seja mais potente, Rip-E demonstrou eficácia na ação anti-leishmania *in vitro* mesmo nas concentrações mais baixas e apresentou menor toxicidade para os macrófagos que Anf B.

Tabela 2: Efeito anti-leishmania de Rip-E sobre *L. amazonensis* (promastigotas e amastigotas internalizadas) e sua citotoxicidade em macrófagos murinos após 48h de incubação.

$CC_{50}$	$CI_{50}$ promastigotas	$CI_{50}$ amastigotas	IS
50,6	4,7	1,3	38,9

Legenda:  $CC_{50}$ : Concentração citotóxica para 50% da população;  $CI_{50}$ : concentração inibitória para 50% da população; IS: índice de seletividade,  $IS = CC_{50}/CI_{50}$  amastigotas.

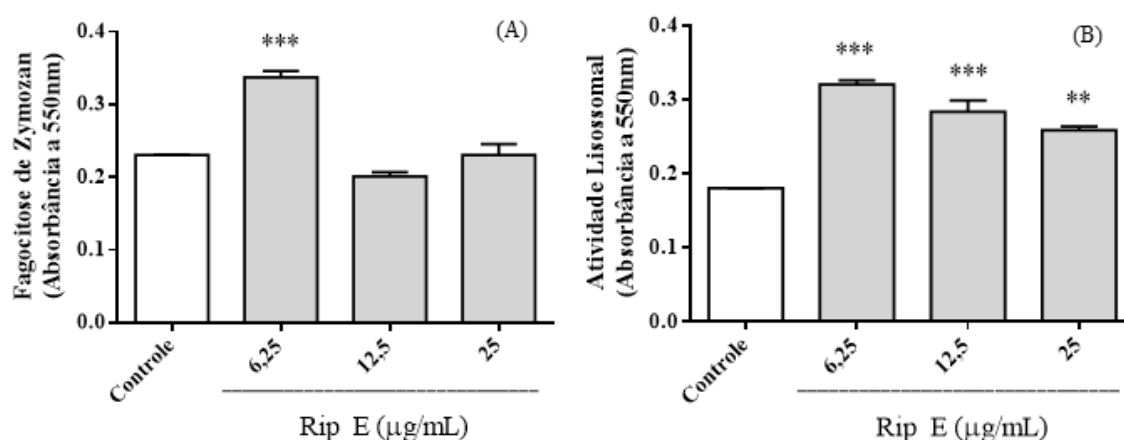
Os macrófagos têm um papel central na infecção por *Leishmania* spp. e que o seu grau de ativação é importante na eliminação dos parasitas. Existe uma regulação complexa da resposta imune celular adaptativa na indução de um padrão de ativação mais pró-inflamatório e citotóxico ou anti-inflamatório e que promove a progressão da infecção e cronificação da doença. Esse balanço da resposta é mediado, em grande parte, por influência de citocinas

secretadas pelos linfócitos T auxiliares, no qual a resposta Th1 é considerada curativa e Th2, por frear a inflamação, em geral favorece a proliferação dos parasitas e a progressão para uma forma mais grave da LT (ROSSI; FASEL, 2017).

Os macrófagos contribuem para a resposta imune inata por combater os micro-organismos por fagocitose. A subsequente fusão dos lisossomas com o fagossoma dá origem ao fagolisossoma e a produção de espécies reativas de oxigênio leva à morte dos micro-organismos internalizados (BALESTRIERI et al., 2006). Devido à grande participação da resposta imune na evolução dessa doença, é importante avaliar não só a ação direta de fármacos sobre a célula de *Leishmania*, bem como sua capacidade de imunomodulação. Nesse contexto, existem alguns parâmetros de ativação de macrófagos que podem ser avaliados, como a capacidade fagocítica, atividade lisossomal e a síntese de óxido nítrico. Por isso, esses parâmetros foram avaliados pela exposição de macrófagos por 48h a Rip-E nas mesmas concentrações utilizadas inicialmente no tratamento de promastigotas.

Um desses parâmetros é a capacidade fagocítica, no qual é medida a quantidade de zymosan capturada por fagocitose pelos macrófagos. O zymosan é um polissacarídeo imunogênico presente na parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, que ativa macrófagos e estimula a fagocitose (ABOU-ELAZAB et al., 2017), como visto no grupo controle (Figura 5 A).

Figura 5: Efeito da Rip-E na capacidade fagocítica (A) e na atividade lisossomal (B) de macrófagos murinos após incubação de 48h. O grupo controle foi composto por células não tratadas. \*\*\*Diferença significativa em relação ao controle, com  $p < 0,001$ ; \*\*Diferença significativa em relação ao controle, com  $p < 0,01$ .

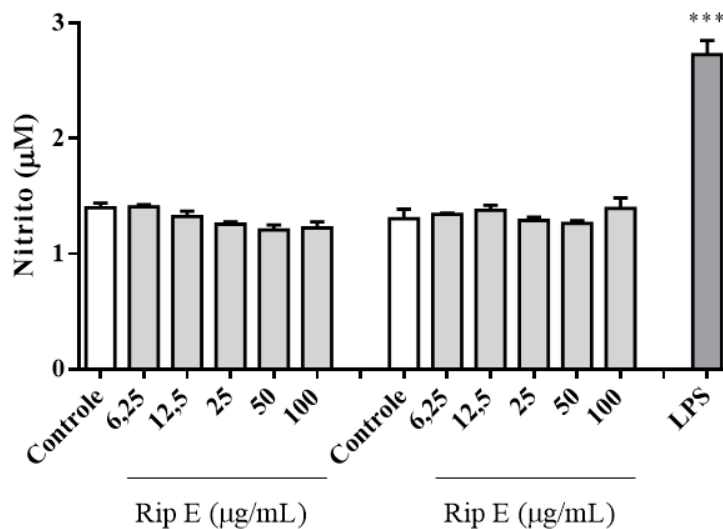


Rip-E induziu a fagocitose do zymosan apenas na concentração de 6,25 µg/mL. Provavelmente esse efeito não é observado nos outros grupos por haver um início de toxicidade

aos macrófagos (Figura 5 A). Nas concentrações de 12,5 e 25  $\mu\text{g/mL}$  já se observa alteração na viabilidade, com visto na Figura 4. Embora o aumento da fagocitose se limite ao grupo 6,25  $\mu\text{g/mL}$ , todas as concentrações testadas de Rip-E aumentaram a atividade lisossomal (Figura 5 B), porém com maior atividade na concentração 6,25  $\mu\text{g/mL}$ , provavelmente pela mesma razão citada anteriormente.

A fagocitose nos macrófagos é acompanhada pela liberação de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (ERO e ERN), entre estas o óxido nítrico (NO) (LIU; UZONNA, 2012). A Rip-E não alterou a produção de NO em nenhuma das concentrações testadas (Figura 6), indicando que não interfere diretamente na atividade da sintase de óxido nítrico (NOS) ou em qualquer outra etapa da síntese de NO nos macrófagos.

Figura 6: Efeito da Rip-E na produção de óxido nítrico por macrófagos murinos após incubação por 48h na presença (+) ou na ausência (-) de infecção por *L. amazonensis*. O grupo controle foi composto por células não tratadas e o grupo LPS corresponde às células expostas a lipopolissacarídeo (LPS). \*\*\*Diferença significativa em relação ao controle, com  $p < 0,001$ ; \*\*Diferença significativa em relação ao controle, com  $p < 0,01$ .



*L. amazonensis*

-

+

NO é um radical e, portanto, é instável em ambiente com oxigênio. Na presença de oxigênio ou superóxido originam-se espécies reativas de nitrogênio e oxigênio que levam a formação de uma gama de espécies antimicrobianas. As espécies reativas de nitrogênio causam dano oxidativo e nitrosativo, levando a alterações no DNA, inibição de enzimas e indução de peroxidação lipídica, que são as principais propriedades antimicrobianas do NO (SCHAIRER et al., 2012).

A produção de NO é aumentada, entre outros fatores, pela ativação de macrófagos por citocinas provenientes da resposta Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , entre outras) e esse padrão de resposta é tradicionalmente associado à maior suscetibilidade da *Leishmania*. Embora essa via seja muito importante na eliminação do parasita, tem-se demonstrado que a exacerbação da produção de radicais livres (ERO e ERN) pode estar associada com a piora do quadro clínico, devido ao aumento no dano tecidual causado pelo estresse oxidativo (CARNEIRO et al., 2016; CONCEIÇÃO-SILVA; LEITE-SILVA; MORGADO, 2018). Dessa forma, fármacos capazes de modular a resposta imune podem tornar os patógenos mais vulneráveis, porém podem contribuir para a evolução para uma forma clínica mais grave da LT.

Em síntese, é possível concluir que a riparina E possui um bom potencial anti-leishmania contra as duas formas evolutivas desse parasita e demonstrou redução na infecção em concentrações mais baixas, nas quais não apresentou toxicidade *in vitro* aos macrófagos. Além disso, promoveu a ativação dos macrófagos por aumento da fagocitose e aumento da atividade lisossomal, porém sem interferir na liberação de óxido nítrico.

#### Referências

- ABOU-ELAZAB, M. F.; INOUE, Y.; KAMEI, H.; HORIUCHI, H.; FURUSAWA, S. Zymosan A enhances humoral immune responses to soluble protein in chickens. **J Vet Med Sci**, v. 79, n. 8 p. 1335–1341, 2017.
- ARAÚJO, E. J. F.; LIMA, L. K. F.; SILVA, O. A.; REZENDE-JÚNIOR, L. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; CARVALHO, F. A. A.; LIMA, F. C. A.; PESSOA, C.; FREITAS, R. M.; FERREIRA, P. M. P. In vitro antioxidant, antitumor and leishmanicidal activity of riparin A, an analog of the Amazon alkaloids from *Aniba riparia* (Lauraceae). **Acta Amazonica** v. 46, n. 3, p. 309 – 314, 2016.
- ARAÚJO, F. L.; MELO, C. T.; ROCHA, N.F.; MOURA, B.A.; LEITE, C.P.; AMARAL, J.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; SOUSA, F.C.F. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (Riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 380, p. 337-344, 2009.
- BALESTRIERI, B.; HSU, V. W.; GILBERT, H.; LESLIE, C. C.; HAN, W. K.; BONVENTRE, J. V. Group V secretory phospholipase A2 translocates to the phagosome after zymosan stimulation of mouse peritoneal macrophages and regulates phagocytosis. **J Biol Chem**, v. 281, p. 6691-6698, 2006.
- BONATTO, S. J.; FOLADOR, A.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R. K.; PIZATTO, N.; OLIVEIRA, H. H.; VECCHI, R.; CURI, R.; CALDER, P. C.; FERNANDES, L. C. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cell Immunol**, v. 231, n. 1-2, p. 56-62, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC). **Relatório de recomendação: Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar**, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. Brasília, 2017b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan): **Leishmaniose Tegumentar Americana - casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação** – Brasil. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/ltabr.def>>. Acesso em: 02 nov. 2017a.

CARNEIRO, S. M. P.; CARVALHO, F. A. A.; SANTANA, L. C. L. R.; SOUSA, A. P. L.; MOITA-NETO, J. M.; CHAVES, M. H.. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). **Biol Res**, v. 45, p. 111-116, 2012.

CARNEIRO, P. P.; CONCEIÇÃO, J.; MACEDO, M.; MAGALHÃES, V.; CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS One**, v. 11, n. 2, 2016.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; LEITE-SILVA, J.; MORGADO, F. N. The Binomial Parasite-Host Immunity in the Healing Process and in Reactivation of Human Tegumentary Leishmaniasis. **Front Microbiol**, v. 9, n. 1308, p. 1-17, 2018.

CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. **Rev Bras Anal Clin**, v. 37, p. 247-249, 2005.

CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; SILVA, M. A. R.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Rev Bras Anal Clin**, v. 42, p. 9-14, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Parasites – Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/disease.html>>. Acesso em: 02 nov. 2017.

GRANDO, F. C. C.; FELÍCIO, C. A.; TWARDOWSCHY, A.; PAULA, F. M.; BATISTA, V. G.; FERNANDES, L. C.; CURTI, R.; NISHIYAMA, A. Modulation of peritoneal macrophage activity by the saturation state of the fatty acid moiety of phosphatidylcholine. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 7, p. 599-605, 2009.

LEITE, C. P.; ARAUJO, F. L. O.; MELO, C. T. V.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SOUSA, F. C. F. Antiinflammatory activity of riparin I (O-methyl N-benzoyl tyramine) on paw edema models in mice **Inflammat Res**, v. 60, p. 202-202, 2011.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, p 1-8, 2012.

MAFUD, A. C.; SILVA, M. P. N.; NUNES, G. B. L.; OLIVEIRA, M. A. R.; BATISTA, L. F.; RUBI, T. I.; MENGARDA, A. C.; LAGO, E. M.; XAVIER, R. P.; GUTIERREZ, S. J. C.; PINTO, P. L. S.; SILVA-FILHO, A. A.; MASCARENHAS, Y. P.; MORAES, J. Antiparasitic, structural, pharmacokinetic, and toxicological properties of riparin derivatives. **Toxicol In Vitro**, v. 50, p. 1-10, 2018

MELO, C. T. V.; CARVALHO, A. M. R.; MOURA, B. A.; TEIXEIRA, C. P. L.; VASCONCELOS, L. F.; FEITOSA, M. L.; OLIVEIRA, G. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CHAVEZ GUTIERREZ, J. C.; FONTELES, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; SOUSA, F. C. F. Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 27, p. 104-112, 2013.

MURBACK, N. D. N.; NASCIMENTO, R. A. F.; DORVAL, M. E. M. C.; HANS-FILHO, G.; NAKAZATO, K. R. O. American cutaneous leishmaniasis: clinical, epidemiological and laboratory studies conducted at a university teaching hospital in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 1, p. 55-63, 2011.

OLIVEIRA, L. G. C.; BRITO, L. M.; ALVES, M. M. M.; AMORIM, L. V.; SOBRINHO-JÚNIOR, E. P. C.; CARVALHO, C. E. S.; RODRIGUES, K. A. F.; ARCANJO, D. D. R.; CITÓ, A. M. G. L.; Carvalho, F. A. A. In Vitro Effects of the Neolignan 2,3-Dihydrobenzofuran Against *Leishmania amazonensis*. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 120, p. 52-58, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance**. In: Weekly epidemiological record v. 92, n. 38, p. 557-572, 2017.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! **Int Immunol**, v. 30, n. 3, p. 103-111, 2017.

SCHAIRES, D. O.; CHOUAKE, J. S.; NOSANCHUK, J. D.; FRIEDMAN, A. J. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 271-279, 2012.

SOARES, D. C.; PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A.; SARAIVA, E. M. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitol Int**, v. 56, n. 2, p. 135-9, Jun 2007.

SOUZA, A. C.; ALVES, M. M. M.; BRITO, L. M.; OLIVEIRA, L. G. C.; SOBRINHO-JÚNIOR, E. P. C.; COSTA, I. C. G.; FREITAS, S. D. L.; RODRIGUES, K. A. F.; CHAVES, M. H. ARCANJO, D. D. R.; CARVALHO, F. A. A. *Platonia insignis* Mart., a Brazilian Amazonian Plant: The Stem Barks Extract and Its Main Constituent Lupeol Exert

Antileishmanial Effects Involving Macrophages Activation. **Evid Based Complement Alternat Med**, v.2017, 2017.

SOUSA, F. C. F.; CARVALHO, A. M. R.; LEITE, C. P.; ROCHA, N. F. M.; RIOS, E. R. V.; VASCONCELOS, L. F.; MELO, C. T. V.; LIMA, S. T.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, S. M. M. Anti-inflammatory activity of riparin II (N-2-hydroxybenzoyl tyramine) in rats. **Inflammat Res**, v. 60, p. 206-206, 2011.

SOUSA, F. C. F.; LEITE, C. P.; MELO, C. T. V.; ARAÚJO, F. L. O.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B. Evaluation of effects of N-(2-hydroxybenzoyl)tyramine (riparin II) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in anxiety models in mice. **Biol Pharm Bull**, v. 30, p. 1212- 1216, 2007.

XU, M.; McCANNA, D. J.; SIVAK, J. G. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 71, p. 1–7, 2015.



## 6. Conclusões

Do ponto de vista molecular, Rip-E e Rip-B apresentam-se como os agentes mais completos, com um deles possuindo a melhor atividade antimicrobiana intrínseca e o outro, melhor atividade como EPI. Embora Rip-B não apresente atividade antimicrobiana intrínseca contra *S. aureus*, é um promissor adjuvante para fluoroquinolonas no tratamento de infecções causadas por cepas de *S. aureus* que superexpressem bomba de efluxo NorA. Entretanto, são necessários estudos adicionais para verificar sua eficácia *in vivo* quando administrada em associação com fluoroquinolonas. Quanto à atividade antimicrobiana a riparina E apresenta atividade contra bactérias, especialmente as Gram-positivas, e leveduras. Neste estudo demonstrou-se que o mecanismo de ação antimicrobiano é de lesão à membrana, levando à lise celular. Há indícios que Rip-E induza apoptose em *C. albicans*, além do efeito direto sobre a membrana, porém mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese. Estes resultados indicam a possibilidade da Riparina E ser utilizada como agente antimicrobiano na prevenção e tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias e leveduras. Em relação à atividade antileishmania, a riparina E possui um bom potencial no combate às duas formas evolutivas de *L. amazonensis* e demonstrou redução na infecção em concentrações mais baixas, nas quais não apresentou toxicidade *in vitro* aos macrófagos. Além disso, promoveu a ativação dos macrófagos por aumento da fagocitose e aumento da atividade lisossomal, porém sem interferir na liberação de óxido nítrico.

## **7. Perspectivas**

Dado o potencial antibacteriano, antifúngico e antileishmania da Riparina E observado neste estudo, temos como perspectiva, a avaliação antimicrobiana com associação de luz ultravioleta (atividade fotodinâmica). Além disso, realizar estudos de toxicidade para avaliar a segurança desses fármacos, visando o desenvolvimento futuro de medicamentos para uso humano ou animal.



# **Anexo**

## ORIGINAL ARTICLE

**Inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by synthetic riparins**L.M. Costa<sup>1</sup>, E.V. de Macedo<sup>2</sup>, F.A.A. Oliveira<sup>2</sup>, J.H.L. Ferreira<sup>2</sup>, S.J.C. Gutierrez<sup>2</sup>, W.J. Peláez<sup>3</sup>, F.C.A. Lima<sup>4</sup>, J.P. de Siqueira Júnior<sup>5</sup>, H.D.M. Coutinho<sup>6</sup>, G.W. Kaatz<sup>7</sup>, R.M. de Freitas<sup>1,\*</sup> and H.M. Barreto<sup>2</sup>

1 Laboratory for Research in Experimental Neurochemistry, Federal University of Piauí, Teresina (PI), Brazil

2 Laboratory for Research in Microbiology, Federal University of Piauí, Teresina (PI), Brazil

3 INFIQC-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina

4 Laboratory of Computational Quantum Chemistry and Drug Planning, State University of Piauí, Teresina (PI), Brazil

5 Laboratory of Genetic of Microorganisms, Federal University of Paraíba, João Pessoa (PB), Brazil

6 Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Regional University of Cariri, Crato (CE), Brazil

7 Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, Wayne State University School of Medicine, Detroit, MI, USA

**Keywords**

antibiotics, diseases, infection, resistance, staphylococci.

**Correspondence**

Humberto Medeiros Barreto, Laboratory for Research in Microbiology, Federal University of Piauí, Teresina (PI) 64049550, Brazil.  
E-mail: hmbarreto@ufpi.edu.br

\*In Memoriam.

2016/0651: received 28 March 2016, revised 12 August 2016 and accepted 15 August 2016

doi:10.1111/jam.13258

**Abstract**

**Aim:** The goal of this study was to increase knowledge about the antimicrobial activity of some synthetic Riparin-derived compounds, alone or in combination with fluoroquinolone antibiotics, against a strain of *Staphylococcus aureus* resistant to fluoroquinolone by way of overexpression of the NorA efflux pump.

**Methods and Results:** Microdilution tests showed that Riparins A and B did not show any significant antibacterial activity against *Staph. aureus* strains. On the other hand, the intrinsic antibacterial activity increased with increasing lipophilicity of the compounds, in the following order: Riparin-D (MIC 256  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; Log P 2.95) < Riparin-C (MIC 102  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; Log P 3.22) < Riparin-E (MIC 16  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; Log P 3.57). The addition of all riparins to growth media at subinhibitory concentrations caused an increase in the antibacterial activity of antibiotics against the NorA-overexpressing test strain. Riparin-B, which has two methoxyl groups at the phenethyl moiety, showed the best modulatory effect.

**Conclusions:** Riparin-E is a good anti-staphylococci agent, while Riparin-B functions as a NorA efflux pump inhibitor.

**Significance and Impact of the Study:** Our data suggest the possibility of using Riparin-B in combination with norfloxacin or ciprofloxacin for therapy of infections caused by multi-drug resistant *Staph. aureus*.

**Introduction**

Riparins are natural alkaloids found in fruits and calyx of *Aniba riparia*, a species of the family Lauraceae (Barbosa-Filho *et al.* 1987; Takaku *et al.* 2007). Several biological activities of these compounds have been reported, in particular in the central nervous system, such as anxiolytic and antidepressive-like activities (Sousa *et al.* 2004, 2005, 2007; Melo *et al.* 2006). Besides their influence on the central nervous system, anti-inflammatory (Carvalho *et al.* 2013) and antinociceptive activities were described

for Riparins (Araújo *et al.* 2009). Riparins also exhibit antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* multidrug-resistant strains (Catão *et al.* 2005), as well as the capacity of impairing drug resistance against penicillin (Catão *et al.* 2010).

The extraction and isolation process from source plants has a very low yield. As such, production of synthetic Riparins was adopted. Since the synthetic route became the main way of obtaining molecules from this group of compounds, several synthetic analogues were produced including Riparins A, B, C, D and E (Barbosa-Filho *et al.* 1990).

Some activities of these analogues were already screened, such as cytotoxic and *in vitro* antioxidant activities (Nunes *et al.* 2014). Synthetic salicylamides which are structurally similar compounds to the riparins showed bioactivity against *Plasmodium falciparum* (Fritzson *et al.* 2011).

Methicillin-resistant *Staph. aureus* (MRSA) is a pathogen associated with several infectious diseases acquired in hospitals and communities worldwide (Razera *et al.* 2009; Shittu *et al.* 2009; Sisirak *et al.* 2010). Examples include cutaneous and soft tissue infections, bacteraemia, septic arthritis, osteomyelitis and necrotizing pneumonia (Seymour 2009; Otto 2010). Therapy of these infections may be complicated as many MRSA strains carry multiple antibiotic resistance genes (Otto 2012), including those encoding transmembrane proteins known as efflux pumps, which can extrude antibiotics from the bacterial cell (Kumar and Varela 2012; Andersen *et al.* 2015). Fluoroquinolones have been used in the treatment of MRSA (Bhopale 2014), but resistance to this antibiotic class has become common and widespread (Gade and Qazi 2013; Lastours *et al.* 2014).

The high prevalence of infectious diseases caused by multi-drug resistant bacteria has resulted in a search for new antibiotics (Céliz *et al.* 2011; Duda-Chodak 2012; Kumar and Chopra 2013) or efforts aimed at improving the efficacy of current antibiotics (Laxminarayan 2014). Resistance to fluoroquinolones is frequently mediated by efflux pumps able to pump out these antibiotics from the bacterial cell (Costa *et al.* 2013). Combination therapies with an antibiotic associated with an efflux pump inhibitor (EPI) could be an innovative strategy to reverse bacterial resistance mediated by efflux pumps (Schindler *et al.* 2013; Bharate *et al.* 2015; Chovanová *et al.* 2015).

Previous studies have provided evidence that secondary metabolites derived from plants, including flavonoids (Wang *et al.* 2014), flavones (Chan *et al.* 2011), coumarins (Roy *et al.* 2013; Joshi *et al.* 2014), acylphloroglucinols (Shiu *et al.* 2013), curcuminoids (Joshi *et al.* 2014) and alkaloids (Markham *et al.* 1999) could be potential inhibitors of NorA, a multi-drug transporter of *Staph. aureus*. In this study, Riparin synthetic analogues were tested for their antibacterial activity alone or in combination with fluoroquinolone antibiotics against *Staph. aureus* aiming to evaluate their potential as NorA inhibitors.

## Material and methods

### Chemicals

Norfloxacin and ciprofloxacin were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Antibiotics were dissolved in sterile water. Stock solutions of *N*-phenethylbenzamide (Riparin-A), *N*-[2-(3,4-dimethoxy-phenyl)ethyl]-benzamide (Riparin-B), 2-hydroxy-*N*-phenethylbenzamide (Riparin-

C), 2-hydroxy-*N*-[2-(3,4-dimethoxy-phenyl)ethyl]-benzamide (Riparin-D) and 2,6-dihydroxy-*N*-phenethylbenzamide (Riparin-E) were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO - MERCK) and then diluted with sterile water.

### Bacterial strains and growth conditions

All tests were performed with *Staph. aureus* SA-1199B, which over-expresses the *norA* gene encoding NorA. NorA can efflux hydrophilic fluoroquinolones and other drugs such as DNA-intercalating dyes (Kaatz and Seo 1993). The strain SA-1199 which express *norA* at a basal level was used as negative control for modulation and ethidium bromide (EtBr) transport assays (Kaatz and Seo 1995). *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was used as positive control only in the assays for evaluation of intrinsic antibacterial activity. Strains were maintained on Nutrient Agar (Himedia, India, Mumbai) slants at 4°C. Before use in assays cells were grown overnight at 37°C in Brain Heart Infusion (BHI; Himedia).

### Evaluation of intrinsic antibacterial activity

Stock solutions of Riparin-A, B, C, D and E (Rip-A through -E respectively), (10 000 µg ml<sup>-1</sup>) were prepared in DMSO followed by dilution in sterile water to a final concentration of 4096 µg ml<sup>-1</sup>. Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined using a microdilution assay (CLSI, 2013), employing 10% BHI broth (Barreto *et al.* 2014) and bacterial suspensions of ca. 10<sup>5</sup> CFU ml<sup>-1</sup> and Riparin solutions ranging from 2048 to 8 µg ml<sup>-1</sup>. Microtitre plates were incubated at 37°C for 24 h, then 20 µl of resazurin (0.01% w/v in sterile distilled water) was added to each well to detect bacterial growth (Hussain *et al.* 2011) by the change in the colour from blue to pink. MICs were defined as the lowest concentration at which no bacterial growth was observed.

### Modulation of the antibiotic activity assay

For evaluation of Riparin-derived compounds as modulators of fluoroquinolone resistance, MICs of norfloxacin and ciprofloxacin were determined in the presence or absence of subinhibitory concentrations (1/8 MIC) of each compound (Coutinho *et al.* 2010). Antibiotics or EtBr concentrations ranged from 128 to 0.125 µg ml<sup>-1</sup>. Microtitre plates were incubated at 37°C for 24 h and readings were performed with resazurin as previously described.

### Ethidium bromide efflux inhibition assay

The potential activity of the Riparins as EPIs was assessed using a semi-automated EtBr method (Kaatz

*et al.* 2000) with modifications. Strains SA-1199B and SA-1199 were cultured in 2 ml of BHI broth until an optical density at 600 nm of 0.6 was achieved, followed by centrifugation at 5000 G for 5 min. Pellets were re-suspended in 2 ml of normal saline. Bacterial suspensions were vortexed and then transferred to 96 well plates followed by addition of a saline solution containing EtBr ( $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) and Riparin-B ( $128$  or  $256 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). A bacterial suspension containing only EtBr ( $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) was used as a positive control. Blank controls for each test were prepared in saline solution. Plates were placed in a StepOnePlus Real-Time PCR System™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) and relative fluorescence representing accumulated EtBr by the bacterium was measured after 60 min. Relative Final Fluorescence (RFF) was calculated by subtracting values for the respective blank controls. Differences in RFF between compound-containing and positive control assays was indicative of activity of the compound to inhibit efflux of EtBr.

#### Species distribution and Log P estimation

Estimation of distribution of the different species in equilibrium of the Riparins under study ( $\text{RH}_2^+ \rightleftharpoons \text{RH} \rightleftharpoons \text{R}^-$ ) as a function of pH and Log P were performed using the ACD/LabD and ACD/LogP (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, ON, Canada). Log P has been calculated at pH = 7 for the uncharged molecule (RH) due to the typical range of pKas of the aromatic hydroxyls which are around 8.0–10.0. Distribution of species against pH (0–14) was also calculated with the same program for all compounds studied to corroborate that at physiological pH the neutral species predominates.

#### Structure prediction of NorA and molecular docking

All dockings were carried out using the Schrodinger Suite 2015 molecular modelling software. A two-dimensional structure of Rip-B was built using Maestro. This structure was converted into its three-dimensional form, including various tautomers, conformers and ionization states using LigPrep and ConfGen modules. A three-dimensional model of the NorA was generated using I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). The best scoring model was used as a receptor for ligand-receptor docking. The receptor was prepared for docking employing Protein Preparation Wizard, and the binding site grid was generated. Ligand-receptor docking was performed using the Glide module, and flexible docking was carried out for all the conformers to determine the ligand binding mode. Extra Precision scoring function of Glide was used.

#### Statistical analysis

Each experiment was performed three times, and results were normalized by calculation of geometric means. Error deviation and standard deviation of geometric means were revealed. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism, ver. 5.02 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Differences between treatment with antibiotics in the absence or presence of Riparin-derived compounds were examined using One-way analysis of variance (ANOVA). The significance of differences was analysed by the Bonferroni post-test, and they were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

## Results

#### Intrinsic antibacterial activity

The intrinsic antibacterial activity of synthetic Riparin-derived compounds was tested by microdilution method against *Staph. aureus* strains, and the results are presented in Table 1. Rip-A, which forms the fundamental core of riparins, as well as Rip-B derivative, showed no intrinsic antibacterial activity against test strains (Holetz *et al.* 2002), while Rip-D showed a moderate inhibitory effect. On the other hand, Rip-C and Rip-E, the more lipophilic synthetic analogues showed a good inhibitory effect (Table 1 and Fig. 1).

#### Modulation of antibiotic activity

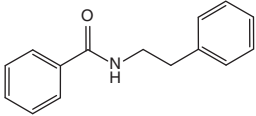
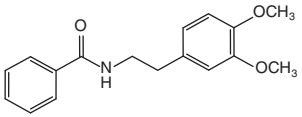
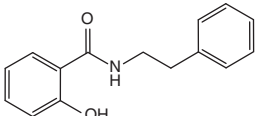
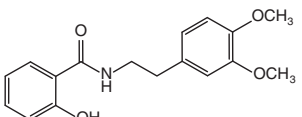
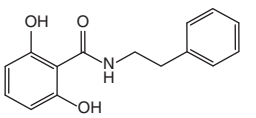
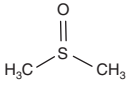
Modulatory activity of compounds on resistance to norfloxacin, ciprofloxacin or EtBr was evaluated using SA-1199 and SA-1199B, which are the wild-type parent and *norA*-overexpressing derivatives respectively. This activity is present when test compounds, added to the growth medium at subinhibitory concentrations, were able to reduce MICs of norfloxacin, ciprofloxacin or EtBr, indicating modulation of resistance to these antibacterial agents.

All Riparins presented modulatory activity towards norfloxacin and ciprofloxacin (Figs 2 and 3), with Rip-B showing the best activity. Only Rip-B showed modulatory activity for EtBr, a known NorA substrate (Fig. 4). On the other hand, no significant change in MICs was verified when antibiotics were tested alone or in combination with Riparins against SA-1199 (the MIC for norfloxacin and ciprofloxacin was  $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  in the absence of Riparins and ranged from 0.25 to  $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  in the presence of all Riparins).

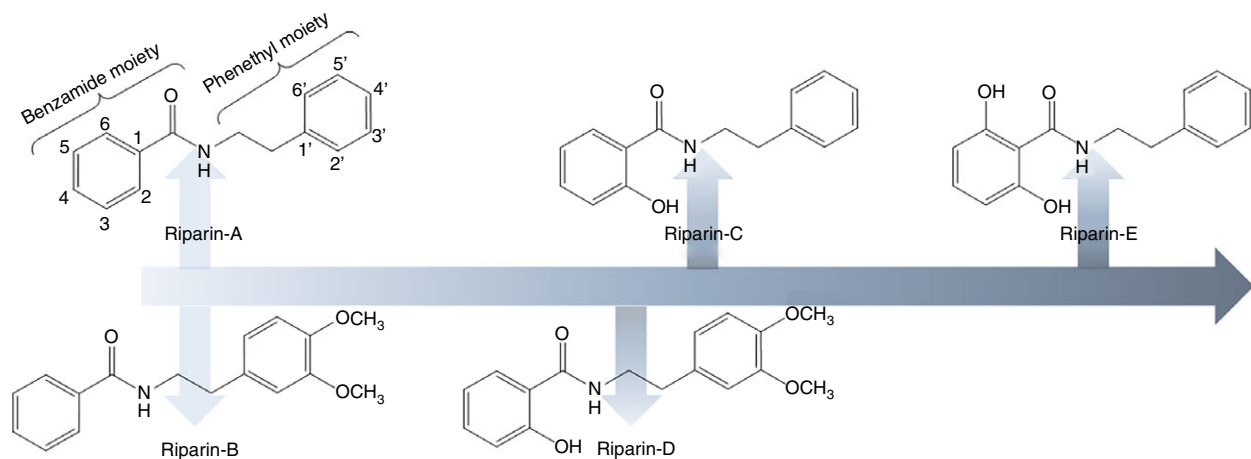
#### Ethidium bromide efflux inhibition by Rip-B

To verify if Rip-B was an EPI for NorA, inhibition of EtBr efflux assays were performed using both SA1199 and

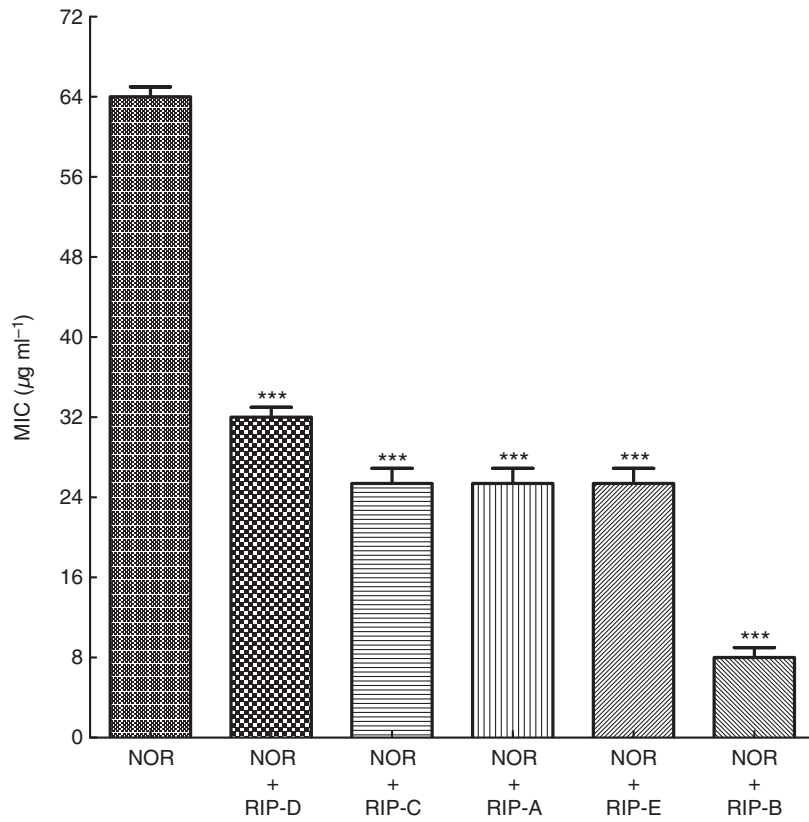
**Table 1** Minimal inhibitory concentration (MIC) and theoretical estimated Log P for all Riparin-derived compounds tested against *Staphylococcus aureus* strains

Entry	Riparins	Structure	Log P	MIC ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )*	
				SA-1199B	ATCC 25923
1	Riparin-A		2.87	$\geq 1024$	$\geq 1024$
2	Riparin-B		2.61	1024	1024
3	Riparin-C		3.22	102	102
4	Riparin-D		2.95	256	813
5	Riparin-E		3.57	32	25
6	DMSO		–	2048	2048

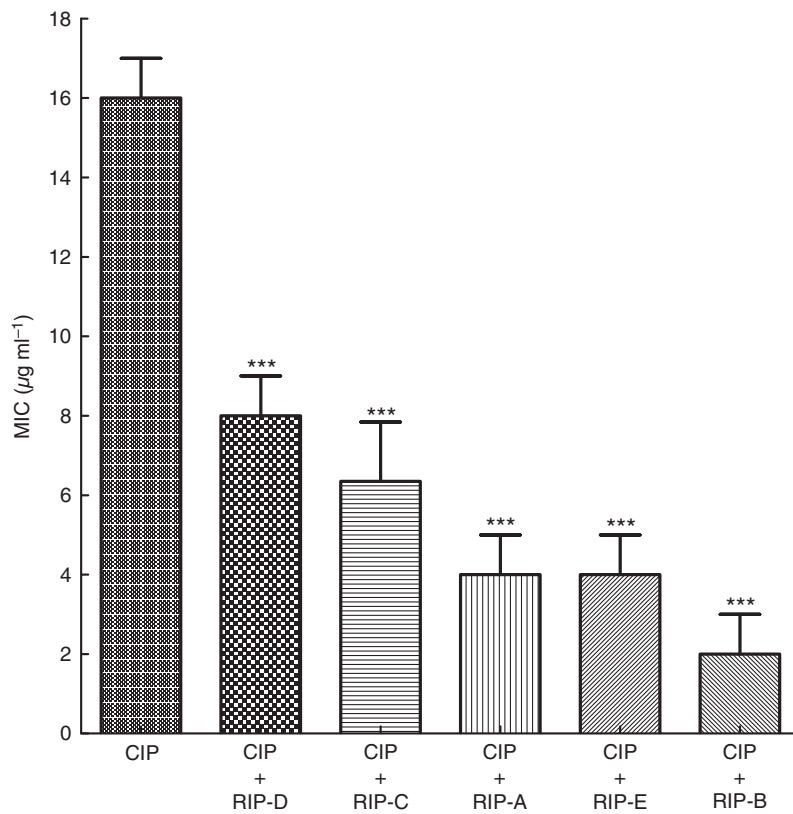
\*Geometric mean of three simultaneous tests.

**Figure 1** Structural differences and qualitative antibacterial activity of synthetic Riparins against *Staphylococcus aureus* SA-1199B. Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).

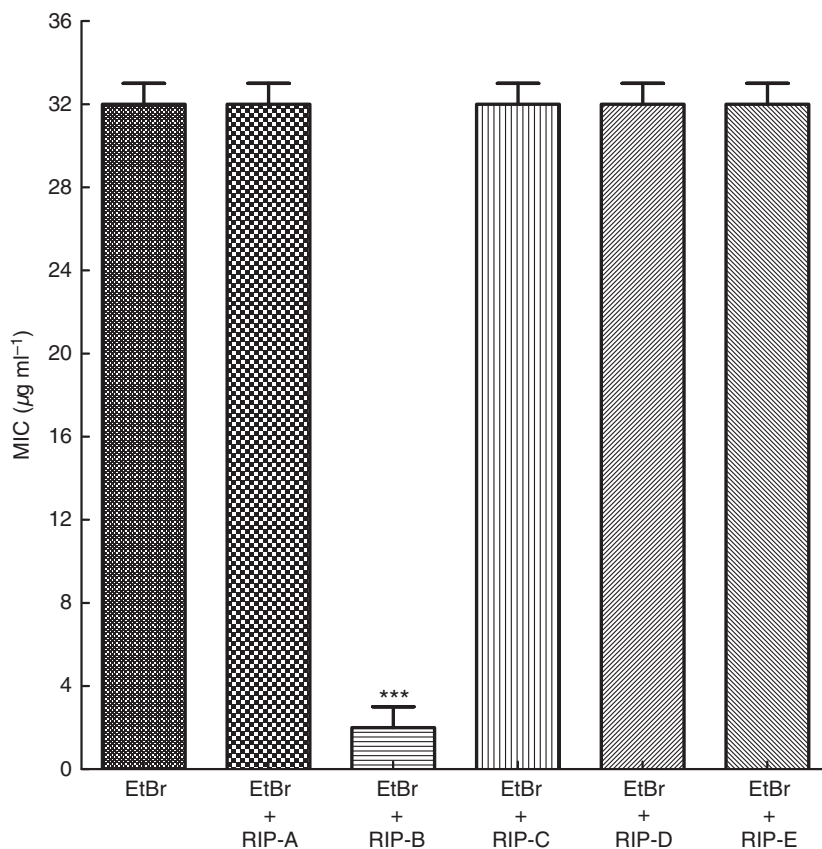




**Figure 2** Minimal inhibitory concentration values (geometric means of three simultaneous tests) shown by Norfloxacin in the absence or presence of Riparin-derived compounds for *Staphylococcus aureus* SA-1199B. \*\*\*Value statistically significant ( $P < 0.0001$ ).



**Figure 3** Minimal inhibitory concentration values (geometric means of three simultaneous tests) shown by Ciprofloxacin in the absence or presence of Riparin-derived compounds for *Staphylococcus aureus* SA-1199B. \*\*\*Value statistically significant ( $P < 0.0001$ ).



**Figure 4** Minimal inhibitory concentration values (geometric means of three simultaneous tests) shown by ethidium bromide in the absence or presence of riparin-derived compounds for *Staphylococcus aureus* SA-1199B. \*\*\*Value statistically significant ( $P < 0.0001$ ).

SA1199-B (Fig. 5). The addition of Rip-B at subinhibitory concentrations caused an intracellular accumulation of EtBr in the SA1199-B, which can be observed by the increase in the fluorescence signal as a result of intercalation of EtBr into the DNA double helix. On the other hand, the fluorescence signal remained high both in the presence and absence of Rip-B when SA-1199 was analysed.

#### Molecular docking of Rip-B to the active site of NorA

A molecular docking study of Rip-B with NorA showed that Rip-B fit a pocket formed by ILE19, ILE23, PHE26, PHE47, ALA48, GLN51, MET109, THR113, SER133, ILE136, THR211, ARG310, ILE313, THR314, ASN332, SER333, THR336, SER337, ASN340, PHE341 (Fig. 6). The amide group of Rip-B was also able to form a hydrogen-bond between the side-chain amide oxygen of ASN340 and the amide nitrogen of GLN51.

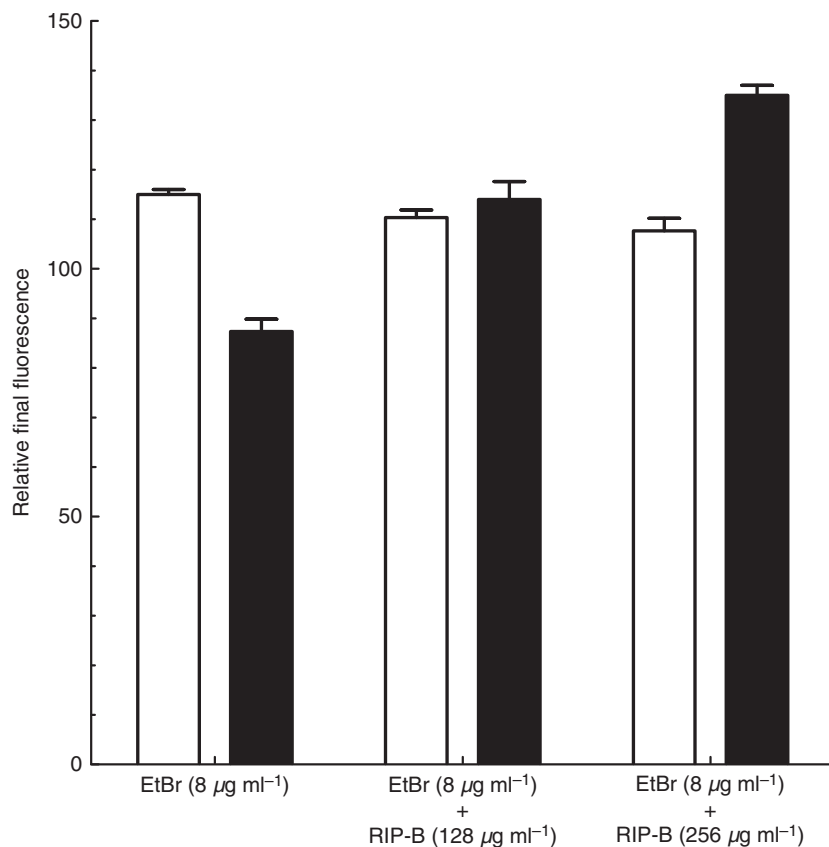
#### Discussion

The intrinsic antimicrobial activity of Riparins was described previously against multi-drug resistant *Staph. aureus* and *E. coli* strains (Catão *et al.* 2005). In this study, we verify that this activity is dependent on the

chemical structure and lipophilicity of each synthetic analogue.

Riparins with one hydroxyl at C2 (Rip-C) or two hydroxyls at C2 and C6 (Rip-E) had antibacterial activity against *Staph. aureus*, indicating that the addition of hydroxyl groups at the benzamide moiety increases reactivity of these derivatives with bacterial biomolecules thus, improving their activity against *Staph. aureus* (three and five entries in Table 1 and Fig. 1). On the other hand, no inhibitory effect was observed for Rip-B indicating that the presence of two methoxyl groups at the phenethyl moiety (at C3' and C4' positions) did not change its intrinsic activity against *Staph. aureus*, (entry 2, Table 1). The presence of methoxyl groups (at C3' and C4') at the phenethyl moiety also attenuated the antibacterial activity of Rip-D. These results indicate that methoxyl groups attached at the phenethyl moiety of Riparins are a factor that reduces the intrinsic antibacterial activity of these compounds against *Staph. aureus* (Fig. 1).

The distribution of species of Riparins was calculated at pH values varying from 0 to 14, to know which species (cationic, anionic or neutral) predominate, where these will execute their pharmacological actions, and if they are capable of interaction with the cell membrane. In all



**Figure 5** Effect of Rip-B on ethidium bromide (EtBr) accumulation for *Staphylococcus aureus* strains SA1199 (white bars) or SA1199-B (black bars). Bacterial suspension was loaded with EtBr ( $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) in the absence or presence of increasing concentrations of Rip-B for 60 min at  $37^\circ\text{C}$ . Relative final fluorescence (RFF) was calculated subtracting all points by the respective blank control. Difference in RFF obtained in the absence or presence of Rip-B was indicative of efflux inhibition.

cases, neutral Riparin structures predominate in the range of pH from 6.5 to 7.5. This result is pertinent because the permeability of the bacterial cell membrane is strongly dependent on the polar characteristics of both molecules and medium pH. Only for hydroxylated Riparins (Rip-C, Rip-D, and Rip-E), the mono-ionized anionic species becomes significant at pH values higher than 9.5. This allows us to conclude that if changes in pH (pH  $7 \pm 1$ ) occur, the predominant species will remain the same.

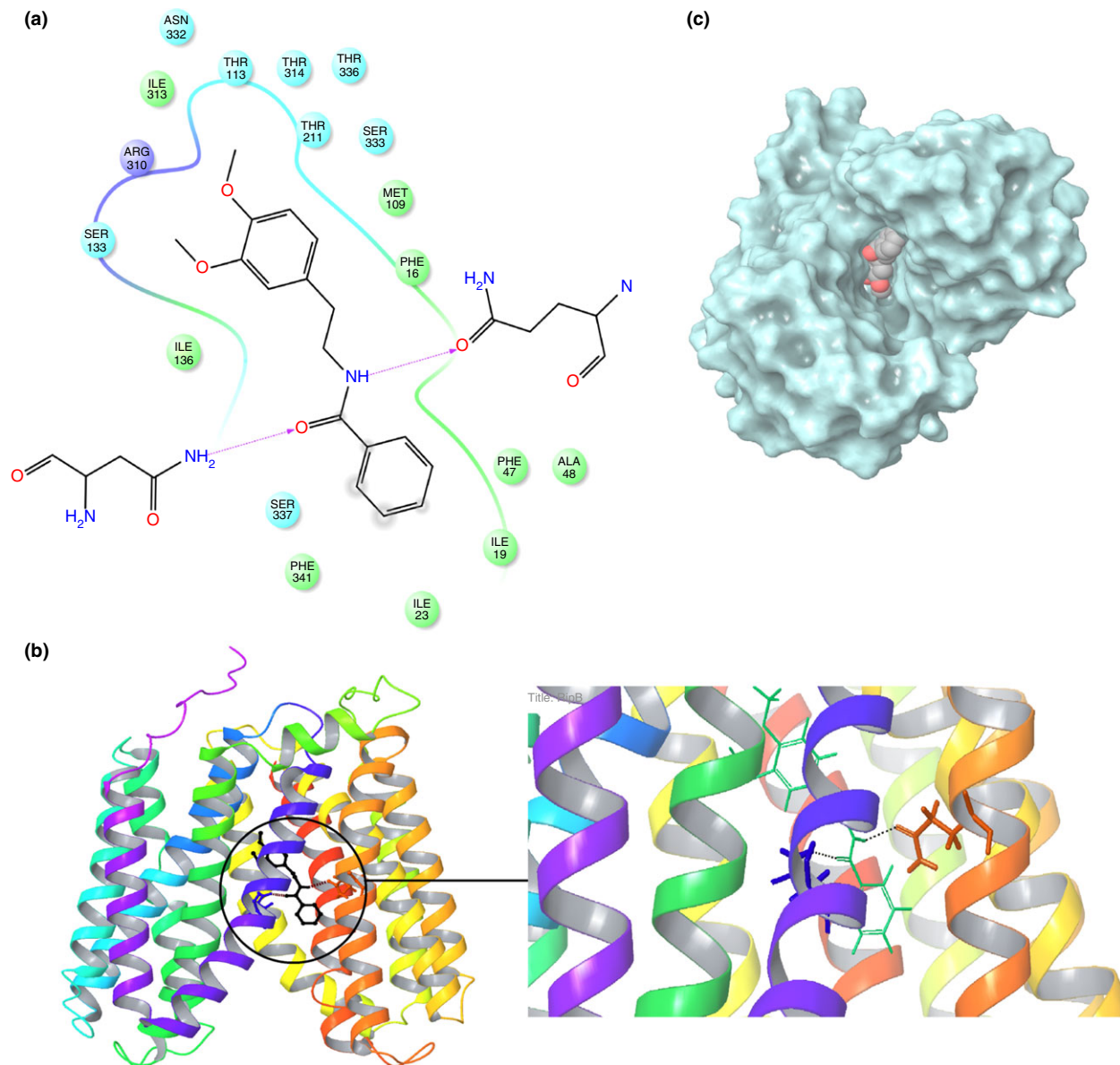
Lipophilicity studies are relevant to know if a molecule can interact with cell membranes. The Log P value of Metoprolol (Log P = 1.72), which is 95% absorbed in the intestinal tract and possess a high cell membrane permeability, has been used as a reference to estimate the permeability of a vast number of drugs (Kasim *et al.* 2004). Taking this compound as a reference, the Log P of all studied Riparins was calculated (Table 1). All of them presented values between 2.61 and 3.57, showing a very hydrophobic characteristic.

Hydrophobic compounds can intercalate into the plasma membrane, affecting both respiratory chain activity and energy production (Nicolson *et al.* 1999). These compounds can also increase cell membrane permeability

leading to leakage of inorganic ions such as  $\text{K}^+$  (Souza *et al.* 2013). Interestingly, our results showed that intrinsic antibacterial activity increased with increasing lipophilicity (Table 1). These results indicate that intrinsic antibacterial activity of hydroxylated Riparins tested could be related to cell membrane damage.

A modulatory effect on the activity of fluoroquinolone antibiotics, increasing their activity against SA-1199B was verified for all synthetic analogues of the Riparins. Rip-B significantly decreased the MIC of the test strain for norfloxacin and ciprofloxacin, changing its phenotype from resistant to intermediate resistance. Modulation tests were conducted with EtBr, a known NorA substrate (Markham *et al.* 1999), in the presence or absence of each Riparin to determine if this modulatory effect was a consequence of NorA inhibition. Only Rip-B was able to reduce EtBr MIC against SA-1199B (Fig. 4) suggesting that this compound could be a potential EPI.

To confirm this hypothesis, inhibition of EtBr efflux was determined. EtBr fluoresces only after intercalation into bacterial DNA, and an increase in fluorescence is an indication of intracellular accumulation due to efflux inhibition. The addition of subinhibitory concentrations of Rip-B caused a significant accumulation of EtBr in



**Figure 6** (a) Interaction of Rip-B in the binding site of NorA. H-bonds formation between Rip-B, GLN51 and ASN340 provides stability to the protein/ligand complex. (b) Relative orientation of the binding site residues with respect to the transmembrane helices of NorA predicted three-dimensional form. (c) Orientation of Rip-B within the binding site (rotated view). Rip-B is shown bound to the central cavity of the protein. Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).

SA1199-B strain, as demonstrated by a fluorescence increase (Fig. 5). This inhibitory effect was similar to that reported for reserpine, a known NorA inhibitor (Brincat *et al.* 2011). On the other hand, the intracellular accumulation of EtBr in SA1199 remained unchanged both in the absence or presence of Rip-B.

Thus, the dimethoxylated analogue Rip-B showed the best modulatory effect when associated with fluoroquinolones employed and was able to inhibit efflux of EtBr in a *Staph. aureus* strain overexpressing *norA*. These

results allow us to conclude that inhibition of NorA by Rip-B was strongly influenced by dimethoxylation of the phenethyl moiety instead of hydroxylation at the benzamide part in Riparins. In other words, the absence of methoxyl groups (Rip-A, Rip-C and Rip-E) or the presence of hydroxyls (Rip-C, Rip-D and Rip-E) avoid the EPI actions of Riparins (Fig. 5), with Rip-B the only one capable of reducing the MIC of EtBr against SA1199-B.

Methoxylated compounds have been reported as modulators of bacterial drug resistance (Silva *et al.* 2009;

Gomes *et al.* 2011). The addition of methoxyl groups on flavones increased both lipophilicity and modulatory effect on resistance to fluoroquinolones in SA1199-B (Maia *et al.* 2011). The lipophilicity of Rip-B (Log P 2.61) was similar to that reported by these researchers for 4',5,6,7-tetramethoxyflavone (Log P 2.57). Cell membrane damage caused by intercalation of lipophilic compounds can inhibit efflux systems dependent on the proton-motive force, such as NorA, leading to a higher intracellular accumulation of antibiotics in the bacterial cell (Holler *et al.* 2012). Besides, hydrophobicity is an important requisite to guarantee affinity of a compound with efflux pumps, including NorA (Nora *et al.* 2012).

However, lipophilicity is not the only factor involved in NorA inhibition as some Riparins having higher lipophilicity than Rip-B did not modulate resistance to EtBr (Table 1). Thus, other structural characteristics of Riparins could be involved in the improvement of molecular interactions between Rip-B and cell membrane components, including the NorA protein. Docking results of Rip-B and NorA showed the orientation of Rip-B within the binding site extending into the hydrophobic cleft, which is the same binding site of other NorA inhibitors (Zhang *et al.* 2014). The amide group of Rip-B was also able to form a hydrogen-bond between the side-chain amide oxygen of ASN340 and amide nitrogen of GLN51 (Fig. 6). Multiple sequence alignment of NorA with other proteins belonging to the Major Facilitator Superfamily (MFS) showed that GLN51 and ASN340 are within a conserved domain of the MFS transporter family (Kalia *et al.* 2012). Although there are no site-directed mutation studies of these residues confirming its role in the protein, several docking studies have shown their importance in interactions with diverse ligands (Kalia *et al.* 2012; Thai *et al.* 2015).

Taking all results in mind, the modulatory effect on fluoroquinolone resistance could be achieved through different actions of the Riparins. One of them could be increasing the influx of antibiotics, through the action of these compounds as membrane permeabilizers. It is possible that this mechanism was at play with Riparin-derivatives which were not able to modulate resistance to EtBr, despite modulating resistance to fluoroquinolones. On the other hand, Rip-B showed a relevant modulator effect and significant inhibition of EtBr efflux, both corroborated by docking parameters, supporting the conclusion that Rip-B is an EPI. We believe that this relevant modulating action could be caused by a dynamic competition between Rip-B and antibiotic during transport through the pump or by inhibiting the normal operation of the pump, by bonding the modulator agent inside the efflux pump cavity.

From a molecular point of view, Rip-E and Rip-B appear to be the most complete agents, with one having the very best intrinsic antibacterial activity and the other

the best EPI activity. Although Rip-B did not have intrinsic antibacterial activity against *Staph. aureus*, it is a potential adjuvant for fluoroquinolones in the treatment of infections caused by resistant *Staph. aureus* strains overexpressing the NorA efflux pump. However, additional studies will be needed to verify its effectiveness *in vivo* when administrated in association with fluoroquinolones.

## Acknowledgements

We are grateful to CNPq, FAPEPI, Federal University of Piauí, CONICET, MINCYT and FONCYT for financial support.

## Conflict of Interest

None declared.

## References

- Andersen, J.L., He, G.-X., Kakarla, P., Kc, R., Kumar, S., Lakra, W.S., Mukherjee, M.M., Ranaweera, I. *et al.* (2015) Multidrug efflux pumps from Enterobacteriaceae, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens. *Int J Environ Res Public Health* **12**, 1487–1547.
- Araújo, F.L.O., Melo, C.T.V., Rocha, N.F.M., Moura, B.A., Leite, C.P., Amaral, J.F., Barbosa-Filho, J.M., Gutierrez, S.J.C. *et al.* (2009) Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **380**, 337–344.
- Barbosa-Filho, J.M., Yoshida, M., Gottlieb, O.R., Barbosa, R.C.S.B.C., Giesbrecht, A.M. and Young, M.C.M. (1987) Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. *Phytochemistry* **26**, 2615–2617.
- Barbosa-Filho, J.M., Silva, E.C. and Bhattacharyya, J. (1990) Synthesis of several new henylethylamines of substituted benzoic acids. *Quim Nov* **13**, 332–334.
- Barreto, H.M., Fontinele, F.C., Oliveira, A.P., Arcanjo, D.D.R., Santos, B.H.C., Abreu, A.P.L., Coutinho, H.D.M., Silva, R.A.C. *et al.* (2014) Phytochemical prospection and modulation of antibiotic activity *in vitro* by *Lippia organoides* H.B.K. in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomed Res Int* **2014**, 1–7.
- Bharate, J.B., Singh, S., Wani, A., Sharma, S., Joshi, P., Khan, I.A., Kumar, A., Vishwakarma, R.A. *et al.* (2015) Discovery of 4-acetyl-3-(4-fluorophenyl)-1-(p-tolyl)-5-methylpyrrole as a dual inhibitor of human P-glycoprotein and *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump. *Org Biomol Chem* **13**, 5424–5431.
- Bhopale, G.M. (2014) Importance of fluoroquinolones in human healthcare: a comprehensive review. *IJPSR* **5**, 5097–5103.



- Brincat, J.P., Carosati, E., Sabatini, S., Manfroni, G., Fravolini, A., Raygada, J.L., Patel, D., Kaatz, G.W. *et al.* (2011) Discovery of novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. *J Med Chem* **54**, 354–365.
- Carvalho, A.M.R., Rocha, N.F.M., Vasconcelos, L.F., Rios, E.R.V., Dias, M.L., Silva, M.I.G., Fonteles, M.M.D.F., Barbosa-Filho, J.M. *et al.* (2013) Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. *Chem Biol Interact* **205**, 165–172.
- Catão, R.M.R., Barbosa-Filho, J.M., Gutierrez, S.J.C., Lima, E.O., Pereira, M.do.S.V., Arruda, T.A. and Antunes, R.M.P. (2005) Avaliação da Atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. *Rev Bras Anal Clin* **37**, 247–249.
- Catão, R.M.R., Barbosa-Filho, J.M., Lima, E.O., Pereira, M.S.V., Arruda, T.A. and Miranda, R.P.A. (2010) Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Anal Clin* **42**, 9–14.
- Céliz, G., Daz, M. and Audisio, M.C. (2011) Antibacterial activity of naringin derivatives against pathogenic strains. *J Appl Microbiol* **111**, 731–738.
- Chan, B.C.L., Ip, M., Lau, C.B.S., Lui, S.L., Jolival, C., Ganem-Elbaz, C., Litaudon, M., Reiner, N.E. *et al.* (2011) Synergistic effects of baicalein with ciprofloxacin against NorA over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and inhibition of MRSA pyruvate kinase. *J Ethnopharmacol* **137**, 767–773.
- Chovanová, R., Mezovská, J., Vaverková, Š. and Mikulášová, M. (2015) The inhibition the Tet(K) efflux pump of tetracycline resistant *Staphylococcus epidermidis* by essential oils from three *Salvia* species. *Lett Appl Microbiol* **61**, 58–62.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2013). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement*. CLSI Document M100-S23. Wayne, PA: CLSI.
- Costa, S.S., Viveiros, M., Amaral, L. and Couto, I. (2013) Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update. *Open Microbiol J* **7**, 59–71.
- Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M., Falcão-Silva, V.S., Siqueira-Júnior, J.P. and Lima, E.O. (2010) Potentiation of antibiotic activity by *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum*. *J Med Food* **13**, 1024–1026.
- Duda-Chodak, A. (2012) The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota. *J Physiol Pharmacol* **63**, 497–503.
- Fritzson, I., Bedingfield, P.T.P., Sundin, A.P., McConkey, G. and Nilsson, U.J. (2011) *N*-substituted salicylamides as selective malaria parasite dihydroorotate dehydrogenase inhibitors. *MedChemComm* **2**, 895–898.
- Gade, N. and Qazi, M. (2013) Fluoroquinolone therapy in *Staphylococcus aureus* infections: where do we stand? *J Lab Physicians* **5**, 109–112.
- Gomes, R.A., Ramirez, R.R.A., Maciel, J.K.S., Agra, M.D.F. and Souza, M.de.F.V. (2011) Phenolic compounds from *Sidastrum micranthum* (A. St.-Hil.) fryxell and evaluation of acacetin and 7,4'-di-o-methylisoscutelellarin as modulator of bacterial drug resistance. *Quim Nov* **34**, 1385–1388.
- Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, D.A.G., Nakamura, C.V. and Dias Filho, B.P. (2002) Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **97**, 1027–1031.
- Holler, J.G., Slotved, H.C., Molgaard, P., Olsen, C.E. and Christensen, S.B. (2012) Chalcone inhibitors of the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus* whole cells and enriched everted membrane vesicles. *Bioorg Med Chem* **20**, 4514–4521.
- Hussain, A.I., Anwar, F., Nigam, P.S., Sarker, S.D., Moore, J.E., Rao, J.R. and Mazumdar, A. (2011) Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *Food Sci Technol* **44**, 1199–1206.
- Joshi, P., Singh, S., Wani, A., Sharma, S., Jain, S.K., Singh, B., Gupta, B.D., Satti, N.K. *et al.* (2014) Osthonol and curcumin as inhibitors of human Pgp and multidrug efflux pumps of *Staphylococcus aureus*: reversing the resistance against frontline antibacterial drugs. *MedChemComm* **5**, 1540–1547.
- Kaatz, G.W. and Seo, S.M. (1993) Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 1086–1094.
- Kaatz, G.W. and Seo, S.M. (1995) Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2650–2655.
- Kaatz, G.W., Seo, S.M., Brien, L.O., Foster, T.J. and Wahiduzzaman, M. (2000) Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 1404–1406.
- Kalia, N.P., Mahajan, P., Mehra, R., Nargotra, A., Sharma, J.P., Koul, S. and Khan, I.A. (2012) Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **67**, 2401–2408.
- Kasim, N.A., Whitehouse, M., Ramachandran, C., Bermejo, M., Lennerna, H., Hussain, A.S. and Junginger, H.E. (2004) Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Mol Pharm* **1**, 85–96.
- Kumar, K. and Chopra, S. (2013) New drugs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an update. *J Antimicrob Chemother* **68**, 1465–1470.
- Kumar, S. and Varela, M.F. (2012) Biochemistry of bacterial multidrug efflux pumps. *Int J Mol Sci* **13**, 4484–4495.
- Lastours, V., Chau, F., Roy, C., Larroque, B. and Fantin, B. (2014) Emergence of quinolone resistance in the microbiota of hospitalized patients treated or not with a fluoroquinolone. *J Antimicrob Chemother* **69**, 3393–3400.

- Laxminarayan, R. (2014) Antibiotic effectiveness: balancing conservation against innovation. *Science* **345**, 1299–1301.
- Maia, G.L.D.A., Falcão-Silva, V.S., Aquino, P.G.V., Araújo-Júnior, J.X., Tavares, J.F., Silva, M.S., Rodrigues, L.C., Siqueira-Júnior, J.P. et al. (2011) Flavonoids from *Praxelis clematidea* R.M. King and Robinson modulate bacterial drug resistance. *Molecules* **16**, 4828–4835.
- Markham, P.N., Westhaus, E., Klyachko, K., Johnson, M.E. and Neyfakh, A.A. (1999) Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 2404–2408.
- Melo, C.T.V., Monteiro, A.P., Leite, C.P., Araújo, F.L.O., Lima, V.T.M., Barbosa-Filho, J.M., França Fonteles, M.M., Vasconcelos, S.M.M. et al. (2006) Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Biol Pharm Bull* **29**, 451–454.
- Nicolson, K., Evans, G. and O'Toole, P.W. (1999) Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. *FEMS Microbiol Lett* **179**, 233–239.
- Nora, S., Brincat, J.P., Broccatelli, F., Sabatini, S., Frosini, M., Neri, A., Kaatz, G.W., Cruciani, G. et al. (2012) Ligand promiscuity between the efflux pumps human p-glycoprotein and *S. aureus* NorA. *ACS Med Chem Lett* **3**, 248–251.
- Nunes, G.B.L., Policarpo, P.R., Costa, L.M., Silva, T.G., Militão, G.C.G., Câmara, C.A., Barbosa Filho, J.M., Gutierrez, S.J.C. et al. (2014) In vitro antioxidant and cytotoxic activity of some synthetic riparin-derived compounds. *Molecules* **19**, 4595–4607.
- Otto, M. (2010) Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol* **64**, 143–162.
- Otto, M. (2012) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with increased mortality. *Future Microbiol* **7**, 189–191.
- Razera, F., Stefani, S., Bonamigo, R.R., Olm, G.S., Dias, C.A.G. and Narvaez, G.A. (2009) CA-MRSA em furunculose: relato de caso do sul do Brasil. *An Bras Dermatol* **84**, 515–518.
- Roy, S.K., Kumari, N., Pahwa, S., Agrahari, U.C., Bhutani, K.K., Jachak, S.M. and Nandanwar, H. (2013) NorA efflux pump inhibitory activity of coumarins from *Mesua ferrea*. *Fitoterapia* **90**, 140–150.
- Schindler, B.D., Jacinto, P. and Kaatz, G.W. (2013) Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: current status of potentiating existing antibiotics. *Future Microbiol* **8**, 491–507.
- Seymour, P. (2009) Hospital-acquired and community-acquired MRSA. *Emerg Med* **41**, 36–41.
- Shittu, A., Nübel, U., Udo, E., Lin, J. and Gaogakwe, S. (2009) Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals in KwaZulu-Natal province, Republic of South Africa. *J Med Microbiol* **58**, 1219–1226.
- Shiu, W.K.P., Malkinson, J.P., Rahman, M.M., Curry, J., Stapleton, P., Gunaratnam, M., Neidle, S., Mushtaq, S. et al. (2013) A new plant-derived antibacterial is an inhibitor of efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* **42**, 513–518.
- Silva, D.A., Falcão-Silva, V.S., Gomes, A.Y.S., Costa, D.A., Lemos, V.S., Agra, M.F., Braz-Filho, R., Siqueira-Junior, J.P. et al. (2009) Triterpenes and phenolic compounds isolated from the aerial parts of *Herissantia tiubae* and evaluation of 5,4,-dihydroxy-3,6,7,8,3-pentamethoxyflavone as a modulator of bacterial drug resistance. *Pharm Biol* **47**, 279–284.
- Sisirak, M., Zvizdic, A. and Hukic, M. (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as a cause of nosocomial wound infections. *Bosn J Basic Med Sci* **10**, 32–37.
- Sousa, F.C.F., Melo, C.T.V., Monteiro, A.P., Lima, V.T.M., Gutierrez, S.J.C., Pereira, B.A., Barbosa-Filho, J.M., Vasconcelos, S.M.M. et al. (2004) Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Pharmacol Biochem Behav* **78**, 27–33.
- Sousa, F.C.F., Monteiro, A.P., Melo, C.T.V., Oliveira, G.R., Vasconcelos, S.M.M., Fonteles, M.M.D.F., Gutierrez, S.J.C., Barbosa-Filho, J.M. et al. (2005) Antianxiety effects of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Phytother Res* **19**, 1005–1008.
- Sousa, F.C.F., Leite, C.P., Melo, C.T.V., Araújo, F.L.O., Gutierrez, S.J.C., Barbosa-Filho, J.M., Fonteles, M.M.F., Vasconcelos, S.M.M. et al. (2007) Evaluation of effects of N-(2-hydroxybenzoyl) tyramine (riparin II) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauraceae) in anxiety models in mice. *Biol Pharm Bull* **30**, 1212–1216.
- Souza, E.L., Oliveira, C.E.V., Stamford, T.L.M., Conceição, M.L. and Gomes Neto, N.J. (2013) Influence of carvacrol and thymol on the physiological attributes, enterotoxin production and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Braz J Microbiol* **44**, 29–35.
- Takaku, S., Haber, W.A. and Setzer, W.N. (2007) Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. *Biochem Syst Ecol* **35**, 525–532.
- Thai, K., Ngo, T., Phan, T., Tran, T., Nguyen, N., Nguyen, T. and Le, M. (2015) Virtual screening for novel *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors from natural products. *Med Chem* **11**, 135–155.
- Wang, S.-Y., Sun, Z.-L., Liu, T., Gibbons, S., Zhang, W.-J. and Qing, M. (2014) Flavonoids from *Sophora moorcroftiana* and their synergistic antibacterial effects on MRSA. *Phytother Res* **28**, 1071–1076.
- Zhang, J., Sun, Y., Wang, Y., Lu, M., He, J., Liu, J., Chen, Q., Zhang, X. et al. (2014) Non-antibiotic agent ginsenoside 20(S)-Rh2 enhanced the antibacterial effects of ciprofloxacin in vitro and in vivo as a potential NorA inhibitor. *Eur J Pharmacol* **740**, 277–284.