

Seleção de inibidores da replicação do DNA de *Staphylococcus aureus*

 <https://doi.org/10.56238/sevened2024.003-050>

Roseane Costa Diniz

Farmacêutica Acupunturista com Mestrado UniBTA
DIGITAL
ORCID: 0000-0001-7321-5668

Clínica das Emoções

Fábio Augusto Siqueira dos Santos

Biólogo e MBA em Gestão Ambiental
Universidade Federal do Maranhão

Luís Cláudio Nascimento da Silva

Biomédico e Pós-Doutor
Universidade CEUMA

Luan Victor Pereira de Sousa

Engenheiro Ambiental
Universidade Federal do Maranhão
E-mail: profa.roseane.c.diniz@gmail.com

Marilene Mendes Costa

Médica e Psiquiatra

RESUMO

Introdução: O *S. aureus* é um importante patógeno causador de infecções hospitalares, intoxicação alimentar por liberação de enterotoxinas e síndrome de choque tóxico através da injeção de super antígenos na corrente sanguínea.

A proteína β -clamp do *S. aureus* é um fator promotor de processos para a maioria das enzimas na replicação do DNA procariótico e sua dimerização é essencial para a ação deletéria do patógeno.

Objetivo: Neste trabalho relatamos a aplicação do sistema de duplo híbrido para selecionar inibidores da dimerização da β -clamp de *S. aureus* a partir de extratos de plantas da Caatinga especialmente *Buchenavia tetraphylla*.

Material e Métodos: (1) preparação dos extratos orgânicos de *Buchenavia tetraphylla* foi preparada conforme relatado anteriormente (2) A interação β -clamp- β -clamp foi avaliada utilizando um sistema bacteriano duplo híbrido (BTH), com base na reconstituição da atividade da enzima adenilato ciclase (*cya*) de *Bordetella pertussis* e clonada em *Escherichia coli*. (3) A atividade antimicrobiana de extratos ativos foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) contra *S. aureus* 8325-4 (4) Para identificar compostos potencialmente responsáveis pela atividade, os extratos ativos foram submetidos a uma análise não segmentada por LC-MS / Q-TOF (5) Os estudos *in silico* se deram pela busca das estruturas dos ligantes, construção e validação do modelo 3D da β -clamp e docking molecular entre ligantes e alvo protéico de *S. aureus* e o sistema hepático CYP3A4 humano.

Resultados e Discussão: Observou-se alta interação (da ordem de 4,800 kcal/mol) entre buchenavianine e análogos com β -clamp sem diferença significativa entre os mesmos. Em contrapartida, a interação entre buchenavianine e análogos com CYP3A4 humana foi (da ordem de 2,200 kcal/mol) seguindo os mesmos princípios de eletronegatividade dos elementos. O objetivo desta análise é perceber como a proteína β -clamp interage com a principal proteína de metabolização hepática humana. A interação entre buchenavianine e análogos com CYP3A4 humana foi 2 vezes menor que buchenavianine e análogos com β -clamp de *S. aureus* e isto mostra que entre os dois alvos aqui trabalhados (β -clamp de *S. aureus* e CYP3A4 humana) os ligantes serão atraídos preferencialmente pela β -clamp de *S. aureus* o que ratifica os mesmos como viáveis inibidores do processo de replicação do DNA de *S. aureus*.

Conclusão: A combinação de recursos microbiológicos, químicos e computacionais permitiram indicar moléculas presentes no extrato das plantas capazes de interagir com a β -clamp de *S. aureus*. A abordagem aqui exposta promove um rastreio bioquímico racional para seleção de ligantes com melhores possibilidades para os testes de bancada subsequentes economizando recursos financeiros e otimizando resultados em pesquisa e desenvolvimento de medicamentos.

Palavras-chave: Formação de Professores, Seleção de inibidores, Replicação do DNA, *Staphylococcus aureus*.



LISTA DE ABREVIATURAS/LEGENDAS

LC-MS/Q-TOF = Liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry

BTH = benzothiadiazole

Cya = adenilato ciclase

DnaN = O dnaN é o gene que codifica o DNA clamp da DNA polimerase III em procariontes. O grampo β bloqueia fisicamente o Pol III em um filamento de DNA durante a replicação para ajudar a aumentar sua processividade. O equivalente eucariótico ao grampo β é o PCNA.

CFU = Em microbiologia, a unidade de formação de colônias (UFC; em inglês, colony forming unit, CFU) é uma unidade de medida usada para estimar o número de bactérias ou fungos viáveis - isto é, capazes de se multiplicar mediante fissão binária sob condições controladas - de uma amostra.

UHPLC = Ultra high performance liquid chromatography

CIM = concentração inibitória mínima

rpm = rotações por minuto

NCBI = National Center for Biotechnology Information é uma secção da United States National Library of Medicine, um ramo dos National Institutes of Health, com sede em Bethesda, Maryland. A instituição foi fundada em 1988 em resultado de legislação proposta pelo senador Claude Pepper.

PDB = O PDB é um banco de dados em 3D de proteínas e ácidos nucléicos. Esses dados, geralmente obtidos através da difração de raios X, ressonância magnética nuclear e crio-microscopia eletrônica são enviados por físicos, biólogos e bioquímicos de todo o mundo. Disponíveis em domínio público, podem ser usados livremente

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma notória bactéria patogênica que causa uma ampla gama de doenças em tecidos moles variando de infecções simples (como furúnculos), a mais grave (pneumonia, mastite, flebite, meningite e infecções do trato urinário) ou infecções profundas (síndrome de choque tóxico, osteomielite e endocardite) (Hill & Imai, 2016; Humphreys et al., 2016; Moormeier & Bayles, 2017; T. H. Nguyen, Park, & Otto, 2017; Tong, Davis, Eichenberger, Holland, & Fowler, 2015). Além disso, *S. aureus* é considerado uma das principais causas de infecção relacionadas à assistência à saúde (IRAS), estando relacionado principalmente a contaminação de feridas cirúrgicas e de dispositivos médicos internos (Humphreys et al., 2016; Moormeier & Bayles, 2017; Tong et al., 2015). Este patógeno também causa intoxicação alimentar por liberação de enterotoxinas (Sergelidis & Angelidis, 2017) e síndrome de choque tóxico através da liberação de super-antígenos na corrente sanguínea (Bassetti et al., 2017).

Vários fatores de virulência foram identificados em isolados de *S. aureus* que estão envolvidos em funções como: (i) promoção da adesão (Fator de aglutinação A e proteína A) e colonização (hialuronidase) dos tecidos do hospedeiro; (ii) evasão do sistema imune (carotenóides e coagulase); (iii) danos ao hospedeiro (hemolisinas, leucotoxinas e leucocidina) (Dunyach-Remy, Ngba Essebe, Sotto, & Lavigne, 2016; Hill & Imai, 2016; Koymans, Vrieling, Gorham, & van Strijp, 2016; Moormeier & Bayles, 2017; Paharik & Horswill, 2016; Spaan, van Strijp, & Torres, 2017). Alvejar essa variedade de fatores de virulência para projetar drogas não é uma tarefa trivial (Kane, Carothers, & Lee, 2016; Kong, Neoh, & Nathan, 2016). Esta dificuldade aumenta consideravelmente se levarmos em conta que existem clones de *S. aureus* com diminuição de suscetibilidade à fármacos antimicrobianos de uso clínico, alta capacidade de *S. aureus* de adquirir resistência aos agentes antimicrobianos.

A falta de recursos quimioterápicos contra *S. aureus* tornou-se um problema sério em todo o mundo, já que um aumento alarmante de linhagens resistentes a diferentes classes de antibióticos (macrolídios, quinolonas e, mais recentemente, vancomicina e oxazolidinona) também foi observado (Das, Dasgupta, & Chopra, 2016; Foster, 2017). Devido a este panorama drástico, muitos pesquisadores dirigiram seus esforços para fortalecer e/ou desenvolver programas eficazes para descoberta de drogas. Neste caso, abordagens multidisciplinares são usadas em vez daquelas tradicionais baseadas apenas em métodos convencionais (como difusão em ágar e os ensaios mínimos de concentração inibitória). Por exemplo, algumas estratégias são baseadas em plataformas genéticas como o **Sistema Duplo Híbrido** (explicação detalhada nos anexos) (Kjelstrup, Hansen, Thomsen, Hansen, & Lobner-Olesen, 2013), phage display (Rentero Rebollo et al., 2016), visando selecionar compostos que inibam fatores específicos envolvidos na sobrevivência ou virulência das bactérias. A aplicação de tecnologias "Omics" (genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica) também

tornou-se popular na descoberta de agentes antimicrobianos e de novos alvos terapêuticos, proporcionando um impulso substancial neste campo (Dominguez et al., 2017; Dos Santos et al., 2016; Martinez, Agbale, Nomiya, & Franco, 2016).

Os esforços para encontrar novos alvos para a terapia indicaram que as proteínas relacionadas à replicação do DNA constituem um alvo antimicrobiano atraente, e consideravelmente subexplorado até agora, dado o número de compostos clinicamente disponíveis que visam essa maquinaria (Sanyal & Doig, 2012; van Eijk, Wittekoek, Kuijper, & Smits, 2017). A replicação do DNA é um processo executado por várias proteínas (Jameson & Wilkinson, 2017). A operação correta desta via é decisiva para o crescimento celular e proliferação (Jameson & Wilkinson, 2017). A proteína β -clamp desempenha um papel fundamental no gerenciamento da replicação do DNA (Nanfara, Babu, Ghazy, & Sutton, 2016). Em *S. aureus*, esta proteína é codificada por *dnaN* e é constituída de um homodímero que circunda o DNA e desliza ao longo do duplex, trazendo a polimerase em contato com o DNA para garantir a processividade (Johnson & O'Donnell, 2005; Kjelstrup et al., 2013; Nielsen & Lobner-Olesen, 2008). A β -clamp interage com muitas proteínas diferentes, incluindo DnaE, PolC, δ , PolIV (DinB), PolV (UmuC / D), PolI, MutS, MutL, DNA ligase e Had (Indiani & O'Donnell, 2006; Johnson & O'Donnell, 2005; Nielsen & Lobner-Olesen, 2008). No entanto, poucos trabalhos exploraram a β -clamp como alvo para descoberta antimicrobiana (Kjelstrup et al., 2013; Pandey, Verma, Dhar, & Gourinath, 2018; Pandey et al., 2017). Com base nisso, foi construído um sistema de duplo híbrido para a seleção de compostos com capacidade de impedir a dimerização da proteína replicativa, resultando na seleção de peptídeos que inibiam a dimerização da β -clamp de *S. aureus* (Kjelstrup et al., 2013).

A proteína β -clamp confere processividade para as DNAs polimerases e outras proteínas. Atua como um grampo, formando um anel em torno do DNA (uma reação catalisada pelo complexo de carregamento de braçadeiras), que se difunde de forma independente de ATP, livre e bidirecional ao longo de dupla hélice.

Neste trabalho, relatamos a aplicação do sistema de duplo híbrido para selecionar inibidores da dimerização da β -clamp de *S. aureus* a partir de extratos de plantas da Caatinga. Estes compostos podem servir como possíveis candidatos para o desenvolvimento futuro em novas classes de antibióticos, bem como fornecer informações sobre a função do processo de replicação de *S. aureus*. Ler os anexos para observar a ordem sistemática de realização das etapas da pesquisa e explicações detalhadas acerca dos métodos utilizados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 EXTRATOS DE PLANTAS DA CAATINGA

Os extratos avaliados em nosso estudo foram gentilmente providos pelo Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco. O material das plantas foram coletados no Parque Nacional do Catimbau (PARNA do Catimbau, Pernambuco, Brasil) em novembro de 2013. A identificação taxonômica foi realizada pelo Dr. Alexandre Gomes da Silva, no Herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), onde cada espécime do voucher é depositado.

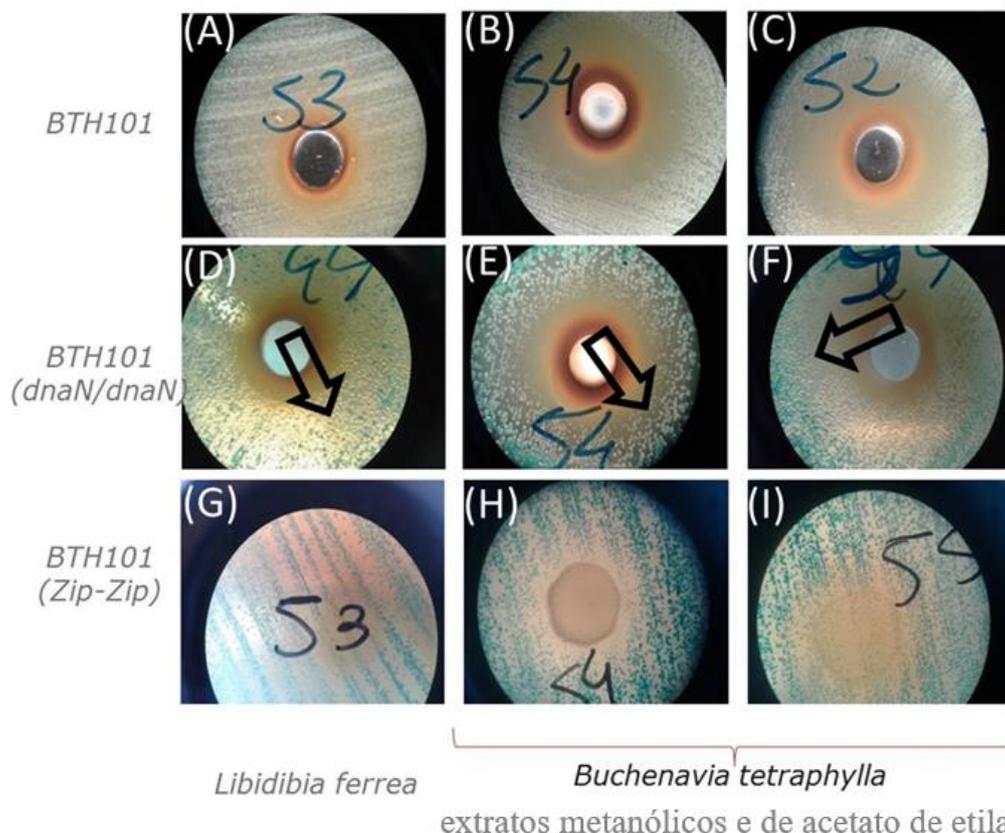
Os extratos aquosos foram obtidos por meio da mistura de 25 g de cada amostra (folhas, ramos, etc.) com água destilada em um agitador a 125 rpm durante 72 h a 25°C. Em seguida, cada extrato foi filtrado e o sobrenadante foi liofilizado. Todas as amostras de extrato foram armazenadas a 4°C antes da utilização. Além disso, a preparação dos extratos orgânicos de *Buchenavia tetraphylla* foi preparada conforme relatado por (Cavalcanti Filho et al., 2017). Ver anexos para acessar os detalhes do rastreo fitoquímico.

2.2 SELEÇÃO DE PLANTAS QUE PERTURBAM A INTERAÇÃO B-CLAMP-B-CLAMP

A interação β -clamp- β -clamp foi avaliada utilizando um sistema bacteriano duplo híbrido (BTH – ver anexos), com base na reconstituição da atividade da enzima adenilato ciclase (*cya*) de *Bordetella pertussis* e clonada em *Escherichia coli*. Neste sistema o gene codificador da enzima *cya* foi dividida em dois fragmentos disfuncionais (T18 e T25), que apenas expressam a enzima se novamente reunidos. Cada fragmento foi então fundido a uma sequência de *dnaN* (codificador de β -clamp) e clonados separadamente em dois plasmídeos recombinantes (p25N-DnaN e pUT18-DnaN). Em seguida uma linhagem mutante *E. coli* BTH101 (com deleção no gene da enzima β -galactosidase) foi co-transformada com os dois plasmídeos recombinantes (p25N-DnaN e pUT18-DnaN). Dado a capacidade de β -clamp formar dímeros, os fragmentos T18 e T25 serão reunidos e a atividade de adenilato ciclase será ativada. Isto resultaria na produção da enzima β -galactosidase o que é evidenciado pela formação de colônias azuis em placas contendo o meio Luria-Bertani (LB) suplementado com X-gal (5-bromo-4-cloro-indolil-p-D-galactósido) (Kjelstrup et al., 2013).

Para avaliar os efeitos dos extratos na dimerização de β -clamp, a linhagem BTH101 (100 μ L) foi aplicada em placas LB+X-gal e antibióticos relevantes. Cada amostra (40 μ L a 50 mg/mL) foi aplicada em orifício de 6 mm feitos nas placas LB+X-gal (5-bromo-4-cloro-indolil-p-D-galactósido). As placas foram incubadas a 37 °C e após 24 h o desenvolvimento de colônias brancas foi o indicativo da inibição das interações β -clamp- β -clamp (Kjelstrup et al., 2013). Ver figura 1. A especificidade do extrato ativo foi confirmada usando os plasmídeos vazios (pKT25-zip e pUT18C-zip). Desenho experimental nos anexos.

Figura 1: Efeitos de extratos de *Libidibia ferrea* (extracto aquoso) e *Buchenavia tetraphylla* (extratos metanólicos e de acetato de etila) sobre a dimerização de β -clamp de *S. aureus*. (A-C): Efeitos de cada extrato no crescimento de *E. coli* BTH101. (D-F): Efeitos de cada extrato em *E. coli* BTH101 co-transformado com plasmídeos p25N-DnaN e pUT18-DnaN. (G-I): Efeitos de cada extrato em *E. coli* BTH101 co-transformado com plasmídeos vazios (pKT25-zip e pUT18C-zip). As setas indicam o desenvolvimento de colônias brancas.



2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS ATIVOS.

A atividade antimicrobiana de extratos ativos foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) contra *S. aureus* 8325-4. A diluição em série dupla de cada extrato foi preparada em uma placa de 96 poços utilizando caldo LB. Cada poço recebeu 10 μ L de suspensão bacteriana (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ CFU / mL). As microplacas foram incubadas a 37 ° C. Após 24 h, foram adicionados a cada poço 50 μ L de solução de resazurina (0,01%). As placas foram reincubadas durante 2 h a 37 ° C, e qualquer mudança na coloração de azul para rosa foi registrada como crescimento microbiano. A concentração mais baixa na qual nenhuma alteração de cor ocorreu foi tomada com a CIM. Ver anexos para maiores detalhes

2.4 ANÁLISES LC-MS/Q-TOF

Para identificar compostos potencialmente responsáveis pela atividade, os extratos ativos foram submetidos a uma análise não segmentada por LC-MS / Q-TOF. A cromatografia foi realizada em um sistema Dionex UltiMate® 3000 Quaternary Rapid Separation UHPLC + (Thermo Fisher Scientific, Germering, Alemanha). A separação foi alcançada em uma coluna Kinetex 1.7u XB-C18 (100 x 2.1 mm, 1.7 μ m, 100 Å, Phenomenex, Torrance, CA, EUA). Foi utilizado ácido fórmico (0,05%) em água

e acetonitrila (fornecido com ácido fórmico a 0,05%) como fases móveis A e B, respectivamente. Condições de gradiente: 0.0-1.0 min, 5% B; 1,0.-12,0 min, 5-40% B; 12,0-20,0 min 40-100% B, 20,0-22,0 min 100% B, 22,0-22,5 min 100-5% B e 22,5-25,0 5% B. A taxa de fluxo da fase móvel foi de 300 $\mu\text{L min}^{-1}$. A temperatura da coluna foi mantida a 30 ° C. Quatro comprimentos de onda (205 nm, 220 nm, 250 nm e 390 nm) foram monitorados por um detector UV-VIS.

A cromatografia líquida foi acoplada a um espectrômetro de massa micrOTOF-Q (Bruker, Bremen, Alemanha) equipado com uma fonte de íons eletrospray (ESI) operada em modo de ionização positiva ou negativa. A tensão de pulverização iônica foi mantida a +4500 V ou -3900 V, respectivamente. A temperatura seca foi ajustada para 200 °C e o fluxo de gás seco foi ajustado para 8 L min^{-1} . O gás de nebulização foi ajustado para 2,5 bar e energia de colisão para 15 eV. O nitrogênio foi usado como gás seco, gás nebulizador e gás de colisão. O intervalo m/z foi ajustado para 50-1400. O modo Auto MSMS foi utilizado para obter os espectros MS e MS/MS dos três íons mais abundantes presentes em cada ponto do tempo com exclusão inteligente para incluir também íons menos abundantes. Todos os arquivos foram calibrados com base em espectros compostos coletados de clusters formados em Na^+ no início de cada corrida.

2.5 ESTUDOS *IN SILICO*

2.5.1 Estrutura dos compostos

A estrutura dos compostos selecionados foram obtidas no banco de dados PubChem Project (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Cada composto foi convertido em arquivos de 3 dimensões (3D) usando o Easy convert software.

2.5.2 Construção e validação da estrutura β -clamp de *S.aureus*

A estrutura 3D da β -clamp de *S. aureus* não está disponível no PDB e foi modelada pelo *Swiss-Model Automated Protein Modeling Server* com configurações padrão (<http://swissmodel.expasy.org/>). A sequência de aminoácidos de β -clamp de *S. aureus* (composto por 377 resíduos) utilizada neste estudo foi obtida no NCBI (WP_000969811.1). O servidor selecionou a estrutura 3D (obtida experimentalmente) da β -clamp de *B. subtilis* (PDB ID: 4TR6) como modelo. A qualidade do modelo de β -clamp de *S. aureus* selecionado foi verificada com Z-score (PROVE: <http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>) e Ramachandran plot (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>).

2.5.3 Docking molecular

Simulações de docking molecular para investigar a ligação do composto ativo e seus derivados para a estrutura predita de β -clamp de *S. aureus*. O acoplamento molecular foi realizado no servidor

Swissdock (<http://www.swissdock.ch/docking>), um serviço web baseado no software EADock DSS (Grosdidier, Zoete, & Michielin, 2011). A interação de todos os compostos com a enzima CYP3A4 humana também foi analisada. Para isso, a estrutura da CYP3A4 humana foi obtida a partir de PDB (PDB ID: 5VCC).

Ver anexos para entendimento detalhado da ordem sistemáticas acerca dos métodos utilizados neste trabalho.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EXTRATOS DE PLANTAS DA CAATINGA CAPAZES DE AFETAR A DIMERIZAÇÃO DA β -CLAMP EM *S. AUREUS*

O primeiro passo deste trabalho foi selecionar extratos de plantas de Caatinga capazes de inibir a formação de dímeros pela β -clamp. Esta proteína é o fator promotor de processos para a maioria das enzimas na replicação do DNA procariótico e sua dimerização é essencial para a ação correta (30). Uma vez que apenas alguns compostos são relatados para inibir β -clamp (16, 27, 28), tentamos analisar se as plantas da caatinga poderiam ser fonte desse tipo de compostos.

As plantas da caatinga foram escolhidas uma vez que são cultivadas em um bioma único, exclusivo do Brasil, marcado por longos períodos de estiagem e altos níveis de radiação solar (Rodrigues, Silva, Eisenlohr, & Schaefer, 2015). A Caatinga está localizada no Nordeste do Brasil e cobre cerca de 12% do território do país, estendendo-se sobre grandes áreas dos estados do Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e também uma parte do norte de Minas Gerais. As condições ambientais extremas têm influência no metabolismo das plantas da caatinga (Oliveira et al., 2017) fazendo-as capazes de produzir novos compostos que são alvos interessantes para pesquisa de drogas. Vários exemplos demonstram o potencial antimicrobiano dos produtos naturais derivados das plantas de Caatinga (da Silva et al., 2013; Malafaia et al., 2017; Silva et al., 2015).

As atividades antimicrobianas desses extratos foram confirmadas por determinações de CIM (tabela 1). Entre eles, o extrato aquoso de *L. ferrea* mostrou o menor valor (MIC: 97,65 $\mu\text{g/mL}$), seguido pelo extrato metanólico (MIC: 195,31 $\mu\text{g/mL}$) e extrato de acetato de etila (MIC: 390,62 $\mu\text{g/mL}$) de *B.tetraphylla*. A atividade antimicrobiana de extratos e compostos de *B. tetraphylla* e *L. ferrea* (incluindo obtidos a partir de espécimes cultivadas na Caatinga) foi relatada em outros estudos contra *S. aureus* (da Silva et al., 2013; de Oliveira et al., 2012) e outros microrganismos (Cavalcanti Filho et al., 2017; de Oliveira Marreiro et al., 2014). No entanto, até onde sabemos, esta é a primeira vez que a presença de inibidores da β -clamp é relatada para essas plantas. Além disso, evidências na interferência na divisão celular de *S. aureus* e *C. albicans* foram sugeridas por microscopia eletrônica

para o extrato hidroalcoólico de frutos de *L. ferrea* (da Silva et al., 2013) e metanólico de *B. tetraphylla* (Cavalcanti Filho et al., 2017), respectivamente. Ver figura 1 após das referências.

Tabela 1: Atividade antimicrobiana de extratos de *Libidibia ferrea* (extrato aquoso) e *Buchenavia tetraphylla* (extratos metanólico e acetato de etila) contra *S. aureus*.

Planta	Extrato	MIC (µg/mL)
<i>Buchenavia tetraphylla</i>	Metanólico	195,31
	Acetato de etila	390,62
<i>Libidibia ferrea</i>	Aquoso	97,65

3.2 DETECÇÃO DE BUCHENAVIANINA E SEUS DERIVADOS NO EXTRATO ATIVO DE *B. TETRAPHYLLA*

A caracterização química do extrato metanólico das folhas de *B. tetraphylla* revelou a presença de buchenavianina e seus compostos derivados (Figura 2). A buchenavianina e derivados [N-desmetilbuchenavianina, O-desmetilbuchenavianina, N,O-bis-(desmetil)-buchenavianina] são classificados como flavoalcalóides com uma porção de piperidina no carbono 8. Flavoalcalóide é um termo utilizado para compostos que contêm tanto flavonóides como componentes alcalóides (Blair, Calvert, & Sperry, 2017). A convergência de duas vias biossintéticas distintas resulta em produtos naturais que exibem uma ampla gama de atividades biológicas interessantes que não seriam esperadas para flavonóides ou alcalóides sozinhos (Blair et al., 2017). A buchenavianina e a N-desmetilbuchenavianina foram primeiro isoladas das folhas de *Buchenavia macrophylla*, enquanto a O-desmetilbuchenavianina e a N,O-bis-(desmetil)-buchenavianina foram encontradas pela primeira vez no fruto da mesma planta (Blair et al., 2017). Existem poucos relatos sobre aplicações biomédicas de buchenavianina e seus derivados que incluem o efeito citoprotetor contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Beutler, Cardellina, McMahon, Boyd, & Cragg, 1992) e inibição de quinases com ciclina CDK1/ciclina B e CDK5/p25 pela competição ATP (T. B. Nguyen et al., 2012). A buchenavianina e seus derivados também foram detectados no extrato de *Buchenavia tomentosa* com atividade contra espécies de *Candida* (Teodoro et al., 2015).

Com base nisso, decidimos selecionar buchenavianina e seus derivados para as avaliações *in silico*. As estruturas de buchenavianina (C₂₂H₂₃NO₄), N-desmetilbuchenavianina (C₂₁H₂₁NO₄), O-desmetilbuchenavianina (C₂₁H₂₁NO₄), N,O-bis-(desmetil)-buchenavianina (C₂₁H₂₁NO₄) e os compostos análogos ChEMBL2029614 (C₂₁H₂₁NO₄) e ChEMBL2029615 (C₂₁H₂₁NO₄) foram obtidos no banco de dados PubChem Project e são mostrados na figura 3.

Figure 2: Detecção de buchenavianina e derivados no extrato metanólico de *B. tetraphylla* por LC-MS/Q-TOF em modo positivo.

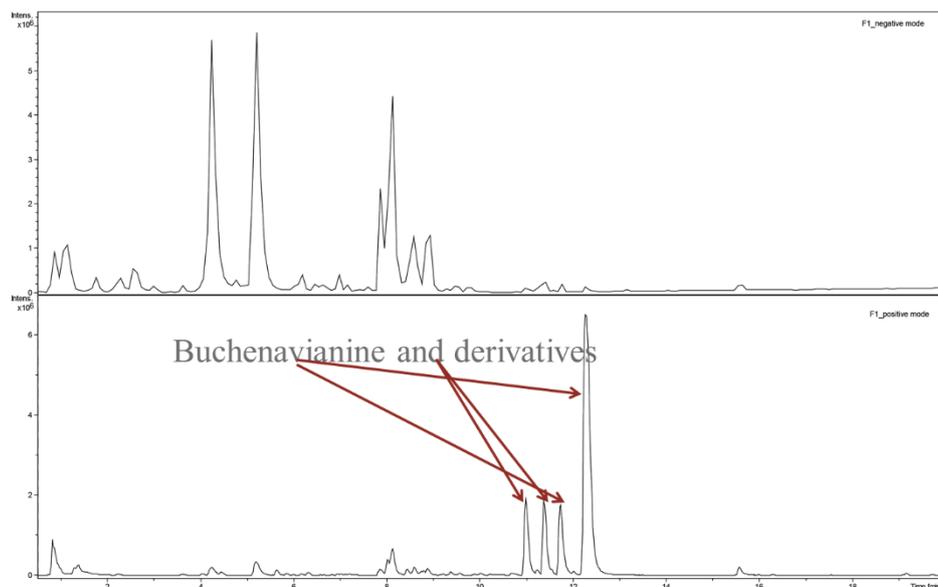
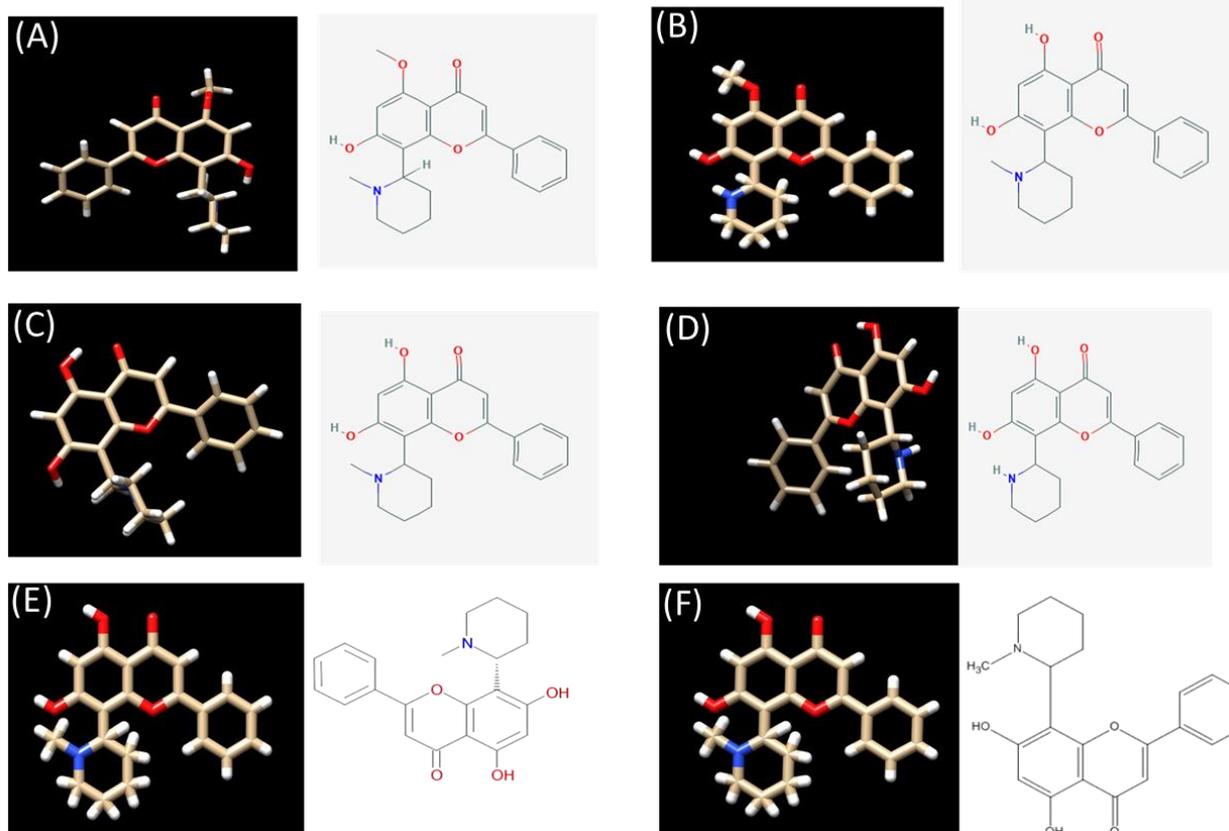


Figura 3: Estruturas de buchenavianina e seus derivados utilizados para estudos *in silico*. (A) Buchenavianina; (B) N-desmetilbuchenavianina; (C) O-desmetilbuchenavianina; (D) N,O-bis-(desmetil)-buchenavianina; (E) CHEMBL2029614; (F) CHEMBL2029615.



3.3 VALIDAÇÃO DO MODELO DE ESTRUTURA 3D PARA B-CLAMP DE *S.AUREUS*

O modelo de β -clamp de *S. aureus* foi predito pela modelagem de homologia usando a estrutura da β -clamp de *B. subtilis* (ID PDB: 4TR6). As duas proteínas exibem 50% de similaridade em suas seqüências de aminoácidos (Figura 4). A estrutura modelada é mostrada na figura 5. A qualidade

estereoquímica do modelo previsto foi determinada pelo Z-score e Ramachandram plot. O Z-score indicou que apenas 4,5% de átomos não seguiram a distribuição gaussiana, o que indicou que a estrutura predita possui um alto nível de átomos na configuração correta (95,5%) (Figura 6A). Além disso, o gráfico de Ramachandram (figura 6) mostrou que 96,8% e 2,6% de resíduos de aminoácidos estão em regiões favoráveis e permitidas, respectivamente (Figura 6B). Todos esses resultados confirmaram que o modelo obtido para β -clamp de *S. aureus* possui qualidade estereoquímica e pode ser usado para estudos de modelagem.

Figura 4: Alinhamento de seqüências de aminoácidos de β -clamp de *S. aureus* e β -clamp de *B. subtilis*.

```

β_clamp_S_aureus      -MMEFTIKRDYFITQLNDTLKAISPRITLPILTGKIDAKEHEVILTGSDSEISIEITIP
β_clamp_B_subtilis    SHMKFTIQKDRLVESVQDLKAVSSRTTIPILTGKIVASDDGVSTGSDSDISIESFIP
      *::***:*  ::  ::*:***:*  ***:*****  *::  *  :*****:***  **

β_clamp_S_aureus      KTVGDGDIVNISETGSVWLPGRFFVDIIKKLPKDKVCLSTNEQFQTLITSGHSEFNLSGL
β_clamp_B_subtilis    KEEGDKIEVTIEQPGSVLQARFFSEIVKKLPMATVEIEVQNOYLTIIIRSGKAEFNLNGL
      *  ::**:*  *  **:**  ***  :*****  *:::***:  *:*  ***:*****:**

β_clamp_S_aureus      DPDQYPLLQVSRDDAIQLSVKVLKNVIAQTNFAVSTSETRPVLTVGNWLIQENELICTA
β_clamp_B_subtilis    DADEYPHLPQIEEHHAIQIPTDLLKNLIRQTVFAVSTSETRPILTVGNWIKVEQSELLCTA
      *  *:*  ***:***:  ***:  ::**:*  *  **  *****:*****  :::  *:*  ***

β_clamp_S_aureus      TDSHRLAVRKLQLEDVS-ENKNVIIPGKALAE LNKIMSDNEEDIDIFFASNQVLFKVGWV
β_clamp_B_subtilis    TDSHRLALRKAKLDIPEDRSYNWVIPGKSLTELSKILDDNQELVDIVITETQVLFKAKNV
      *****:**  *:*  .  .  .  **:****:*  **:*  **:*  *  *:*  .  .  .  *****  **

β_clamp_S_aureus      NFISRLLEGHYPDTRLPFENYEIKLSIDNGEFYHAIDRASLLAREGGNNVIKLSTG-DD
β_clamp_B_subtilis    LFFSRLLDGNYPDTTSLIPQDSKTEIIVNTKEFLQAIDRASLLAREGRNNVVKLSAKPAE
      *::***:*  :*****  *:*  :  :  :  :  *  :*****:*****  ***:***:  :

β_clamp_S_aureus      VVELSSTSP EIGTVK EEV DANDVEGGS LKISFN SKYMDALKAIDNDEVEVEFFGTMKPF
β_clamp_B_subtilis    SIEISSNSPEIGKWEAIVADQIEGEELNISFSPKYMLDALKVLEGAIEIRVSTGAMRPF
      :*:*  :*****:*  *  :  *::**  *:*  ***:*****:***:  *:*  *  *:*  **

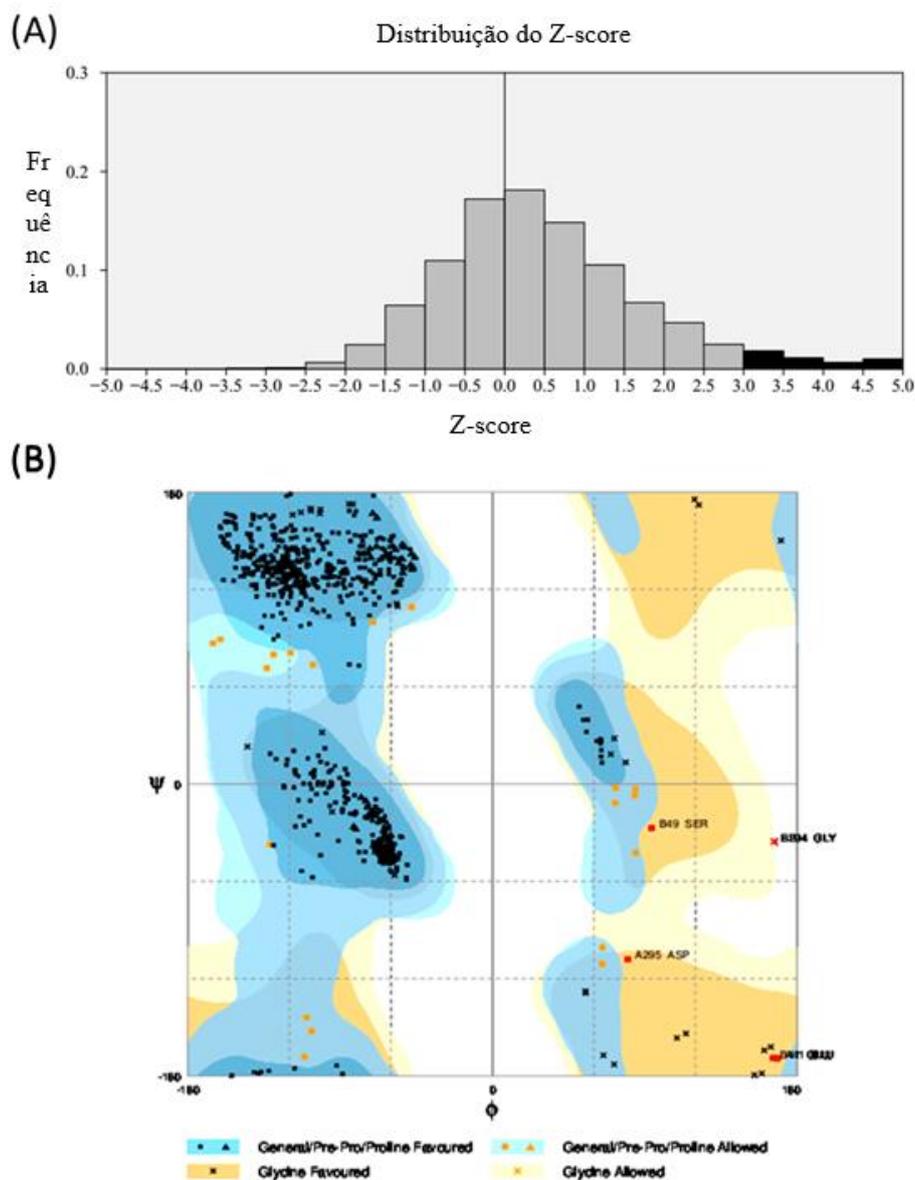
β_clamp_S_aureus      ILKPKGDDSVTQLILPIRTY
β_clamp_B_subtilis    LIRTPNDETIVQLILPVRTY
      :::  .*:::***:***

```

Figura 5: Modelo para a estrutura de β -clamp de *S. aureus* previsto pela modelagem de homologia.



Figura 6: Validação do modelo de estrutura 3D para β -clamp de *S. aureus* determinado pelo Z-score (A) e Ramachandram plot (B). Em (A) Somente 4,5% (122) átomos estão fora da Distribuição gaussiana, indicando que a estrutura possui 95,5% de correção. Em (B) temos número de resíduos na região favorecida é 720 (96,8%), na região permitida é 19 (2,6%).



3.4 ESTUDOS DE ANCORAGEM COM B-CLAMP DE *S.AUREUS* E COMPOSTOS SELECIONADOS

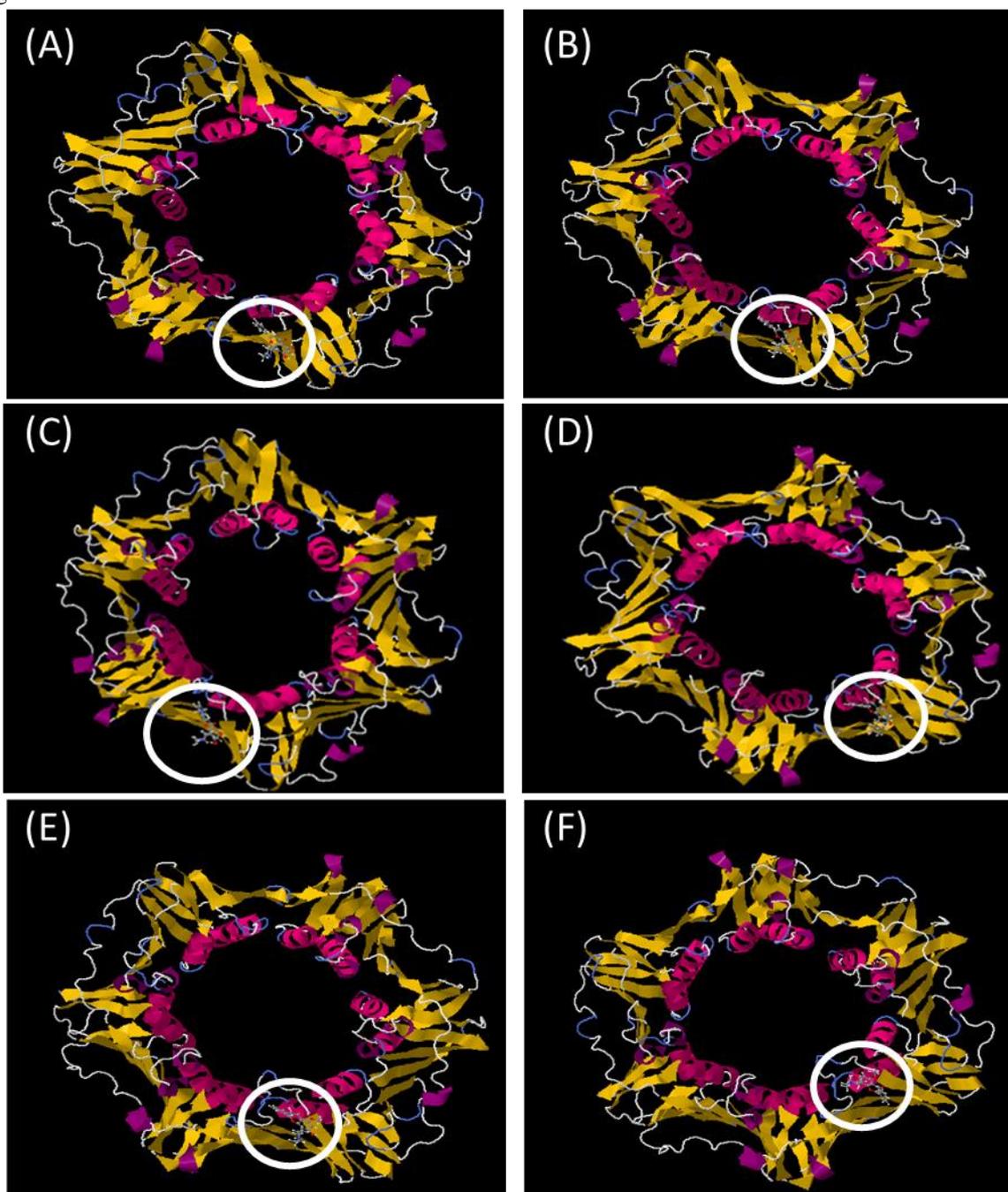
A interação de buchenavianina e compostos relacionados com β -clamp de *S. aureus* foi predita por acoplamento molecular. Swissdock apresenta os resultados em termos de FullFitness e energia livre de Gibbs (ΔG) (Tabela 2). Os modos de ligação favoráveis foram obtidos com base na FullFitness e na formação de aglomerados. Os valores de FullFitness variaram de -4894.34 kcal/mol a -4879.57 kcal/mol. Em relação ao ΔG estimado, os valores variaram de -6,64 kcal/mol a -7,50 kcal/mol. O ranking dos compostos foi realizado utilizando o valor de FullFitness como anteriormente adotado em outros estudos (Saha, Islam, Shilpi, & Hasan, 2013). A Figura 7 mostra a visualização da ligação mais energeticamente favorável de cada composto em β -clamp de *S. aureus*.

O melhor FullFitness foi encontrado para N,O-bis-(desmetil)-buchenavianina com um valor de -4894,34 kcal/mol e ΔG estimado de -7,26 kcal/mol, para a interação mais favorável. O análogo ChEMBL2029615 (FullFitness = -4892,24 kcal/mol, ΔG estimado = -7,43 kcal/mol) e ChEMBL2029614 (FullFitness = -4891,09 kcal/mol, ΔG estimado = -7,31 kcal/mol) exibiram resultados semelhantes aos observados para N,O-bis-(desmetil)-buchenavianina. O-desmetilbuchenavianina (FullFitness = -4888,70 kcal/mol, ΔG estimado = -6,64 kcal/mol), N-desmetilbuchenavianina (FullFitness = -4880,36 kcal/mol, ΔG estimado = -7,50 kcal/mol) e buchenavianina (FullFitness = -4879,57 kcal/mol, ΔG estimado = -7,40 kcal/mol) foram classificados nos quarto, quinto e sexto lugares em relação à sua capacidade de se ligar a β -clamp de *S. aureus*. Como sabemos, as reações exotérmicas liberam calor e logo são por isso capazes de estabilizar um sistema bioquímico, em conformidade com os princípios da química (termodinâmica) e da física (mecânica lagrangeana hamiltoniana)

Tabela 2: Interação entre β -clamp de *S. aureus* e compostos selecionados.

Classificação	Composto	FullFitness (kcal/mol)	ΔG Estimado (kcal/mol)
1	N,O-bis-(desmetil)-buchenavianina	-4894,34	-7,26
2	ChEMBL2029615	-4892,24	-7,43
3	ChEMBL2029614	-4891,09	-7,31
4	O-desmetilbuchenavianina	-4888,70	-6,64
5	N-desmetilbuchenavianina	-4880,36	-7,50
6	Buchenavianina	-4879,57	-7,40
$ \Delta R $	$ R_6 - R_1 $	$ \Delta \text{FullFitness} = 14.77$ ordem 4,000	compare a ordem de classificação com a tabela 3

Figura 7: *Docking* molecular entre β -clamp de *S. aureus* e compostos selecionados. Os compostos são classificados por seus valores FullFitness. (A) N,O-bis-(desmetil)-buchenavianina; (B) ChEMBL2029615; (C) ChEMBL2029614; (D) O-desmetilbuchenavianina; (E) N-desmetilbuchenavianina; (F) Buchenavianina. Os círculos brancos indicam a posição de cada ligante.



3.5 ESTUDOS DE ANCORAGEM COM CYP3A4 HUMANO E COMPOSTOS SELECIONADOS

O citocromo P450 compreende várias enzimas que desempenham papel essencial durante o metabolismo de compostos exógenos, como drogas e álcool. Existem pelo menos quatro isoformas para CYP (citocromo P450), mas o 3A4 é o mais abundante no fígado e aquele que mais contribui para a desintoxicação do ácido biliar, no término da ação dos hormônios esteróides e na eliminação de fitoquímicos nos alimentos e na maioria dos medicamentos (Nebert, Wikvall, & Miller, 2013; Olsen,

Oostenbrink, & Jorgensen, 2015). Nesse sentido, é importante avaliar o efeito de um novo candidato a drogas com CYP3A4.

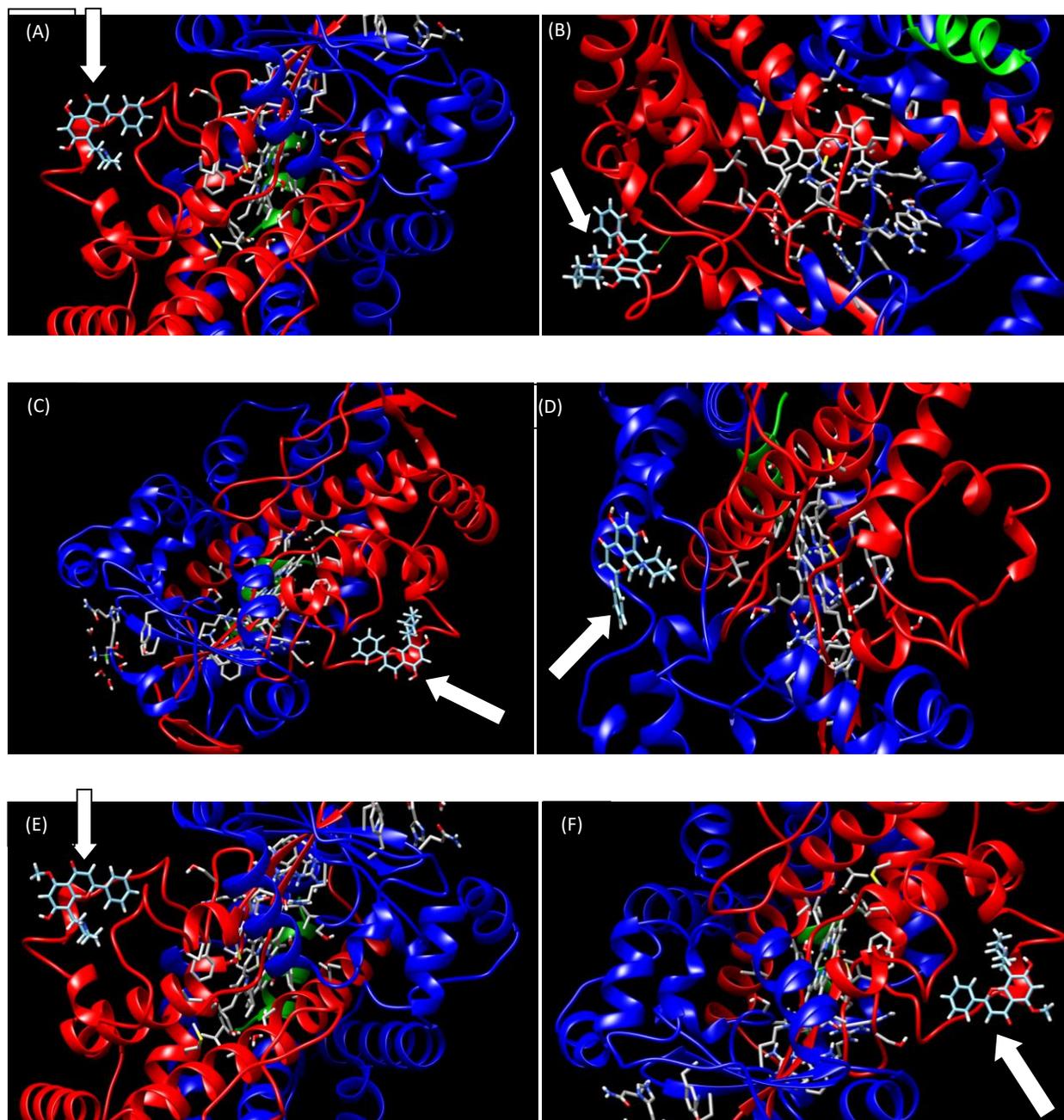
A interação de buchenavianina e compostos relacionados com CYP3A4 humano foi predita por acoplamento molecular (Tabela 3). Os valores de FullFitness variaram de -2217,75 kcal/mol a -2201,27 kcal/mol. Em relação ao ΔG estimado, os valores variaram de -6,82 kcal/mol a -7,09 kcal/mol. A Figura 8 mostra a visualização da ligação mais energeticamente favorável de cada composto em CYP3A4 humano.

O melhor FullFitness foi encontrado para N,O-bis-(desmetil)-buchenavianina com um valor de -2217,75 kcal/mol e estimado ΔG de -6,86 kcal/mol, para a interação mais favorável. O análogo ChEMBL2029615 (FullFitness = -2215,91 kcal/mol, ΔG estimado = -7,09 kcal/mol) e ChEMBL2029614 (FullFitness = -2213,84 kcal/mol, ΔG estimado = -6,98 kcal/mol) exibiram resultados semelhantes aos observados em N,O-bis-(desmetil)-buchenavianina. O-desmetilbuchenavianina (FullFitness = -2214,25 kcal/mol, ΔG estimado -7,01 kcal/mol), N-desmetilbuchenavianina (FullFitness = -2203,70 kcal/mol, ΔG estimado = -6,82 kcal/mol) e buchenavianina (FullFitness = -2201,26 kcal/mol, ΔG estimado = -7,04 kcal/mol) foram classificados nos terceiro, quinto e sexto lugares em relação à sua capacidade de se ligar ao CYP3A4 humano. A interação entre buchenavianine e análogos com CYP3A4 humana foi 2 vezes menor que buchenavianine e análogos com β -clamp de *S. aureus* e isto mostra que entre os dois alvos aqui analisados (β -clamp de *S. aureus* e CYP3A4 humana) os ligantes serão atraídos preferencialmente pela β -clamp de *S. aureus* o que ratifica os mesmos como viáveis inibidores do processo de replicação do DNA de *S. aureus*.

Tabela 3: Interação entre CYP3A4 humano e compostos selecionados.

Classificação	Composto	FullFitness (kcal/mol)	ΔG Estimado (kcal/mol)
1	N,O-bis-(desmetil)-buchenavianina	-2217,7524	-6,8654685
2	ChEMBL2029615	-2215,9163	-7,0911956
3	O-desmetilbuchenavianina	-2214,2532	-7,006671
4	ChEMBL2029614	-2213,8435	-6,977535
5	N-desmetilbuchenavianina	-2203,7002	-6,822664
6	Buchenavianina	-2201,2568	-7,044045
$ \Delta R $	$ R_6 - R_1 $	$ \Delta \text{FullFitness} = 16.4956$ ordem 2,000	Mesmo ordem da tabela 2, muda apenas na classificação 3

Figura 8: *Docking* molecular entre CYP3A4 de *S. aureus* e compostos selecionados. Os compostos são classificados por seus valores FullFitness. (A) N,O-bis-(desmetil)-buchenavianina; (B) ChEMBL2029615; (C) O-desmetilbuchenavianina; (D) ChEMBL2029614; (E) N-desmetilbuchenavianina; (F) Buchenavianina. As setas indicam a posição de cada ligante.



4 CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o grau de interação entre potenciais inibidores e a proteína β -clamp de *S. aureus* por meio de ensaios microbiológicos, químicos e simulações computacionais. A modelagem comparativa da β -clamp e a validação da estrutura 3D da mesma ocorreu de forma satisfatória (Figura 4, 5 e 6). A partir dos resultados de docking molecular (Figura 9 e 10) conclui-se que a buchenavianine isoladamente confere estabilidade se comparada com seus



derivados e/ou análogos. Estes últimos apresentam elementos eletronegativos (oxigênio, nitrogênio,...) em sua estrutura, razão pela qual ocorre diminuição da energia de ligação pela estabilização da nuvem eletrônica. Conforme o princípio de Hamilton Lagrange um sistema estável será sempre um sistema com entropia negativa máxima (menor valor numérico), por uma razão que intuitivamente podemos perceber: fenômenos com alta vibração interna não conseguem existir na natureza pois a energia de movimento de suas partículas desagregam a estrutura. Concluímos também, das tabelas 2 e 3, que ocorre alta interação (ordem de 4,800 kcal/mol) entre buchenavianine e análogos com β -clamp. Em contrapartida, a interação entre buchenavianine e análogos com CYPE3A4 humana foi da ordem de 2,200 seguindo os mesmos princípios de eletronegatividade dos elementos. Logo se conclui que a abordagem aqui exposta promove um rastreamento bioquímico racional para seleção de ligantes com melhores possibilidades para os testes de bancada subsequentes economizando recursos financeiros e otimizando resultados em pesquisa e desenvolvimento de medicamentos. A combinação de recursos microbiológicos, químicos e computacionais permitiram indicar moléculas presentes no extrato das plantas capazes de interagir com a β -clamp. A buchenavianina mostrou-se satisfatória pelos estudos laboratoriais e *in silico* aqui realizados com potencial para desenvolvimento tecnológico como inibidora da dimerização da proteína β -clamp de *S. aureus* e assim interromper a maquinaria de replicação do DNA bacteriano durante as infecções provocadas por este patógeno.

REFERÊNCIAS

- Bassetti, M., Peghin, M., Treccarichi, E. M., Carnelutti, A., Righi, E., Del Giacomo, P., . . . Tumbarello, M. (2017). Characteristics of *Staphylococcus aureus* Bacteraemia and Predictors of Early and Late Mortality. *PLoS One*, *12*(2), e0170236. doi: 10.1371/journal.pone.0170236
- Beutler, J. A., Cardellina, J. H., 2nd, McMahon, J. B., Boyd, M. R., & Cragg, G. M. (1992). Anti-HIV and cytotoxic alkaloids from *Buchenavia capitata*. *J Nat Prod*, *55*(2), 207-213.
- Blair, L. M., Calvert, M. B., & Sperry, J. (2017). Flavoalkaloids-Isolation, Biological Activity, and Total Synthesis. *Alkaloids Chem Biol*, *77*, 85-115. doi: 10.1016/bs.alkal.2016.04.001
- Cavalcanti Filho, J. R., Silva, T. F., Nobre, W. Q., Oliveira de Souza, L. I., Silva, E. S. F. C. S., Figueiredo, R. C., . . . Correia, M. T. (2017). Antimicrobial activity of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretions. *Pharm Biol*, *55*(1), 1521-1527. doi: 10.1080/13880209.2017.1304427
- da Silva, L. C., Sandes, J. M., de Paiva, M. M., de Araujo, J. M., de Figueiredo, R. C., da Silva, M. V., & Correia, M. T. (2013). Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. *Nat Prod Res*, *27*(16), 1492-1496. doi: 10.1080/14786419.2012.722090
- Das, S., Dasgupta, A., & Chopra, S. (2016). Drug repurposing: a new front in the war against *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol*, *11*, 1091-1099. doi: 10.2217/fmb-2016-0021
- de Oliveira Marreiro, R., Bandeira, M. F., de Souza, T. P., de Almeida, M. C., Bendaham, K., Venancio, G. N., . . . de Oliveira Conde, N. C. (2014). Evaluation of the stability and antimicrobial activity of an ethanolic extract of *Libidibia ferrea*. *Clin Cosmet Investig Dent*, *6*, 9-13. doi: 10.2147/CCIDE.S54319
- de Oliveira, Y. L., Nascimento da Silva, L. C., da Silva, A. G., Macedo, A. J., de Araujo, J. M., Correia, M. T., & da Silva, M. V. (2012). Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretoideae). *ScientificWorldJournal*, *2012*, 849302. doi: 10.1100/2012/849302
- Dominguez, A., Munoz, E., Lopez, M. C., Cordero, M., Martinez, J. P., & Vinas, M. (2017). Transcriptomics as a tool to discover new antibacterial targets. *Biotechnol Lett*, *39*(6), 819-828. doi: 10.1007/s10529-017-2319-0
- Dos Santos, B. S., da Silva, L. C., da Silva, T. D., Rodrigues, J. F., Grisotto, M. A., Correia, M. T., . . . Paiva, P. M. (2016). Application of Omics Technologies for Evaluation of Antibacterial Mechanisms of Action of Plant-Derived Products. *Front Microbiol*, *7*, 1466. doi: 10.3389/fmicb.2016.01466
- Dunyach-Remy, C., Ngba Essebe, C., Sotto, A., & Lavigne, J. P. (2016). *Staphylococcus aureus* Toxins and Diabetic Foot Ulcers: Role in Pathogenesis and Interest in Diagnosis. *Toxins (Basel)*, *8*(7). doi: 10.3390/toxins8070209
- Foster, T. J. (2017). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol Rev*. doi: 10.1093/femsre/fux007
- Grosdidier, A., Zoete, V., & Michielin, O. (2011). SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res*, *39*(Web Server issue), W270-277. doi: 10.1093/nar/gkr366



- Hill, P. B., & Imai, A. (2016). The immunopathogenesis of staphylococcal skin infections - A review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 49, 8-28. doi: 10.1016/j.cimid.2016.08.004
- Humphreys, H., Becker, K., Dohmen, P. M., Petrosillo, N., Spencer, M., van Rijen, M., . . . Garau, J. (2016). Staphylococcus aureus and surgical site infections: benefits of screening and decolonization before surgery. *J Hosp Infect*, 94(3), 295-304. doi: 10.1016/j.jhin.2016.06.011
- Indiani, C., & O'Donnell, M. (2006). The replication clamp-loading machine at work in the three domains of life. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(10), 751-761. doi: 10.1038/nrm2022
- Jameson, K. H., & Wilkinson, A. J. (2017). Control of Initiation of DNA Replication in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Genes (Basel)*, 8(1). doi: 10.3390/genes8010022
- Johnson, A., & O'Donnell, M. (2005). Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annu Rev Biochem*, 74, 283-315. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073859
- Kane, T., Carothers, K., & Lee, S. (2016). Virulence factor targeting of the bacterial pathogen *Staphylococcus aureus* for vaccine and therapeutics. *Curr Drug Targets*.
- Kjelstrup, S., Hansen, P. M., Thomsen, L. E., Hansen, P. R., & Lobner-Olesen, A. (2013). Cyclic peptide inhibitors of the beta-sliding clamp in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 8(9), e72273. doi: 10.1371/journal.pone.0072273
- Kong, C., Neoh, H. M., & Nathan, S. (2016). Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. *Toxins (Basel)*, 8(3). doi: 10.3390/toxins8030072
- Koymans, K. J., Vrieling, M., Gorham, R. D., Jr., & van Strijp, J. A. (2016). Staphylococcal Immune Evasion Proteins: Structure, Function, and Host Adaptation. *Curr Top Microbiol Immunol*. doi: 10.1007/82_2015_5017
- Malafaia, C. B., Jardelino, A. C. S., Silva, A. G., de Souza, E. B., Macedo, A. J., Correia, M., & Silva, M. V. (2017). Effects of Caatinga Plant Extracts in Planktonic Growth and Biofilm Formation in *Ralstonia solanacearum*. *Microb Ecol*. doi: 10.1007/s00248-017-1073-0
- Martinez, O. F., Agbale, C. M., Nomiya, F., & Franco, O. L. (2016). Deciphering bioactive peptides and their action mechanisms through proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 1-10. doi: 10.1080/14789450.2016.1238305
- Moormeier, D. E., & Bayles, K. W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol Microbiol*, 104(3), 365-376. doi: 10.1111/mmi.13634
- Nanfara, M. T., Babu, V. M., Ghazy, M. A., & Sutton, M. D. (2016). Identification of beta Clamp-DNA Interaction Regions That Impair the Ability of *E. coli* to Tolerate Specific Classes of DNA Damage. *PLoS One*, 11(9), e0163643. doi: 10.1371/journal.pone.0163643
- Nebert, D. W., Wikvall, K., & Miller, W. L. (2013). Human cytochromes P450 in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368(1612), 20120431. doi: 10.1098/rstb.2012.0431
- Nguyen, T. B., Lozach, O., Surpateanu, G., Wang, Q., Retailleau, P., Iorga, B. I., . . . Gueritte, F. (2012). Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of natural and unnatural flavonoidal alkaloids, inhibitors of kinases. *J Med Chem*, 55(6), 2811-2819. doi: 10.1021/jm201727w

- Nguyen, T. H., Park, M. D., & Otto, M. (2017). Host Response to *Staphylococcus epidermidis* Colonization and Infections. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 90. doi: 10.3389/fcimb.2017.00090
- Nielsen, O., & Lobner-Olesen, A. (2008). Once in a lifetime: strategies for preventing re-replication in prokaryotic and eukaryotic cells. *EMBO Rep*, 9(2), 151-156. doi: 10.1038/sj.embor.2008.2
- Oliveira, M. T., Souza, G. M., Pereira, S., Oliveira, D. A. S., Figueiredo-Lima, K. V., Arruda, E., & Santos, M. G. (2017). Seasonal variability in physiological and anatomical traits contributes to invasion success of *Prosopis juliflora* in tropical dry forest. *Tree Physiol*, 37(3), 326-337. doi: 10.1093/treephys/tpw123
- Olsen, L., Oostenbrink, C., & Jorgensen, F. S. (2015). Prediction of cytochrome P450 mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev*, 86, 61-71. doi: 10.1016/j.addr.2015.04.020
- Paharik, A. E., & Horswill, A. R. (2016). The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. *Microbiol Spectr*, 4(2). doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0022-2015
- Pandey, P., Verma, V., Dhar, S. K., & Gourinath, S. (2018). Screening of *E. coli* beta-clamp Inhibitors Revealed that Few Inhibit *Helicobacter pylori* More Effectively: Structural and Functional Characterization. *Antibiotics (Basel)*, 7(1). doi: 10.3390/antibiotics7010005
- Pandey, P., Verma, V., Gautam, G., Kumari, N., Dhar, S. K., & Gourinath, S. (2017). Targeting the beta-clamp in *Helicobacter pylori* with FDA-approved drugs reveals micromolar inhibition by diflunisal. *FEBS Lett*, 591(15), 2311-2322. doi: 10.1002/1873-3468.12734
- Rentero Rebollo, I., McCallin, S., Bertoldo, D., Entenza, J. M., Moreillon, P., & Heinis, C. (2016). Development of Potent and Selective *S. aureus* Sortase A Inhibitors Based on Peptide Macrocycles. *ACS Med Chem Lett*, 7(6), 606-611. doi: 10.1021/acsmchemlett.6b00045
- Rodrigues, P. M., Silva, J. O., Eisenlohr, P. V., & Schaefer, C. E. (2015). Climate change effects on the geographic distribution of specialist tree species of the Brazilian tropical dry forests. *Braz J Biol*, 75(3), 679-684. doi: 10.1590/1519-6984.20913
- Saha, S., Islam, M. K., Shilpi, J. A., & Hasan, S. (2013). Inhibition of VEGF: a novel mechanism to control angiogenesis by *Withania somnifera*'s key metabolite Withaferin A. *In Silico Pharmacol*, 1, 11. doi: 10.1186/2193-9616-1-11
- Sanyal, G., & Doig, P. (2012). Bacterial DNA replication enzymes as targets for antibacterial drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, 7(4), 327-339. doi: 10.1517/17460441.2012.660478
- Sergelidis, D., & Angelidis, A. S. (2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A controversial food-borne pathogen. *Lett Appl Microbiol*. doi: 10.1111/lam.12735
- Silva, L. N., Trentin Dda, S., Zimmer, K. R., Treter, J., Brandelli, C. L., Frasson, A. P., . . . Macedo, A. J. (2015). Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. *Pharm Biol*, 53(3), 464-468. doi: 10.3109/13880209.2014.922587
- Spaan, A. N., van Strijp, J. A. G., & Torres, V. J. (2017). Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors. *Nat Rev Microbiol*. doi: 10.1038/nrmicro.2017.27
- Teodoro, G. R., Brighenti, F. L., Delbem, A. C., Delbem, A. C., Khouri, S., Gontijo, A. V., . . . Koga-Ito, C. Y. (2015). Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-*albicans*. *Future Microbiol*, 10(6), 917-927. doi: 10.2217/fmb.15.20



Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G., Jr. (2015). Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*, 28(3), 603-661. doi: 10.1128/CMR.00134-14

van Eijk, E., Wittekoek, B., Kuijper, E. J., & Smits, W. K. (2017). DNA replication proteins as potential targets for antimicrobials in drug-resistant bacterial pathogens. *J Antimicrob Chemother*, 72(5), 1275-1284. doi: 10.1093/jac/dkw548