

**Estudo da enzima beta-lactamase e sua relação com a resistência aos antibióticos**  
**Study of the beta-lactamase enzyme and its relationship with antibiotic resistance**  
**Estudio de la enzima beta-lactamasa y su relación con la resistencia a los antibióticos**

Recebido: 16/05/2020 | Revisado: 22/05/2020 | Aceito: 23/05/2020 | Publicado: 01/06/2020

**Lorena de Lourdes Costa Araújo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4704-1128>

Centro Universitário Santo Agostinho, Brasil

E-mail: [lorennalourdes@hotmail.com](mailto:lorennalourdes@hotmail.com)

**Francisco Honeidy Carvalho Azevedo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8431-2022>

Centro Universitário Santo Agostinho, Brasil

E-mail: [honeydy@gmail.com](mailto:honeydy@gmail.com)

## **Resumo**

Os antibióticos beta-lactâmicos possuem um mesmo mecanismo de ação, a inibição da síntese da parede celular bacteriana, atingindo, principalmente, o peptidoglicano. São considerados antibióticos de segurança, uma vez que, ao atingir diretamente a parede celular, provocam uma autólise bacteriana. O objetivo desta pesquisa é avaliar a afinidade entre a enzima beta-lactamase e diversas classes de antibióticos beta-lactâmicos. Este estudo é uma pesquisa de metodologia do tipo exploratória, de natureza quantitativa com aplicação de simulação computacional com aplicação de métodos com simulação computacional com a avaliação dos escores de ligação por ancoramento molecular tradicional utilizando o programa AutoDock 4.2. Identificamos que, nos resultados das simulações de docagem molecular, a penicilina e a cefalosporina apresentaram maior afinidade no sítio catalítico, devido a uma menor energia livre de Gibbs. Conclui-se que a afinidade dos antibióticos penicilina e cefalosporina pode no futuro representar um obstáculo para o tratamento de doenças como, infecções leves e moderadas do trato respiratório, infecções da pele, infecções venéreas, e a profilaxia de doenças reumáticas. Sugerimos que estudos posteriores avaliem as simulações com testes de dinâmica molecular para verificar se, considerando a flexibilidade da enzima, seriam possíveis resultados ainda mais acurados.

**Palavras-chave:** Beta-lactamases; Resistência microbiana a medicamentos; Biologia Computacional.

### **Abstract**

Beta-lactam antibiotics have the same mechanism of action, the inhibition of bacterial cell wall synthesis, mainly affecting peptidoglycan. They are considered safety antibiotics, since, when they directly reach the cell wall, they cause bacterial autolysis. The objective of this research is to evaluate the affinity between the beta-lactamase enzyme and several classes of beta-lactam antibiotics. This study is a research of exploratory type methodology, of quantitative nature with application of computer simulation with application of methods with computer simulation with the evaluation of the connection scores by traditional molecular anchoring using the AutoDock 4.2 program. We identified that, in the results of molecular docking simulations, penicillin and cephalosporin showed greater affinity at the catalytic site, due to a lower Gibbs free energy. It is concluded that the affinity of the antibiotics penicillin and cephalosporin may in the future represent an obstacle for the treatment of diseases such as, mild and moderate infections of the respiratory tract, skin infections, venereal infections, and the prophylaxis of rheumatic diseases. We suggest that further studies evaluate the simulations with molecular dynamics tests to see if, considering the flexibility of the enzyme, even more accurate results would be possible.

**Keywords:** Beta-lactamases; Drug resistance microbial; Computational biology.

### **Resumen**

Los antibióticos betalactámicos tienen el mismo mecanismo de acción, la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, que afecta principalmente al peptidoglucano. Se consideran antibióticos de seguridad, ya que, cuando alcanzan directamente la pared celular, causan autólisis bacteriana. El objetivo de esta investigación es evaluar la afinidad entre la enzima betalactamasa y varias clases de antibióticos betalactámicos. Este estudio es una investigación de metodología exploratoria, de naturaleza cuantitativa con la aplicación de simulación por computadora con la aplicación de métodos con simulación por computadora con la evaluación de puntajes de unión por anclaje molecular tradicional usando el programa AutoDock 4.2. Identificamos que, en los resultados de las simulaciones de acoplamiento molecular, la penicilina y la cefalosporina mostraron mayor afinidad en el sitio catalítico, debido a una menor energía libre de Gibbs. Se concluye que la afinidad de los antibióticos penicilina y cefalosporina puede representar en el futuro un obstáculo para el tratamiento de

enfermedades como infecciones leves y moderadas del tracto respiratorio, infecciones de la piel, infecciones venéreas y la profilaxis de enfermedades reumáticas. Sugerimos que otros estudios evalúen las simulaciones con pruebas de dinámica molecular para ver si, considerando la flexibilidad de la enzima, serían posibles resultados aún más precisos.

**Palabras clave:** Beta-lactamasas; Resistencia a los medicamentos microbianos; Biología computacional.

## 1. Introdução

A resistência bacteriana é definida a partir de critérios microbiológicos e clínicos. Na microbiologia, uma cepa resistente consegue se desenvolver na presença de um antimicrobiano em concentração acima da suportada por outras bactérias não resistentes. Na visão clínica, uma cepa resistente possui a capacidade de não ser degradada por um antimicrobiano que reprimiria tal infecção (George, Sankar, Jesudasan, Sudandiradoss & Nandagopal, 2015).

Estudos estruturais da atividade enzimática das bactérias podem ajudar em pesquisas voltadas para a busca de alternativas a resistência bacteriana, sendo um conteúdo de utilidade pública no aspecto social, econômico e educacional, alertando sobre a gravidade do problema, tornando-se relevante para estudo na área, além da busca de novas classes farmacológicas para a eliminação destes parasitas.

Os antibióticos beta-lactâmicos possuem um mesmo mecanismo de ação, a inibição da síntese da parede celular bacteriana, atingindo, principalmente, o peptidoglicano. São considerados antibióticos de segurança, uma vez que, ao atingir diretamente a parede celular, provocam uma “autólise” bacteriana.

Portanto, se objetivou na pesquisa, avaliar a afinidade entre a enzima beta-lactamase e diversas classes de antibióticos beta-lactâmicos.

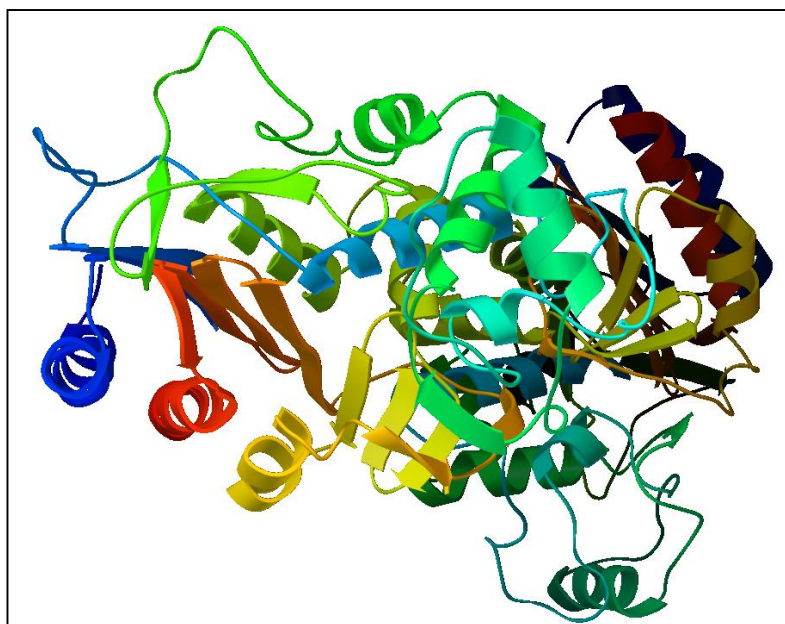
## 2. Metodologia

Este estudo é uma pesquisa de metodologia do tipo exploratória, de natureza quantitativa com aplicação de simulação computacional. Pesquisas buscam trazer novos saberes para a sociedade como preconiza Pereira et al. (2018), neste estudo as técnicas *in silico*, visaram à análise das interações entre a enzima beta-lactamase e diversos antibióticos beta-lactâmicos com as perspectivas de compreensão dos mecanismos moleculares que

envolvem a inativação destes antibióticos.

O modelo estrutural da enzima beta-lactamase (Figura 1) foi obtido a partir da estrutura cristalográfica depositada no PDB - *Protein Data Bank* ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) AmpC, código de acesso 6DPZ (resolução 1.50 Å) (Pdb, 1999; Rose et al. 2017; Jiankun et al. 2019).

**Figura 1** – Estrutura 3D da enzima beta-lactamase AmpC.



Fonte: os autores, 2020.

Para os testes *in silico*, foi feita uma busca código SMILES dos ligantes no PubChem. O software *ChemSketch*, versão 12.01 (Foster & Sohlberg, 2010) foi, então, usado para gerar as estruturas dos ligantes, que foram posteriormente otimizados no *MarvinSketch* versão 17.6 (Acclabs, 1996) e no *ArgusLab* (Chemaxon, 2020) com aplicação de cálculos quânticos por método semiempírico AM1 (Arguslab, 2020).

O Autodock (Gasteiger & Marsili, 1980), versão 4.2, é um programa de acoplamento usado para os cálculos de interação entre o alvo (enzima beta-lactamase) e os ligantes (antibióticos beta-lactâmicos). Os ligantes foram testados individualmente e, para o alvo, foram calculadas cargas parciais de Gasteiger (Morris et al. 2009) após a adição de todos os hidrogênios. Hidrogênios não polares do alvo e ligantes foram fundidos. Alvo e ligantes foram preparados para simulações de encaixe com a interface AutoDockTools (ADT) (Sanner, 1999) versão 1.5.6. Uma caixa cúbica de  $70 \times 70 \times 70$  pontos com um espaçamento de 0,35 Å entre os pontos da grade foi gerada para cada simulação. Nas simulações, o receptor

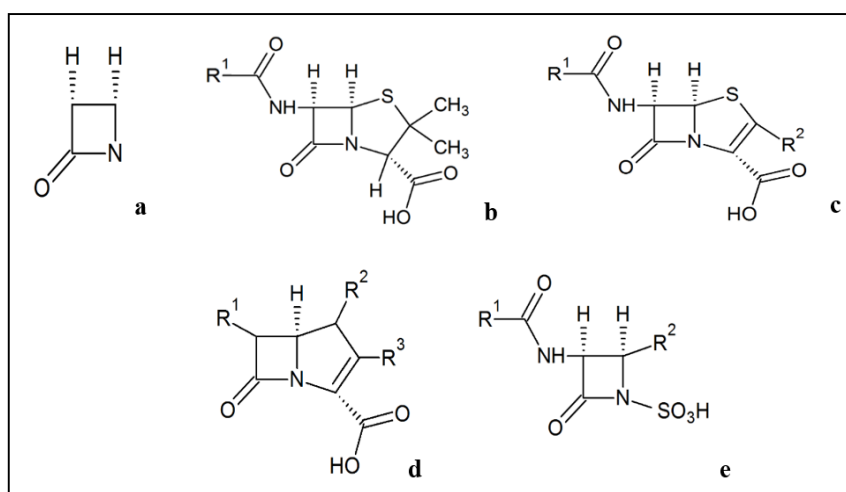
foi tratado como rígido e os ligantes como flexíveis. Os escores de ligação foram, portanto, analisados e comparados com a literatura.

Os métodos usados pelo programa para acoplagem ou ancoramento são os de pesquisa global, com algoritmo genético lamarckiano (LGA) (Morris et al. 1998) e pesquisa local, (LS) pseudo-Solis e (Solis & Wets, 1981) a cada simulação de encaixe única consistia em 10 execuções independentes. Como parâmetros aplicados ao programa, foi usada uma população inicial de 150, número máximo de gerações de 27.000 e o número máximo de avaliações de energia de  $2,5 \times 10^6$ . Os valores padrão foram selecionados para outros parâmetros. As caixas de grade foram centralizadas em aminoácidos do sítio catalítico da enzima beta-lactamase.

### 3. Antibióticos beta-lactâmicos e a Resistência Bacteriana

A Figura 2 apresenta as estruturas moleculares de diferentes antibiótico beta-lactâmicos.

**Figura 2** – Estrutura molecular dos beta-lactâmicos. Anel beta-lactâmico (a). Penicilina (b). Cefalosporina (c). Carbapenêmico (d). Monobactâmico (e).



Fonte: os autores, 2020.

As beta-lactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel beta-lactâmico (Figura 2-a) de antibióticos como, penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos. Estas enzimas são codificadas nos plasmídeos, transpósons e íntegrans, sendo elementos capazes de carregar o gene de resistência, transmitindo horizontalmente para outras bactérias (Lima, Lima, Calvacanti, Santos & Lima, 2017).

Os antibióticos beta-lactâmicos possuem um mesmo mecanismo de ação, a inibição da síntese da parede celular bacteriana, atingindo principalmente o peptidoglicano. São considerados antibióticos de segurança, uma vez que, ao atingir diretamente a parede celular, provoca-se a autólise bacteriana. Os beta-lactâmicos inibem a etapa final da síntese de peptidoglicano, reagindo no entrecruzamento dos polímeros (Sousa et al. 2019).

A penicilina (Figura 2-b) é um antibiótico beta-lactâmico, descoberto na década de 1940, e, a partir dele, vários medicamentos foram fabricados. As penicilinas são ativas contra cocos gram-positivos, apesar da resistência bacteriana, continua sendo essencial no tratamento de infecções adultas e infantis. Utilizadas como primeira escolha, a penicilina G e penicilina V ainda são efetivas para infecções como a sífilis (Lteif & Eiland, 2019).

Cefalosporinas (Figura 2-c) são os antibióticos mais usados no tratamento de infecções cirúrgicas, possuem bom histórico e avaliação em indivíduos com alergia à penicilina, apesar da reatividade cruzada entre os medicamentos. Indivíduos com alergia a cefalosporina podem tolerar cefalosporinas com diferentes cadeias laterais (Choi, 2019).

Os carbapenêmicos (Figura 2-d) são membros cruciais da classe dos beta-lactâmicos no tratamento de infecções, possuem um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e bactérias anaeróbicas. Como exemplo de carbapenêmico, com uso terapêutico, podemos citar o Meropenem (Lee & Bradley, 2019).

O único monobactâmico (Figura 2-e) aprovado para uso terapêutico é o aztreonam, um beta-lactâmico monocíclico. Tem como alvo, bactérias entéricas aeróbicas e *Pseudomonas aeruginosa*, com concentrações inibitórias mínimas (CIMs), *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis*. Liga-se firmemente à proteína ligadora de penicilina (PBP3) em bastonetes Gram-negativos, com ligação mais fraca em PBP1, ocorrendo, assim, a filamentação pela lise celular (Bush & Bradford, 2016).

Os mecanismos de resistência aos antibióticos estão ligados às mutações nos genes bacterianos que passaram por uma seleção natural, devido ao uso contínuo de antibióticos. Em outras palavras como afirmam Morehead & Scarbrough (2018), é um fenômeno natural, independente da intervenção humana, entretanto, o uso indiscriminado de antibióticos tem acelerado esse processo.

#### 4. Resultados e Discussão

Na Tabela 1, é possível identificar o resultado das simulações de docagem molecular, com cálculo da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) para estudo da possível interação dos antibióticos

beta-lactâmicos a enzima beta-lactamase AmpC. A energia livre de Gibbs representa o potencial termodinâmico que pode ser usado como referência para avaliarmos a espontaneidade de uma reação ou a afinidade entre uma enzima e seu substrato. A energia livre de Gibbs pode ser aplicada a análise de processos celulares (Vergara et al. 2019). A tendência do sistema termodinâmico, atingir a menor energia livre de Gibbs está relacionada a segunda lei da termodinâmica e é consistente com o princípio da entropia máxima indicando a maior tendência ou não para a ocorrência de uma reação química (Rietman et al. 2020).

O cálculo de energia livre de Gibbs é de fundamental importância na compreensão de processos biofísicos da proteína, bem como, interações proteína-ligantes. O cálculo de ligação de proteína-ligantes possui sua importância na descoberta de medicamentos, principalmente, em estágios de geração e otimização de compostos com atividade terapêutica. Vários métodos de cálculo da energia livre foram desenvolvidos nas últimas décadas, como perturbação de energia, integração termodinâmica, amostragens de distribuição envolvente e dinâmica (Ding, Vilseck, Hayes & Brooks, 2017).

**Tabela 1** - Resultados da simulação de Docagem molecular. Energias em kcal/mol.

Ligantes	Energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) para interação com o alvo AmpC
Penicilina	-8.47
Cefalosporina	-5.62
Meropenem	-5.92
Aztreonam	-4.41

Fonte: os autores, 2020.

O resultado mostra que, a penicilina, cefalosporinas e carbapenêmicos representado pelo Meropenem são os compostos que podem apresentar maior afinidade no sítio catalítico, devido a uma menor energia livre de Gibbs.

A penicilina apresentou maior afinidade em relação a enzima AmpC com uma energia livre de Gibbs menor, essa menor energia representa que essa reação seria mais espontânea, ou seja, a enzima seria capaz de se associar a penicilina quebrando o anel beta-lactâmico e desta forma inativando o antibiótico, o que confere resistência da bactéria contra este antibiótico, o mesmo ocorre com a cefalosporina cuja a energia foi a terceira menor, apresentada na Tabela 1.

Estudos realizados no Sudão em 2020 (Dirar, Bilal, Ibrahim & Hamid, 2020) corroboram estes resultados, pois mostram que enzimas AmpC foi identificada em uma porcentagem de 49,3% de bactérias, desta forma as bactérias apresentaram experimentalmente

resistência a penicilina e cefalosporina indicando que as nossas simulações computacionais estão coerentes com os dados experimentais.

As beta-lactamases podem ser divididas em várias classes, segundo a classificação de Ambler, podem ser divididas em quatro classes distintas. De acordo com a classificação de enzimas, a classe A, que em sua classificação compreende as famílias Temoneira (TEM), Variante sulfidril (SVH), Cefotaximase (CTX-M) e Klebsiela (KPC). A classe B é composta por Metallo- $\beta$ -lactamase de Nova Deli (NDM) e Verona imipinemase (VIM), na classe C, constituída por CMY e ADC, e a classe D, envolvendo a família Oxacilinase (OXA-23, 24/40 e OXA-48). São identificadas de acordo com as sequências específicas e diferenciadas pelo mecanismo hidrolítico, outra classificação se dá, principalmente, na classe B que compreende um grupo heterogêneo de melatoenzimas de zinco as Melato  $\beta$ -lactamases (MBLs) (Tooke et al. 2019).

Beta-lactamases AmpC são enzimas da classe C de Ambler, que possuem resíduos de serina em local ativo para catálise. Possuem mecanismos de resistência divididos em três categorias, resistência induzível por genes AmpC codificados por cromossomos, resistência cromossômica não induzível e resistência mediada por plasmídeo. Compreender os mecanismos de resistência bacteriana ainda é um desafio para os especialistas, embora tenham estudos fundamentados sobre o tratamento para produtores de AmpC, poucos têm se mostrado eficazes (Tamma, Doi, Bonomo, Johnson & Simmer, 2019).

As penicilinas da classe A de Ambler são encontradas em cocos Gram-positivos e são capazes de hidrolisar penicilinas. As beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) de classe A degradam as cefalosporinas de 1ª geração. O TEM-5 é uma beta-lactamase de amplo espectro capaz de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos, porém, possuem resistência ao sulbactam e tazobactam. No final dos anos 90, a beta-lactamase, classificada como classe A, sofreu mutação e tornou-se uma carbapenemase (Sawa, Kooguchi & Moriyama, 2020).

A resistência aos carbapenêmicos em bactérias gram-negativas acontece devido à produção de carbapenemases ou cefalosporinase pertencentes às classes A, B ou D. Enzimas de classe A e D possuem mecanismos a base de serina e enzimas de classe B precisam de íons de zinco para catalização, há, ainda, um caso raro de beta-lactamase da classe C, que hidrolisam imipenem. A classe A (KPC) é frequentemente relatada em *K. pneumoniae* e Enterobacteriaceae, a classe B (MBLs), (NDM), (VIM), (IMP) identificadas em grande escala pelo mundo, estão presentes, principalmente, em *Acinetobacter baumannii*. Beta-lactamases de classe D hidrolisam beta-lactamas de espectro estreito e fracamente carbapenêmicos,



porém, não possuem atividade inibidora contra cefalosporinas (Bonomo et al. 2018).

O meropenem apresentou um resultado muito próximo da cefalosporina indicando que a enzima AmpC também seria capaz de inativá-lo. Dados experimentais encontrados em Taiwan (Wang et al. 2015) mostraram que a resistência a carbapenêmicos, a exemplo do meropenem, demonstraram um aumento gradativo da resistência ao longo dos anos, este aumento é preocupante, pois as opções de tratamento são muito limitadas.

O aztreonam pertencente a classe dos monobactâmicos, por meio de nossas simulações apresentou menor afinidade a enzima AmpC, isso poderia indicar que provavelmente esse antibiótico apresentaria maior eficiência em relação as bactérias, não sendo inativados por esse mecanismo de resistência bacteriana representado pelas enzimas beta-lactamases. O antibiótico aztreonam é utilizado para o tratamento de infecções de tecidos moles como infecções ginecológicas, infecções urinárias, abdominais entre outras (Chauzy et al. 2019).

## 5. Conclusão

Considerando a estrutura da AmpC, nossos resultados apontam que esta, apresentando maior afinidade com a penicilina, cefalosporinas e os carbapenêmicos, pode no futuro representar um obstáculo para o tratamento de doenças como, infecções leves e moderadas do trato respiratório, infecções da pele, infecções venéreas, e a profilaxia de doença reumáticas, já que os referidos antibióticos apresentam esta aplicação principal.

Sugerimos que estudos posteriores avaliem as simulações com testes de dinâmica molecular para verificar se, considerando a flexibilidade da enzima, seria possível resultados ainda mais acurados, dinamizando as soluções computacionais para planejamento de novos fármacos e compreensão dos mecanismos de resistência dos microrganismos. É necessário que sejam feitos testes com as várias penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, pois seriam, teoricamente, as que apresentariam mais afinidade com a AmpC e apresentariam possíveis riscos para o desenvolvimento de uma resistência bacteriana a estes antibióticos.

Diante do exposto as simulações apresentadas nesta pesquisa estão coerentes com os dados experimentais, podendo então ser avaliadas alterações estruturais na molécula dos antibióticos, observando se isso diminuiria a afinidade destes com a enzima e sua capacidade de inativá-los, por sua vez contribuindo para a diminuição da resistência bacteriana aos beta-lactâmicos.

## Referências

- George, EA, Sankar, S, Jesudasan, MV, Sudandiradoss, C & Nandagopal, B. (2015). Molecular characterization of CTX-M type Extended Spectrum Beta Lactamase producing E. coli isolated from humans and the environment. *Indian J Med Microbiol*, 33,73–79.
- Lima, DS, Lima, JC, Calvacanti, RMCB, Santos, BHC & Lima, IO. (2017). Estudo da atividade antibacteriana dos monoterpenos timol e carvacrol contra cepas de Escherichia coli produtoras de  $\beta$ -lactamases de amplo espectro. *Ver Pan-Amaz Saúde*, 8(1),17-21.
- Sousa, ATHI, Makino, H, Bruno, VCM, Candido, SL, Nogueira, BS, Menezes, IG, Nakazato, L & Dutra, V. (2019). Perfil de resistência antimicrobiana de Klebsiella pneumoniae isoladas de animais domésticos e silvestres. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71(2), 584-593.
- Lteif, L & Eiland, LS. (2019). The Basics of Penicillin Allergy: What A Clinician Should Know. *Pharmacy (Basel)*,7(3),94.
- Choi, JH. (2019). Does Cephalosporin Skin Test Predict Immediate Hypersensitivity to Cephalosporin? *J Korean Med Sci*, 34(50).
- Lee, Y & Bradley, N. (2019). Overview and Insights into Carbapenem Allergy. *Pharmacy (Basel)*, 7(3).
- Bush, K & Bradford, PA. (2016).  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6(8), 025247.
- Morehead, MS & Scarbrough, C. (2018). Emergence of Global Antibiotic Resistance. *Prim Care*, 45(3), 467–484.
- Pdb - Protein Data Bank. (1999). rcsb.org. Acesso em: 10 abril 2020. Disponível em: <http://www.rcsb.org/pages/about-us/index>

Pereira, AS, Shitsuka, DM, Parreira, FJ & Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. [e-book]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM. Disponível em: [https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic\\_Computacao\\_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1](https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1).

Rose, PW, Ell, DS, Hudson, B, Kalro, T, Lowe, R, Peisach, E, Randle, C, Rose, AS, Shao, C, Tao, YP, Valasatava, Y, Voigt, M, Westbrook, JD, Woo, J, Yang, H, Young, JY, Zardecki, C, Berman, HM & Burley, SK. (2017). The RCSB protein data bank: Integrative view of protein, gene and 3D structural information. *Nucleic Acids Res*, 45, 271–281.

Jiankun, L, Sheng, W, Trent, EB, Isha, S, Anat, L, Yurii, SM, Matthew, JO'M, Tao, C, Enkhjargal, A, Kateryna, T, Andrey, AT, Brian, KS, Bryan, LR & John, JI. (2019). Ultra-large library docking for discovering new chemotypes. *Nature*, 566(7743), 224–229.

Foster, ME & Sohlberg, KA. (2010). New Empirical Correction to the AM1 Method for Macromolecular Complexes. *J Chem Theory Comput*, 6(7), 2153-66.

Acad /chemsketch para uso acadêmico e pessoal. (1996). acdlabs.com. Acesso em: 10 abril 2020. Disponível em: <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>

Soluções e serviços de software para química e biologia. (2020). Chemaxon.com. Acesso em: 10 abril 2020. Disponível em: <https://www.chemaxon.com>

Arguslab. (2020). Arguslab.com. Acesso em: 10 de abril de 2020. Disponível em: <http://www.arguslab.com>

Gasteiger, J & Marsili, M. (1980). Iterative partial equalization of orbital electronegativity- a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron*, 36(22), 3219–3228.

Morris, GM, Huey, R, Lindstrom, W, Sanner, MF, Belew, RK, Goodsell, DS & Olson, AJ. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput*, 30, 2785–2791.

- Sanner, MF. (1999). Python: a programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model*, 17, 57–61.
- Morris, GM, Goodsell, DS, Halliday, RS, Huey, R, Hart, WE, Belew, RK & Olson, AJ. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem*, 19, 1639–1662.
- Solis, FJ, Wets, RJB. (1981). Minimization by Random Search Techniques. *Math. Oper. Res*, 6, 19–30.
- Vergara, RC, Jaramillo-Riveri, S, Luarte, A, Moenne-locoz, C, Fuentes, R, Couve, A & Maldonado, PE. (2019). The Energy Homeostasis Principle: Neuronal Energy Regulation Drives Local Network Dynamics Generating Behavior. *Front Comput Neurosci*, 13, 49.
- Rietman, EA, Taylor, S, Siegelmann, HT, Deriu, MA, Cavaglia, M & Tuszynski, JA. (2020). Using the Gibbs Function as a Measure of Human Brain Development Trends from Fetal Stage to Advanced Age. *Int J Mol Sci*, 21(3), 1116.
- Ding, X, Vilseck, JZ, Hayes, RL & Brooks, CL. (2017). Gibbs Sampler-Based  $\lambda$ -Dynamics and Rao-Blackwell Estimator for Alchemical Free Energy Calculation. *J Chem Theory Comput*, 13(6), 2501–2510.
- Dirar, M, Bilal, N, Ibrahim, ME, & Hamid, M. (2020). Resistance Patterns and Phenotypic Detection of  $\beta$ -lactamase Enzymes among Enterobacteriaceae Isolates from Referral Hospitals in Khartoum State, Sudan. *Cureus*, 12(3), e7260.
- Tooke, CL, Hinchliffe, P, Bragginton, EC, Colenso, KC, Hirvonen, VHA, Takebayashi, Y & Spencer, J. (2019).  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol*, 431(18), 3472–3500.
- Tamma, PD, Doi, Y, Bonomo, RA, Johnson, JK & Simner, PJ. (2019). Antibacterial Resistance Leadership Group. A Primer on AmpC  $\beta$ -Lactamases: Necessary Knowledge for an Increasingly Multidrug-resistant World. *Clin Infect Dis*, 69(8), 1446–1455.

Sawa, T, Kooguchi, K & Moriyama, K. (2020). Molecular diversity of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J Intensive Care*, 8.

Bonomo, RA, Burd, EM, Conly, J, Limbago, BM, Segre, JA & Westblade, LF. (2018). Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clin Infect Dis*, 66(8), 1290–1297.

Wang, JT, Wu, UI, Lauderdale, TL, Chen, MC, Li, SY, Hsu, LY, & Chang, SC. (2015). Carbapenem-nonsusceptible Enterobacteriaceae in Taiwan. *PloS one*, 10(3), e0121668.

Chauzy, A, Gaelzer STB, Buyck, J, de Jonge, B, Adier, C, Marchand, S, Couet, W, & Grégoire, N. (2019). Semimechanistic Pharmacodynamic Modeling of Aztreonam-Avibactam Combination to Understand Its Antimicrobial Activity Against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology*, 8(11), 815–824.

#### **Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Lorena de Lourdes Costa Araújo – 50%

Francisco Honeidy Carvalho Azevedo – 50%