



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE
BIOLÓGICA E RECURSOS NATURAIS - PPGDR

EFEITO DO D-DIHDROCARVONA EM CEPAS
DE *Staphylococcus aureus* PORTADORAS DA BOMBA DE
EFLUXO NorA E AVALIAÇÃO DE SUA TOXICIDADE
EM MODELO DE *Drosophila melanogaster*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PAULA PATRÍCIA MARQUES CORDEIRO

CRATO-CE

2021

**EFEITO DO D-DIHDROCARVONA EM CEPAS
DE *Staphylococcus aureus* PORTADORAS DA BOMBA DE EFLUXO NorA E
AVALIAÇÃO DE SUA TOXICIDADE EM MODELO
DE *Drosophila melanogaster***

Dissertação apresentada à Universidade Regional do Cariri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais - PPGDR, área de concentração em Prospecção de Produtos Naturais, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha

Orientador

Prof. Dr. Saulo Relison Tintino

Coorientador

CRATO-CE

2021

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Regional do Cariri – URCA
Bibliotecária: Ana Paula Saraiva CRB: 3/1000

Cordeiro, Paula Patrícia Marques.

C794e Efeito do D-dihidrocarvona em cepas de *Staphylococcus aureus* portadoras da bomba de efluxo *norA* e avaliação de sua toxicidade em modelo de *Drosophila melanogaster*/ Paula Patrícia Marques Cordeiro.
– Crato – CE, 2021.

63p.; il.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais da Universidade Regional do Cariri – URCA

Orientador: Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra
da Cunha
Coorientador: Prof. Dr. Saulo Relison
Tintino

1. Resistência Bacteriana, 2. Efluxo, 3. Produtos Naturais;
I. Título.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais - PPGDR, da Universidade Regional do Cariri - URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Diversidade Biológica e Recursos Naturais / Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais. É permitida a citação de qualquer texto desta dissertação respeitando-se as normas de ética na pesquisa.

Dissertação aprovada em: 25/01/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha – URCA

Orientador

Prof. Dr. Saulo Relison Tintino – URCA

Coorientador

Profa. Dra. Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga – URCA (Membro interno)

Profa. Dra. Jacqueline Cosmo Andrade – UFCA (Membro externo)

Profa. Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues – URCA (Suplente de membro interno)

Prof. Dr. Aracélio Viana Colares – UNILEÃO (Suplente de membro externo)

Dedico aos meus filhos, Baruch, Kalil e Albert.

AGRADECIMENTOS

À minha vizinha, Francisca Felipe, que me criou, por todo amor dedicado a mim e por todos os ensinamentos, principalmente com seu exemplo de garra e determinação.

À minha mãe, Socorro Marques, por todo amor, cuidado, incentivo e apoio, sobretudo nas horas mais difíceis. Obrigada por sempre acreditar em mim e não me deixar desistir!

Ao meu pai (*in memoriam*) por todo amor e ensinamentos que não cessaram com sua partida!

Aos meus filhos Baruch Marques, Kalil Marques e Albert Marques por mesmo sem saber, serem meu amparo, meu porto seguro, minha âncora, minha luz na escuridão e minha força para continuar. Obrigada Baruch e Kalil por toda ajuda com nosso bebê Albert.

Aos meus irmãos Aliny Marques, Anderson Marques e Alisson Marques e às minhas tias Francilene Marques, Francilene Correia e Ana Correia por seu amor, amizade e apoio.

Às amigas Gleiciane Soares, Aparecida Santos (Nonô) e Natalia Rodrigues, por sempre me socorrerem e cuidarem tão bem de mim e dos meus filhos.

Às minhas amigas Vivianne Mattos, Mírian Oliveira, Eduarda Lima, Fátima Bernardino e Jocykelly Sátiro, pela amizade e incentivo, mesmo à distância.

Ao meu orientador, professor Francisco Cunha, por ter me recebido tão bem em seu laboratório e grupo de pesquisa, por todos os ensinamentos, conselhos e contribuições que tornaram possível a realização desse trabalho e a concretização de um sonho. Agradeço por agir como um pai, ao puxar minha orelha e não desistir de mim. Desculpe-me contrariar suas palavras, “fez muito mais que sua obrigação!”

Ao meu coorientador, professor Dr. Saulo Relison Tintino, pela contribuição e incentivo. A toda equipe do Laboratório de Bioprospecção do Semiárido e Métodos Alternativos - LABSEMA, por todas as contribuições acadêmicas, trocas de experiências, ajuda com os testes e momentos de descontração. Em especial a Dárcio Sousa, Joycy Sampaio, Zildene Sousa, Nair Macedo, Cristina Rodrigues e Jackeline Scherf por estarem diretamente envolvidos nos testes e pelas contribuições para elaboração desse trabalho. Sem vocês não teria conseguido em tempo hábil.

Ao professor Henrique Douglas e sua equipe do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular-LMBM, por cederem seu laboratório e equipamentos, sem os quais essa pesquisa não aconteceria.

À Universidade Regional do Cariri-URCA, pelas instalações e pelo curso de mestrado.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular-PPBM pela ajuda com a burocracia.

À CAPES, CNPq, FUNCAP e FINEP, pelo apoio financeiro e equipamentos.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Resistência bacteriana.....	13
2.2 Mecanismo de resistência por bomba de efluxo.....	14
2.2.1 Bomba de efluxo NorA	15
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.4 Produtos naturais como modificadores da resistência bacteriana.....	17
2.4.1 Terpenos	17
2.4.1.1 D-dihidrocarvona.....	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Substâncias.....	20
3.2 Ensaio de atividade direta pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	20
3.3 Avaliação da inibição da bomba de efluxo por modificação da CIM do antibiótico e do brometo de etídio	21
3.4 Ensaio de toxicidade em modelo de <i>Drosophila melanogaster</i>.....	21
3.4.1 Criação e estoque.....	21
3.4.2 Preparação dos ensaios	22
3.4.3 Ensaios de geotaxia negativa e de mortalidade	22
3.5 Análise Estatística.....	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Manuscrito submetido.....	23
4. 2 Ensaios microbiológicos.....	47
4.2.1 Avaliação da atividade direta pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	47
4.2.2 Avaliação da inibição da bomba de efluxo por redução da CIM do antibiótico...47	
4.2.3 Avaliação da inibição da bomba de efluxo por redução da CIM do brometo de etídio	49

4.3 Ensaio de toxicidade em modelo de <i>Drosophila melanogaster</i>	50
5 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXOS.....	62
ANEXO A: Comprovante de submissão do manuscrito: "Inhibition of the NorA efflux pump by D-dihydrocarvone and evaluation of its toxicity in a <i>Drosophila melanogaster</i> model"	62
ANEXO B: Trabalhos Publicados em Anais de Congressos.....	63

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ABC *ATP-Binding Cassette Superfamily*

ANOVA Análise de Variância

ATP Adenosina Trifosfato

BHI *Brain Heart Infusion*

BrEt Brometo de Etídio

CCCP *Carbonyl Cyanide m-Chlorophenyl-hydrazone*

CIM Concentração Inibitória Mínima

DDHC D-dihidrocarvona

DNA Ácido Desoxirribonucleico

DMAPP Difosfato de Dimetilalil

GPP Geranil Difosfato

HIA *Heart Infusion Agar*

IBE Inibidores de Bomba de Efluxo

IPP Difosfato de Isopentenil

MATE *Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family*

MDR *Multiple Drug Resistance*

MFS *Major Facilitator Superfamily*

MRSA *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*

OMS Organização Mundial da Saúde

RND *Resistance-nodulation-cell Division Superfamily*

SMR *Small Multidrug Resistance Family*

UFC Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Principais famílias de bombas de efluxo.....	15
FIGURA 2 Estrutura química do terpeno D-dihidrocarvona.....	18
FIGURA 3 Representação da redução da Carvona à Dihidrocarvona pelo Zinco e pelo Ácido acético	19
FIGURA 4 Efeito de inibição de bomba de efluxo por redução da CIM do antibiótico norfloxacina pelo D-dihidrocarvona.....	48
FIGURA 5 Efeito de inibição de bomba de efluxo por redução da CIM do brometo de etídio (BrEt) pelo D-dihidrocarvona.....	49
FIGURA 6 Avaliação da toxicidade por geotaxia negativa em modelo de <i>Drosophila melanogaster</i>	51
FIGURA 7 Avaliação da mortalidade de <i>Drosophila melanogaster</i> pela exposição ao D-dihidrocarvona.....	51

RESUMO

Desde sua origem até hoje, os antimicrobianos tornaram-se aliados indispensáveis no controle de infecções. No entanto, seu uso desregrado é uma das principais causas do aumento da resistência bacteriana, corroborando com o surgimento de cepas multirresistentes. A resistência microbiana se dá por diferentes mecanismos, entre os quais está o efluxo de substâncias mediado por bomba. A bomba de efluxo NorA, presente em *Staphylococcus aureus*, é responsável pela eliminação de diferentes antibióticos e outras substâncias prejudiciais à célula bacteriana. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e inibidora da bomba de efluxo NorA, pelo terpeno D-dihidrocarvona, sobre cepas de *S. aureus*, além de avaliar sua toxicidade em modelo de *Drosophila melanogaster*. Todo o ensaio se deu pelo método de microdiluição em caldo, analisando-se a inibição da bomba de efluxo NorA pela diminuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do antibiótico Norfloxacin e do Brometo de Etídio (BrEt) quando em associação com o D-dihidrocarvona. O ensaio de toxicidade foi realizado por fumigação, submetendo-se *D. melanogaster* aos volumes de 5, 10 e 20 µL do D-dihidrocarvona para avaliar os danos ao aparelho locomotor e a mortalidade, quando expostas ao terpeno por 3, 6, 9, 12, 24, 36 e 48 horas. No ensaio de atividade direta, o D-dihidrocarvona apresentou uma CIM ≥ 1024 µg/mL contra as cepas 1199 e 1199B, valor considerado clinicamente irrelevante. Também foi observado que o D-dihidrocarvona apresentou um efeito sinérgico ao reduzir a CIM da norfloxacin de 50,79 µg/mL para 32 µg/mL e de 128 µg/mL para 50,79 µg/mL, contra as cepas SA-1199 e SA-1199B, respectivamente. Já no ensaio de inibição de bomba de efluxo pela redução da CIM do brometo, o D-dihidrocarvona reduziu a CIM do BrEt de 50,79 µg/mL para 32 µg/mL na cepa 1199, não diferindo do controle na cepa 1199B. No ensaio de toxicidade, alterou a locomoção e foi letal para *D. melanogaster*, em todos os volumes, a partir de três horas do ensaio. Tendo um efeito volume-dependente, evidenciado nos volumes de 10 e 20 µL. Conclui-se que o terpeno em estudo atuou como possível inibidor da bomba de efluxo NorA na cepa 1199, devido à redução da CIM. Além do mais, foi tóxico para *D. melanogaster*, em todos os volumes ensaiados. Novos estudos poderão elucidar os efeitos antibacterianos e toxicológicos do D-dihidrocarvona.

Palavras-Chave: Resistência Bacteriana; Efluxo; Produtos Naturais.

ABSTRACT

From its origin until today, antimicrobials have become indispensable allies in the control of infections. However, its unruly use is one of the main causes of the increase in bacterial resistance, corroborating the appearance of multidrug-resistant strains. Microbial resistance occurs through different mechanisms, among which is the pump mediated substance efflux. The NorA efflux pump, present in *Staphylococcus aureus*, is responsible for the elimination of different antibiotics and other substances harmful to the bacterial cell. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the antibacterial and inhibitory activity of the NorA efflux pump, by the terpene D-dihydrocarvone, on strains of *S. aureus*, in addition to evaluating its toxicity in a model of *Drosophila melanogaster*. The entire assay was carried out using the broth microdilution method, analyzing the inhibition of the NorA efflux pump by decreasing the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the antibiotic Norfloxacin and Ethidium Bromide (BrEt) when in association with D-dihydrocarvone. The toxicity test was performed by fumigation, submitting *D. melanogaster* to volumes of 5, 10 and 20 μL of D-dihydrocarvone to assess damage to the locomotor system and mortality when exposed to the terpene for 3, 6, 9, 12, 24, 36 and 48 hours. In the direct activity assay, D-dihydrocarvone showed an MIC $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ against strains 1199 and 1199B, a value considered clinically irrelevant. It was also observed that D-dihydrocarvone had a synergistic effect by reducing the MIC of norfloxacin from 50.79 $\mu\text{g/mL}$ to 32 $\mu\text{g/mL}$ and from 128 $\mu\text{g/mL}$ to 50.79 $\mu\text{g/mL}$, against strains SA-1199 and SA-1199B, respectively. In the efflux pump inhibition assay by reducing the bromide MIC, D-dihydrocarvone reduced the BrEt MIC from 50.79 $\mu\text{g/mL}$ to 32 $\mu\text{g/mL}$ in the 1199 strain, not differing from the control in the 1199B strain. In the toxicity test, it changed locomotion and was lethal to *D. melanogaster*, in all volumes, after three hours of the test. Having a volume-dependent effect, evidenced in the volumes of 10 and 20 μL . It is concluded that the studied terpene acted as a possible inhibitor of the NorA efflux pump in strain 1199, due to the reduction in MIC. Furthermore, it was toxic to *D. melanogaster*, in all volumes tested. New studies may elucidate the antibacterial and toxicological effects of D-dihydrocarvone.

Key words: Bacterial Resistance; Efflux; Natural Products.

1. INTRODUÇÃO

A descoberta dos antibióticos e sua introdução no uso clínico representa um dos grandes feitos da medicina do século 20 (KATZ e BALTZ, 2016). Seu uso proporcionou o tratamento de muitas doenças infecciosas e do câncer, além de facilitar o transplante de órgãos (HUTCHINGS *et al.*, 2019). Porém, o uso inadequado e a prescrição indiscriminada dos mesmos contribuíram para o desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes a antimicrobianos (OLIVEIRA *et al.*, 2020; SHAHRAZ *et al.*, 2012).

Entre as bactérias multirresistentes, os isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) foram reconhecidos como uma das principais causas de infecções hospitalares, possuindo capacidade de adquirir resistência a muitas classes de agentes antibacterianos, como os β -lactâmicos, quinolonas e macrolídeos (HASSANZADEH *et al.*, 2020; WALANA *et al.*, 2020). Os mecanismos pelos quais essa resistência é mediada são diversos, tendo destaque para a absorção limitada do fármaco, modificação do alvo, inativação enzimática e bombas de efluxo (YILMAZ e ASLANTAS, 2017). Estas últimas são proteínas transportadoras que expulsam compostos tóxicos, incluindo drogas antimicrobianas, da célula (BROWN *et al.*, 2015). A Bomba de Efluxo NorA é uma das principais bombas identificadas em *S. aureus*, a qual confere resistência principalmente a fluoroquinolonas hidrofílicas, como norfloxacin e ciprofloxacina (COSTA *et al.*, 2013; RAJABI *et al.*, 2020).

Foi nessa perspectiva que em 2017 a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou uma lista de patógenos resistentes a antibióticos para os quais se faz necessário o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Dentre elas *S. aureus* obteve destaque recebendo *status* de prioridade “alta” (WHO, 2017). No entanto, a descoberta de novas terapêuticas antimicrobianas pode ser confrontada com o aparecimento de novos mecanismos de resistência a esses agentes em um futuro próximo (TAMFU *et al.*, 2020).

Diante disso, o desenvolvimento de inibidores da bomba de efluxo que atuem como adjuvantes para reduzir a resistência aos antibióticos tem atraído atenção de pesquisadores, sendo que já se tem estudos promissores nesse sentido (SILVA *et al.*, 2020). Os compostos de origem natural, sobretudo, aqueles derivados de plantas fornecem oportunidades de pesquisa devido às diversas propriedades farmacológicas e toxicológicas descritas na literatura, as quais estão associadas aos diferentes metabólitos secundários que os constituem (ZIANI *et al.*, 2020; PADMAHARISH e LAKSHMI, 2017).

O monoterpeno D-dihidrocarvona (DHC) é um dos principais constituintes dos óleos essenciais de *Citrus aurantifolia* e *Citrus sinensis* (PATIL *et al.*, 2009; SELLI *et al.*, 2004), que além de inibir micróbios da cavidade oral, é também empregado como ingrediente na formulação de cuidados bucais (PARIKH e KUMAR, 2004). No entanto sua atividade antibacteriana sobre *S. aureus*, bem como sua atividade inibidora de bomba de efluxo ainda não foram avaliadas.

Os inibidores de bomba devem ser destituídos de toxicidade para humanos (BHARDWAJ e MOHANTY, 2012). Logo, é necessário investigar sua toxicidade. Para tanto, *Drosophila melanogaster* é recomendada como modelo alternativo pelo *European Center for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) (SHARMA *et al.*, 2012), por ser um invertebrado muito utilizado em estudos para doenças humanas (HAMMER *et al.*, 2018; JEIBMANN e PAULUS, 2009).

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e inibidora da bomba de efluxo NorA, pelo terpeno D-dihidrocarvona, sobre cepas de *S. aureus*, além de avaliar sua toxicidade em modelo de *D. melanogaster*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resistência bacteriana

O desenvolvimento da resistência bacteriana a fármacos está associado a uma diversidade de fatores, a saber: fácil acessibilidade de antibióticos, desregulamentação e falta de fiscalização em estabelecimentos que fornecem esses medicamentos, assim como diagnósticos imprecisos, contribuem para o uso excessivo e indevido dessas drogas, desencadeando o esgotamento de antimicrobianos eficazes para o tratamento de infecções bacterianas (MORRIS e CERCEO, 2020).

Os antibióticos existentes no mercado atuam, basicamente, de cinco formas sobre as células bacterianas: na biogênese da parede celular, na estrutura da membrana, na biossíntese de proteínas, na replicação e reparo do DNA e no metabolismo do ácido fólico (GONZÁLEZ- BELLO, 2017).

A resistência bacteriana é classificada como ativa quando há uma pressão evolutiva específica com o propósito de induzir um processo de adaptação de um mecanismo de resistência a um determinado antibiótico ou a uma classe de antibióticos, enquanto que a resistência denominada como passiva está associada a processos adaptativos mais generalizados, promovendo um tipo de resistência inespecífico, ou seja, o mecanismo de resistência não está necessariamente ligado a uma determinada classe de antibióticos (WRIGHT, 2003). A resistência pode ser desenvolvida através de processos de mutação espontânea no DNA cromossômico ou pode surgir por meio de processos extra-cromossômicos, como por exemplo, a troca de plasmídeos ou transposons entre bactérias (MONSERRAT-MARTINEZ; GAMBIN; SIERECKI, 2018).

As bactérias podem apresentar diversos mecanismos de resistência aos antibióticos, dentre eles destacam-se, degradação ou modificação da estrutura do antibiótico, mudanças ou proteção do alvo bacteriano ao fármaco, além de alteração da permeabilidade da parede celular bacteriana e efluxo ativo do antibiótico para o exterior da célula, sendo esses dois últimos responsáveis pela limitação da concentração intracelular do antibiótico (COSTA *et al.*, 2013).

As enzimas que agem modificando a estrutura dos antibióticos pertencem ao grupo das transferases, as quais promovem a inativação dos antibióticos ou de alvos antibióticos com a inserção de grupos químicos, bloqueando a ligação dessas drogas a seus respectivos alvos (LIU *et al.*, 2019).

Dentre esses mecanismos, a resistência enzimática que está associada à

ineficiência dos antibióticos e o mecanismo de efluxo ativo que expulsa as drogas antimicrobianas para o exterior da célula de patógenos Gram-positivos e Gram-negativos, foram considerados importantes linhas de estudo para a busca de novas alternativas para o tratamento de infecções bacterianas (PARRINO *et al.*, 2020).

2.2 Mecanismo de resistência por bomba de efluxo

Muitos mecanismos de resistência foram desenvolvidos pelos micro-organismos desde que os agentes antimicrobianos foram introduzidos nas práticas terapêuticas (DAVIES e DAVIES, 2010). Essa resistência se manifesta através de vários mecanismos, no entanto, a resistência mediada pelas bombas de efluxo tem despertado bastante interesse (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

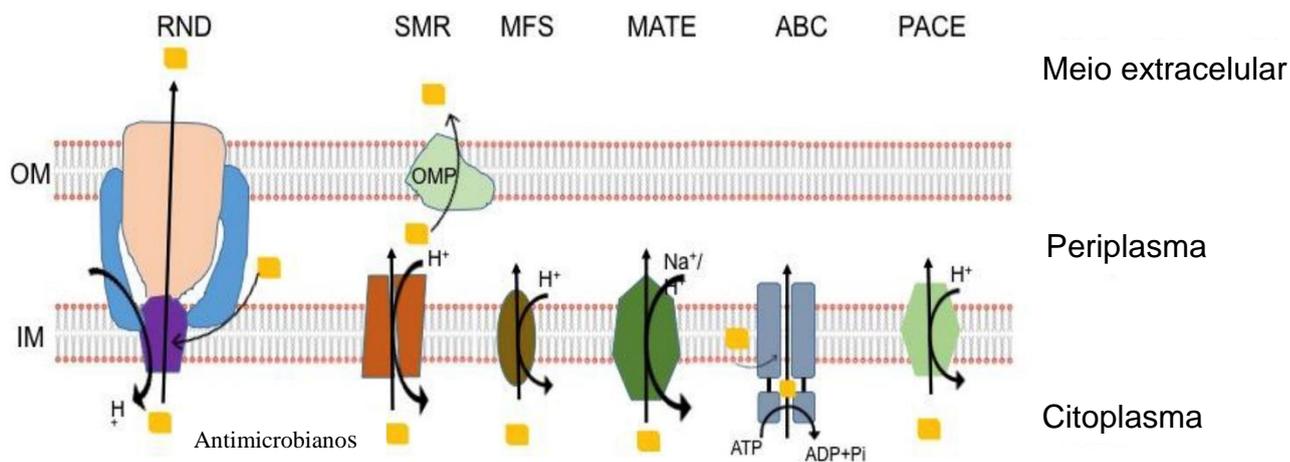
As bombas de efluxo são proteínas da membrana citoplasmática encontradas em quase todos os tipos de células, incluindo as bacterianas e eucarióticas (BAMBEKE *et al.*, 2000; AUDA *et al.*, 2020). Em relação às bombas de efluxo de células bacterianas, estudos genéticos moleculares já elucidaram seu papel fisiológico, sendo demonstrado que as mesmas são mecanismos evolutivos bastante antigos que apoiam o enfrentamento de desafios de sobrevivência em ambientes com exposição a compostos nocivos (ALCADE-RICO *et al.*, 2016). Dessa forma, esses sistemas de efluxo desempenham importante função como elementos de desintoxicação ao possibilitarem à extrusão de substratos nocivos as células, como corantes, produtos químicos e antibióticos, representando, portanto, elementos-chave no desenvolvimento da resistência antimicrobiana (POOLE, 2008).

Quanto as suas especificidades, os sistemas de efluxo bacterianos podem atuar extrudando apenas um tipo de antibiótico ou até mesmo antibióticos pertencentes a uma mesma classe, ou ainda serem capazes de extrudir diferentes classes de compostos antimicrobianos, sendo essas últimas designados como bombas de efluxo de Resistência a Múltiplas Drogas (MDR) (KUMAR e SCHWEIZE, 2005).

Como mostra a Figura 1, essas bombas de efluxo podem ser classificadas em seis famílias, as quais se distinguem pelas subunidades em suas estruturas, além de suas necessidades de energia, a saber: Superfamília Principal Facilitadora (*Major Facilitator Superfamily* [MFS]); Superfamília Ligada à ATP Cassete (*ATP-binding cassette superfamily* [ABC]); Pequena Família de Resistência a Múltiplos Medicamentos (*Small multidrug resistance family* [SMR]); Superfamília de Divisão Celular de Nodulação de Resistência, (*Resistance-nodulation-cell division superfamily* [RND]); Superfamília de Extrusão de Multidrogas e de Compostos Tóxicos (*Multidrug and toxic compound*

extrusion family [MATE]) e Superfamília de Efluxo de Compostos Antimicrobianos Proteobacterianos (*Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux* [PACE]) (KABRA *et al.*, 2019; PIDDOCK *et al.*, 2006).

Figura 1: Principais famílias de bombas de efluxo



Fonte: Adaptado de KABRA *et al.*, 2019

Mais de quinze tipos de bombas de efluxo já foram identificados em *Staphylococcus aureus*, sendo elas expressas por plasmídeos ou cromossomo. A maioria dessas bombas pertencem à família MFS, tendo destaque para NorA, NorB, NorC, as quais contribuem para a remoção de antibióticos através da força próton-motriz (SCHINDLER *et al.*, 2015)

2.2.1 Bomba de efluxo NorA

Os sistemas de efluxo ativo pertencentes à MFS são um dos principais mecanismos de resistência presentes em *S. aureus*, sendo a bomba NorA uma das mais importantes dessa família (COSTA *et al.*, 2013). Essa foi à primeira bomba MDR de *S. aureus* codificada por cromossomos a ser identificada e possui cerca de 42 kDa e 12 segmentos transmembranares. O gene cromossômico *norA* que a codifica contém 388 aminoácidos (YOSHIDA *et al.*, 1990; SCHINDLER e KAATZ, 2016).

Estudos vêm mostrando que NorA possui ampla especificidade de substratos, podendo transportar uma série de compostos quimicamente e estruturalmente diferentes, sendo eles, especialmente fluoroquinolonas hidrofílicas, como norfloxacin e ciprofloxacina, corantes, como brometo de etídio e biocidas (ANDRADE *et al.*, 2020; RAJABI *et al.*, 2020; HASSANZADEH *et al.*, 2020). Até o momento sua estrutura

cristalina ainda não foi resolvida, assim como seu sítio de ligação aos substratos (LAMUT *et al.*, 2019). No entanto, há evidências de que o local de ligação aos substratos em NorA seja grande e hidrofóbico, o que poderia explicar a ampla especificidade de substratos que a mesma é capaz de transportar (BHASKAR *et al.*, 2016).

NorA é regulada por MgrA, um membro do grupo MarR de reguladores de transcrição MgrA. Este se comporta como um regulador negativo, pois sua expressão está associada a uma redução na síntese do transcrito de NorA (ANDERSEN *et al.*, 2015). Esse regulador também afeta outras bombas, como NorB, NorC, diminuindo a sua expressão, resultando em menor resistência à quinolonas hidrofílicas como norfloxacin e ciprofloxacina, além de substratos hidrofóbicos (WALSH, 2000).

Essa bomba de efluxo tem sido alvo de diversas pesquisas que investigam o potencial de produtos de origem natural para o desenvolvimento de Inibidores de Bomba de Efluxo (EBIs) (THAI *et al.*, 2015).

2.3 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* compreende mais de 51 espécies, a maioria delas vivendo como bactérias comensais inofensivas na pele e mucosa de diversos mamíferos (LEROY *et al.*, 2020). Uma representante desse gênero é a bactéria *Staphylococcus aureus*, um anaeróbio facultativo, Gram-positivo e coagulase-positiva, com dimensões que variam de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, sendo imóveis, não esporulados e geralmente não-encapsulados (KONEMAN *et al.*, 2001; HENNEKINNE *et al.*, 2012).

A bactéria *S. aureus* é um patógeno com a capacidade de produzir uma série de fatores de virulência como toxinas esfoliativas, enterotoxinas estafilocócicas e a toxina I da Síndrome do Choque Tóxico (TSAI *et al.*, 2020). Essa bactéria está associada à pequenas infecções cutâneas, como celulite e impetigo, até infecções graves com riscos de morte, como bacteremia, endocardite infecciosa, infecção pulmonar, gastroenterite, meningite, entre outras (MAHMOUDI *et al.*, 2019). Além disso, é um dos principais responsáveis por doenças transmitidas por alimentos em humanos, através da produção de enterotoxinas (LEE *et al.*, 2018) e de infecções associadas à resistência a antibióticos, desenvolvida por essa bactéria através de mecanismos extrínsecos ou adquiridos, como modificação enzimática de drogas, alvos mutantes de drogas, expressão melhorada da bomba de efluxo e alteração da permeabilidade da membrana, além de formação de biofilme e a produção de fatores de virulência (TANG *et al.*, 2020).

2.4 Produtos naturais como modificadores da resistência bacteriana

O tratamento de infecções desencadeadas por micro-organismos antes da descoberta de antibióticos era realizado com a utilização de fitoterápicos, tendo em vista a produção de metabólitos secundários pelas plantas para autodefesa e em contrapartida essas substâncias podem apresentar bioatividades, dentre elas, as antibacterianas e antifúngicas (RAO *et al.*, 2018). Após a descoberta de drogas antimicrobianas, surgiu a problemática da resistência bacteriana aos fármacos existentes no mercado para o tratamento de infecções e devido a isso, é necessário o desenvolvimento de novas alternativas para solucionar esse problema, sendo os produtos naturais um importante alvo para a descoberta de novos agentes terapêuticos (VERAS *et al.*, 2017).

Estudos apontam produtos naturais eficazes na diminuição da resistência bacteriana. O ácido gálico, por exemplo, inibiu a bomba de efluxo NorA e o ácido cafeico inibiu as bombas MrsA e TetK de *S. aureus* (DOS SANTOS *et al.*, 2018). Tintino e colaboradores (2016) demonstraram a ação inibição da bomba de efluxo NorA pelo ácido tânico.

2.4.1 Terpenos

Dentre os metabólitos secundários produzidos pelas plantas, os terpenos ou terpenóides destacam-se por apresentar mais de 40.000 moléculas diferentes que se originam a partir da união de isopreno (C_5H_8) e possuem como característica a insolubilidade em água (GARCIA e CARRIL, 2009). São extraídos a partir de óleos essenciais obtidos de diversas partes de plantas aromáticas, como as flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, madeira, frutos e raízes (GALLUCCI *et al.*, 2009).

Os terpenos são sintetizados através da adição direta de difosfato de isopentenil (IPP) ao seu isômero difosfato de dimetilalil (DMAPP), produzindo ao final o geranyl difosfato (GPP, C_{10}) (DUBEY; BHALLA; LUTHRA, 2003). O IPP e DMAPP são derivados da acetil-CoA (CHO *et al.*, 2017).

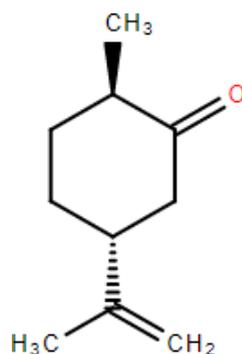
Embora pouco se saiba sobre os mecanismos de ação dos terpenos sobre as bactérias, estudos sugerem que sua natureza hidrofóbica desestabilizam a membrana externa, causando sua ruptura e impedindo seu funcionamento normal (COWAN, 1999; LAMBERT *et al.*, 2001; GILL e HOLLEY, 2006). Foi demonstrado por Gallegos-Flores e colaboradores (2019) a atividade antibacteriana dos compostos Carvacrol, Timol,

Linalol, Limoneno e Terpineno frente às cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *S. aureus*. Alguns terpenos apresentam potencial como inibidores de bomba de efluxo, como por exemplo, o Terpinoleno que inibiu a bomba QacC na cepa SA K4100 (SCHERF *et al.*, 2020). Esta é uma das características que torna os terpenos alvo de estudos, pois os inibidores podem reestabelecer a sensibilidade dos antibióticos e a associação do inibidor-antibiótico diminui o surgimento de novas variantes de resistência aos antibióticos (GIBBONS, 2008).

2.4.1.1 D-dihidrocarvona

O terpeno D-dihidrocarvona [(+) - Dihidrocarvona], também conhecido como (2*R*, 5*R*) -2-metil-5-prop-1-en-2-ilciclohexan-1-ona (Figura 2), é uma Dihidrocarvona na configuração (R, R) e, portanto, um enantiômero da (-) - Dihidrocarvona (PUBCHEM, 2020). Pouco se sabe sobre atividades ou bioatividades desse terpeno. No entanto, há relato na literatura que esse composto foi capaz de induzir apoptose em células de adenocarcinoma do cólon humano e inibir mico-organismos da cavidade oral (PATIL *et al.*, 2009). Infere-se por analogia e com base em estruturas outrora estudadas, que o D-dihidrocarvona seja formado a partir do monotерpeno Carvona (Figura 3).

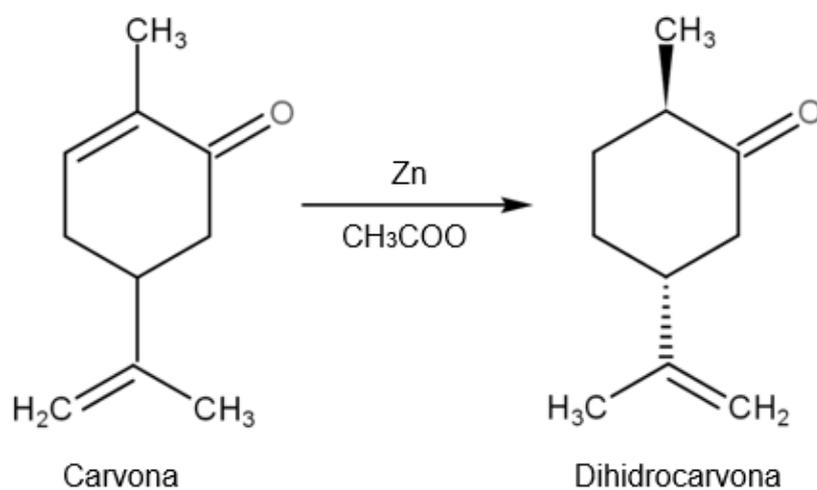
Figura 2: Estrutura química do terpeno D-dihidrocarvona



Fonte: Disponível em <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:154>

Como mostra a Figura 3, a Carvona é reduzida a Dihidrocarvona pelo zinco e pelo ácido acético (NEVES, 2012; OLIVEIRA, 1993). Suas três ligações duplas facilitam essa redução, não só à Dihidrocarvona, mas também a outros compostos, a depender das condições e reagentes presentes (NEVES, 2012).

Figura 3: Representação da redução da Carvona à Dihidrocarvona pelo Zinco e pelo Ácido acético



Fonte: Adaptado de NEVES, 2012.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Substâncias

A fim de se obter uma concentração de 1024 µg/mL, o D-dihidrocarvona e o antibiótico Norfloxacin, foram diluídos em 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO), e logo após em água estéril. O Brometo de Etídio (BrEt) e a Clorpromazina (CPZ) foram diluídos em água destilada, enquanto o Cianeto de Carbonila M-Clorofenil-Hidrazona (CCCP) foi dissolvido em metanol/água (1:3, v/v). A Clorpromazina foi adquirida de farmácia convencional e as demais substâncias, da SIGMA Chemical Co. St. Louis, E.U.A.

3.2 Ensaio de atividade direta pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM do D-dihidrocarvona foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, segundo Javadpour et al. (1996). As cepas SA-1199 (selvagem) e SA-1199B (NorA) foram semeadas por 24 horas à 37 °C e posteriormente diluídas em solução salina estéril (0,9%). Em seguida os inóculos foram comparados à escala Mcfarland. Na preparação dos microtubos, foram usados 1440 µL do meio de cultura líquido BHI, e 160 µL do inóculo bacteriano, formando o volume final de 1600 mL. Posteriormente as placas de microdiluição foram preenchidas com 100 µL da solução do conteúdo total dos microtubos em cada poço das 8 primeiras fileiras. Sendo a fileira 7, controle de crescimento bacteriano e a fileira 8 reservada para o controle de esterilidade, contendo apenas meio de cultura. Tanto no controle de crescimento como no controle de esterilidade não houve adição da substância em estudo. Em seguida, foi feita a microdiluição com o produto (100 µL) nas 6 primeiras fileiras em concentrações que variaram de 512 µg/mL até 2,0 µg/mL. Por fim, as placas foram incubadas na estufa bacteriológica na temperatura de 37 °C, por 24 horas. A leitura das placas foi realizada após 24 horas da realização do teste, adicionando-se 20 µL de resazurina em cada poço para detectar o crescimento das bactérias, indicado pela modificação na cor do meio de azul para vermelho (CLSI, 2012).

3.3 Avaliação da inibição da bomba de efluxo por modificação da CIM do antibiótico e do brometo de etídio

Para observar se o D-dihidrocarvona atua como potencial inibidor da bomba de efluxo NorA, um estudo comparativo entre os efeitos dos inibidores padrão da bomba de efluxo foi utilizado, avaliando a capacidade de ambos na diminuição da CIM do brometo de etídio e do antibiótico norfloxacino. Os Inibidores de Bomba de Efluxo (IBEs) padrões, CCCP e o CPZ, foram utilizados para comprovar a expressão da bomba NorA pelas cepas testadas.

A inibição da bomba de efluxo foi testada usando uma concentração sub-inibitória (CIM/8) dos IBEs e do D-dihidrocarvona. Nos testes, 160 µL de cada inóculo bacteriano suspenso em solução salina, correspondente a 0,5 da escala de McFarland, foram adicionados juntamente com IBEs e o D-dihidrocarvona (CIM/8), e completados com BHI. Estes foram então transferidos para placas de microdiluição de 96 poços, aos quais foram adicionados 100 µL do antibiótico ou do BrEt em diluições seriadas (1:1) que variaram de 512 a 0,25 µg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e o crescimento bacteriano foi avaliado pelo uso da resazurina (7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one). Também foram preparados dois controles de modulação, utilizando apenas o antibiótico norfloxacina e o BrEt.

3.4 Ensaio de toxicidade em modelo de *Drosophila melanogaster*

3.4.1 Criação e estoque

As moscas da estirpe de Harwich foram obtidas do National Species Stock Center, Bowling Green, OH e criadas de acordo com a metodologia de Cunha *et al.* (2015), sendo acondicionadas em recipientes de vidro de 340 mL e cultivadas em um meio a base de 83 % de massa de milho, 4 % de açúcar, 4 % de leite liofilizado, 4 % de farelo de soja, 4 % de farelo de trigo e 1 % de sal. Após o preparo da mistura foi adicionado 1 g de Nipagin (Metilparabeno) e 1 mL de solução contendo *Saccharomyces cerevisiae*, após resfriamento. As moscas foram mantidas na estufa BOD a 25 °C e a 60 % de umidade relativa do ar.

3.4.2 Preparação dos ensaios

De acordo com Cunha *et al.*, (2015), foram colocadas 20 moscas adultas de ambos os sexos, em cada recipiente. No fundo de cada recipiente havia papel toalha embebido em 1 mL de sacarose a 20 % em água destilada. Os recipientes usados como controle receberam apenas a sacarose, os demais, além de sacarose no fundo dos recipientes, receberam em um papel filtro colado nas tampas, diferentes volumes do terpeno D-dihidrocarvona, a saber, 5, 10 e 20 μ L. Tendo sua ação pelo método de fumigação.

3.4.3 Ensaio de geotaxia negativa e de mortalidade

O ensaio de geotaxia negativa proposto por Coulom e Birman (2004) foi utilizado na detecção dos danos ao aparelho locomotor de *D. melanogaster*, após serem submetidas às concentrações do terpeno D-dihidrocarvona. Com leves batidas nos frascos, as moscas foram conduzidas para o fundo dos mesmos e após 1 minuto foi quantificado o total de moscas que atingiu 5 cm de altura. Repetindo-se esse mesmo procedimento após 1 minuto. Na avaliação da mortalidade foi observada a quantidade de moscas mortas após exposição ao terpeno. Para ambos ensaios foram usados os mesmos volumes do terpeno D-dihidrocarvona e observados os mesmos tempos, de 3, 6, 9, 12, 24, 36 e 48 horas.

3.5 Análise Estatística

Os ensaios antibacterianos foram realizados em sextuplicatas e os resultados foram expressos como a média das repetições. Os resultados dos testes foram expressos como a média geométrica. A análise de hipótese estatística será aplicada usando *Two-Way ANOVA*, seguido do teste *post hoc de Bonferroni*, usando o software *GraphPad Prism*. Para a análise dos dados de toxicidade foi feito um teste *ANOVA* de duas vias, e em seguida foi realizado um teste de múltipla comparação de *Tukey*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Manuscrito submetido (ao EXCLI Journal)

EFEITO DO D-DIHDROCARVONA EM CEPAS DE *Staphylococcus aureus* PORTADORAS DA BOMBA DE EFLUXO NorA E AVALIAÇÃO DE SUA TOXICIDADE EM MODELO DE *Drosophila melanogaster*

Paula Patrícia Marques Cordeiro ^{a, e}, Dárcio Luiz de Souza Júnior ^{a, d}, Joycy Francely Sampaio dos Santos ^{a, d}, Cristina Rodrigues Barbosa dos Santos ^{a, d}, Zildene de Sousa Silveira ^{a, c}, Nair Silva Macêdo ^{a, c}, Jackelyne Roberta Scherf ^{a, d}, Saulo Relison Tintino ^b, Henrique Douglas Melo Coutinho ^b, Francisco Assis Bezerra da Cunha ^a

^aLaboratório de Bioprospecção do Semiárido e Métodos Alternativos (LABSEMA), Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato, 63105-000, CE, Brasil

^bLaboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM), Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato, 63105-000, CE, Brasil

^cPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - PPGCB, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, 50670-901, PE, Brasil

^dPrograma de Pós-Graduação em Química Biológica (PPQB), Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato, 63105-000, CE, Brasil

^ePrograma de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais (PPGDR), Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato, 63105-000, CE, Brasil

*Autor Correspondente: Universidade Regional do Cariri - URCA, Center for Biological and Health Sciences - CCBS, Department of Biological Chemistry - DQB, Laboratory of Microbiology and Molecular Biology - LMBM. Av. Cel. Antonio Luiz, 1161. Pepper. Crato - CE. Brazil. CEP: 63105-000. Phone: +55 (88) 31021212; Fax: +55 (88) 31021291; email: saulorelison@gmail.com

ABSTRACT

Since its inception, antimicrobials have become allies in infection control. However, its unrestrained use is one of the main causes of the increase in bacterial resistance. This occurs through different mechanisms, among which is the pump mediated flow of substances. The objective was to evaluate the terpene D-dihydrocarvone for its antibacterial effect combined with norfloxacin, its ability to inhibit the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* and its toxicity in a model of *D. melanogaster*. The MIC determination was made using the broth microdilution method. The pump inhibition test was performed by decreasing the MIC of the antibiotic and ethidium bromide when associated with D-dihydrocarvone. Toxicity was tested by fumigation, submitting *D. melanogaster* to volumes of 5, 10 and 20 μL of D-dihydrocarvone to assess damage to the locomotor system and mortality when exposed to the terpene for 3, 6, 9, 12, 24, 36 and 48 hours. D-dihydrocarvone presented MIC $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ against strains 1199 and 1199B. It reduced the MIC of norfloxacin from 50.79 $\mu\text{g/mL}$ to 32 $\mu\text{g/mL}$ and from 128 $\mu\text{g/mL}$ to 50.79 $\mu\text{g/mL}$, against strains SA-1199 and SA-1199B, respectively. It also reduced the BrEt MIC from 50.79 $\mu\text{g/mL}$ to 32 $\mu\text{g/mL}$ in the 1199 strain, not differing from the control in the 1199B strain. It was found to be toxic to *D. melanogaster*, in all volumes, after three hours of the test. Being evidenced in the volumes of 10 and 20 μL . It is concluded that D-dihydrocarvone had antibacterial activity because it has a synergistic effect to norfloxacin in the strains tested and by inhibiting the NorA efflux pump in strain 1199. Furthermore, it was toxic to *D. melanogaster*, in all tested volumes. New studies may elucidate the antibacterial and toxicological effects of D-dihydrocarvone.

Key words: Bacterial Resistance; Efflux; Natural Products.

1. INTRODUÇÃO

A descoberta dos antibióticos e sua introdução no uso clínico representa um dos grandes feitos da medicina do século 20 (KATZ e BALTZ, 2016). Seu uso proporcionou o tratamento de muitas doenças infecciosas e do câncer, além de facilitar o transplante de órgãos (HUTCHINGS *et al.*, 2019). Porém, o uso inadequado e a prescrição indiscriminada dos mesmos contribuíram para o desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes a antimicrobianos (OLIVEIRA *et al.*, 2020; SHAHRAZ *et al.*, 2012).

Entre as bactérias multirresistentes, os isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) foram reconhecidos como uma das principais causas de infecções hospitalares, possuindo capacidade de adquirir resistência a muitas classes de agentes antibacterianos, como os β -lactâmicos, quinolonas e macrolídeos (HASSANZADEH *et al.*, 2020; WALANA *et al.*, 2020). Os mecanismos pelos quais essa resistência é mediada são diversos, tendo destaque para a absorção limitada do fármaco, modificação do alvo, inativação enzimática e bombas de efluxo (YILMAZ e ASLANTAS, 2017). Estas últimas são proteínas transportadoras que expulsam compostos tóxicos, incluindo drogas antimicrobianas, da célula (BROWN *et al.*, 2015).

A Bomba de Efluxo NorA é uma das principais bombas identificadas em *S. aureus*, a qual confere resistência principalmente a fluoroquinolonas hidrofílicas, como norfloxacina e ciprofloxacina (COSTA *et al.*, 2013; RAJABI *et al.*, 2020).

Foi nessa perspectiva que em 2017 a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou uma extensa lista de patógenos resistentes a antibióticos para os quais se faz necessário o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Dentre elas *Staphylococcus aureus* obteve destaque recebendo *status* de prioridade “alta” (WHO, 2017). No entanto, a descoberta de novas terapêuticas antimicrobianas pode ser confrontada com o aparecimento de novos mecanismos de resistência a esses agentes em um futuro próximo (TAMFU *et al.*, 2020).

Diante disso, o desenvolvimento de inibidores da bomba de efluxo que atuem como adjuvantes para reduzir a resistência aos antibióticos tem atraído atenção de pesquisadores, sendo que já se tem estudos promissores nesse sentido (SILVA *et al.*, 2020). Os compostos de origem natural, sobretudo, aqueles derivados de plantas fornecem oportunidades de pesquisa devido às diversas propriedades farmacológicas e toxicológicas descritas na literatura, as quais estão associadas aos diferentes metabólitos

secundários que os constituem (ZIANI *et al.*, 2020; PADMAHARISH e LAKSHMI, 2017).

O monoterpeno D-dihidrocarvona (DHC) é um dos principais constituintes dos óleos essenciais de *Citrus aurantifolia* e *Citrus sinensis* (PATIL *et al.*, 2009; SELLI *et al.*, 2004), que além de inibir micróbios da cavidade oral, é também empregado como ingrediente na formulação de cuidados bucais (PARIKH e KUMAR, 2004). No entanto sua atividade antibacteriana sobre *S. aureus*, bem como sua atividade inibidora de bomba de efluxo ainda não foram avaliadas.

Os inibidores de bomba devem ser destituídos de toxicidade para humanos (BHARDWAJ & MOHANTY, 2012). Logo, é necessário investigar sua toxicidade. Para tanto, *D. melanogaster* é recomendada como modelo alternativo pelo *European Center for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) (SHARMA *et al.*, 2012), por ser um invertebrado muito utilizado em estudos para doenças humanas (HAMMER *et al.*, 2018; JEIBMANN e PAULUS, 2009).

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o terpeno D-dihidrocarvona quanto ao seu efeito antibacteriano combinado à norfloxacina, à sua capacidade de inibir a bomba de efluxo NorA de *Staphylococcus aureus* e quanto à sua toxicidade em modelo de *Drosophila melanogaster*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Substâncias

A fim de se obter uma concentração de 1024 $\mu\text{g/mL}$, o D-dihidrocarvona e o antibiótico Norfloxacin, foram diluídos em 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO), e logo após em água estéril. O brometo de etídio (BrEt) e a Clorpromazina foram diluídos em água destilada, enquanto o Cianeto de Carbonila M-Clorofenil-Hidrazona (CCCP) foi dissolvido em metanol/água (1:3, v/v). A Clorpromazina foi adquirida de farmácia convencional e as demais substâncias, da SIGMA Chemical Co. St. Louis, E.U.A.

2.2 Ensaio de atividade direta pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM do D-dihidrocarvona foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, segundo Javadpour et al. (1996). As cepas SA-1199 (selvagem) e SA-1199B (NorA) foram semeadas por 24 horas à 37 °C e posteriormente diluídas em solução salina estéril (0,9%). Em seguida os inóculos foram comparados à escala Mcfarland. Na preparação dos microtubos, foram usados 1440 μL do meio de cultura líquido BHI, e 160 μL do inóculo bacteriano, formando o volume final de 1600 mL. Posteriormente as placas de microdiluição foram preenchidas com 100 μL da solução do conteúdo total dos microtubos em cada poço das 8 primeiras fileiras. Sendo a fileira 7, controle de crescimento bacteriano e a fileira 8 reservada para o controle de esterilidade, contendo apenas meio de cultura. Tanto no controle de crescimento como no controle de esterilidade não houve adição da substância em estudo. Em seguida, foi feita a microdiluição com o produto (100 μL) nas 6 primeiras fileiras em concentrações que variaram de 512 $\mu\text{g/mL}$ até 2,0 $\mu\text{g/mL}$. Por fim, as placas foram incubadas na estufa bacteriológica na temperatura de 37 °C, por 24 horas. A leitura das placas foi realizada após 24 horas da realização do teste, adicionando-se 20 μL de resazurina em cada poço para detectar o crescimento das bactérias, indicado pela modificação na cor do meio de azul para vermelho (CLSI, 2012).

2.3 Avaliação da inibição da bomba de efluxo por modificação da CIM do antibiótico e do brometo de etídio

Para observar se o D-dihidrocarvona atua como potencial inibidor da bomba de efluxo NorA, um estudo comparativo entre os efeitos dos inibidores padrão da bomba de efluxo foi utilizado, avaliando a capacidade de ambos na diminuição da CIM do brometo de etídio e do antibiótico norfloxacin. Os Inibidores de Bomba de Efluxo (IBEs) padrões, CCCP e o CPZ, foram utilizados para comprovar a expressão da bomba NorA pelas cepas testadas.

A inibição da bomba de efluxo foi testada usando uma concentração sub-inibitória (CIM/8) dos IBEs e do D-dihidrocarvona. Nos testes, 160 µL de cada inóculo bacteriano suspenso em solução salina, correspondente a 0,5 da escala de McFarland, foram adicionados juntamente com IBEs e o D-dihidrocarvona (CIM/8), e completados com BHI. Estes foram então transferidos para placas de microdiluição de 96 poços, aos quais foram adicionados 100 µL do antibiótico ou do BrEt em diluições seriadas (1:1) que variaram de 512 a 0,25 µg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e o crescimento bacteriano foi avaliado pelo uso da resazurina (7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one). Também foram preparados dois controles de modulação, utilizando apenas o antibiótico norfloxacin e o BrEt.

2.4 Ensaio de toxicidade em modelo de *Drosophila melanogaster*

2.4.1 Criação e estoque

As moscas da estirpe de Harwich foram obtidas do National Species Stock Center, Bowling Green, OH e criadas de acordo com a metodologia de Cunha *et al.* (2015), sendo acondicionadas em recipientes de vidro de 340 mL e cultivadas em um meio a base de 83 % de massa de milho, 4 % de açúcar, 4 % de leite liofilizado, 4 % de farelo de soja, 4 % de farelo de trigo e 1 % de sal. Após o preparo da mistura foi adicionado 1 g de Nipagin (Metilparabeno) e 1 mL de solução contendo *Saccharomyces cerevisiae*, após resfriamento. As moscas foram mantidas na estufa BOD a 25 °C e a 60 % de umidade relativa do ar.

2.4.2 Preparação dos ensaios

De acordo com Cunha *et al.*, (2015), foram colocadas 20 moscas adultas de ambos os sexos, em cada recipiente. No fundo de cada recipiente havia papel toalha embebido em 1 mL de sacarose a 20 % em água destilada. Os recipientes usados como controle receberam apenas a sacarose, os demais, além de sacarose no fundo dos recipientes, receberam em um papel filtro colado nas tampas, diferentes volumes do terpeno D-dihidrocarvona, a saber, 5, 10 e 20 μ L. Tendo sua ação pelo método de fumigação.

2.4.3 Ensaio de geotaxia negativa e de mortalidade

O ensaio de geotaxia negativa proposto por Coulom e Birman (2004) foi utilizado na detecção dos danos ao aparelho locomotor de *D. melanogaster*, após serem submetidas aos volumes do terpeno D-dihidrocarvona. Com leves batidas nos frascos, as moscas foram conduzidas para o fundo dos mesmos e após 1 minuto foi quantificado o total de moscas que atingiu 5 cm de altura. Repetindo-se esse mesmo procedimento após 1 minuto. Na avaliação da mortalidade foi observada a quantidade de moscas mortas após exposição ao terpeno. Para ambos ensaios foram usados os mesmos volumes do terpeno D-dihidrocarvona e observados os mesmos tempos, de 3, 6, 9, 12, 24, 36 e 48 horas.

2.5 Análise Estatística

Os ensaios antibacterianos foram realizados em sextuplicatas e os resultados foram expressos como a média das repetições. Os resultados dos testes foram expressos como a média geométrica. A análise de hipótese estatística será aplicada usando *Two-Way ANOVA*, seguido do teste *post hoc de Bonferroni*, usando o *software GraphPad Prism*. Para a análise dos dados de toxicidade foi feito um teste *ANOVA* de duas vias, e em seguida foi realizado um teste de múltipla comparação de *Tukey*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio microbiológicos

3.1.1 Avaliação da atividade direta pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

No ensaio de avaliação da atividade direta, foi observado que o terpeno D-dihidrocarvona apresentou uma CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ contra as cepas testadas SA-1199 (selvagem) e SA-1199B (NorA). Esse valor não é considerado clinicamente relevante se comparado ao valor da CIM do antibiótico norfloxacina.

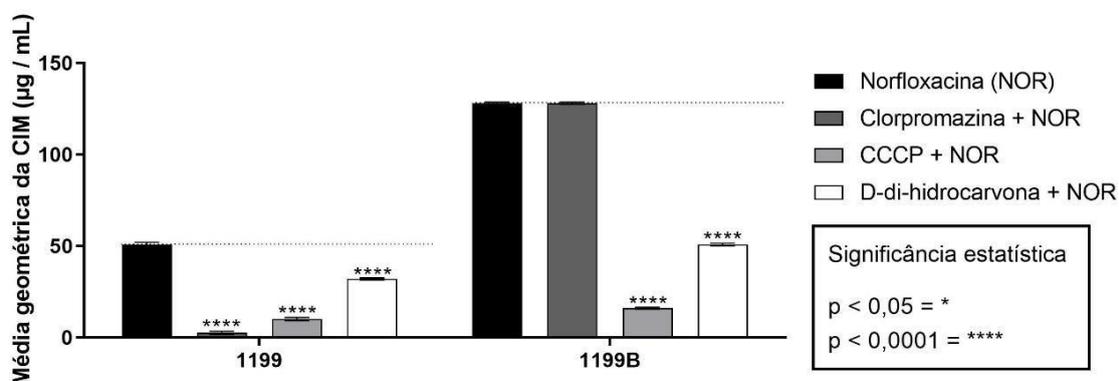
Óleos essenciais são usados há séculos por sua atividade antimicrobiana como métodos alternativos em terapias naturais (BADAWY; ABDELGALEIL, 2014). Sabe-se que essa atividade está relacionada aos diferentes constituintes encontrados nesses óleos como D-dihidrocarvona e outros componentes (PATIL; JAYAPRAKASHA; MURTHY, 2017). Entretanto, nossos resultados demonstraram que o D-dihidrocarvona não apresenta atividade intrínseca frente às cepas de *S. aureus* portadoras da bomba de efluxo NorA, contudo essa característica torna-se promissora visto que possíveis candidatos a futuros Inibidores de Bomba de Efluxo (IBE) devem apresentar pouca atividade antibiótica ou serem totalmente desprovidos da mesma (LAMUT *et al.*, 2019).

3.1.2 Avaliação da inibição da bomba de efluxo por redução da CIM do antibiótico

Com relação à modificação da CIM do antibiótico, foi verificado que o D-dihidrocarvona reduziu a CIM da Norfloxacina de $50,79 \mu\text{g/mL}$ para $32 \mu\text{g/mL}$ contra a

SA-1199. Já para a cepa SA-1199B, a redução da CIM da norfloxacinina foi de 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para 50,79 (Figura 1).

Figura 1. Efeito de inibição de bomba de efluxo por redução da CIM do antibiótico norfloxacinina pelo D-dihidrocarvona em cepas portadoras de bombas de efluxo.



Legenda: NOR: controle Norfloxacinina; CCCP: *Carbonyl Cyanidem Chlorophenylhydrazone* (inibidor padrão). Os valores representam a média geométrica \pm E.P.M. (erro padrão da média). Utilizou-se ANOVA de duas vias, seguido do *post hoc de Bonferroni*: $p < 0.0001$

A diminuição da CIM do antibiótico em até três vezes, em relação ao controle, é indicativo de inibição da bomba de efluxo (TINTINO, 2020). Estudos avaliando o efeito da associação do D-dihidrocarvona com antibióticos de uso comum contra cepas portadoras do mecanismo de efluxo ativo ainda não foram descritos pela literatura. Entretanto, a importância do uso de compostos terpênicos oxigenados como alternativas terapêuticas para potencializar a eficácia da norfloxacinina para a cepa SA-1199B, foi observada por Coêlho *et al.* (2016), onde avaliaram a atividade associada do antibiótico norfloxacinina com os terpenos oxigenados em CIM/8, Nerol, 3,7-Dimetil-1-Octanol e Estragol, os quais reduziram de forma concentração-dependente a CIM da Norfloxacinina de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente para a cepa SA-1199B.

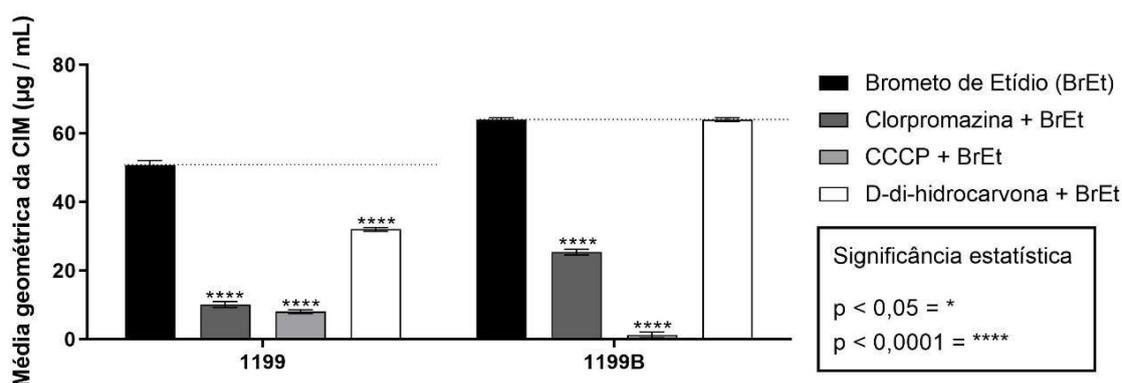
Conjuntamente, Da Cruz *et al.* (2020) observavam em seu trabalho que o terpeno oxigenado α -bisabolol em combinação com a norfloxacinina reduziu a CIM da mesma de 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para a cepa SA-1199B mostrando atividade sinérgica significativa. No mesmo trabalho, foi verificado suposto sinergismo na associação do α -bisabolol com o antibiótico tetraciclina, promovendo a redução da CIM de 192 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra a cepa SA-IS-58 que expressa a bomba de efluxo TetK. Uma moderada redução da CIM da Tetraciclina foi observada nessa cepa, no trabalho de Silveira *et al.* (2020), na associação com o terpeno oxigenado Timol, em concentração subinibitória CIM/8, ocasionando um leve decréscimo da CIM de 114 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para 101 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Estudos anteriores afirmam que terpenos oxigenados, exibem melhor atividade antibacteriana que outros grupos terpênicos, visto que podem ocasionar o rompimento da membrana, interagindo com componentes intracelulares, facilitando a penetração de antibióticos em combinação com os mesmos ao interior da célula e, portanto, quando associado a antibióticos, os terpenos podem ter sua ação não somente na bomba (GUIMARÃES *et al.*, 2019). Estes achados sugerem que o dano causado nas bactérias pelo composto do presente estudo, pode estar ligado à perda da integridade ou alteração da função da membrana celular ocasionada pela interação com terpenos oxigenados.

3.1.3 Avaliação da inibição da bomba de efluxo por redução da CIM do brometo de etídio

Para avaliar a inibição da bomba de efluxo NorA foram realizados ensaios utilizando o Brometo de Etídio (BrEt) em associação com inibidores padrões de bomba. Por meio desses ensaios foi observado que o D-dihidrocarvona modificou a CIM do BrEt de 50,7968 para 32 µg/mL frente a cepa SA-1199. Com relação a cepa 1199B o D-dihidrocarvona não modificou a CIM do BrEt com CIM de 64 µg/mL, não diferindo estatisticamente do controle (Figura 2).

Figura 2: Efeito de inibição de bomba de efluxo por redução da CIM do Brometo de Etídio (BrEt) pelo D-dihidrocarvona em cepas portadoras de bombas de efluxo.



Legenda: CCCP: *Carbonyl Cyanidem-Chlorophenylhydrazone* (inibidor padrão). Os valores representam a média geométrica ± E.P.M. (erro padrão da média). Utilizou-se ANOVA de duas vias, seguido do *post hoc de Bonferroni*: $p < 0.0001$

É conhecido que o brometo de etídio é um agente capaz de interpor-se ao DNA da bactéria e como consequência promover a morte celular, mecanismos como proteínas de efluxo são ativados expelindo o BrEt do meio intracelular bacteriano. Processo semelhante também ocorre com antibióticos (BANERJEE *et al.*, 2014). A cepa SA-1199 (selvagem), expressa a proteína NorA em níveis mais baixos, visto que se origina de um gene cromossômico que ocorre naturalmente no genoma de *S. aureus* promovendo baixa resistência a substratos como o BrEt, já a cepa SA-1199B, super expressa a proteína NorA de forma constitutiva, proporcionando maior resistência a este composto (KAATZ; SEO, 1995).

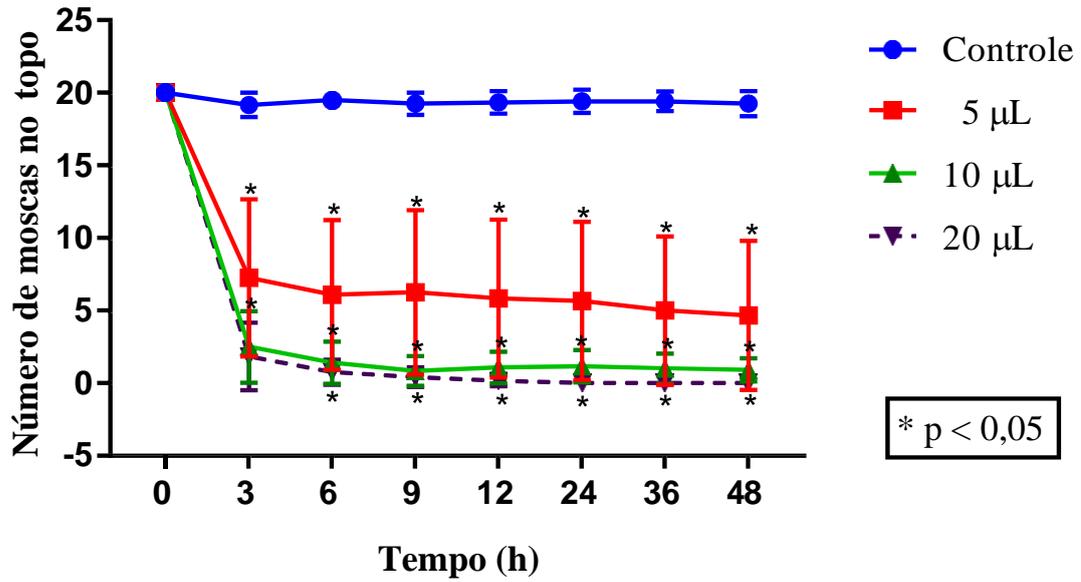
Nos resultados do presente estudo, foi observado uma suposta interação coadjuvante na associação do D-dihidrocarvona com o BrEt para a cepa SA-1199 (selvagem), entretanto nenhuma interação foi observada para a cepa SA-1199B, sugerindo que este terpeno não atua contra o mecanismo de efluxo NorA expresso por esta cepa, resultado semelhante foi observado por Silveira *et al.* (2020), na associação do BrEt com os terpenos oxigenados timol e carvacrol em concentração subinibitória CIM/8 para a cepa de *S.aureus* IS-58, onde não foi verificada a modificação da CIM do BrEt .

Portanto, é possível que o mesmo possa atuar frente a outros mecanismos de resistência como, mudança no alvo do fármaco, inativação enzimática de antibióticos, redução da permeabilidade da membrana e inclusive sobre outros mecanismos de efluxo ativo (KHAMENEH *et al.*, 2016), o que pode ser observado pela redução da CIM do antibiótico norfloxacina na associação com D-dihidrocarvona (figura 1).

3.2 Ensaio de toxicidade em modelo de *Drosophila melanogaster*

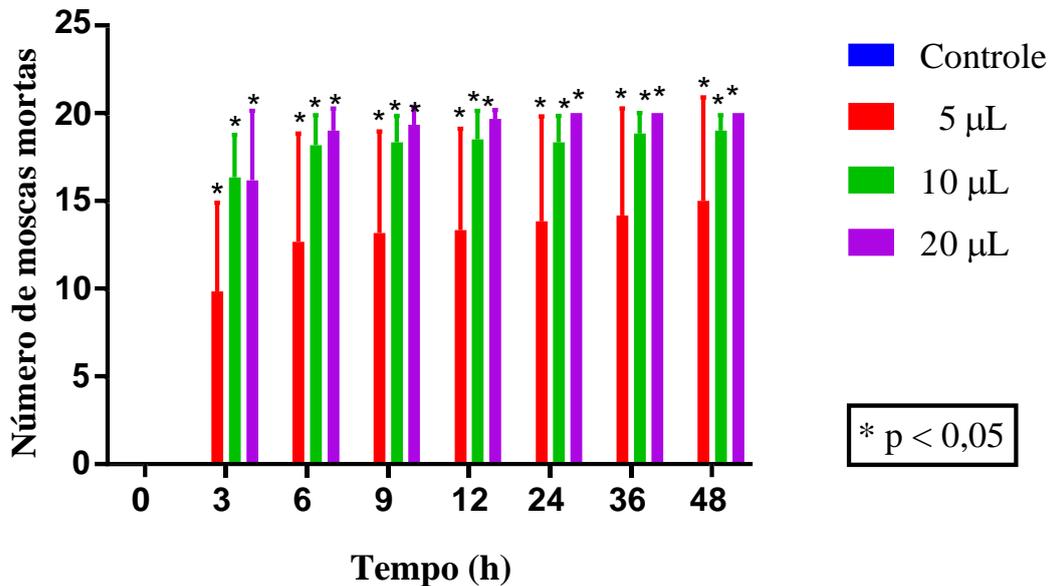
O terpeno D-dihidrocarvona apresentou uma EC₅₀ de 6,87 µL em três horas de exposição. O ensaio de geotaxia negativa apresentado na figura 3, mostrou um possível dano ao aparelho locomotor (dificuldade das moscas de chegarem até o topo do frasco) a partir de 3 horas de exposição ao D-dihidrocarvona em todos os volumes testados. Sendo esse efeito mais forte nos volumes de 10 e 20 µL, onde a partir da terceira hora de exposição ao terpeno, um n < 5 moscas chegou até o topo dos recipientes, tendo um efeito volume-dependente.

Figura 3. Avaliação da toxicidade por geotaxia negativa em modelo de *D. melanogaster*



Como é possível observar na figura 4, o D-dihidrocarvona apresentou um efeito tóxico capaz de causar a morte de *D. melanogaster* em todos os volumes, a partir de 3 horas de exposição. Sendo esse efeito potencializado nos volumes de 10 e 20 µL, onde a taxa de mortalidade foi de $n > 15$ moscas, já a partir de três horas de exposição.

Figura 4. Avaliação da mortalidade de *D. melanogaster* pela exposição ao D-dihidrocarvona



Não há relatos anteriores de estudos que evidenciem a toxicidade do terpeno D-dihidrocarvona para *D. melanogaster*. De forma inédita, o presente trabalho testou a sua toxicidade para esse artrópode, pelo método de fumigação. Pelo mesmo método e utilizando o mesmo artrópode modelo, Zhang *et al.* (2016) testaram a toxicidade de 40 terpenos, ressaltando que os monoterpenos oxigenados eugenol, timol, carvacrol e isoeugenol apresentaram toxicidade alta para o artrópode supracitado. Tais achados corroboram com o presente trabalho, uma vez que o D-dihidrocarvona é um terpeno oxigenado.

No trabalho de Xie e colaboradores (2014) foi mostrado por fumigação, que o terpeno oxigenado carvacrol, teve toxicidade significativa para *R. chinensis*. Testou-se a toxicidade de 42 terpenos para *M. domestica*, concluindo-se que, entre os fenóis, o timol e carvacrol apresentaram as maiores toxicidades com LC₅₀ de 1,60 e 1,69 µl/L, respectivamente. Já entre os compostos cetônicos, os melhores efeitos de toxicidade em 24 horas foram mostrados por (+) - pulegona, (-) - mentona e (-) - carvona, com as respectivas LC₅₀ de 0,26, 1,73 e 1,76 µl/L (ZHANG *et al.*, 2017).

Em estudo anterior, o óleo essencial de *Eugenia uniflora* mostrou-se tóxico para *D. melanogaster*, sugerindo que seu efeito biocida pode estar associado à presença de compostos terpênicos (DA CUNHA *et al.*, 2015). Já o grupo de pesquisa do atual estudo demonstrou que o terpeno Terpinoleno nos volumes de 5 µL e 10 µL foi tóxico para a mosca da fruta, causando danos à locomoção e morte, já nas primeiras horas de exposição (SCHERF *et al.*, 2020).

4. CONCLUSÃO

O D-dihidrocarvona não apresentou atividade intrínseca contra as cepas SA-1199 (selvagem) e SA-1199B. Já associado à Norfloxacina, potencializou a eficácia da mesma por redução da CIM frente às duas linhagens de *S.aureus*.

Apresentou um suposto sinergismo na associação com o BrEt, apenas para a cepa SA-1199 (selvagem), presumindo-se que o DDHC não seja efetivo contra o mecanismo de efluxo NorA expresso pela cepa SA-1199B. É possível que o mesmo possa atuar frente a outros mecanismos de resistência para ambas linhagens.

Além disso, o terpeno mostrou-se tóxico para *D. melanogaster*, pois alterou sua locomoção e teve efeito letal em todos os volumes ensaiados, já a partir de três horas de exposição. Todavia, serão necessários novos estudos para elucidar os mecanismos de ação em relação aos efeitos antibacterianos e toxicológicos do DDHC.

AGRADECIMENTOS

Aos Laboratório de Bioprospecção do Semiárido e Métodos Alternativos (LABSEMA) e Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM).

FINANCIAMENTO

Projeto BPI 03/2018 (Número: BP3-0139-00077.01.00/18)

Bolsa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico (FUNCAP)

CONFLITOS DE INTERESSES: Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

REFERÊNCIAS

- ALCALDE-RICO, M. *et al.* Multidrug efflux pumps at the crossroad between antibiotic resistance and bacterial virulence. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1483, 2016.
- ANDERSEN, J. L. *et al.* Multidrug efflux pumps from Enterobacteriaceae, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens. **International journal of environmental research and public health**, v. 12, n. 2, p. 1487-1547, 2015.
- ANDRADE, L. M. S. *et al.* Antimicrobial activity and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by extract and isolated compounds from *Arrabidaea brachypoda*. **Microbial Pathogenesis**, v. 140, p. 103935, 2020.
- AUDA, I. G.; SALMAN, I. M. A.; ODAH, J. G. Efflux pumps of Gram-negative bacteria in brief. **Gene Reports**, p. 100666, 2020.
- BADAWY, M. E. I.; ABDELGALEIL, S. A. M. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 776–782, 2014.
- BAMBEKE, F. V.; BALZI, E.; TULKENS, P. M. Antibiotic efflux pumps. **Biochemical pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 457-470, 2000.
- BANERJEE, A. *et al.* The DNA intercalators ethidium bromide and propidium iodide also bind to core histones. **FEBS Open Bio**, v. 4, n. 1, p. 251–259, 1 jan. 2014.
- BHASKAR, B. V. *et al.* Homology modeling, molecular dynamics, and virtual screening of NorA efflux pump inhibitors of *Staphylococcus aureus*. **Drug design, development and therapy**, v.10, p. 3237, 2016.
- BHARDWAJ, K. A.; MOHANTY, P. Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: rejuvenating the antimicrobial chemotherapy. **Recent patents on antiinfective drug discovery**, 7, 73-89, 2012.
- BROWN, A. R. *et al.* A mass spectrometry-based assay for improved quantitative measurements of efflux pump inhibition. **PLoS One**, v. 10, n. 5, 2015.

Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia. Resumo do composto PubChem para CID 22227, (+) - Dihidrocarvona. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dihydrocarvone>. Acessado em 2 de dezembro de 2020.

CHO, K. S. *et al.* Terpenes from forests and human health. **Toxicological research**, v. 33, n. 2, p. 97-106, 2017.

COÊLHO, M. L. *et al.* Inhibition of the NorA multi-drug transporter by oxygenated monoterpenes. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 173–177, out. 2016.

COSTA, L. M. *et al.* Inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by synthetic riparins. **Journal of applied microbiology**, v.121, n.5, p. 1312-1322, 2016.

COSTA, S. S. *et al.* Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update. **The open microbiology journal**, v. 7, p. 59, 2013.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 12(4), p. 564-582, 1999.

DA CRUZ, R. P. *et al.* Effect of α -bisabolol and its β -cyclodextrin complex as TetK and NorA efflux pump inhibitors in *Staphylococcus aureus* strains. **Antibiotics**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2020.

DA CUNHA, F. A. B. *et al.* The essential oil of *Eugenia uniflora* leaves induces toxicity in *Drosophila melanogaster*: involvement of oxidative stress mechanisms. **Toxicology Research**, v. 4, n. 3, p. 634-644, 2015.

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

DOS SANTOS, J. F. S. *et al.* In vitro e in silico evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v.57, p. 22–28, 2018.

DUBEY, V. S.; BHALLA, R.; LUTHRA, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Journal of biosciences**, v. 28, n. 5, p. 637-646, 2003.

GALLEGOS-FLORES, P. I. *et al.* Antibacterial activity of five terpenoid compounds: Carvacrol, Limonene, Linalool, α -terpinene and Thymol. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 22, n. 2, 2019.

GALLUCCI, M. N. *et al.* Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Flavour and fragrance journal**, v. 24, n. 6, p. 348-354, 2009.

GAO, Lin *et al.* Effect of ethylparaben on the growth and development of *Drosophila melanogaster* on preadult. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 80, p. 103495, 2020.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca (biología)**, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GIBBONS, S. Phytochemicals for Bacterial Resistance – Strengths, Weaknesses and Opportunities, **Planta Med**, n. 74, p. 594 - 602, 2008.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cell membranes by vegetable oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v.108 (1): 1-9, 2006.

GONZÁLEZ-BELLO, C. Antibiotic adjuvants—A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 27, n. 18, p. 4221-4228, 2017.

GUIMARÃES, A. C. *et al.* Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 1-12, 2019.

HAMMER, B. *et al.* In utero exposure to cigarette smoke and effects over generations: an animal conference on asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 48, n. 11, pág. 1378-1390, 2018.

HASSANZADEH, S. *et al.* Epidemiology of efflux pumps genes mediating resistance among *Staphylococcus aureus*; a systematic review. **Microbial pathogenesis**, v. 139, p. 103850, 2020.

HENNEKINNE, J. A.; BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 4, p. 815-836, 2012.

HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Opinião atual em microbiologia**, v. 51, p. 72-80, 2019.

JEIBMANN, A.; PAULUS, W. *Drosophila melanogaster* as a model organism of brain diseases. **Jornal internacional de ciências moleculares**, v. 10, n. 2, pág. 407-440, 2009.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M. Inducible NorA-Mediated Multidrug Resistance in *Staphylococcus aureus*. v. 39, n. 12, p. 2650–2655, 1995.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Discovery of natural products: past, present and future. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 2-3, pág. 155-176, 2016.

KABRA, Ritika *et al.* Efflux pumps and antimicrobial resistance: Paradoxical components in systems genomics. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 141, p. 15-24, 2019.

KHAMENEH, B. *et al.* Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. **Microbial Pathogenesis**, v. 95, p. 32–42, 2016.

KONEMAN, E. Diagnóstico microbiológico. 5. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2001.

KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 10, p. 1486-1513, 2005.

LAMUT, A. *et al.* Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria. **Medicinal research reviews**, v. 39, n. 6, p. 2460-2504, 2019.

LAMBERT, R. J. W. *et al.* A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of the essential oil of oregano, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91 (3), p. 453-62, 2001.

LEE, A. S. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature reviews Disease primers**, v. 4, n. 1, p. 1-23, 2018.

LEROY, S. *et al.* Interaction in dual species biofilms between *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, p. 108653,

2020.

LIU, Y. *et al.* Molecules that Inhibit Bacterial Resistance Enzymes. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 43, 2019.

MAHMOUDI, H. *et al.* Biofilm formation and antibiotic resistance in meticillin-resistant and meticillin-sensitive *Staphylococcus aureus* isolated from burns. **Journal of wound care**, v. 28, n. 2, p. 66-73, 2019.

MONSERRAT-MARTINEZ, A.; GAMBIN, Y.; SIERECKI, E. Thinking outside the bug: molecular targets and strategies to overcome antibiotic resistance. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 6, p. 1255, 2019.

MORRIS, S.; CERCEO, E. Trends, Epidemiology, and Management of Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacterial Infections in the Hospitalized Setting. **Antibiotics**, v. 9, n. 4, p. 196, 2020.

NEVES, P. P. **Estudo da composição os produtos da reação de Baeyer-Villiger da Carvona**. Dissertação (Mestrado em Química Industrial) - Universidade da Beira Interior, Covilhã, p. 92. 2012.

OLIVEIRA, D. M. *et al.* Antimicrobial Resistance in ESKAPE. **Pathogens. Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, 2020.

OLIVEIRA, E. R. **Síntese de octalonas homoquirais a partir da (-) -carvona: uma abordagem sintética para a preparação enantiosseletiva de Eudesmanos**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 178. 1993.

OLIVEIRA, M. M. *et al.* Spectroscopic characterization and efflux pump modulation of a thiophene curcumin derivative. **Journal of Molecular Structure, Journal of Molecular Structure**, p. 128-291, 2020.

PADMAHARISH, V.; LAKSHMI, T. Anticancer Activities of Medicinal Plants—An Update. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 9, n. 4, p. 432, 2017.

PARIKH, R.; KUMAR, L. Oral care capsules. U.S. **Patent Application**, n. 10/406,851, 2004.

PARRINO, B. *et al.* Inhibitors of antibiotic resistance mechanisms: clinical applications and future perspectives, v. 12, n. 5, p. 357–359, 2019.

PATIL, J. R. *et al.* Apoptosis-mediated proliferation inhibition of human colon cancer cells by volatile principles of *Citrus aurantifolia*. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1351-1358, 2009.

PATIL, B. S.; JAYAPRAKASHA, G. K.; MURTHY, K. N. C. Beyond vitamin C: the diverse, complex health-promoting properties of citrus fruits. **Citrus Research & Technology**, v. 38, n. 1, 2017.

PIDDOCK, L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 2, p. 382–402, 2006.

PIDDOCK L. J. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. **Nature reviews. Microbiology**, 4(8), p. 629–636, 2006.

POOLE, K. Bacterial multidrug efflux pumps serve other functions. **Microbe-American Society for Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 179, 2008.

RAJABI, S. *et al.* Evaluation of multidrug efflux pump expression in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Gene Reports**, v. 18, p. 100-537, 2020.

SCHERF, J. R. *et al.* Effect of terpinolene against the resistant *Staphylococcus aureus* strain, carrier of the efflux pump QacC and β -lactamase gene, and its toxicity in the *Drosophila melanogaster* model. **Microbial Pathogenesis**, Volume 149, p. 1-6, 2020.

SCHINDLER, B. D. *et al.* Analyses of multidrug efflux pump-like proteins encoded on the *Staphylococcus aureus* chromosome. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 747-748, 2015.

SCHINDLER, B. D.; KAATZ, G. W. Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. **Drug Resistance Updates**, v. 27, p. 1-13, 2016.

SELLI, S.; CABAROGLU, T.; CANBAS, A. Volatile flavour components of orange juice obtained from the cv. Kozan of Turkey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, n. 6, p. 789-796, 2004.

SHAHRAZ, F. *et al.* Analysis of antibiotic resistance patterns and detection of *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* isolated from packaged hamburger. **Meat Sci**, v.90, n.3, p.759-63, 2012.

- SHARMA, A. *et al.* Organochlorine pesticide, endosulfan induced cellular and organismal response in *Drosophila melanogaster*, **Journal of Hazardous Materials**, V. 221–222, 2012.
- SILVA, H. C. *et al.* Structural characterization, antibacterial activity and NorA efflux pump inhibition of flavonoid fisetinidol. **South African Journal of Botany**, v. 132, p. 140-145, 2020.
- SILVEIRA, Z. S. DE *et al.* Evaluation of the Antibacterial Activity and Efflux Pump Reversal of Thymol and Carvacrol against *Staphylococcus aureus* and Their Toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 9, p. 2103, 2020.
- TAMFU, A. N. *et al.* Antibiofilm, anti-quorum sensing and antioxidant activity of secondary metabolites from seeds of *Annona senegalensis*, Persoon. **Microbial Pathogenesis**, p. 104191, 2020.
- TANG, H. *et al.* Triterpenoid acids isolated from *Schinus terebinthifolia* fruits reduce *Staphylococcus aureus* virulence and abate dermonecrosis. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.
- TENCONI, E.; RIGALI, S. Self-resistance mechanisms to DNA-damaging antitumor antibiotics in actinobacteria. **Current opinion in microbiology**, v. 45, p. 100-108, 2018.
- THAI, K. M. *et al.* Virtual screening for novel *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors from natural products. **Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 135-155, 2015.
- TINTINO, Saulo R. *et al.* Effect of vitamin K3 on the inhibition of the NorA efflux pump function and its gene expression in *Staphylococcus aureus*. **Membranes**, v. 10, n. 6, p. 130, 2020.
- TINTINO, S. R. *et al.* Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 97, p. 9-13, 2016.
- TSAI, H. C. *et al.* Multidrug-resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from a subtropical river contaminated by nearby livestock industries. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 200, p. 110724, 2020.
- VERAS, H. N. H. *et al.* Enhancement of aminoglycosides and β -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S2790-S2795, 2017.

WALANA, W. *et al.* *Staphylococcus aureus* nasal carriage among healthcare workers, inpatients and caretakers in the Tamale Teaching Hospital, Ghana. **Scientific African**, v. 8, p. 325, 2020.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 775-781, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017. http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1. Accessed 2 Junho 2020.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 10, p. 1451-1470, 2005.

YILMAZ, E. S.; ASLANTAŞ, Özkan. Antimicrobial resistance and underlying mechanisms in *Staphylococcus aureus* isolates. **Asian Pacific journal of tropical zmedicine**, v. 10, n. 11, p. 1059-1064, 2017.

YOSHIDA, H. M. S. K. M. *et al.* Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* NorA gene, which confers resistance to quinolones. **Journal of bacteriology**, v. 172, n. 12, p. 6942-6949, 1990.

ZHANG, Z. *et al.* Fumigant toxicity of monoterpenes against fruit fly, *Drosophila melanogaster*. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 147-151, 2016.

ZHANG, Z. *et al.* Toxicities of monoterpenes against housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 31, p. 24708-24713, 2017.

ZIANI, B. E. *et al.* C. Phenolic profiling, biological activities and in silico studies of *Acacia tortilis* (Forssk.) Hayne ssp. raddiana extracts. **Food Bioscience**, p. 100616, 2020.

4.2 Ensaio microbiológicos

4.2.1 Avaliação da atividade direta pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

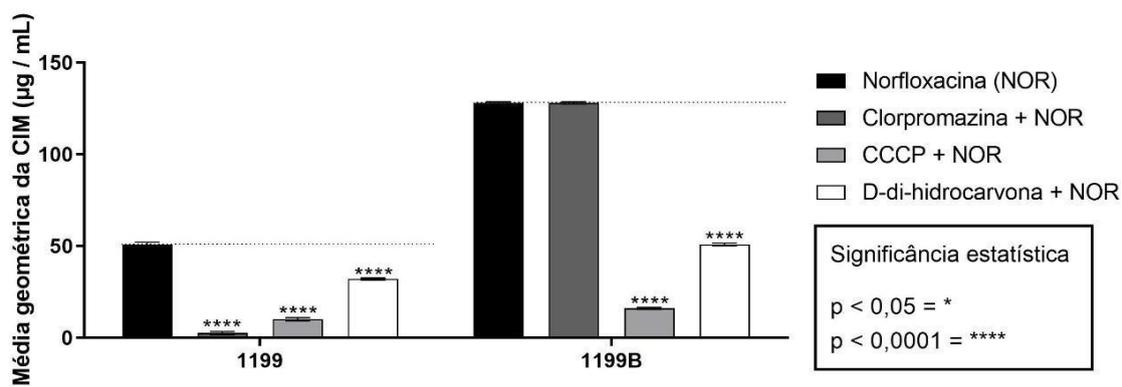
No ensaio de avaliação da atividade direta, foi observado que o terpeno D-dihidrocarvona apresentou uma CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ contra as cepas testadas SA-1199 (selvagem) e SA-1199B (NorA). Esse valor não é considerado clinicamente relevante se comparado ao valor da CIM do antibiótico Norfloxacin.

Óleos essenciais são usados há séculos por sua atividade antimicrobiana como métodos alternativos em terapias naturais (BADAWY; ABDELGALEIL, 2014). Sabe-se que essa atividade está relacionada aos diferentes constituintes encontrados nesses óleos como D-dihidrocarvona e outros componentes (PATIL; JAYAPRAKASHA; MURTHY, 2017). Entretanto, nossos resultados demonstraram que o D-dihidrocarvona não apresenta atividade intrínseca frente às cepas de *S. aureus* portadoras da bomba de efluxo NorA, contudo essa característica torna-se promissora visto que possíveis candidatos a futuros Inibidores de Bomba de Efluxo (IBE) devem apresentar pouca atividade antibiótica ou serem totalmente desprovidos da mesma (LAMUT *et al.*, 2019).

4.2.2 Avaliação da inibição da bomba de efluxo por redução da CIM do antibiótico

Com relação à modificação da CIM do antibiótico, foi verificado que o D-dihidrocarvona reduziu a CIM da Norfloxacin de $50,79 \mu\text{g/mL}$ para $32 \mu\text{g/mL}$ contra a SA-1199. Já para a cepa SA-1199B, a redução da CIM da Norfloxacin foi de $128 \mu\text{g/mL}$ para $50,79$ (Figura 4).

Figura 4. Efeito de inibição de bomba de efluxo por redução da CIM do antibiótico Norfloxacina pelo D-dihidrocarvona em cepas portadoras de bombas de efluxo.



Legenda: NOR: controle Norfloxacina; CCCP: *Carbonyl Cyanidem Chlorophenylhydrazone* (inibidor padrão). Os valores representam a média geométrica \pm E.P.M. (erro padrão da média). Utilizou-se ANOVA de duas vias, seguido do *post hoc de Bonferroni*: $p < 0.0001$

Estudos avaliando o efeito da associação do D-dihidrocarvona com antibióticos de uso comum contra cepas portadoras do mecanismo de efluxo ativo ainda não foram descritos pela literatura, entretanto a importância do uso de compostos terpênicos oxigenados como alternativas terapêuticas para potencializar a eficácia da norfloxacina para a cepa SA-1199B, foi observada por Coêlho *et al.* (2016), que avaliaram a atividade associada do antibiótico norfloxacina com os terpenos oxigenados em CIM/8, Nerol, 3,7-Dimetil-1-Octanol e Estragol, os quais reduziram de forma concentração-dependente a CIM da Norfloxacina de 64 $\mu\text{g/mL}$ para 4 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$ e 40 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente para a cepa SA-1199B.

Conjuntamente, Da Cruz *et al.* (2020) observavam em seu trabalho que o terpeno oxigenado α -bisabolol em combinação com a norfloxacina reduziu a CIM da mesma de 256 $\mu\text{g/mL}$ para 32 $\mu\text{g/mL}$, para a cepa SA-1199B mostrando atividade sinérgica significativa. No mesmo trabalho, foi verificado suposto sinergismo na associação do α -bisabolol com o antibiótico tetraciclina, promovendo a redução da CIM de 192 $\mu\text{g/mL}$ para 128 $\mu\text{g/mL}$ contra a cepa SA-IS-58 que expressa a bomba de efluxo TetK. Uma moderada redução da CIM da tetraciclina também foi observada nesta cepa pelo grupo de pesquisa do presente trabalho em Silveira *et al.* (2020), na associação com o terpeno oxigenado Timol em concentração subinibitória CIM/8, ocasionando um leve decréscimo da CIM de 114 $\mu\text{g/mL}$ para 101 $\mu\text{g/mL}$.

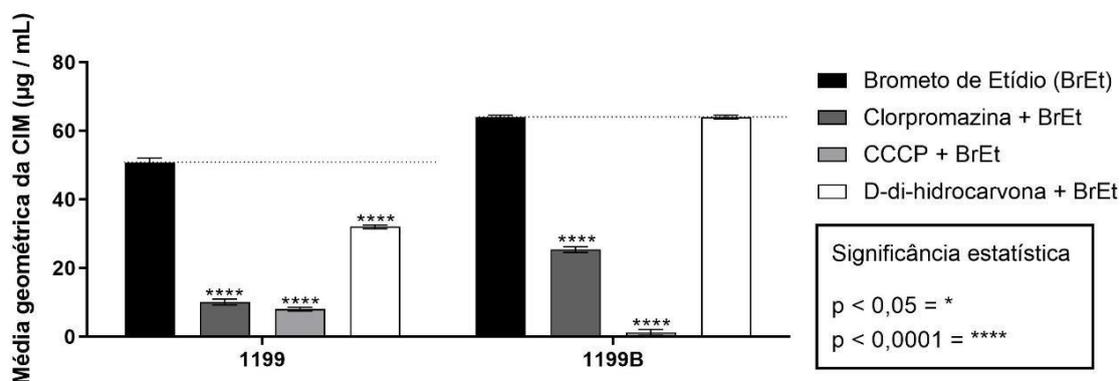
Estudos anteriores afirmam que terpenos oxigenados, exibem melhor atividade antibacteriana que outros grupos terpênicos, visto que podem ocasionar o rompimento da membrana, interagindo com componentes intracelulares, facilitando a penetração de antibióticos em combinação com os mesmos ao interior da célula e, portanto, quando

associado a antibióticos, os terpenos podem ter sua ação não somente na bomba (GUIMARÃES *et al.*, 2019). Estes achados sugerem que o dano causado nas bactérias pelo composto do presente estudo, pode estar ligado à perda da integridade ou alteração da função da membrana celular ocasionada pela interação com terpenos oxigenados.

4.2.3 Avaliação da inibição da bomba de efluxo por redução da CIM do brometo de etídio

Para avaliar a inibição da bomba de efluxo NorA foram realizados ensaios utilizando o Brometo de Etídio (BrEt) em associação com inibidores padrões de bomba. Por meio desses ensaios foi observado que o D-dihidrocarvona modificou a CIM do BrEt de 50,7968 para 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente a cepa SA-1199. Com relação a cepa 1199B o D-dihidrocarvona não modificou a CIM do BrEt com CIM de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, não diferindo estatisticamente do controle (Figura 5).

Figura 5: Efeito de inibição de bomba de efluxo por redução da CIM do Brometo de Etídio (BrEt) pelo D-dihidrocarvona em cepas portadoras de bombas de efluxo.



Legenda: CCCP: Carbonyl Cyanidem Chlorophenylhydrazone (inibidor padrão). Os valores representam a média geométrica \pm E.P.M. (erro padrão da média). Utilizou-se ANOVA de duas vias, seguido do *post hoc de Bonferroni*: $p < 0.0001$

É conhecido que o brometo de etídio é um agente capaz de interpor-se ao DNA da bactéria e como consequência promover a morte celular, mecanismos como proteínas de efluxo são ativados expelindo o BrEt do meio intracelular bacteriano. Processo semelhante também ocorre com antibióticos (BANERJEE *et al.*, 2014). A cepa SA-1199 (selvagem), expressa a proteína NorA em níveis mais baixos, visto que se origina de um gene cromossômico que ocorre naturalmente no genoma de *S. aureus* promovendo baixa

resistência a substratos como o BrEt, já a cepa SA-1199B, super expressa a proteína NorA de forma constitutiva, proporcionando maior resistência a este composto (KAATZ; SEO, 1995).

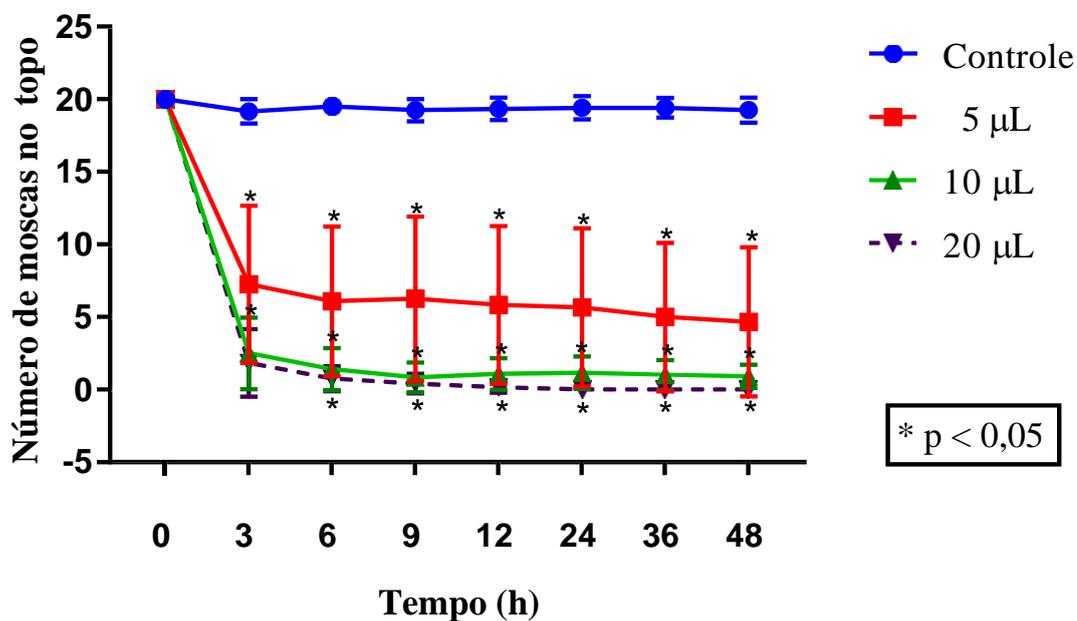
Nos resultados do presente estudo, foi observado uma suposta interação coadjuvante na associação do D-dihidrocarvona com o BrEt para a cepa SA-1199 (selvagem), entretanto nenhuma interação foi observada para a cepa SA-1199B, sugerindo que este terpeno não atua contra o mecanismo de efluxo NorA expresso por esta cepa, resultados semelhantes também foram observados pelo grupo de pesquisa do presente trabalho em Silveira *et al.* (2020), na associação do BrEt com os terpenos oxigenados timol e carvacrol em concentração subinibitória CIM/8 para a cepa de *S. aureus* IS-58, onde não foi verificada a modificação da CIM do BrEt .

Portanto, é possível que o mesmo possa atuar frente a outros mecanismos de resistência como, mudança no alvo do fármaco, inativação enzimática de antibióticos, redução da permeabilidade da membrana e inclusive sobre outros mecanismos de efluxo ativo (KHAMENEH *et al.*, 2016), o que pode ser observado pela redução da CIM do antibiótico norfloxacina na associação com D-dihidrocarvona (figura 4).

4.3 Ensaio de toxicidade em modelo de *Drosophila melanogaster*

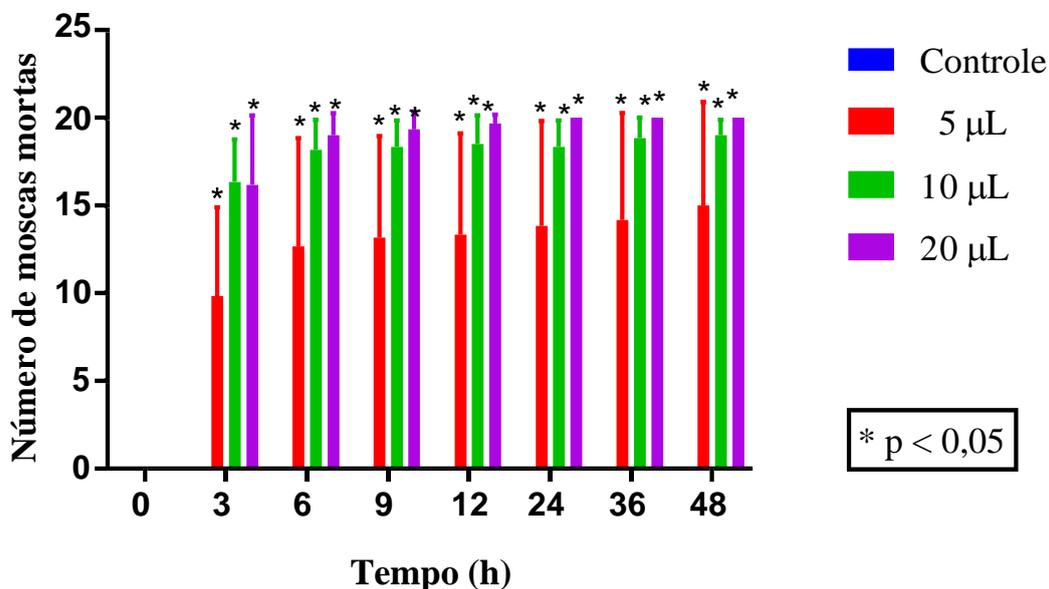
O terpeno D-dihidrocarvona apresentou uma EC₅₀ de 6,87 µL em três horas de exposição. O ensaio de geotaxia negativa apresentado na figura 6, mostrou um possível dano ao aparelho locomotor (dificuldade das moscas de chegarem até o topo do frasco) a partir de 3 horas de exposição ao D-dihidrocarvona em todos os volumes testados. Sendo esse efeito mais forte nos volumes de 10 e 20 µL, onde a partir da terceira hora de exposição ao terpeno, um n < 5 moscas chegou até o topo dos recipientes, tendo um efeito volume-dependente.

Figura 6. Avaliação da toxicidade por geotaxia negativa em modelo de *D. melanogaster*



Como é possível observar na figura 7, O D-dihidrocarvona apresentou um efeito tóxico capaz de causar a morte de *D. melanogaster* em todos os volumes, a partir de 3 horas de exposição. Sendo esse efeito potencializado nos volumes de 10 e 20 µL, onde a taxa de mortalidade foi de $n > 15$ moscas, já a partir de 3 horas de exposição.

Figura 7. Avaliação da mortalidade de *D. melanogaster* pela exposição ao D-dihidrocarvona



Não há relatos anteriores de estudos que evidenciem a toxicidade do terpeno D-dihidrocarvona para *D. melanogaster*. De forma inédita, o presente trabalho testou a sua toxicidade para esse artrópode, pelo método de fumigação. Pelo mesmo método e utilizando o mesmo artrópode modelo, Zhang *et al.* (2016) testaram a toxicidade de 40 terpenos, ressaltando que os monoterpênicos oxigenados eugenol, timol, carvacrol e isoeugenol apresentaram toxicidade alta para o artrópode supracitado. Tais achados corroboram com o presente trabalho, uma vez que o D-dihidrocarvona é um terpeno oxigenado.

No trabalho de Xie e colaboradores (2014) foi mostrado por fumigação que o terpeno oxigenado carvacrol, teve toxicidade significativa para *R. chinensis*. Testou-se a toxicidade de 42 terpenos para *M. domestica*, concluindo-se que, entre os fenóis, o timol e carvacrol apresentaram as maiores toxicidades com LC₅₀ de 1,60 e 1,69 µl/L, respectivamente. Já entre os compostos cetônicos, os melhores efeitos de toxicidade em 24 horas foram mostrados por (+) - pulegona, (-) - mentona e (-) - carvona, com as respectivas LC₅₀ de 0,26, 1,73 e 1,76 µl/L (ZHANG *et al.*, 2017).

Em estudo anterior, o óleo essencial de *Eugenia uniflora* mostrou-se tóxico para *D. melanogaster*, sugerindo que seu efeito biocida pode estar associado à presença de compostos terpênicos (DA CUNHA *et al.*, 2015). Já o grupo de pesquisa do atual estudo demonstrou que o terpeno Terpinoleno nos volumes de 5 µL e 10 µL foi tóxico para a mosca da fruta, causando danos à locomoção e morte, já nas primeiras horas de exposição (SCHERF *et al.*, 2020).

5. CONCLUSÃO

O D-dihidrocarvona não apresentou atividade intrínseca contra a cepa de *S. aureus* SA-1199 (selvagem) e SA-1199B. Entretanto a ausência de atividade antibiótica é uma característica importante de possíveis IBEs. O DDHC expressou suposto sinergismo quando associado à Norfloxacin, potencializando a eficácia da mesma por redução da CIM frente às duas linhagens de *S. aureus*.

Entretanto, na associação com o BrEt o D-dihidrocarvona apresentou suposto sinergismos apenas para a cepa SA-1199 (selvagem), não sendo observado a interação dos compostos para a cepa SA-1199B, presumindo-se que o D-dihidrocarvona não seja efetivo contra o mecanismo de efluxo NorA expresso pela cepa SA-1199B. No entanto é possível que o mesmo possa atuar frente a outros mecanismos de resistência, o que pode ser observado pela redução da CIM do antibiótico Norfloxacin para as duas linhagens.

Além disso, o terpeno mostrou-se tóxico para *D. melanogaster*, pois alterou sua locomoção e teve efeito letal em todos os volumes ensaiados, já a partir de três horas de exposição. Todavia, serão necessários novos estudos para elucidar os mecanismos de ação em relação aos efeitos antibacterianos e toxicológicos do D- dihidrocarvona.

REFERÊNCIAS

- ALCALDE-RICO, M. *et al.* Multidrug efflux pumps at the crossroad between antibiotic resistance and bacterial virulence. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1483, 2016.
- ANDERSEN, J. L. *et al.* Multidrug efflux pumps from Enterobacteriaceae, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens. **International journal of environmental research and public health**, v. 12, n. 2, p. 1487-1547, 2015.
- ANDRADE, L. M. S. *et al.* Antimicrobial activity and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by extract and isolated compounds from *Arrabidaea brachypoda*. **Microbial Pathogenesis**, v. 140, p. 103935, 2020.
- AUDA, I. G.; SALMAN, I. M. A.; ODAH, J. G. Efflux pumps of Gram-negative bacteria in brief. **Gene Reports**, p. 100666, 2020.
- BADAWY, M. E. I.; ABDELGALEIL, S. A. M. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 776–782, 2014.
- BAMBEKE, F. V.; BALZI, E.; TULKENS, P. M. Antibiotic efflux pumps. **Biochemical pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 457-470, 2000.
- BANERJEE, A. *et al.* The DNA intercalators ethidium bromide and propidium iodide also bind to core histones. **FEBS Open Bio**, v. 4, n. 1, p. 251–259, 1 jan. 2014.
- BHASKAR, B. V. *et al.* Homology modeling, molecular dynamics, and virtual screening of NorA efflux pump inhibitors of *Staphylococcus aureus*. **Drug design, development and therapy**, v.10, p. 3237, 2016.
- BHARDWAJ, K. A.; MOHANTY, P. Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: rejuvenating the antimicrobial chemotherapy. **Recent patents on antiinfective drug discovery**, 7, 73-89, 2012.
- BROWN, A. R. *et al.* A mass spectrometry-based assay for improved quantitative measurements of efflux pump inhibition. **PLoS One**, v. 10, n. 5, 2015.

Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia. Resumo do composto PubChem para CID 22227, (+) - Dihidrocarvona. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dihydrocarvone>. Acessado em 2 de dezembro de 2020.

CHO, K. S. *et al.* Terpenes from forests and human health. **Toxicological research**, v. 33, n. 2, p. 97-106, 2017.

COÊLHO, M. L. *et al.* Inhibition of the NorA multi-drug transporter by oxygenated monoterpenes. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 173–177, out. 2016.

COSTA, L. M. *et al.* Inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by synthetic riparins. **Journal of applied microbiology**, v.121, n.5, p. 1312-1322, 2016.

COSTA, S. S. *et al.* Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update. **The open microbiology journal**, v. 7, p. 59, 2013.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 12(4), p. 564-582, 1999.

DA CRUZ, R. P. *et al.* Effect of α -bisabolol and its β -cyclodextrin complex as TetK and NorA efflux pump inhibitors in *Staphylococcus aureus* strains. **Antibiotics**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2020.

DA CUNHA, F. A. B. *et al.* The essential oil of *Eugenia uniflora* leaves induces toxicity in *Drosophila melanogaster*: involvement of oxidative stress mechanisms. **Toxicology Research**, v. 4, n. 3, p. 634-644, 2015.

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

DOS SANTOS, J. F. S. *et al.* In vitro e in silico evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v.57, p. 22–28, 2018.

DUBEY, V. S.; BHALLA, R.; LUTHRA, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Journal of biosciences**, v. 28, n. 5, p. 637-646, 2003.

GALLEGOS-FLORES, P. I. *et al.* Antibacterial activity of five terpenoid compounds: Carvacrol, Limonene, Linalool, α -terpinene and Thymol. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 22, n. 2, 2019.

GALLUCCI, M. N. *et al.* Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Flavour and fragrance journal**, v. 24, n. 6, p. 348-354, 2009.

GAO, Lin *et al.* Effect of ethylparaben on the growth and development of *Drosophila melanogaster* on preadult. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 80, p. 103495, 2020.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca (biología)**, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GIBBONS, S. Phytochemicals for Bacterial Resistance – Strengths, Weaknesses and Opportunities, **Planta Med**, n. 74, p. 594 - 602, 2008.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cell membranes by vegetable oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v.108 (1): 1-9, 2006.

GONZÁLEZ-BELLO, C. Antibiotic adjuvants—A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 27, n. 18, p. 4221-4228, 2017.

GUIMARÃES, A. C. *et al.* Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 1-12, 2019.

HAMMER, B. *et al.* In utero exposure to cigarette smoke and effects over generations: an animal conference on asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 48, n. 11, pág. 1378-1390, 2018.

HASSANZADEH, S. *et al.* Epidemiology of efflux pumps genes mediating resistance among *Staphylococcus aureus*; a systematic review. **Microbial pathogenesis**, v. 139, p. 103850, 2020.

HENNEKINNE, J. A.; BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 4, p. 815-836, 2012.

HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Opinião atual em microbiologia**, v. 51, p. 72-80, 2019.

JEIBMANN, A.; PAULUS, W. *Drosophila melanogaster* as a model organism of brain diseases. **Jornal internacional de ciências moleculares**, v. 10, n. 2, pág. 407-440, 2009.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M. Inducible NorA-Mediated Multidrug Resistance in *Staphylococcus aureus*. v. 39, n. 12, p. 2650–2655, 1995.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Discovery of natural products: past, present and future. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 2-3, pág. 155-176, 2016.

KABRA, Ritika *et al.* Efflux pumps and antimicrobial resistance: Paradoxical components in systems genomics. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 141, p. 15-24, 2019.

KHAMENEH, B. *et al.* Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. **Microbial Pathogenesis**, v. 95, p. 32–42, 2016.

KONEMAN, E. Diagnóstico microbiológico. 5. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2001.

KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 10, p. 1486-1513, 2005.

LAMUT, A. *et al.* Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria. **Medicinal research reviews**, v. 39, n. 6, p. 2460-2504, 2019.

LAMBERT, R. J. W. *et al.* A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of the essential oil of oregano, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91 (3), p. 453-62, 2001.

LEE, A. S. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature reviews Disease primers**, v. 4, n. 1, p. 1-23, 2018.

LEROY, S. *et al.* Interaction in dual species biofilms between *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, p. 108653,

2020.

LIU, Y. *et al.* Molecules that Inhibit Bacterial Resistance Enzymes. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 43, 2019.

MAHMOUDI, H. *et al.* Biofilm formation and antibiotic resistance in meticillin-resistant and meticillin-sensitive *Staphylococcus aureus* isolated from burns. **Journal of wound care**, v. 28, n. 2, p. 66-73, 2019.

MONSERRAT-MARTINEZ, A.; GAMBIN, Y.; SIERECKI, E. Thinking outside the bug: molecular targets and strategies to overcome antibiotic resistance. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 6, p. 1255, 2019.

MORRIS, S.; CERCEO, E. Trends, Epidemiology, and Management of Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacterial Infections in the Hospitalized Setting. **Antibiotics**, v. 9, n. 4, p. 196, 2020.

NEVES, P. P. **Estudo da composição os produtos da reação de Baeyer-Villiger da Carvona**. Dissertação (Mestrado em Química Industrial) - Universidade da Beira Interior, Covilhã, p. 92. 2012.

OLIVEIRA, D. M. *et al.* Antimicrobial Resistance in ESKAPE. **Pathogens. Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, 2020.

OLIVEIRA, E. R. **Síntese de octalonas homoquirais a partir da (-) -carvona: uma abordagem sintética para a preparação enantiosseletiva de Eudesmanos**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 178. 1993.

OLIVEIRA, M. M. *et al.* Spectroscopic characterization and efflux pump modulation of a thiophene curcumin derivative. **Journal of Molecular Structure, Journal of Molecular Structure**, p. 128-291, 2020.

PADMAHARISH, V.; LAKSHMI, T. Anticancer Activities of Medicinal Plants—An Update. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 9, n. 4, p. 432, 2017.

PARIKH, R.; KUMAR, L. Oral care capsules. U.S. **Patent Application**, n. 10/406,851, 2004.

PARRINO, B. *et al.* Inhibitors of antibiotic resistance mechanisms: clinical applications and future perspectives, v. 12, n. 5, p. 357–359, 2019.

PATIL, J. R. *et al.* Apoptosis-mediated proliferation inhibition of human colon cancer cells by volatile principles of *Citrus aurantifolia*. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1351-1358, 2009.

PATIL, B. S.; JAYAPRAKASHA, G. K.; MURTHY, K. N. C. Beyond vitamin C: the diverse, complex health-promoting properties of citrus fruits. **Citrus Research & Technology**, v. 38, n. 1, 2017.

PIDDOCK, L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 2, p. 382–402, 2006.

PIDDOCK L. J. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. **Nature reviews. Microbiology**, 4(8), p. 629–636, 2006.

POOLE, K. Bacterial multidrug efflux pumps serve other functions. **Microbe-American Society for Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 179, 2008.

RAJABI, S. *et al.* Evaluation of multidrug efflux pump expression in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Gene Reports**, v. 18, p. 100-537, 2020.

SCHERF, J. R. *et al.* Effect of terpinolene against the resistant *Staphylococcus aureus* strain, carrier of the efflux pump QacC and β -lactamase gene, and its toxicity in the *Drosophila melanogaster* model. **Microbial Pathogenesis**, Volume 149, p. 1-6, 2020.

SCHINDLER, B. D. *et al.* Analyses of multidrug efflux pump-like proteins encoded on the *Staphylococcus aureus* chromosome. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 747-748, 2015.

SCHINDLER, B. D.; KAATZ, G. W. Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. **Drug Resistance Updates**, v. 27, p. 1-13, 2016.

SELLI, S.; CABAROGLU, T.; CANBAS, A. Volatile flavour components of orange juice obtained from the cv. Kozan of Turkey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, n. 6, p. 789-796, 2004.

SHAHRAZ, F. *et al.* Analysis of antibiotic resistance patterns and detection of *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* isolated from packaged hamburger. **Meat Sci**, v.90, n.3, p.759-63, 2012.

- SHARMA, A. *et al.* Organochlorine pesticide, endosulfan induced cellular and organismal response in *Drosophila melanogaster*, **Journal of Hazardous Materials**, V. 221–222, 2012.
- SILVA, H. C. *et al.* Structural characterization, antibacterial activity and NorA efflux pump inhibition of flavonoid fisetinidol. **South African Journal of Botany**, v. 132, p. 140-145, 2020.
- SILVEIRA, Z. S. DE *et al.* Evaluation of the Antibacterial Activity and Efflux Pump Reversal of Thymol and Carvacrol against *Staphylococcus aureus* and Their Toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 9, p. 2103, 2020.
- TAMFU, A. N. *et al.* Antibiofilm, anti-quorum sensing and antioxidant activity of secondary metabolites from seeds of *Annona senegalensis*, Persoon. **Microbial Pathogenesis**, p. 104191, 2020.
- TANG, H. *et al.* Triterpenoid acids isolated from *Schinus terebinthifolia* fruits reduce *Staphylococcus aureus* virulence and abate dermonecrosis. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.
- TENCONI, E.; RIGALI, S. Self-resistance mechanisms to DNA-damaging antitumor antibiotics in actinobacteria. **Current opinion in microbiology**, v. 45, p. 100-108, 2018.
- THAI, K. M. *et al.* Virtual screening for novel *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors from natural products. **Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 135-155, 2015.
- TINTINO, Saulo R. *et al.* Effect of vitamin K3 on the inhibition of the NorA efflux pump function and its gene expression in *Staphylococcus aureus*. **Membranes**, v. 10, n. 6, p. 130, 2020.
- TINTINO, S. R. *et al.* Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 97, p. 9-13, 2016.
- TSAI, H. C. *et al.* Multidrug-resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from a subtropical river contaminated by nearby livestock industries. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 200, p. 110724, 2020.
- VERAS, H. N. H. *et al.* Enhancement of aminoglycosides and β -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S2790-S2795, 2017.

WALANA, W. *et al.* *Staphylococcus aureus* nasal carriage among healthcare workers, inpatients and caretakers in the Tamale Teaching Hospital, Ghana. **Scientific African**, v. 8, p. 325, 2020.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 775-781, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017. http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1. Accessed 2 Junho 2020.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 10, p. 1451-1470, 2005.

YILMAZ, E. S.; ASLANTAŞ, Özkan. Antimicrobial resistance and underlying mechanisms in *Staphylococcus aureus* isolates. **Asian Pacific journal of tropical zmedicine**, v. 10, n. 11, p. 1059-1064, 2017.

YOSHIDA, H. M. S. K. M. *et al.* Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* NorA gene, which confers resistance to quinolones. **Journal of bacteriology**, v. 172, n. 12, p. 6942-6949, 1990.

ZHANG, Z. *et al.* Fumigant toxicity of monoterpenes against fruit fly, *Drosophila melanogaster*. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 147-151, 2016.

ZHANG, Z. *et al.* Toxicities of monoterpenes against housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 31, p. 24708-24713, 2017.

ZIANI, B. E. *et al.* C. Phenolic profiling, biological activities and in silico studies of *Acacia tortilis* (Forssk.) Hayne ssp. raddiana extracts. **Food Bioscience**, p. 100616, 2020.

ANEXOS

ANEXO A- Comprovante de submissão do artigo “EFFECT OF D-DIHYDROCARVONE IN 1199 AND 1199B *Staphylococcus aureus* CARRIERS OF THE NORA EFLUX PUMP AND EVALUATION OF ITS TOXICITY IN *Drosophila melanogaster* MODEL”

[EXCLI] Submission acknowledgement to the non-corresponding authors 🖨️ 📧

Caixa de entrada x

 **EXCLI Journal** <noreply@ifado.de> 11:29 (há 2 horas) ☆ ↶ ⋮
para mim, Dárcio, Joycy, Cristina, Zildene, Nair, Jackelyne, Henrique, Francisco ▼

🌐 inglês ▼ > português ▼ Traduzir mensagem Desativar para: inglês x

Hello,

Saulo Tintino has submitted the manuscript, "ARTICLE EFFECT OF D-DIHYDROCARVONE IN 1199 AND 1199B *Staphylococcus aureus* CARRIERS OF THE NORA EFLUX PUMP AND EVALUATION OF ITS TOXICITY IN *Drosophila melanogaster* MODEL" to EXCLI Journal.

If you have any questions, please contact me. Thank you for considering this journal as a venue for your work.

EXCLI Journal

[EXCLI Journal](#)
IfADo - Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors, Dortmund
Ardeystr. 67, D-44139 Dortmund/GERMANY

ANEXO B- Trabalhos Publicados em Anais de Congressos

Título: PROMOÇÃO DA BIOSSEGURANÇA E APLICAÇÃO DESTE CONHECIMENTO NO LAB-BIOPROSPEC DA UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA

Evento: Iv Semana Universitária Da Urca – XXII Semana de Iniciação Científica da URCA e VII Semana de Extensão

Local: Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE

Data: 21 a 25 de outubro de 2019

Autores: Guilherme Viana De Souza, Larissa Da Silva, Ana Karoline De Almeida Lima, Luiz Jardelino De Lacerda-Neto, Paula Patrícia Marques Cordeiro, Suieny Rodrigues Bezerra, Antonio Henrique Bezerra, Jailson Santana Do Nascimento, Francisco Assis Bezerra Da Cunha

Modalidade: Pôster

Título: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Jatropha curcas* CONTRA *Drosophila melanogaster*

Evento: XXI Semana de Iniciação Científica com o tema: “Investimento em Patrimônio Cultural, Pesquisa, Ciência e Tecnologia: Desafios e Perspectivas”

Local: Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE

Data: 05 a 09 de novembro de 2018

Autores: Nayra Thaislene Pereira Gomes, Paula Patrícia Marques Cordeiro, Luíz Jardelino De Lacerda Neto, Francisco Assis Bezerra Da Cunha

Modalidade: Pôster

Título: PHYTOCHEMICAL PROSPECTION OF ETHANOLIC EXTRACT OF *Azadirachta indica* STEM BARK AND ITS TOXICITY AGAINST *Drosophila melanogaster*

Evento: I Simpósio Paraibano de Estudos Químicos de Produtos Naturais – SIMPEQPN

Local: Universidade Federal da Paraíba- UFPB, João Pessoa-PB

Data: 9 a 11 de outubro de 2018

Autores: Paula Patrícia Marques Cordeiro, Dárcio Luiz de S. Júnior, Joycy Francely S. dos Santos, Larissa da Silva, Maria Apoliana C. dos Santos, Luiz Jardelino de L. Neto, Henrique Douglas M. Coutinho, Francisco Assis B. da Cunha

Modalidade: Painel

Título: PHYTOCHEMICAL PROFILE OF LEAVES EXTRACT OF *Azadirachta indica* A. JUSS AND TOXICITY AGAINST *Drosophila melanogaster*

Evento: I Simpósio Paraibano de Estudos Químicos de Produtos Naturais - SIMPEQPN

Local: Universidade Federal da Paraíba- UFPB, João Pessoa-PB

Data: 9 a 11 de outubro de 2018

Autores: Dárcio Luiz de Sousa Júnior, Paula Patrícia M. Cordeiro, Zildene de Sousa Silveira, Nair S. Macêdo, Aline Augusti Boligon, Joycy F. Sampaio dos Santos, José G. Martins da Costa, Francisco A. Bezerra da Cunha

Modalidade: Painel