



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

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS COMPOSTOS ALILBENZENO E ALLYLANIOSE CONTRA A ENZIMA β -LACTAMASE E PROTEÍNA DE EFLUXO QacA/B, E SUA TOXICIDADE FRENTE AO MODELO DE *Drosophila melanogaster*

THAIS PEREIRA LOPES

CRATO-CE

2021

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS COMPOSTOS
ALLYLBENZENE E ALLYLANILOSE CONTRA A ENZIMA β -LACTAMASE E
PROTEÍNA DE EFLUXO QacA/B, E SUA TOXICIDADE FRENTE AO MODELO DE
*Drosophila melanogaster***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador:

Prof. Dr. Alysson Pontes Pinheiro

Co-orientador:

Prof. Dr Francisco Assis Bezerra da Cunha

CRATO - CE

2021

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

Lopes, Thais Pereira.

L864a Avaliação da atividade inibitória dos compostos fenólicos Allylbenzene e Allylanilose contra a enzima β -lactamase e proteína de efluxo QacA/B, e sua toxicidade frente ao modelo de *Drosophila melanogaster*/ Thais Pereira Lopes. – Crato - CE, 2021

81p.

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

Orientador: Prof. Dr. Alysson Pontes Pinheiro

Coorientador: Prof. Dr Francisco Assis Bezerra da Cunha

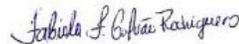
1. Bomba de efluxo, 2. Métodos alternativos, 3. Resistênciamicrobiana; I. Título.

CDD: 547.7

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS ALLYLBENZENE E ALLYLANILOSE CONTRA A ENZIMA B-LACTAMASE E PROTEÍNA DE EFLUXO QACA/B, E SUA TOXICIDADE FRENTE AO MODELO DE *Drosophila Melanogaster*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em: 22/07/2021



Prof. Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues (**Membro Interno**)
Universidade Regional do Cariri – URCA



Prof. Saulo Relison Tintino (**Membro Externo**)
Universidade Regional do Cariri – URCA



Prof. Dr. Alysson Pontes Pinheiro (**Orientador**)
Universidade Regional do Cariri – URCA



Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra Da Cunha (**Co- Orientador**)
Universidade Regional do Cariri – URCA

CRATO – CE

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus por ter me mantido na trilha certa durante esta da minha vida com saúde e forças para chegar até o final.

Aos meus pais e toda minha família pela confiança no meu progresso e pelo apoio emocional.

Agradeço ao meu filho João Marcos por compreenderem as várias horas em que estive ausente por causa do desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu atual professor orientador Dr Allysson Pontes Pinheiro pelas valiosas contribuições dadas durante todo o processo.

Agradeço ao meu Professor coorientador Dr Francisco Cunha pela sua dedicação e paciência durante este projeto. Seus conhecimentos fizeram grande diferença no resultado final deste trabalho.

Também agradeço à Universidade Regional do Cariri e aos seus docentes que nos incentivaram a percorrer o caminho da pesquisa científica.

Aos meus colegas do curso, especialmente aos meus amigos Júlio Cesar e Raimundo Luiz pelas trocas de idéias e ajuda mútua, por estar sempre presente nos momentos difíceis.

A toda equipe do Laboratório de Bioprospecção do Semiárido - Labsema na qual eu faço parte.

A todos que fazem parte do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular -

LMBM que me auxiliaram na parte principal da minha pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

As infecções ocasionadas por cepas bacterianas multirresistentes vêm se tornando um problema de saúde preocupante. Dentre estes micro-organismos a bactéria *Staphylococcus aureus* é responsável por ocasionar infecções em pacientes hospitalizados e imunocomprometidos. Esta espécie possui diversos mecanismos de ação responsáveis por conferir resistência a múltiplas drogas como, por exemplo, a enzima β -lactamase e as proteínas de efluxo. Diante desta problemática é imprescindível a busca por novas substâncias com atividade inibitória frente a mecanismos de resistência expressos por bactérias, dentre estes compostos se destaca os compostos Alilbenzeno e Allylanilose descritos na literatura com atividade antibacteriana frente a cepas resistentes, porém, é necessário a análise dos efeitos toxicológicos destes compostos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antibacteriana de compostos Alilbenzeno e Allylanilose contra a enzima β -lactamase e a proteína de efluxo QacA/B expressado pela cepa bacteriana SA K4414 de *S. aureus* e sua toxicidade utilizando o modelo de *Drosophila melanogaster*. Foi utilizada na metodologia do presente estudo a cepa SA K4414 de *S. aureus* portadora do gene β -lactamase e proteína de efluxo QacA/B para os ensaios microbiológicos. Os compostos isolados Alilbenzeno e Allylanilose foram obtidos da empresa SigmaAldrichCo. Ltd. Para obter as Concentrações Inibitórias Mínima (CIMs) dos compostos Alilbenzeno e Allylanilose foi realizado o ensaio de microdiluição em caldo. A verificação da presença da enzima β -lactamase foi realizada através da associação do inibidor Sulbactam e o antibiótico Ampicilina enquanto a atividade inibitória contra este mecanismo foi avaliada através da redução da CIM do antibiótico Penicilina em associação com os compostos Alilbenzeno e Allylanilose. A inibição da bomba de efluxo QacA/B foi testada utilizando a concentração subinibitória CIM/8 dos compostos fenólicos Alilbenzeno e Allylanilose com o objetivo de avaliar sua capacidade de diminuir a CIM do EtBr na cepa K4414. As leituras dos resultados dos testes citados anteriormente foram realizadas através do método colorimétrico com adição de resazurina. A toxicidade contra *D. melanogaster* foi realizada através dos ensaios de mortalidade e geotaxia negativa. Nos resultados, foi observado que os compostos fenólicos apresentaram atividade antibacteriana direta irrelevante, com CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$. Foi possível observar que a associação dos compostos Alilbenzeno e Allylanilose com o antibiótico Penicilina ocasionou uma redução da CIM de $512 \mu\text{g/mL}$ para $128 \mu\text{g/mL}$ e $256 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, além disso reduziram os valores da CIM do Brometo de etidio (EtBr) de $512 \mu\text{g/mL}$ para $406 \mu\text{g/mL}$ e $256 \mu\text{g/mL}$, respectivamente indicando possivelmente um efeito inibitório frente a enzima β -lactamase e a proteína de efluxo QacA/B. Em relação aos ensaios de toxicidade os compostos Alilbenzeno e Allylanilose apresentaram CI_{50} de 19, 21 μg em 12 h. de exposição e 11,07 μg em 3 h de exposição, respectivamente. Estes compostos também apresentaram mortalidade significativa e dano ao aparelho locomotor das moscas a partir da primeira leitura, com potencialização do efeito tóxico de acordo com a concentração exposta. Concluímos que é pressuposto que os compostos Alilbenzeno e Allylanilose atuem inibindo os mecanismos mediados pelo gene β -lactamase e a proteína de efluxo QacA/B, no entanto estas substâncias apresentaram toxicidade, sendo necessários novos ensaios *in vitro* e *in vivo* para avaliar a ação desta atividade tóxica. Diante dos

resultados apresentados é visto que ambos os compostos fenólicos apresentaram resultados antibacterianos significativos, embora também apresentem toxicidade, os mesmos podem ser utilizado como base de dados para futuras pesquisas, como também ser empregados de outras formas como uso veterinário, tópico ou produtos sanitizantes.

.Palavras- chaves: Bomba de efluxo; Métodos Alternativos; Resistência microbiana.

ABSTRACT

Infections caused by multiresistant bacterial strains are becoming a worrying situation for health agencies. Among these microorganisms, the *S. aureus* bacteria is responsible for causing infections in hospitalized and immunocompromised patients. This species has several mechanisms of action responsible for conferring resistance to multiple drugs, such as the β -lactamase enzyme and efflux proteins. Given this problem, it is essential to search for new substances with inhibitory activity against resistance mechanisms expressed by bacteria, among them the compounds Allylbenzene and Allylanilose described in the literature as inhibitors of resistance mechanisms, however, it is necessary to analyze the toxicological effects of these compounds. The aim of the present study was to evaluate the antibacterial activity of Allylbenzene and Allylanilose compounds against the β -lactamase enzyme and the efflux protein QacA/B expressed by the bacterial strain SA K4414 of *S. aureus* and its toxicity using the *D. melanogaster* model. The SA K4414 strain of *S. aureus*, carrying the β -lactamase gene and efflux protein QacA/B, was used for microbiological assays in the methodology of this study. The isolated compounds Allylbenzene and Allylanilose were obtained from Sigma Aldrich Co. Ltd. To obtain the Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of the Allylbenzene and Allylanilose compounds, the broth microdilution test was performed. The verification of the presence of the β -lactamase enzyme was carried out through the association of the Sulbactam inhibitor and the antibiotic Ampicillin, while the inhibitory activity against this mechanism was evaluated through the reduction of the MIC of the Penicillin antibiotic in association with the compounds Allylbenzene and Allylanilose. The inhibition of the QacA/B efflux pump was tested using the MIC/8 subinhibitory concentration of the phenolic compounds Allylbenzene and Allylanilose in order to evaluate their ability to decrease the MIC of EtBr in strain K4414. The readings of the results of the tests mentioned above were performed using the colorimetric method with the addition of resazurin. Toxicity against *D. melanogaster* was performed through mortality and negative geotaxy tests. In the results, it was observed that the phenolic compounds had irrelevant direct antibacterial activity, with MIC $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$. It was possible to observe that the association of the compounds Allylbenzene and Allylanilose with the antibiotic Penicillin caused a reduction in the MIC from 512 $\mu\text{g/mL}$ to 128 $\mu\text{g/mL}$ and 256 $\mu\text{g/mL}$ respectively, as well as reduced the MIC values of EtBr, possibly indicating an inhibitory effect against the β -lactamase enzyme and the efflux protein QacA/B. The compounds Allylbenzene and Allylanilose presented EC_{50} respectively of 2.498 $\mu\text{g/mL}$ in 12 h. of exposure and 1.439 $\mu\text{g/mL}$ in 3 h. of exposure. These compounds also showed significant mortality and damage to the locomotor system of flies from the first reading, with potentiation of the toxic effect according to the exposed concentration. We conclude that it is assumed that the compounds Allylbenzene and Allylanilose act by inhibiting the mechanisms mediated by the β -lactamase gene and the efflux protein QacA/B, however these substances showed toxicity, requiring further tests to assess the action of this toxic activity.

Keywords: Efflux pump; Alternative Methods; Microbial resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação das famílias de Bombas de Efluxo.....	21
Figura 2: Estrutura química do Allilbenzeno	25
Figura 3: Estrutura química do Allylanilose	26
 Manuscrito original da dissertação	
Figura 1: Identificação da presença da enzima β -lactamase em <i>S. aureus</i> K4414.....	40
Figura 2: Inibição da enzima β -lactamase pelos compostos fenólicos Allylbenzene e Allylanilose associados à Penicilina	40
Figura 3: Inibição da bomba de efluxo QacA/B pelos compostos fenólicos Allylbenzene e Allylanilose associados ao Brometo de Etídio, contra a cepa multirresistente SA K4414.	43
Figura 4: Determinação do efeito tóxico de diferentes concentrações de Allylbenzene em <i>D. melanogaster</i>	44
Figura 5: Determinação do efeito tóxico de diferentes concentrações de Allylanilose em <i>D. melanogaster</i>	45
Figura 6: Determinação do efeito tóxico de concentrações variáveis de Allylbenzene sobre a capacidade locomotora de <i>D.melanogaster</i>	46
Figura 7: Determinação do efeito tóxico de concentrações variáveis de Allylanilose sobre a capacidade locomotora de <i>D. melanogaster</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABC - Superfamília “*ATP Binding Cassette*” (Cassete de Ligação de Adenosina Trifosfato) ATP
- Adenosina Trifosfato
- ANOVA - Análise de variância
- BLI'S- Inibidores de β Lactamase
- BHI - *Brain Heart Infusion* (Caldo infusão cérebro-coração)
- CCCP- Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona
- CIM - Concentração Inibitória Mínima
- CLSI – *Clinical & Laboratory Standards Institute* (Instituto de Padrões clínicos e Laboratoriais)
- CMPZ- Clorpromazina
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- EtBr - Brometo de Etídio
- HIA - *Heart Infusion Agar* (Agar de infusão de coração)
- MATE – *Multi drug and Toxic Compound Extrusion* (Extrusão de compostos tóxicos e multidrogas)
- MBL'S- Metallo- β - Lactamases
- MDR – *Multiple Drug Resistance* (Resistente a Múltiplas Drogas)
- MFS - *Major Facilitator Superfamily*(Superfamília facilitadora)
- MRSA- *Staphylococcus aureus*Resistênte a Meticilina
- MrsA - Proteína de efluxo para macrolídeos
- NorA - Proteína de efluxo para fluoroquinolonas e outras substâncias
- PACE- Superfamília de *Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux*
- PBP'S- Proteínas ligadas a Penicilina
- PMF- Força da matriz do Próton
- RND – *Resistance Nodulation Division* (Divisão de nodulação de resistência)
- SBL'S- Serinas Lactamases
- SMR – *Small Multidrug Resistance* (Pequena família de resistência a múltiplas drogas)
- TetK - Proteína de efluxo ativo para Tetraciclina
- UFC – Unidade Formadora de Colônia

SÚMARIO

1.INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 BACTÉRIA	16
3.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	17
3.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA	18
3.2.1 Enzima β- lactamase	19
3.2.2 Bomba de efluxo	20
3.3 SUBSTÂNCIAS MODIFICADORAS DE RESISTÊNCIA	23
3.4 COMPOSTOS FENÓLICOS	24
3.4.1 Alilbenzeno	26
3.4.2 4- Allylanilose	27
3.5 MÉTODOS ALTERNATIVOS	28
3.5.1 <i>Drosophila melanogaster</i>	29
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 MANUSCRITO.....	32
Abstract	32
1.INTRODUÇÃO	32
2. METODOLOGIA	33
2.1 CEPA BACTERIANA	33
2.2 MEIOS DE CULTURAS	34
2.3 SUBSTÂNCIAS.....	34
2.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	34
2.5 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE B-LACTAMASE	35
2.6 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE B-LACTAMASE POR REDUÇÃO DE MIC	35
2.7 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA BOMBA DE EFLUXO PELA REDUÇÃO DA CIM	36

2.8 ENSAIOS DE TOXICIDADE	36
2.8.1 Criação e estoque de <i>Drosophila melanogaster</i>	36
2.8.2 Ensaio de mortalidade	36
2.8.3 Ensaio de geotaxia negativa	37
2.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.1 AVALIAÇÕES DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MINIMA (CIM).....	38
3.2 AVALIAÇÃO DA VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE β -LACTAMASE.....	38
3.3 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE B-LACTAMASE POR REDUÇÃO DE MIC .	39
2.7 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA BOMBA DE EFLUXO PELA REDUÇÃO DA CIM	40
3.3 ENSAIO DE MORTALIDADE E GEOTAXIA NEGATIVA COM <i>Drosophila melanogaster</i>	44
CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	50
5. CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	53
ANEXOS	55
ANEXOS A	55
ANEXOS B	56

1. INTRODUÇÃO:

As infecções bacterianas são responsáveis por um aumento gradativo na morbidade e mortalidade humana ocasionando um problema agravante na saúde pública mundial. Dentre as espécies responsáveis por esta problemática, *S. aureus* possui diversos fatores de virulência responsáveis por o desenvolvimento de diversas infecções cutâneas e sistêmicas principalmente em pacientes hospitalares (LIMA *et al.*, 2015). A espécie *S. aureus* vêm se tornando preocupante devido a sua capacidade de adquirir resistência a grande parte dos antibióticos, como ocorre nas cepas selvagens de *S. aureus* resistente a Meticilina (MRSA) (ANNUNZIATO, 2019).

Nas últimas décadas a resistência bacteriana teve um aumento gradativo devido a vários fatores como uso irracional de antibióticos, tratamentos empíricos e falta de diagnóstico correto. As infecções ocasionadas por micro-organismos multirresistentes estão associadas ao aumento no nível de mortalidade em comparação com aquelas causadas por bactérias sensíveis a antibióticos prescritos na prática clínica, esta situação é agravada por a escassez de novos antibióticos o que resulta em falta de alternativas terapêuticas (MUNITA; ARIAS, 2016).

A resistência bacteriana é adquirida por meio de mutações onde os genes responsáveis são transportados por plasmídeos ou transposons. Dentre os principais mecanismos de ação se destacam a inativação por enzimas como β -lactamases, efluxo ativo e alteração do sítio alvo do antibiótico (LIU *et al.*, 2019). Dentre os mecanismos de resistência citados, a inativação do alvo por enzimas como a β -lactamase foi um dos primeiros mecanismos identificados em bactérias resistentes à classe dos β -lactâmicos. Esta enzima ocasiona uma hidrólise no anel β -lactâmico destes agentes antibacterianos inativando a sua ação antibiótica (FAULKNER; HURLEY; WEIBEL, 2017; TRONCOSO *et al.*, 2017).

Dentre os mecanismos de ação mencionados anteriormente se destaca as bombas de efluxo, estas são proteínas de membrana responsáveis pelo transporte de antibióticos e substâncias tóxicas para fora da célula bacteriana. Este mecanismo pode ser específico para determinada droga ou pode expulsar múltiplas drogas, o que contribui para a multirresistência bacteriana. Estas proteínas de efluxo são classificadas em seis famílias distintas caracterizadas de acordo com a estrutura da proteína, características bioquímicas, mecanismos de ação e fonte de energia (GUO *et al.*, 2020).

O desafio e a dificuldade para encontrar novas substâncias com ação antimicrobiana despertou o interesse de analisar produtos naturais, os quais são caracterizados por possuir substâncias ativas que apresentam bioatividade. (TRETIN *et al.*, 2013). Um dos métodos alternativos utilizados para controlar a resistência bacteriana causada por enzimas como β -lactamase e proteínas de efluxo é a utilização de inibidores capazes de bloquear a atividade destes mecanismos. Estas substâncias podem ser de origem natural, oriundas de plantas medicinais ou sintetizadas, dentre os compostos químicos que apresentam esta atividade biológica se destaca os alcaloides e compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos são uma classe química caracterizada por apresentar hidroxilas e anéis aromáticos na forma simples ou de polímeros em sua estrutura químicas, que podem ser sintetizados por produtos naturais e já apresentam diversas ações farmacológicas (PRASCH; BUCAR, 2015). Dentre estas propriedades a atividade antioxidante é a principal ação biológica exercida por estes compostos, porém, estudos apontam que diversos fenóis como flavonoides, taninos e cumarinas apresentam ação antibacteriana e inibitória frente a mecanismos de resistência como a enzima β -lactamase e bombas de efluxo. Considerando os inúmeros benefícios encontrados nos fenóis é essencial a avaliação de novas substâncias como Alilbenzeno e Allylanilose(ANGELO; JORGE, 2017).

Grande parte dos metabólitos secundários sintetizados de plantas medicinais apresentam efeitos adversos quando utilizados no organismo humano, desta forma é crucial a investigação do perfil toxicológico destas substâncias. Dentre os métodos alternativos utilizados para avaliação toxicológica se destaca o modelo de *D. melanogaster*, este método tem sido bastante empregado para avaliar interações tóxicas e mecanismos genéticos devido a semelhanças observadas entre os humanos e este artrópode, como também apresentam outras vantagens como fácil manuseio, custo baixo e ciclo de vida curto (TALYN *et al.*, 2019).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar da atividade inibitória dos compostos fenólicos Alilbenzeno e Allylanilose contra a cepa SA K4414 portadora da enzima β -lactamase e proteína de efluxo QacA/B, e sua toxicidade frente ao modelo de *Drosophila melanogaster*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos Alilbenzeno e Allylanilose;
- Verificar a presença da enzima β -lactamase na cepa SA K4414 através da associação do inibidor sulbactam e o antibiótico Ampicilina;
- Avaliar o efeito inibitório dos compostos Alilbenzeno e Allylanilose associados ao antibiótico Penicilina frente a enzima β -lactamase;
- Analisar o efeito inibitório dos compostos Alilbenzeno e Allylanilose frente a proteína de efluxo QacA/B através do inibidor padrão Brometo de Etídio;
- Investigar a toxicidade dos compostos Alilbenzeno e Allylanilose através do modelo *D. melanogaster*, analisando a avaliação da mortalidade;
- Identificar a geotaxia negativa, onde é verificado o dano ao aparelho locomotor das moscas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 BACTÉRIAS

As bactérias são micro-organismos unicelulares, que possuem células procarióticas ou seja não possuem uma membrana celular envolvendo o seu material genético, o que torna esse tipo celular mais simples comparando com as células eucarióticas. Sua morfologia é diversificada onde se encontram microscopicamente em forma de cocos, bastonetes ou espirais. Devido à diversidade de espécies bacterianas a identificação destes micro-organismos será caracterizada através da sua variação morfológica, composição química da parede celular, forma de obtenção de energia e utilização do oxigênio (aeróbicas ou anaeróbicas). (STRAHL; ERRINGTON, 2017)

As células bacterianas possuem uma parede celular que está situada próxima a região citoplasmática, a composição dessa estrutura bacteriana permite classificar as bactérias em Gram-positivas e Gram- negativas. As bactérias Gram - positivas são compostas por diversas camadas de peptidoglicano formando uma estrutura rígida que impede a passagem de substâncias hidrofóbicas. Em relação às bactérias Gram- negativas a composição e estrutura da parede celular são constituídas por poucas camadas de peptidoglicano, uma membrana externa formada principalmente por lipossacarídeos e fosfolípido (HYUN *et al.*, 2015).

Para que ocorram as infecções, as bactérias necessitam de fatores de virulência que as permitam escapar do sistema imunológico como também são responsáveis por a disseminação e replicação dos patógenos para outros órgãos ocasionando diversas patologias. Dentre os inúmeros fatores de virulência se destacam a produção de toxinas, formação de biofilmes, superantígenos e aderência mediada por adesinas(COSTA *et al.*, 2015).

As infecções bacterianas são ocasionadas por espécies pertencentes à microbiota normal quando há desequilíbrio ou migração para sítios estéreis, como também podem ser desenvolvidos por bactérias provenientes de ambientes exógenos, ambos os casos são responsáveis por desencadear uma série de infecções que podem resultar em um quadro clínico de sepse, o que torna imprescindível o conhecimento acerca das espécies bacterianas e seus fatores de virulência (RAMACHANDRAN, 2014).

3.1.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcae, possui 33 espécies e 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. Dentre estas espécies de destaca a bactéria *Staphylococcus aureus* isolada principalmente na região nosocomial e está relacionada a infecções em seres humanos (AGUAYO-REYES *et al.*, 2018).

A espécie *S. aureus* é caracterizada como cocos Gram-positivos, onde pode apresentar várias formas, que vão desde isolados, aos pares ou agregados semelhantes a cachos de uva. Seu diâmetro varia entre 0,5 a 1,5 μm , não produzem esporos e são imóveis. Seu principal fator de virulência é a presença de uma cápsula de polissacarídeo responsável por revestir a parede celular bacteriana, resultando na inibição da fagocitose por células do sistema imunológico (TODD; PETERS, 2019).

Embora a bactéria *S. aureus* faça parte da microbiota normal humana situada principalmente na pele e na cavidade nasal, este patógeno pode romper as defesas imunológicas do hospedeiro e se disseminar para outros tecidos causando uma variedade de patologias. As infecções ocasionadas por esta espécie podem causar dano tecidual direto tais como: pneumonia, endocardite e quadro graves de sepsis. Dentre os fatores de virulência apresentados por *S. aureus* a capacidade de produção de toxinas ganha destaque, estas substâncias podem ser isoladas principalmente em alimentos ocasionando intoxicações alimentares, como também podem ser responsáveis por outras patologias como a síndrome do choque tóxico causada por a secreção de exoenzimas (LIMA *et al.*, 2015).

A conduta terapêutica direcionada a infecções ocasionadas por *S. aureus* é a utilização da antibioticoterapia, sendo a classe dos β -lactâmicos a mais prescrita no âmbito hospitalar. Porém a espécie *S. aureus* possui adaptabilidade fenotípica que permite adquirir resistência a múltiplas drogas, proporcionando o desenvolvimento de cepas multirresistentes e limitando as opções de tratamento (MORELLO *et al.*, 2018).

Nas últimas décadas é crescente o número de cepas resistentes a múltiplas drogas, dentre estas bactérias se destaca a cepa de *S. aureus* MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina), esta espécie apresenta resistência através de genes cromossômicos responsáveis por modificar os receptores de ação dos β -lactâmicos, como também a produção de enzimas como as proteínas ligadoras de Penicilina (PBP's). Estas estirpes bacterianas permitem a resistência frente

a outras classes antibióticas como as Cefalosporinas e Carbapenêmicos, limitando a conduta terapêutica (AGUAYO-REYES *et al.*, 2018).

3.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA

Os antibióticos foram uma das descobertas mais relevantes no século XX, o surgimento desta classe farmacológica revolucionou a saúde pública através do controle e erradicação de doenças infecciosas que não possuíam tratamento eficaz. Porém em 1954, Fleming já havia previsto que o uso irracional destes fármacos ocasionaria uma seleção e propagação de bactérias multirresistentes (ANNUNZIATO, 2019).

A resistência microbiana é definida como a capacidade de um micro-organismo sobreviver e multiplicar-se na presença de antibióticos e substâncias tóxicas. Este fenômeno resultará em alterações funcionais e estruturais na célula bacteriana que permitirá sua adaptação a condições adversas (TRONCOSO *et al.*, 2017).

A resistência das bactérias a antibióticos pode ocorrer através de uma seleção natural na qual algumas espécies bacterianas sofrem mutações e passam a desenvolver genes de resistência, que posteriormente serão propagados para outras espécies através da transferência de material genético do plasmídeos ou transposons, os quais contêm a informação genética necessária para a bactéria desenvolver mecanismos de resistência a determinado antibiótico (HILTUNEN; VIRTÁ; ANNA-LIISA, 2017).

As bactérias possuem fatores fisiológicos e estruturais responsáveis por mediar mecanismos de ação, dentre estes mecanismos de resistência se destacam: impermeabilidade da membrana da celular, hidrolise enzimática, bombas de efluxo. e modificação do sitio alvo (MUNITA; ARIAS, 2016). O mecanismo mediado por a impermeabilidade da membrana plasmática, é caracterizado pela diminuição da expressão de porinas que são responsáveis por o transporte de substâncias para o interior da célula através da membrana plasmática, a deficiência de porinas resulta em inibição de antibióticos principalmente hidrofóbicos como Beta-lactâmicos, Aminoglicosídeos, Fluoroquinolonas para o interior da célula, conferindo a resistência a esses fármacos (OGAWARA, 2019).

Outra forma de resistência aos antibióticos é a modificação do sitio alvo celular, neste mecanismo ocorrera alteração estrutural do alvo celular impedindo que o antibiótico atue de forma

eficiente em seu sítio celular conseqüentemente diminuindo a sua ação antibiótica que resultara em resistência bacteriana a determinada droga (NORDMANN; POIREL, 2019).

Embora os mecanismos de resistência citados anteriormente sejam uma importante linha de defesa a uma variedade de antibacterianos, outros mecanismos de ação como as proteínas de efluxo e enzimas como β -lactamase vêm sendo constantemente citada nas literaturas científicas devido a sua capacidade de conferir resistência a fármacos como a Vancomicina que é utilizada como principal conduta terapêutica para cepas multirresistentes (MCGUINNESS; MALACHOWA; DELEO, 2017).

3.2.1 Enzima β - lactamase

Os β -lactâmicos foram a primeira classe de antibióticos utilizada em infecções bacterianas, estes fármacos apresentam amplo espectro de atividade antibacteriana incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e tem como principal mecanismo de ação a inibição da atividade de proteínas de ligação da Penicilina (PBP'S) essenciais para a síntese da parede celular. Devido ao uso contínuo e crescente destes antibióticos, as bactérias desenvolveram mecanismos de defesa como, por exemplo, a produção de enzimas β -lactamase (PALACIOS; ROSSI; MAHLER, 2020).

A β - lactamase é uma enzima responsável por hidrolisar compostos químicos contendo anel β -lactâmico de 4 membros, incluindo os agentes antibacterianos β -lactâmicos, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos. Em decorrência ao uso inicial da penicilina frente a cepas Gram-positivas a espécie *S. aureus* foi uma das primeiras a expressar a enzima β -lactamase no qual está resistência é decorrente da produção da enzima PC1 codificada por o gene *BlaZ*, embora estas enzimas também possam ser identificadas em estripes Gram-negativas como *Escherichia coli* (TOOKE *et al.*, 2019).

A evolução das β -lactamases permitiu que as mesmas apresentassem alterações estruturais e genéticas, diante deste contexto foi necessário que estas enzimas fossem subdivididas em grupos de acordo com características bioquímicas e mecanismos hidrolíticos. A principal forma de divisão destas enzimas consiste nas classes A, B, C onde utilizam enzimas serinas como sítio alvo e são classificadas como serinas- lactamases (SBL's), já a classe requer íons de zinco para exercer sua atividade, este grupo é caracterizado como metalo- β - lactamases classe B (MBL's) (BUSH, 2018).

As SBL's utilizaram uma serina nucleofílica como sítio ativo para a hidrólise do anel β -lactâmico onde esta reação será mediada pôr o mecanismo acilação –desacilação, estas enzimas estão diretamente relacionadas às PBP's. Esta classe têm como principal inibidor o ácido clavulânico comumente associado a amoxicilina para tratamento de infecções bacterianas, porém estudos apontam cepas bacterianas que vêm apresentando resistência a esta substância (HANG *et al.*, 2020).

Em relação às MBL's, estas enzimas possuem um amplo espectro de atividade incluindo todos os antibióticos β -lactâmicos com exceção dos monobactâmicos, esta classe serão subdivida em metaloenzimas B1, B2 e B3 de acordo com a sequência de aminoácidos. O mecanismo de ação destas enzimas consiste na utilização de um ou dois íons de zinco como sítio ativo para ativar uma água molecular responsável por clivar o anel β -lactâmico, esta classe em comparação com as SBL irá apresentar uma resposta mais forte e rápida devido à ausência de interações covalentes (PALZKILL, 2013).

Cepas bacterianas têm expressado fenótipos que permitem estas a expressar combinações de mecanismos de resistência caracterizadas como resistência multifatorial, dentre estes mecanismos se destaca a presença de proteínas de efluxo e a produção de enzimas β -lactamases em uma mesma espécie (RAMACHANDRAN, 2014).

3.2.2 Bomba de efluxo

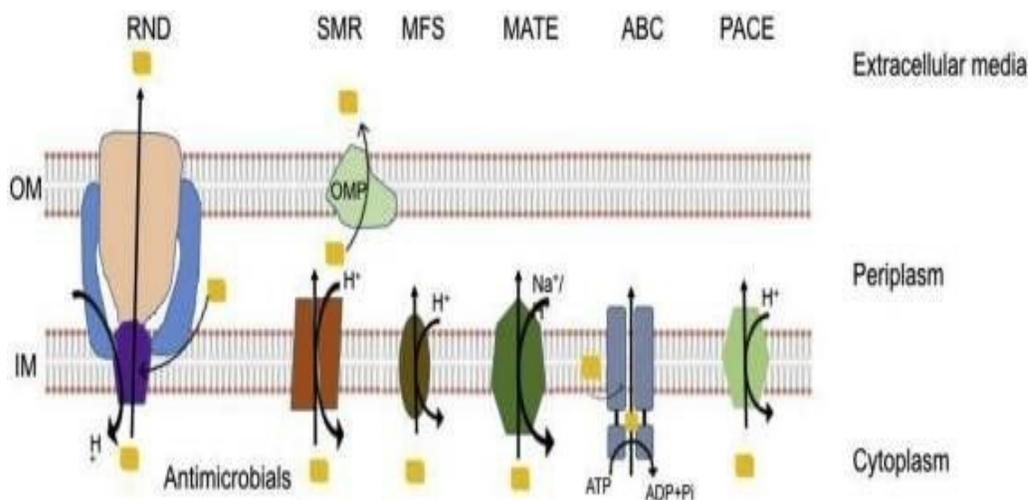
As Bombas de efluxo são proteínas transportadoras transmembrana que possuem a capacidade de expulsar substâncias tóxicas como os antibióticos para fora da célula bacteriana. Estas proteínas estão presentes em cepas Gram positivas e Gram negativas, no qual podem atuar de forma seletiva frente a um substrato específico ou podem estruir uma variedade de compostos conferindo Resistência a Múltiplas Drogas (*Multi Drug Resistance*) (JANG, 2016).

As proteínas de efluxo ativo realizam o transporte de compostos através de transportadores ativos primários e secundários. O ativo primário consiste na hidrólise de ATP como forma de energia para realizar o transporte de substâncias através da membrana bacteriana. Em relação aos transportadores ativos secundários, estes irão realizar o transporte de substratos através de um gradiente de concentração no qual a substância é acoplada ao um movimento de um íon de H^+ ou

N^+ , onde estes íons são transportados para um gradiente de baixa concentração e o substrato simultaneamente transportado contra este gradiente de concentração (LEKSHMI *et al.*, 2018).

Todas as bombas de efluxo são agrupadas principalmente em seis famílias de acordo com a estrutura da proteína, características bioquímicas, mecanismos de ação e fonte de energia, desta forma essa subdivisão resultará nas famílias: Superfamília grande facilitadora (*Major facilitator superfamily* - MFS), Superfamília ligada a ATP cassete (*ATP-binding cassette*- ABC superfamily), Pequena família de resistência a múltiplos medicamentos (*Small multidrug resistancefamily*-SMR), Superfamília de Divisão celular de nodulação de Resistência (*Resistance nodulation cell division* (RND) superfamily), Superfamília de extrusão de multidroga e de compostos tóxicos (*Multidrug and toxic compound extrusion*- (MATE) family) (RAMACHANDRAN, 2014), *Superfamília de Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux* (PACE) (BOLLA *et al.*, 2020).

Figura 1: Representação das famílias de Bombas de Efluxo



Fonte: Kabraet *al.*, (2019)

O MFS é uma família antiga e diversificada de bombas de efluxo, esta classe utiliza a força da matriz do próton (PMF) como fonte de energia. As proteínas pertencentes a esta família são codificadas principalmente através de genes cromossômicos, que irão conferir resistência a compostos anfipáticos mono e divalentes, como por exemplo, os antibióticos tetraciclina e fluoroquinolonas. Dentre as bombas de efluxo pertencente a esta família se destaca a NorA, QacA/B e TetK (SPENGLER *et al.*, 2017).

A família SMR consiste em pequenas proteínas de efluxo responsáveis por conferir resistência a múltiplas drogas, esta classe é dependente da força da matriz do próton para realizar o seu transporte. As proteínas SMR irão transportar principalmente compostos e antibióticos lipofílicos, como compostos quaternários de amônia e brometo de etídio (NASIE *et al.*, 2012).

As bombas de efluxo pertencente à família MATE são uma descoberta recente desta forma são menos descritas que as demais categorias. Esta família realiza o transporte de substratos através do gradiente Na^+ responsável por estruir agentes antibacterianos como ciproflaxacina e norflaxacina. Dentre as bombas de efluxo pertencentes a esta família, a mepA foi a primeira proteína isolada de cepas patogênicas de *S. aureus* (RANAWEERA *et al.*, 2016).

Em relação à família RND estas serão codificadas por genes cromossômicos, no qual seu transporte consiste na utilização do íon H^+ . Uma característica desta família é capacidade de transportar o substrato diretamente para o meio externo facilitando de forma eficiente a saída dos compostos (HANDZLIK; MATYS; KIEĆ-KONONOWICZ, 2013).

As proteínas de efluxo da família ABC são responsáveis por realizar o transporte de substratos como aminoácidos, açúcares, íons e polissacarídeos através do mecanismo ativo primário que utiliza a hidrólise de ATP como fonte de energia. Uma característica específica desta classe é a capacidade de conferir resistência as células cancerígenas ao tratamento de quimioterapia. Dentre as proteínas ABC se destaca a MrsA responsável por conferir resistência a múltiplas drogas, como por exemplo, eritromicina (HASSANZADEH *et al.*, 2020).

Dentre as proteínas de efluxo citadas anteriormente se destacam a Bomba NorA e TetK pertencentes a família MFS e isoladas principalmente de estirpes selvagens de *S. aureus*. A NorA é responsável por conferir resistência a múltiplas substâncias tóxicas como fluoroquinolonas hidrofílicas, verapamil, brometo de etídio. Por outro lado a TetK possui o antibiótico tetraciclina como substrato específico (KUMAR; VARELA, 2012).

A QacA/B é uma proteína de efluxo pertencente a família MFS pode ser isolada de cepas como *S. aureus*. Esta bomba é codificada através de plasmídeos e realiza seu transporte através da força da matriz do próton, estas proteínas serão reguladas pelo repressor QacR no qual sua estrutura permite conferir resistência a vários substratos estruturalmente diferentes, como, compostos quaternários de amônia, brometo de etídio e acriflavina (SCHINDLER; KAATZ, 2016).

Os mecanismos de resistência citados anteriormente são responsáveis por o desenvolvimento de cepas multirresistentes, desta forma se torna crucial a identificação de novas

substâncias químicas capazes de potencializar a ação antibiótica como também possíveis percussoras de novas drogas (GOUDARZI *et al.*, 2020).

3.3 SUBSTÂNCIAS MODIFICADORAS DE RESISTÊNCIA

Os antibióticos β -lactâmicos são os mais utilizados na prática clínica devido a sua alta eficácia, amplo espectro de atividade e baixa toxicidade, porém esta classe vem se tornando resistente devido a fatores de resistência como a enzima β -lactamase e bombas de efluxo, Diante deste contexto se torna crucial a identificação de substâncias químicas com ação inibitória frente a estes mecanismos de resistência (HANG *et al.*, 2020).

Uma das estratégias adotadas para reverter a resistência de agentes β -lactâmicos é associação destes antibióticos com inibidores de lactamase (BLI's), neste caso os inibidores irão inativar a ação da enzima mantendo o efeito terapêutico do antibiótico. Os inibidores enzimáticos comumente apresentam pouca ou nenhuma atividade antibacteriana, estas substâncias irão impedir a atividade enzimática através da inibição dos processos de transcrição e tradução ou inativando o sítio alvo da enzima (BONOMO, 2017)

Atualmente os três inibidores de β -lactamase comercializados são, ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam no qual estes compostos são associados com os seguintes antibióticos: amoxicilina, ampicilina e piperacilina, respectivamente (SANDANAYAKA; PRASHAD, 2002).

Os inibidores enzimáticos mais relevantes são restritos especificamente para a classe A das β -lactamases, porém com o desenvolvimento de cepas patogênicas portadoras de β -lactamases dos tipos C e D foi visto a necessidade de identificar possíveis inibidores que têm como alvo as MBL's. Dentre os inúmeros compostos que vêm sendo estudado se destacam os derivados do ácido dicarboxílico tais como 3- amino e 3- alcoxi, estas substâncias irão inativar os íons de zinco impedindo que a enzima realize a hidrólise do anel β -lactâmico (ELFAKY *et al.*, 2020)

Inúmeros compostos que inibem a enzima β -lactamase já foram descritos, porém o seu uso clínico se torna limitado pois estas substâncias apresentam altas taxas de toxicidade devido a sua ligação inespecífica a enzimas procarióticas e eucarióticas, desta forma a inibição destas enzimas hidrolíticas pode ocasionar graves efeitos colaterais no organismo humano (LIU *et al.*, 2019).

É notório que as bombas de efluxo são um dos principais mecanismos de resistência identificados em cepas patogênicas, por esta razão a inibição da atividade destas proteínas de efluxo

resultou no desenvolvimento de inibidores de bombas de efluxo (IBE's). Os compostos com atividade inibitória frente às proteínas de efluxo, não devem apresentar efeito em células eucarióticas, a fim de reduzir os níveis de toxicidade, bem como estes inibidores não podem apresentar atividade antibacteriana para impedir o desenvolvimento de mecanismos de resistência contra estas substâncias (SPENGLER *et al.*, 2017).

Os IBE's quando isolados ou associados aos antibióticos irão aumentar a concentração intracelular do antibiótico restaurando a sensibilidade de cepas resistentes, com isto estes inibidores reduzem os níveis de resistência intrínseca como também impede o desenvolvimento de novas bactérias resistentes (SCHINDLER; KAATZ, 2016).

Os compostos com atividade frente às proteínas de efluxo serão classificados de acordo com o seu mecanismo de ação dentre eles se destacam, os desaclopadores de energia que atuam modificando o potencial eletroquímico transmembranar impedindo que as bombas de efluxo utilizem a força da matriz do próton como fonte de energia, um exemplo de composto pertencente a este grupo é o Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP). Outra forma de inibição dos IBES's é através da ligação direta com as proteínas de efluxo inibindo a sua ação, drogas como a reserpina e verapimil atuem desta forma, porém o seu uso clínico é limitado devidos as altas taxas de neurotoxicidade(WRIGHT; BONOMO; PATERSON, 2017).

A escassez de novos antibióticos proporcionou o desenvolvimento de tratamentos alternativos a fim de reduzir as taxas de resistência, dentre estas substâncias alternativas, a utilização de compostos químicos isolados de plantas medicinais vêm crescendo gradativamente. As plantas medicinais são fontes de uma ampla variedade de substâncias químicas ativas como terpenóides, compostos fenólicos e alcaloides, no qual possuem atividade antibacteriana direta como também agem em associação com antibióticos potencializando a sua eficácia terapêutica (WAMBA *et al.*, 2018).

3.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são um dos principais grupos de metabólitos secundários isolados de plantas medicinais, que podem ser encontrados em chás, frutas, legumes, sementes, caules e flores. Esta classe química é subdividida de acordo com a estrutura química, fonte de origem e

funções biológicas, dentre as substâncias pertencentes a este grupo se destaca: Flavonoides, Taninos, e Ácidos fenólicos (RODR; LOZANO-SANCHEZ; BORR, 2020).

Os flavonoides são um grupo de compostos fenólicos isolados de diversas espécies vegetais que possuem propriedades farmacológicas como, ação antioxidante frente a patologias associadas ao estresse oxidativo, por exemplo, câncer e doenças neurodegenerativas. Além desta propriedade os flavonoides também possuem atividade antibacteriana frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas devido à capacidade de inibir a DNA girase e interferir na energia da célula bacteriana (DOS SANTOS; FARIAS RODRIGUES, 2017).

Outro grupo pertencente à classe dos compostos fenólicos são os ácidos fenólicos, estes podem ser encontrados em todo reino vegetal porém, bebidas como café e chás verdes são as principais fontes. Dentre os ácidos fenólicos o ácido gálico vêm ganhando destaque devido a sua alta taxa de atividade antibacteriana frente a espécies como *S. aureus*, estudos apontam que esta substância ocasiona alterações morfológicas na célula bacteriana induzindo o vazamento de componentes citoplasmáticos essenciais (RAMONA *et al.*, 2016).

Uma das principais substâncias químicas com atividade antibacteriana caracterizada como composto fenólico são os taninos, estes compostos que agem interferindo na disponibilidade de substratos essenciais para o metabolismo da célula bacteriana. Outra característica marcante dos taninos é a sua capacidade de reverter à resistência de antibióticos comumente prescritos como os β -lactâmicos, estes compostos quando associados aos antibióticos atuam inibindo enzimas microbianas permitindo que a droga exerça sua ação consequentemente mantendo a eficácia terapêutica (PEREIRA *et al.*, 2018).

A falta de novos antibióticos permitiu que fossem avaliados novos compostos para futuramente serem utilizados como alternativa para o tratamento de infecções ocasionadas por cepas resistentes, dentre eles a utilização de substâncias químicas como compostos fenólicos em associação com antibióticos vêm sendo bastante investigado. Estudos apontam que esta classe química exibe um efeito sinérgico quando combinado com antibióticos *in vivo* devido a sua capacidade de elevar as concentrações intracelulares de várias drogas (KOURTESI *et al.*, 2013).

A alta taxa de resistência bacteriana permitiu que os compostos fenólicos fossem investigados como uma possível alternativa terapêutica devida sua atividade biológica frente a mecanismos de resistência como as bombas de efluxo. Estas substâncias químicas são capazes de interferir na ação destas proteínas de efluxo através de mecanismos como, por exemplo, alteração

na transcrição de genes responsáveis por codificar as proteínas de efluxo, inibição competitiva ou não competitiva com o substrato de ligação e interferência na hidrólise do ATP utilizado como energia para ativação das bombas de efluxo (SEUKEP *et al.*, 2019).

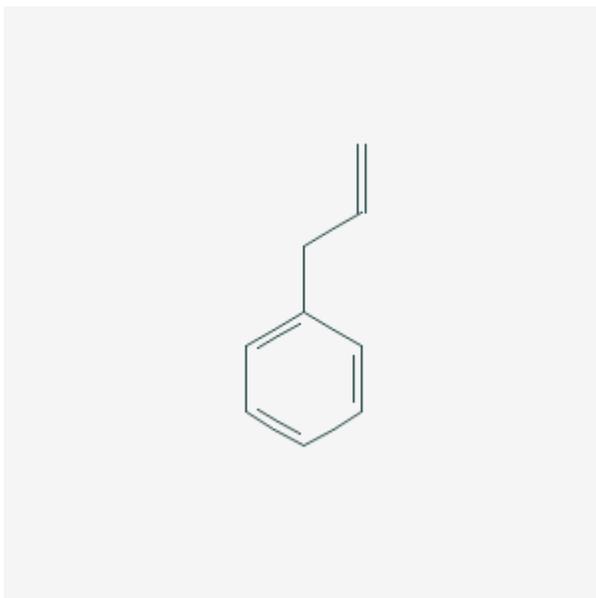
Algumas substâncias químicas pertencentes à classe dos compostos fenólicos são pouco elucidadas na literatura em relação as suas propriedades farmacológicas, desta forma é imprescindível a análise da atividade biológica destes compostos para auxiliar na identificação de possíveis precursores de novas drogas como, os antibióticos (GULUA *et al.*, 2019).

3.4.1 Alilbenzeno

O composto fenólico Alilbenzeno é formado a partir de uma ligação simples entre a molécula de propenilo e anel fenilo, esta substância é identificada em diversas famílias vegetais como, por exemplo, Apiaceae, Lamiaceae, Myrtaceae e Rutaceae (MARTINS *et al.*, 2014).

Os dados referentes obtidos sobre as propriedades farmacológicas do composto Alilbenzeno são escassos, porém já é descrito que esta substância atua inibindo enzimas como as lipoxigenases (LOXs) responsáveis por atuar em processos inflamatórios. Apesar de este composto apresentar atividades biológicas relevantes alguns estudos indicam possível efeito genotóxico e cancerígeno que ocasionam riscos ao organismo humano (MOUSAVIAN *et al.*, 2018).

Figura 2: Estrutura química do composto Alilbenzeno



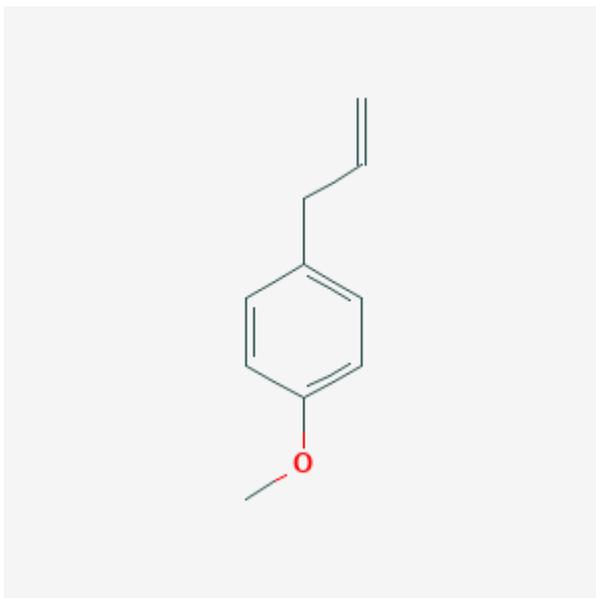
Fonte: Pubchem

3.4.2 Allylanilose

O Allylanilose é um composto fenólico da classe dos fenilpropanóides, cuja sinonímia é o Estragol. É constituído por um anel benzênico substituído por um grupo propenil. Esta substância é encontrada principalmente em espécies de árvores Coníferas, e possui atividade inseticida como propriedade farmacológica mais elucidada (STROM; CLARKE; SHEA, 2004).

O estudo isolado da substância Allylanilose é superficial, porém óleos essenciais e extrato vegetais que possuem como principal constituinte este composto químico têm demonstrado atividade biológica como, por exemplo, atividade antibacteriana, antioxidante e anti-inflamatória (BALBINO *et al.*, 2020).

Figura 3: Estrutura química composto Allylanilose



Fonte:Pubchem

3.5 MÉTODOS TOXICOLÓGICOS ALTERNATIVOS

Embora grande parte dos metabólitos secundários oriundos de plantas medicinais apresentem atividade biológica, estas substâncias também podem ocasionar reações adversas no organismo humano quando utilizadas *in vivo*. Para que ocorra o desenvolvimento de novos antibióticos ou drogas modificadoras de resistência é imprescindível que ocorra uma análise toxicológica dos possíveis candidatos a fármacos como, os compostos químicos isolados e sintetizados a partir de produtos naturais (FERNANDES *et al.*, 2014; NAGPAL *et al.*, 2017).

Diversas espécies vegetais produzem substâncias tóxicas como mecanismo de defesa frente a insetos, pragas e outros micro-organismos, porém, estes compostos quando presente no organismo humano pode apresentar efeitos toxicológicos. Pesquisas anteriores realizadas com o intuito de avaliar o impacto toxicológico destas substâncias no organismo humano utilizavam principalmente métodos tradicionais de testes em animais, mas estes testes são frequentemente lentos, possuem alto custo e difícil metodologia (CHAHARDEHI; ARSAD; LIM, 2020). Desta forma foi iniciado a aplicação de abordagens alternativas no qual é empregado o uso de métodos

com organismos modelos , dentre eles: *Artemia salina*, *Danio rerio*, e *Drosophila melanogaster*. (REMY; BÜRKLE; LANDSIEDEL, 2015).

Dentre os métodos alternativos citados anteriormente o peixe , *Danio rerio* é um modelo in vivo amplamente utilizado hoje em dia para a realização de testes de toxicidade, este apresenta rápido desenvolvimento como também apresenta semelhança filogenética com o genoma humano(GABALLAH *et al.*, 2020).

3.5.1 *Drosophila melanogaster*

Um dos métodos alternativos empregados para avaliação toxicológica é a *D. melanogaster*, esta espécie de inseto é conhecida popularmente como mosca da fruta, seu ciclo de vida ocorre em cerca de 10 dias incluindo os estágios de ovo, larva, pupa e adultos. Uma vez adultos estes insetos sobrevivem por aproximadamente 75 dias a 25°C (DISEASES, 2016).Este sistema modelo toxicológico ganhou destaque sobre outros animais devido a facilidade de manuseio, ciclo de vida curto, alta reprodutibilidade como também o baixo custo para serem mantidas em laboratórios(ROCHA *et al.*, 2016).

Os testes utilizando o modelo de *D. melanogaster* são recentes, porém com uma extensa literatura que fornece informações impertinentes a respeito dos mecanismos fisiológicos, genéticos e bioquímicos destes animais. Embora os seres humanos e as moscas possuam pouca relação evolutiva, estudos fornecem evidencias que comprovam que 75 % de genes ortólogos responsáveis por desencadear patologias nos seres humanos podem ser identificados em *D.melanogaster*(TALYN *et al.*, 2019)

3.RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos nessa dissertação resultaram em um manuscrito **Pharmacological activities of phenolic compounds Allylbenzene and allylanisole: Inhibition of β -lactamase enzyme and the QacA/B efflux protein and toxicity profile in a *Drosophila melanogaster* model**. Submetido no dia 03/07/2021 no Journal Phytomedicine Qualis A2 e fator de impacto 5,3. Área: Biodiversidade

Thais Pereira Lopes^a, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa^a, Nair Silva Macêdo^b, Jackelyne Roberta Scherf^c, Maria Apoliana Costa dos Santos ^a, Thiago Sampaio de Freitas^d, Jaime Ribeiro Filho^e, Henrique Douglas Melo Coutinho^{f,*}, Francisco Assis Bezerra da Cunha^a, Alysson Pontes Pinheiro^g

a Laboratory of Semi-Arid Bioprospecting (LABSEMA), Regional University of Cariri- URCA, Crato, CE, Brazil; thaishonorato001@gmail.com (T.P.L); cristinase75@gmail.com (C.R.d.S.B.); apolianacosta14@gmail.com (M. A. C.d. S); cunha.urca@gmail.com (F.A.B.d.C).

b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB), Universidade Federal do Pernambuco, Recife, PE, CE, Brazil; naiirmacedo@gmail.com (N.S.M).

c Laboratory of Antibiotics Federal University of Pernambuco - Federal do Pernambuco, Recife, PE, CE, Brazil; jackelyne_scherf@yahoo.com.br (J.R.S.)

d Laboratory of Simulations and Molecular Spectroscopy (LASEMOL), Regional University of Cariri-URCA, Crato, CE, Brazil; thiagocrato@hotmail.com (T.S.d.F.).

e Research Laboratory in Genetics and Trnslational Hematology, Instituto Gonçalo Moniz (IGM), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Salvador, BA, Brazil. jaime.ribeiro@ioc.fiocruz.br. (J. R. F)

f Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Regional University of Cariri-URCA, Crato, CE, Brazil; hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M.C.)

g Laboratory of Semi-Arid Crustacean Laboratory (LACRUSE), Regional University of Cariri-URCA, Crato, CE, Brazil; allysonpp@hotmail.com (A. P. P)

* Corresponding author

Dr Henrique Douglas Melo Coutinho, Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Regional University of Cariri-URCA, Crato, CE, Brazil;
Tel: +55 88 9 92080462
E- mail address : hdmcoutinho@gmail.com (H. D. M .C)

Resumo

O aparecimento crescente de bactérias multi-resistentes exigiu a descoberta de novos medicamentos capazes de inibir os mecanismos de resistência bacteriana, tais como os mediados por proteínas de fluxo e pela enzima β -lactamase. Considerando as evidências que indicam que os compostos fenólicos são eficazes contra a resistência bacteriana, o presente estudo visou avaliar a atividade antibacteriana dos compostos allylbenzeno e allylanisole contra a estirpe de *Staphylococcus aureus* SA K4414, que transporta genes que codificam a β -lactamase e as proteínas QacA/B. As concentrações inibitórias mínimas (MICs) foram determinadas pelo método da microdiluição do caldo. A presença da β -lactamase foi verificada através da associação do inibidor sulbactam com o antibiótico ampicilina, enquanto a sua inibição foi analisada através da redução da MIC da penicilina na presença de compostos fenólicos. A inibição da bomba de efluxo foi analisada através da redução do MIC do substrato da bomba Brometo de etídeo. A toxicidade contra *Drosophila melanogaster* foi determinada através de mortalidade e ensaios de geotaxia negativa seguindo o método de fumigação. Os resultados demonstraram que os compostos fenólicos não mostraram actividade antibacteriana directa relevante, com valores de MIC superiores a 1024 $\mu\text{g/mL}$. A associação de allylbenzeno e allylanisole com penicilina potenciou o seu efeito antibacteriano, reduzindo o seu MIC (512 $\mu\text{g/mL}$) para 128 $\mu\text{g/mL}$ e 256 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os compostos também reduziram a MIC do EtBr, indicando um possível efeito inibidor contra a enzima β -lactamase e a proteína eflux QacA/B. Quanto à toxicidade, o allylbenzeno (após 12 h) e o allylanisole (após 3 h) apresentaram EC50 de 19,21 μg e 11,07 μg , respectivamente. Estes compostos também causaram danos no sistema locomotor das moscas, que foi potenciado após o aumento das concentrações e do período de exposição. Conclui-se que os compostos allylbenzeno e allylanisole podem inibir os mecanismos de resistência mediados pela enzima β -lactamase e a proteína eflux QacA/B. No entanto, devido à toxicidade significativa observada, é necessária mais investigação para avaliar a segurança destes compostos.

Palavras-chave: Fenol; Resistência às drogas; Allylbenzeno; Allylanisole; Bomba QacA/B; métodos alternativos.

ABREVIATURAS

S. aureus resistente à meticilina (MRSA); força próton-motiva (PMF); Major Facilitator Superfamily (MFS); inibidores da bomba de efluxo (EPIs); brometo de etídeo (BrEt); m-clorofenilidrazona-carbonilcianeto(CCCP), clorpromazina (CPMZ); dimetilsulfóxido (DMSO);

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus está entre os principais microrganismos que causam infecções resistentes a antibióticos. Este patógeno possui fatores de virulência notáveis que contribuem para o desenvolvimento de manifestações como a síndrome do choque tóxico, intoxicação alimentar, e infecções de feridas de tecidos moles (Olatunji et al., 2020). Nas últimas décadas, esta espécie bacteriana tornou-se uma preocupação no ambiente hospitalar devido à sua capacidade de adquirir resistência a vários agentes antimicrobianos, tal como observado nas infecções causadas pela estirpe *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA)(Tsai et al., 2020).

A resistência antibiótica nas estirpes de *S. aureus* é mediada por vários mecanismos, que incluem: alteração da permeabilidade extracelular da membrana, produção de enzimas como a β -lactamase, mudança do alvo do medicamento, e efluxo ativo do antibiótico. Entre estes, o mecanismo enzimático de degradação por β -lactamases é notável por conferir resistência aos antibióticos β -lactâmicos como a penicilina. Estas enzimas atuam degradando o anel de β -lactâmico através da catálise hidrolítica, diminuindo assim a concentração efetiva do antibiótico, o que resulta na perda do efeito antibacteriano (Kapoor et al., 2020).

Outro mecanismo importante de resistência bacteriana é a extrusão ativa dos antibióticos promovida pelas proteínas presentes na membrana celular bacteriana conhecida como bombas de efluxo (EPs). Estas proteínas são responsáveis pela expulsão de substâncias nocivas como os antibióticos, através do transporte primário com o gasto de ATP, ou do transporte secundário utilizando a força proton-motriz (PMF) (Troncoso et al., 2017).

A proteína efflux QacA/B, expressa pela estirpe SA K4414 de *S. aureus*, pertence à família de transportadores *Major Facilitator Superfamily* (MFS). Esta proteína, codificada através de plasmídeos, está associada ao supressor QacR responsável pela extrusão de drogas hidrófobas

como a tetraciclina e outras substâncias estruturalmente distintas, e como tal, pode ser classificada como uma *Major Facilitator Superfamily* (MFS) (Chatterjee et al., 2016).

A identificação de compostos químicos com atividade antibacteriana contra estirpes de MDR desempenha um papel central no combate à resistência bacteriana. Neste contexto, β -lactamase e os inibidores da bomba de efluxo têm um potencial significativo para o desenvolvimento de adjuvantes antibióticos (Spengler et al., 2017).

Em relação aos produtos naturais bioativos, os compostos fenólicos destacam-se pela sua atividade antibacteriana contra estirpes resistentes, cujo mecanismo ocorre através da inibição tanto de proteínas de efluxo como de β -lactamases (Seukep et al., 2020). Entre os compostos fenólicos, o allylbenzeno e o allylanisole destacam-se pelas suas aplicações industriais. O allylbenzeno, um fenilpropanoide sintetizado através de uma reação de oxidação entre os ácidos p- Cúmarico e Cimânico, é amplamente utilizado na indústria farmacêutica como base para a formação de Lignanas (Costa, 1999). Por outro lado, o allylanisole, obtido principalmente de plantas medicinais como a "Albahaca", é utilizado na produção de produtos aromáticos (Garcez et al., 2009).

Apesar da sua importância no contexto industrial, as provas indicam que os compostos fenólicos podem ser significativamente tóxicos para as células eucarióticas e, portanto, os estudos toxicológicos são essenciais para estabelecer os riscos associados à utilização destes compostos. Neste sentido, o modelo *Drosophila melanogaster* demonstrou ser uma excelente ferramenta para a investigação dos mecanismos genéticos e perfis de toxicidade das substâncias para uso humano e exposição ambiental (Talyn et al., 2019).

Considerando a importância da investigação de novos compostos para combater a resistência bacteriana, este estudo visou investigar a atividade dos compostos fenólicos contra uma estirpe de *S. aureus* (SA K4414) expressando a enzima β -lactamase e a proteína efflux QacA/B, bem como avaliar a sua toxicidade utilizando o modelo *D. melanogaster*.

2. METODOLOGIA

2.1 CEPA BACTERIANA

A cepa de *S. aureus* utilizada foi SA-K4414, a qual possui resistência a β -lactâmicos, através do mecanismo de β -lactamase, bem como ao Brometo de Etídio através da proteína de efluxo QacA/B. A cepa foi fornecida pelo Prof. Glenn Kaatz (*Wayne State University*) e mantida

em meio de cultura de base de ágar sangue (Laboratórios Difco Ltda., Brasil). Antes do estudo, as células foram cultivadas em *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco) para crescimento, por 24 h em 36 °C.

2.2 MEIOS DE CULTURAS

Para realização dos testes microbiológicos foram utilizados os meios de cultura: *Heart Infusion Agar* (HIA, Difcolaboratories Ltda.) preparado de acordo com o fabricante e *Brain Heart Infusion* (BHI, AcumediaManufacturers Inc.) preparado na concentração de 10%.

2.3 SUBSTÂNCIAS

Os antibióticos (Penicilina e Ampicilina+ Sulbactam), Brometo de Etídio (BrEt) e o Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) juntamente com os compostos fenólicos Allylbenzene e Allylanilose foram obtidos da empresa Sigma AldrichCo. Ltd., e a Clorpromazina (CPMZ) obtida do laboratório Aché. Os antibióticos bem como os compostos fenólicos foram dissolvidos em Dimetilsulfóxido (DMSO) e água estéril até a concentração de 1024 µg/mL. A CMPZ e BrEt foram dissolvidos em água destilada estéril, enquanto que o CCCP foi dissolvido em metanol/água (1:3, v/v). Todas as substâncias foram diluídas até a concentração de 1024 µg/mL (CLSI, 2015).

2.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

O teste de Concentração Inibitória Mínima foi realizado pelo método de microdiluição em caldo. Após o período de 24 horas do semeio das cepas do estoque, foram preparados os inóculos em tubos de ensaios contendo 6 mL de solução salina estéril, sendo comparados à escala de Mcfarland 0.5 que corresponde a 10^8 UFC. Em seguida, foram preparados *ependorfs*® contendo 1440 µL do meio de cultura líquido BHI, e 160 µL do inóculo bacteriano, formando o volume final de 1,6 mL. Posteriormente, as fileiras da placa de microdiluição foram preenchidas com 100 µL da solução final do inóculo. sendo as fileiras 7 e 8 separadas para controle de crescimento bacteriano e as fileiras 9 e 10, para controle de esterilidade. Em seguida foi feita a microdiluição com os

compostos fenólicos (100 μL), em concentrações que variam de 512 $\mu\text{g/mL}$ até 0,5 $\mu\text{g/mL}$. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica na temperatura de 36 °C por 24 h. A leitura das placas foi realizada por observação de modificação da cor do meio, determinada pela adição de 20 μL Resazurina. O MIC foi definido como a mais baixa concentração onde o crescimento bacteriano não foi observado (CLSI, 2015); (JAVADERPOOL et al , 1996).

2.5 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE β -LACTAMASE

A verificação da presença de β -lactamase, foi realizada utilizando a CIM da Ampicilina e CIM da Ampicilina em associação com o inibidor da β -lactamase (Sulbactam) na concentração de 50% $\mu\text{L/mL}$. Em relação aos controles foram utilizadas as substâncias CMPZ e CCCP para verificar a presença do mecanismo de proteína de efluxo. Para confirmar a presença da enzima β -lactamase é necessário que ocorra uma diminuição de três vezes na MIC do inibidor Sulbactam junto com antibiótico em comparação a CIM da Ampicilina isolada (CLSI, 2015).

2.6 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE β -LACTAMASE

A inibição da β -lactamase, foi avaliada utilizando uma concentração subinibitória CIM/8 (128 $\mu\text{g/mL}$) dos compostos fenólicos Allylbenzene e Allylanilose para verificar sua capacidade de diminuir a MIC do antibiótico na cepa SA-K4414. 170 μL do inóculo bacteriano suspenso em solução salina estéril foi adicionado a um eppendorf's®, junto com a concentração subinibitória (128 $\mu\text{g/mL}$) dos compostos fenólicos Allylbenzene e Allylanilose e suplementado com BHI até atingir o volume final de 1700 μL . Esta solução foi então transferida para a placa de microdiluição e posteriormente foi feita a microdiluição com o antibiótico Penicilina (100 μL) em concentrações variando entre 512 $\mu\text{g/mL}$ até 0,5 $\mu\text{g/mL}$ Depois de 24 h, a leitura das placas foi realizada conforme citado anteriormente (CLSI, 2015).

2.7 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA BOMBA DE EFLUXO

A inibição da bomba de efluxo QacA/B foi testada utilizando a concentração subinibitória CIM/8 (128 µg/mL) dos compostos fenólicos Allylbenzene e Allylanilose com o objetivo de avaliar sua capacidade de diminuir a CIM do EtBr na cepa K4414. Foi utilizado o CCCP e CMPZ como inibidores padrão da bomba de efluxo na concentração subinibitória (MIC /8), respectivamente (1,41 e 128 µg/mL). Em seguida 170 µL do inóculo bacteriano foram suspensos em solução salina estéril e foram adicionados a um *Eppendorf's*®, juntamente com a concentração subinibitória (128 µg / mL) dos compostos fenólicos Allylbenzene e Allylanilose e suplementado com BHI até atingir o volume final de 1700 µL. Esta solução foi então transferida para a placa de microdiluição e posteriormente foi feita a microdiluição com o EtBr (100 µL) em concentrações variando entre 512 µg/mL até 0,5 µg/mL. Depois de 24 h, a leitura das placas foi realizada conforme citado anteriormente (CLSI, 2015).

2.8 ENSAIOS DE TOXICIDADE

2.8.1 Criação e estoque de *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster (estirpe de Harwich) foi obtida do National Species Stock Center, Bowling Green, OH. As moscas foram criadas de acordo com a metodologia de Cunha et al (2015). Em recipientes de vidro de 340 mL e cultivadas com o meio contendo: (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). Por ocasião do cozimento da mistura foi acrescentado 1 g de Nipagin (Metilparabeno). Após resfriamento nos recipientes de crescimento foi adicionado 1 mL de solução contendo *Saccharomyces cerevisiae*. As moscas foram mantidas a temperatura de 25 °C ± 1 °C e umidade relativa do ar de 60 % em estufa BOD com ciclo claro-escuro 12:12 h. Todos os testes foram realizados com a mesma estirpe.

2.8.2 Ensaio de mortalidade

Os testes também foram realizados de acordo com o método proposto por Cunha et al. (2015). Moscas adultas (machos e fêmeas) foram colocadas em recipientes de vidro de 130 mL (6 cm de altura e 6,5 cm de diâmetro), contendo na parte de cima do recipiente um papel filtro onde foi adicionado o composto para ser volatilizado, utilizando a técnica de fumigação. Para o controle foi adicionado somente no papel 1 mg/mL de sacarose a 20 % em água destilada. Para os grupos testes foram adicionados 1 mL da solução de sacarose mais as concentrações do composto, sendo que para o Allylbenzene foram utilizadas as concentrações de 1 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL e para Allylanilose foram utilizadas as concentrações de 1 mg/mL, 2 mg/mL e 3 mg/mL. Durante todo procedimento, foi mantido a temperatura controlada a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de 60 % em estufa BOD com ciclo claro: escuro 12: 12 h. Os experimentos foram realizados em triplicata onde cada “n” foi composto por dois recipientes, e em cada, foram colocadas 20 moscas (machos e fêmeas). As leituras para a verificação de mortalidade do composto Allylanilose foram realizadas nos horários de 1, 3, 5, e 7 horas, já para o composto Allylbenzene foi verificado a leitura a cada 3, 6, 9, 12, 24, 36 e 48 horas.

2.8.3 Ensaio de geotaxia negativa

A determinação do dano à capacidade locomotora foi realizada através do ensaio de geotaxia negativa descrita por Coulom e Birman (2009). Cada grupo de moscas vivas foram expostos ao composto Allylanilose nos horários de leitura de 1, 3, 5, e 7 horas e 3, 6, 9, 12, 24, 36 e 48 horas para o produto Allylbenzene. Em seguida as moscas foram conduzidas para o fundo dos recipientes e após um minuto, o número de moscas que atingiram 4 cm de altura do recipiente foi contado. Os ensaios foram repetidos duas vezes a intervalos de um minuto.

2.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os ensaios foram expressos como a média geométrica. A análise de hipótese estatística foi aplicada usando *Two-Way ANOVA*, seguido do teste post hoc de Bonferroni, usando o software GraphPadPrism 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS (CIM)

A análise antibacteriana revelou que os compostos fenólicos avaliados neste estudo tinham valores de MIC acima de 1024 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a penicilina antibiótica tinha uma MIC de 512 $\mu\text{g/mL}$. Estes resultados indicam que o allylbenzeno e o allylanisole não possui atividade antibacteriana clinicamente relevante. No entanto, as propriedades antibacterianas dos compostos fenólicos têm sido amplamente relatadas na literatura. Um estudo de Ahmad et al., (2012) polifenóis sintéticos mostrou atividade antibacteriana relacionada com a inibição da enzima ATP sintase. Além disso, foi observado que a posição dos grupos OH e a modificação da estrutura molecular dos fenóis são fatores críticos para a eficácia da atividade antibacteriana desta classe de constituintes.

3.2 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE β -LACTAMASE

Os resultados do presente estudo demonstraram que a combinação de sulbactam e ampicilina resultou numa redução de aproximadamente 5 vezes na MIC do antibiótico (645,08 $\mu\text{g/mL}$ para 80,63 $\mu\text{g/mL}$), contra a estirpe SAK4414 de *S. aureus*, indicando que esta estirpe apresenta resistência bacteriana mediada por β -lactamase de atividade enzimática. Por outro lado, a associação da ampicilina com os controles CMPZ e CCCP não teve efeito significativo sobre a MIC, indicando que a inibição das proteínas efluxo não é um mecanismo relevante para inverter a resistência bacteriana à penicilina neste modelo

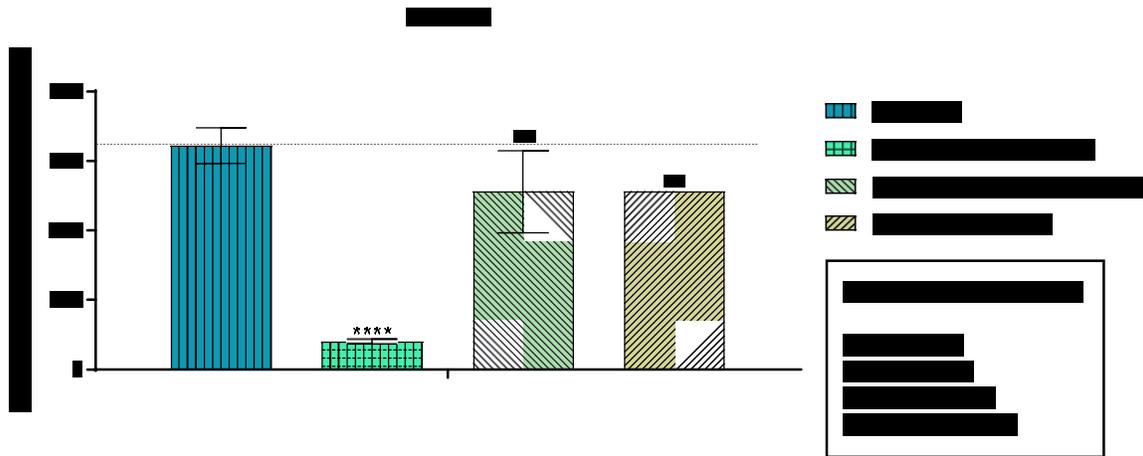


Figure 1: Avaliação da atividade de β -lactamase na estirpe de *S. aureus* K4414. Os valores representam a média geométrica \pm S.E.M. (erro padrão da média).

Como demonstrado no presente estudo, a estirpe SA K4414 de *S. aureus* expressa a enzima β -lactamase como um mecanismo de resistência à penicilina. Geralmente, as estirpes de *S. aureus* transportam plasmídeos de resistência, que podem expressar um único determinante de resistência, ou, no caso de plasmídeos de multi-resistência, transportam múltiplos determinantes de resistência (Orlović et al., 2016).

De fato, as estirpes de *S. aureus* do tipo selvagem geralmente apresentam múltiplos mecanismos de resistência devido à sua capacidade de partilhar diferentes características fenotípicas e genotípicas associadas à multirresistência, o que é favorecido pela existência de sistemas reguladores que modulam a expressão genética de acordo com a especificidade do substrato (Uddin e Ahn, 2017). Nesta espécie, a resistência à penicilina é principalmente conferida pela enzima β -lactamase, cuja expressão é regulada pelos genes *BlaZ*, *blaRI* e *blaI* (Malachowa e Deleo, 2010).

3.3 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE β -LACTAMASE

Como observado na figura 2, a combinação de compostos fenólicos allylanisole e allylbenzeno com penicilina reduziu a CIM deste antibiótico de 512 μ g/mL para 256 μ g/mL e 128 μ g/mL, respectivamente. De acordo com estes resultados, os compostos fenólicos potenciaram o

efeito antibacteriano da penicilina, sugerindo que podem atuar como potenciais inibidores do mecanismo de resistência enzimática mediado por β -lactamases..

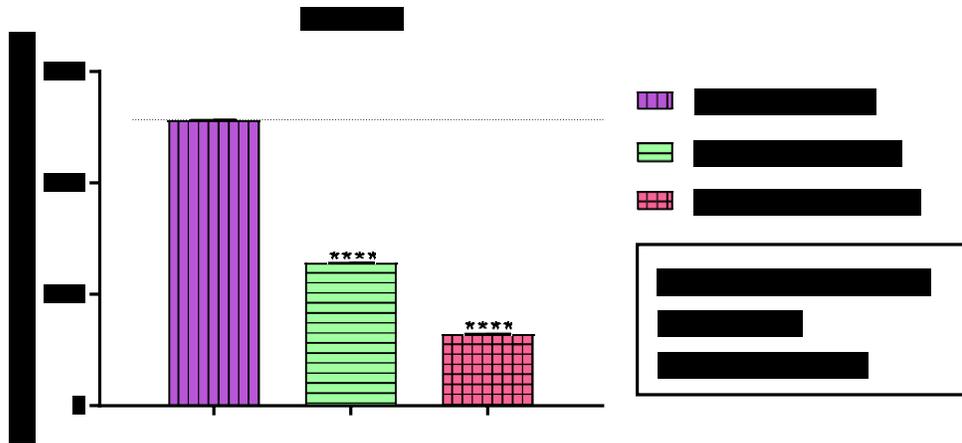


Figure 2. Inibição da actividade de β -lactamase pelos compostos fenólicos allylbenzene e allylanisoleína associados à penicilina. Os valores representam as médias geométricas \pm S.E.M. (erro padrão da média).

Em um estudo recente realizada por Elfaky et al., 2020 foi identificado produtos naturais com actividade inibitória significativa contra estirpes bacterianas portadoras do gene da β -lactamase, incluindo compostos fenólicos como o galato de catequina, galato de epicatequina, e galato de epigallocatequina, que demonstraram uma potente inibição da actividade da β -lactamase.

Trabelsi et al.(2020) identificaram compostos fenólicos no óleo essencial do *Punica granatum*, que mostraram efeitos antibacterianos sinérgicos em associação com o antibiótico amoxicilina contra *S. aureus*, reduzindo o antibiótico CIM de 512 mg/mL para 64 mg/mL. Os autores propuseram que os compostos fenólicos podem causar alterações na permeabilização da membrana bacteriana e inibição enzimática, resultando numa actividade antibiótica potencializada.

Outro estudo de Scherf et al. (2020), demonstrou que a combinação de terpinoleno com oxacilina contra a estirpe K4100 de *S. aureus* reduziu a CIM antibiótica de 161,26 μ g/mL para 71,83 μ g/mL, indicando um aumento da actividade antibiótica possivelmente devido à inibição da β -lactamase pelo composto fenólico.

2.7 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA BOMBA DE EFLUXO

Neste estudo, demonstrámos que a combinação com os inibidores padrão CMPZ e CCCP resultou numa redução do EtBr MIC de 512 µg/mL para 256 µg/mL e 17 µg/mL respectivamente, provando a importância do mecanismo de efluxo mediado por QacA/B na resistência bacteriana do *S.aureus*. Consequentemente, a associação com allylanisole e allylbenzene reduziu a CIM do EtBr de 512 µg/mL para 406 µg/mL e 256 µg/mL, respectivamente. Estes resultados sugerem que ambos os compostos fenólicos podem atuar como inibidores da bomba de efluxo QacA/B.

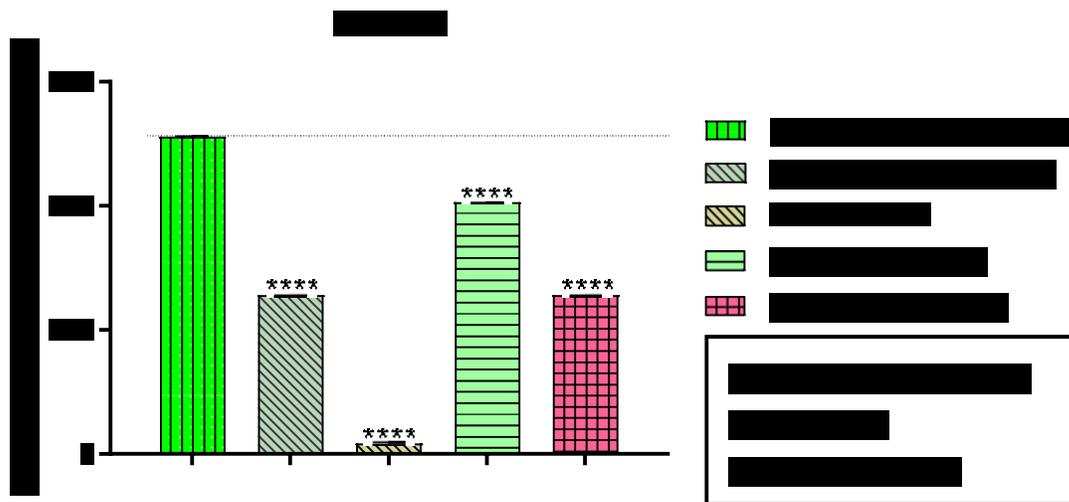


Figura 3. Inibição da bomba de efluxo QacA/B pelos compostos fenólicos allylbenzeno e allylanisole na associados a EtBr contra a estirpe SA K4414 de *S. aureus*. Os valores representam a média geométrica \pm S.E.M. (erro padrão da média).

Um estudo de Santos et al.(2018), sugeriu que os compostos fenólicos ácido cafeico e ácido gálico podem inibir a proteína de efluxo NorA expressa pela estirpe *S. aureus* 1199-B, corroborando os resultados da presente investigação, uma vez que ambos os estudos investigaram compostos pertencentes à mesma classe química contra proteínas efluxo da mesma família.

O mecanismo de ação dos compostos fenólicos como inibidores de PE é ainda mal compreendido. No entanto, Tintino et al. (2017) sugeriu que a ação do ácido tânico contra a estirpe da proteína TetK expressa pela estirpe IS-58 de *S. aureus* envolve um mecanismo dependente da quelatação do ferro, que impede a utilização deste íon como co-factor para manter a resistência da matriz de próton (PMF) desta bomba de efluxo.

O ensaio do brometo de etídio demonstrou que a associação deste substrato com compostos fenólicos resultou em um aumento do efeito antibacteriano, o que indica um aumento da concentração intracelular e, portanto, a inibição da QacA/B da proteína efluxo. No estudo realizado por Wang et al. (2018), o composto fenólico silibinina inibiu a transcrição do gene da mesma proteína na estirpe MrsA 41577 de *S. aureus* através de um mecanismo relacionado com a inibição do plasmídeo pSK1, invertendo assim a sensibilidade bacteriana aos antibióticos.

Estudos recentes indicaram que a terapia combinada envolvendo certos compostos químicos e antibióticos contra estirpes bacterianas MDR pode causar um efeito farmacocinético

multidireccional que resulta na inibição de diferentes mecanismos resistentes, recuperando o efeito terapêutico dos agentes antibacterianos (MAHIZAN et al., 2019).

3.3 ENSAIO DE MORTALIDADE E GEOTAXIA NEGATIVA COM *Drosophila melanogaster*

A análise da mortalidade em *D. melanogaster* revelou que o allylbenzeno tinha um EC 50 de 19,2 μg , enquanto o allylanisole apresentou EC 50 de 11,07 μg . É de notar que estes valores foram determinados em tempos de exposição diferentes, correspondentes a 12h e 3h, respectivamente, e, portanto, não são diretamente comparáveis.

A maior concentração testada de allylbenzeno (10 $\mu\text{L/mL}$) mostrou uma mortalidade significativa a partir da terceira hora de exposição. Por outro lado, a concentração de 1 $\mu\text{L/mL}$ não induziu mortalidade significativa (Figura 4). Portanto, podemos afirmar que a mortalidade relacionada com este composto aumenta de uma forma dependente da concentração.

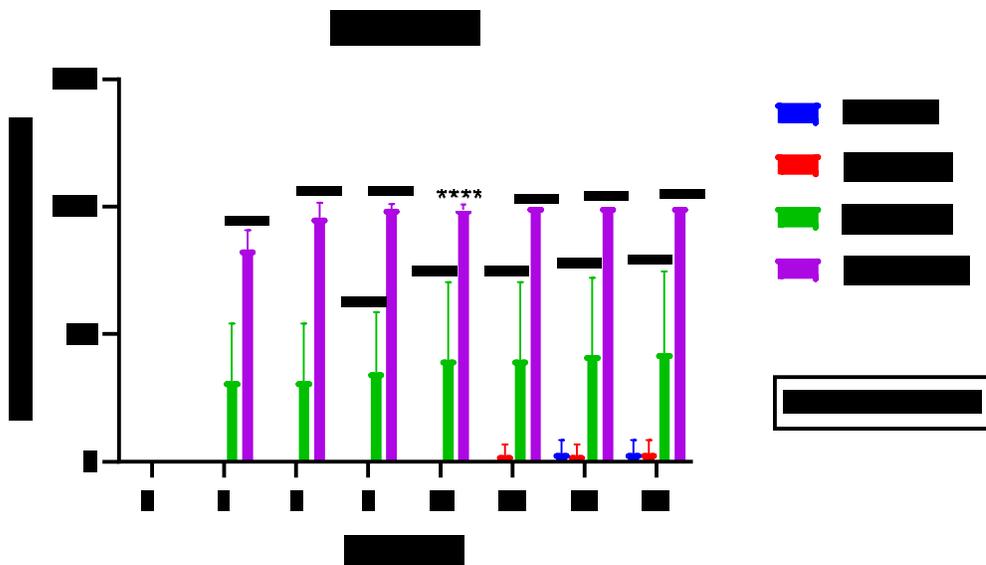


Figura 4: Determinação do efeito tóxico de diferentes concentrações de Allylbenzene em *D. melanogaster*

No que diz respeito ao efeito do allylanisole na mortalidade de *D. melanogaster*, todas as concentrações causaram mortalidade significativa após a terceira hora de exposição (Figura 5), mostrando uma toxicidade dependente do tempo e da concentração.

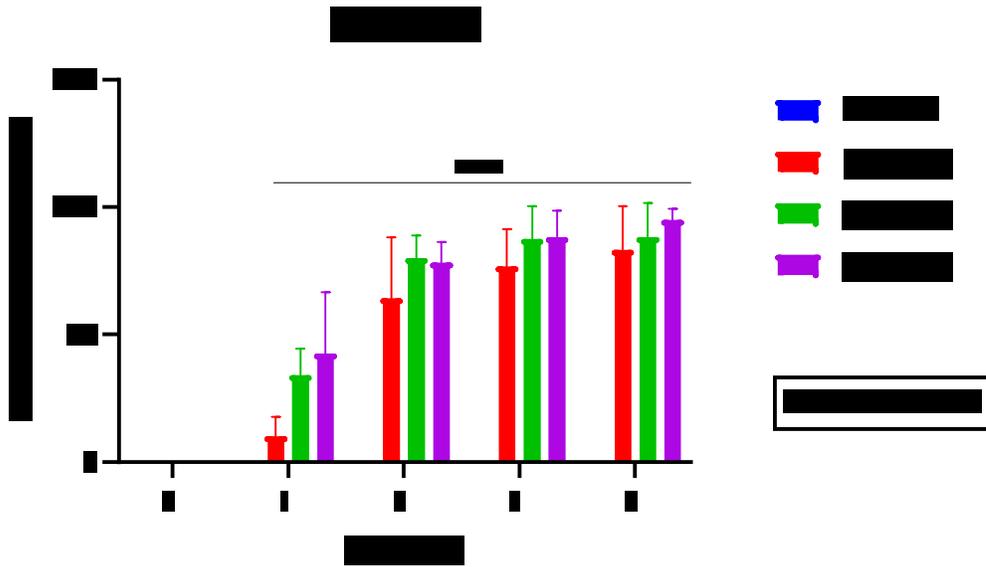


Figura 5: Determinação do efeito tóxico de diferentes concentrações de Allylanilose em *D. melanogaster*

No estudo realizado por Ebadollahi., (2020), o óleo essencial da planta medicinal *Satureja hortensis*L contendo como principal constituinte o Estragol cuja sinonímia é Allylanilose, foi possível observar seu efeito tóxico frente à espécie de inseto *Rhyzopertha dominica*, onde apresentou resultados toxicológicos significantes ocasionando mortalidade em 72 horas de exposição entre as concentrações utilizadas, é pressuposto que este efeito toxicológico é ocasionado por a interação sinérgica entre o principal constituinte Estragol e outros compostos fenólicos identificados nesta espécie vegetal.

No teste de geotaxia negativa é possível verificar a capacidade do composto de causar danos ao aparelho locomotor das moscas. A maior concentração de Allylbenzeno, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ apresentou dano a partir da primeira leitura até a terceira hora de exposição ao produto. Já a concentração de 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ apresentou dano significativo a partir da sexta hora de exposição, enquanto que a menor concentração testada, 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, não apresentou toxicidade considerável (Figura 6). Portanto, é possível afirmar que esse composto age de forma concentração-dependente.

Os resultados obtidos no presente estudo são semelhantes aos dados observados na pesquisa realizada por Silveira et al., (2020), onde os compostos fenólicos Timol e Carvacrol apresentaram dano ao aparelho locomotor de moscas adultas de *D. melanogaster* na maior concentração utilizada

a partir da terceira hora de leitura como também não houve resultados significantes em concentrações menores.

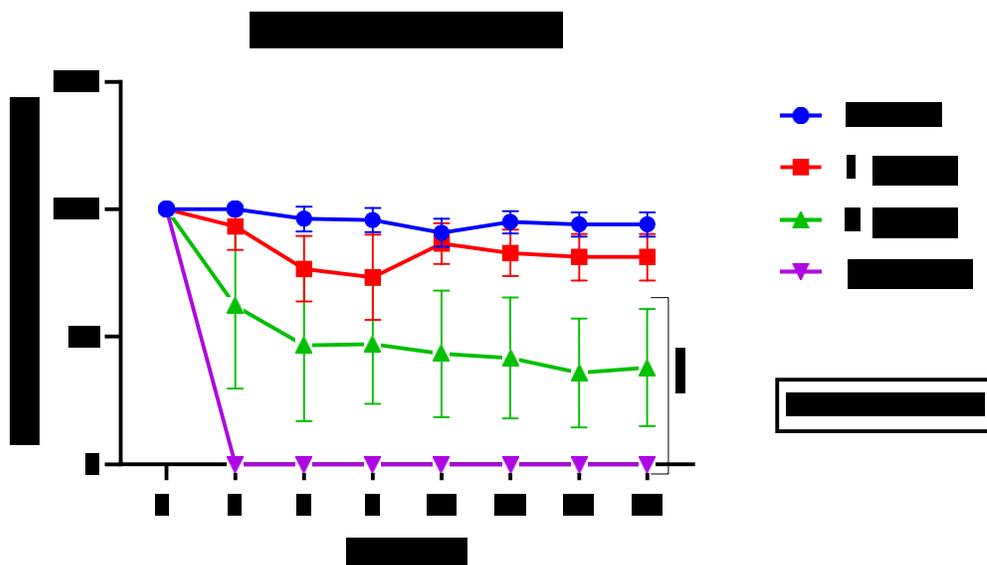


Figura 6: Determinação do efeito tóxico de concentrações variáveis de Allylbenzene sobre a capacidade locomotora de *D. melanogaster*

No teste de geotaxia negativa realizado com o Allylaniolose foi possível observar que este é capaz de gerar danos ao aparelho locomotor das moscas a partir da primeira hora em todas as concentrações testadas, sendo que a concentração de 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ a maior taxa de dano. No entanto, na terceira hora de exposição todas as concentrações demonstraram dano ao aparelho locomotor das moscas, tornando esse composto tóxico para as moscas de acordo com a concentração exposta (Figura 7).

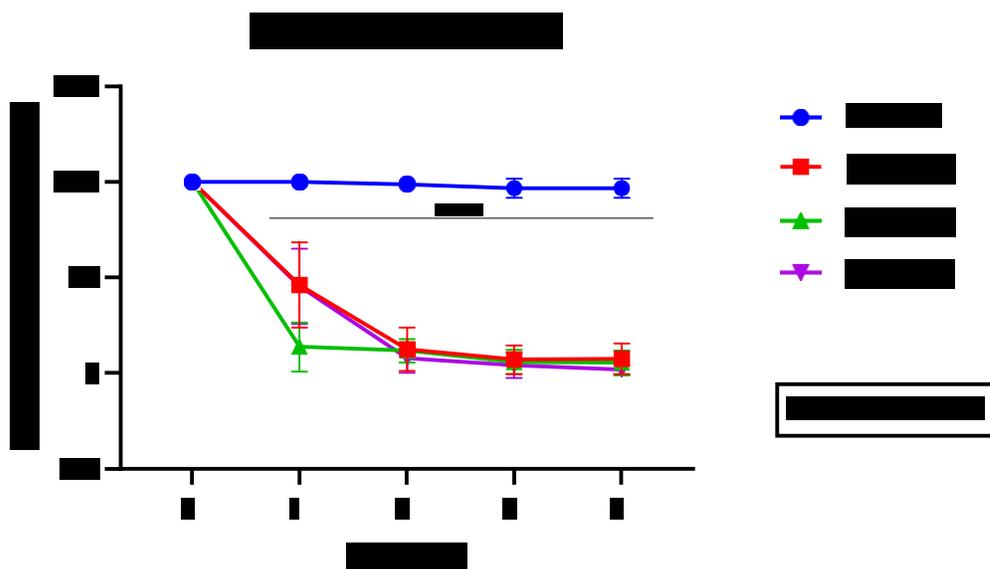


Figura 7: Determinação do efeito tóxico de concentrações variáveis de Allylanilose sobre a capacidade locomotora de *D. melanogaster*

Em um estudo realizado por Bezerra et al., (2020), o composto isolado Estragol apresentou efeito tóxico ao aparelho locomotor das moscas adultas de *D. melanogaster* após a primeira hora de leitura em todas as concentrações testadas. Compostos químicos e metabólitos secundários de plantas medicinais apresentam mecanismos que induzem efeito toxicológico e dano ao aparelho locomotor, dentre eles é pressuposto que estas substâncias ocasionem uma redução na liberação de acetilcolinesterase (AChE) resultando em uma ativação neuronal ao longo prazo conseqüentemente levando a morte (HU et al., 2019).

No presente estudo, observou-se que ambos os compostos fenólicos apresentavam uma toxicidade significativa. Embora estas substâncias estejam estruturalmente relacionadas, diferem na presença de alguns grupos funcionais como o grupo carbonila, presente no Allybenzeno, mas ausente no Allylanilose. Contudo, de um ponto de vista químico, a presença de um grupo carbonila geralmente confere atividade tóxica e mutagénica a muitos compostos (Semchyshyn, 2014).

6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que os compostos fenólicos allybenzeno e allylanilose não apresentaram atividade antibacteriana directa contra a estirpe K4414 de *S. aureus*. Contudo, estes

compostos potenciaram o efeito antibacteriano da penicilina, que está supostamente associado à capacidade dos compostos fenólicos de inibir a actividade enzimática de β -lactamases.

No ensaio de inibição da bomba de efluxo utilizando o método do brometo de etídio, os compostos reduziram o substrato CIM, indicando que estes compostos fenólicos provavelmente atuam como inibidores da proteína QacA/B efflux expressa pela estirpe *S. aureus* SA-K4414. Por outro lado, os testes de toxicidade num modelo *D. melanogaster* model revelaram que ambos os compostos apresentam toxicidade significativa, causando mortalidade e danos locomotores nestes organismos. Estes dados encorajam estudos adicionais para elucidar os mecanismos moleculares de interacção com alvos bacterianos associados à resistência aos antibióticos, bem como para caracterizar o perfil toxicológico destes compostos em células eucarióticas.

Contribuições do autor: T.P.L.: Conceptualização; C.R.B.S., N.S.M., J.R.S.; M. A. C.d. S.: Metodologia; T.S.P.: Análise; J.R.-F.: Escrita e revisão crítica; F.A.B.d.C., H.D.M.C., A.P.P.P Conceptualização, Supervisão e Coordenação.

Financiamento: Esta investigação não recebeu qualquer financiamento externo

Agradecimentos: Os autores agradecem à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP (BPI 02/2020 NÚMERO: BP4-0172-00168.01.00 / 20 SPU Nº: 09673071/2020); Coordenação para a Melhoria do Pessoal do Ensino Superior - CAPES; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não ter qualquer conflito de interesses em relação a esta publicação.

REFERÊNCIAS

1. Ahmad, Z., Ahmad, M., Okafor, F., Jones, J., Abunameh, A., Cheniya, R.P., Kady, I.O., 2012. Effect of structural modulation of polyphenolic compounds on the inhibition of *Escherichia coli* ATP synthase. *Int. J. Biol. Macromol.* 50, 476–486.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.01.019>
2. Bezerra, A.H., Bezerra, S.R., Macêdo, N.S., de Sousa Silveira, Z., dos Santos Barbosa, C.R., de Freitas, T.S., Muniz, D.F., de Sousa Júnior, D.L., Júnior, J.P.S., Donato, I.A., Coutinho, H.D.M., da Cunha, F.A.B., 2020. Effect of estragole over the RN4220 *Staphylococcus aureus* strain and its toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Life Sci.*
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118675>
3. Chatterjee, S., Zahid, M.S.H., Awasthi, S.P., Chowdhury, N., Asakura, M., Hinenoya, A., Ramamurthy, T., Iwaoka, E., Aoki, S., Yamasaki, S., 2016. In vitro inhibition of cholera toxin production in *vibrio cholerae* by methanol extract of sweet fennel seeds and its components. *Jpn. J. Infect. Dis.* 69, 384–389.
<https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2015.421>
4. Clsi, 2013. Clinical and Laboratory Standards Institute Standards Development Policies and Process. *Clin. Lab. Stand. Int.*
5. Costa, P.R.R., 2000. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados Paulo. *Quim. Nova* 23, 357–369.
6. Coulom, H., Birman, S., 2004. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* 24, 10993–10998.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2993-04.2004>
7. Cunha, F.A.B., Wallau, G.L., Pinho, A.I., Nunes, M.E.M., Leite, N.F., Tintino, S.R., Da Costa, G.M., Athayde, M.L., Boligon, A.A., Coutinho, H.D.M., Pereira, A.B., Posser, T., Franco, J.L., 2015. Eugenia uniflora leaves essential oil induces toxicity in *Drosophila melanogaster*: Involvement of oxidative stress mechanisms. *Toxicol. Res. (Camb)*. 4, 634–644. <https://doi.org/10.1039/c4tx00162a>
8. Dos Santos, J.F.S., Tintino, S.R., de Freitas, T.S., Campina, F.F., Irwin, I.R., Siqueira-Júnior, J.P., Coutinho, H.D.M., Cunha, F.A.B., 2018. In vitro e in silico evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 57, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.03.001>
9. . EbadollahI., 2020. Estragole-rich essential oil of summer savory (*Satureja hortensis* L.) as an eco-friendly alternative to the synthetic insecticides in management of two stored-products insect pests 115.

10. Elfaky, M.A., El-Halawany, A.M., Koshak, A.E., Alshali, K.Z., El-Araby, M.E., Khayat, M.T., Abdallah, H.M., 2020. Bioassay Guided Isolation and Docking Studies of a Potential β -Lactamase Inhibitor from *Clutia myricoides*. *Molecules* 25, 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules25112566>
11. Garcez, F.R., Garcez, W.S., Hamerski, L., Miguita, C.H., 2009. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. *Quim. Nova* 32, 407–411. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000200026>
12. Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., Wang, Y., 2020. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107>
13. Hu, X., Fu, W., Yang, X., Mu, Y., Gu, W., Zhang, M., 2019. Ecotoxicology and Environmental Safety Effects of cadmium on fecundity and defence ability of *Drosophila melanogaster*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 171, 871–877. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.029>
14. Javadpour MM, Juban MM, Lo WC, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM, Becker CL, M.M., 1996. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J Med Chem* 39, 3107–13. <https://doi.org/doi:10.1021/jm9509410>.
15. Mahizan et al., 2019. Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens. *Molecules* 24, 2631. <https://doi.org/10.3390/molecules24142631>
16. Malachowa, N., Deleo, F.R., 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 3057–3071. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0389-4>
17. Olatunji, S., Yu, X., Bailey, J., Huang, C., Zapotoczna, M., Bowen, K., Rem, M., Müller, R., Scanlan, E.M., Geoghegan, J.A., Olieric, V., Caffrey, M., 2020. Structures of lipoprotein signal peptidase II from *Staphylococcus aureus* complexed with antibiotics globomycin and myxovirescin. *Nat. Commun.* 11, 140. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13724-y>
18. Orlović, J., Miljković-Selimović, B., Dinić, M., Ristić, L., 2016. Resistance in *staphylococcus Aureus*: The never-ending story. *Acta Fac. Medicae Naissensis* 33, 153–162. <https://doi.org/10.1515/afmnai-2016-0017>
19. Scherf, J.R., Barbosa dos Santos, C.R., Sampaio de Freitas, T., Rocha, J.E., Macêdo, N.S., Mascarenhas Lima, J.N., Melo Coutinho, H.D., Bezerra da Cunha, F.A., 2020. 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. *Microb. Pathog.* 149. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104528>
20. Semchyshyn, H.M., 2014. Reactive Carbonyl Species In Vivo : Generation and Dual

- Biological Effects. *Sci. World J.* 14, 27–31. <https://doi.org/10.1155/2014/417842>
21. Seukep, A.J., Kuete, V., Nahar, L., Sarker, S.D., Guo, M., 2020. Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification. *J. Pharm. Anal.* <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.11.002>
 22. Silveira, Z.D.S., Freitas, T.S. De, Douglas, H., Coutinho, M., Balbino, V.Q., 2020. molecules Evaluation of the Antibacterial Activity and Efflux Pump Reversal of Thymol and Carvacrol against *Staphylococcus aureus* and Their Toxicity in 1–10. <https://doi.org/10.3390/molecules25092103>
 23. Spengler, G., Kincses, A., Gajdács, M., Amaral, L., 2017. New roads leading to old destinations: Efflux pumps as targets to reverse multidrug resistance in bacteria. *Molecules* 22. <https://doi.org/10.3390/molecules22030468>
 24. Talyn, B., Lemon, R., Badoella, M., Melchiorre, D., Villalobos, M., Elias, R., Muller, K., Santos, M., Melchiorre, E., 2019. Roundup®, but not Roundup-ready® corn, increases mortality of *Drosophila melanogaster*. *Toxics* 7. <https://doi.org/10.3390/toxics7030038>
 25. Tintino, S.R., Morais-Tintino, C.D., Campina, F.F., Costa, M. do S., Menezes, I.R.A., de Matos, Y.M.L.S., Calixto-Júnior, J.T., Pereira, P.S., Siqueira-Junior, J.P., Leal-Balbino, T.C., Coutinho, H.D.M., Balbino, V.Q., 2017. Tannic acid affects the phenotype of *Staphylococcus aureus* resistant to tetracycline and erythromycin by inhibition of efflux pumps. *Bioorg. Chem.* 74, 197–200. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.08.004>
 26. Trabelsi, A., Amine, M., Kaibi, E., Horchani, A., Chekir-ghedira, L., Ghedira, K., 2020. Phytochemical Study and Antibacterial and Antibiotic Modulation Activity of Punica granatum (Pomegranate) Leaves. *Hindawi Sci.* 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8271203>
 27. Troncoso, C., Pavez, M., Santos, A., Salazar, R., Barrientos Díaz, L., 2017. Structural and physiological implications of bacterial cell in antibiotic resistance mechanisms. *Int. J. Morphol.* 35, 1214–1223. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022017000401214>
 28. Tsai, H.C., Tao, C.W., Hsu, B.M., Yang, Y.Y., Tseng, Y.C., Huang, T.Y., Huang, S.W., Kuo, Y.J., Chen, J.S., 2020. Multidrug-resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from a subtropical river contaminated by nearby livestock industries. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 200, 110724. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110724>
 29. Uddin, M.J., Ahn, J., 2017. Associations between resistance phenotype and gene expression in response to serial exposure to oxacillin and ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 65, 462–468. <https://doi.org/10.1111/lam.12808>
 30. Wang, D., Xie, K., Zou, D., Meng, M., Xie, M., 2018. Inhibitory effects of silybin on the efflux pump of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Mol. Med. Rep.* 18, 827–833. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018>

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que os compostos fenólicos Alilbenzeno e Allylanilose não apresentaram atividade antibacteriana direta, porém, quando associados ao antibiótico Penicilina ocasionaram um possível efeito inibitório frente à enzima β -lactamase expressada pela cepa SA K4414. Estes compostos também demonstraram uma possível reversão de resistência por inibição da proteína de efluxo QacA/B através da redução da CIM do Brometo de Etídio. Em relação aos testes com *D. melanogaster* foi observado através dos ensaios de mortalidade e geotaxia que os compostos Alilbenzeno e Allylanilose apresentaram toxicidade relevante como também causaram danos ao aparelho locomotor das moscas. Diante dos dados expostos é evidenciado que os compostos fenólicos analisados apresentam atividade biológica frente à cepa multirresistente SA K4414, porém estes também demonstraram efeitos toxicológicos. Embora apresente toxicidade, estes compostos futuramente podem ser empregados de outras formas como uso tópico em humanos ou como sanitizantes, sendo necessário a realização de outras metodologias para compreensão das respectivas atividades biológicas e seus mecanismos de ação.

REFERÊNCIAS

- AGUAYO-REYES, A. et al. Bases moleculares de la resistencia a meticilina en. **Rev Chilena Infectol**, v. 35, n. 1, p. 7–14, 2018.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão Phenolic compounds in foods – A brief review. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2017.
- ANNUNZIATO, G. Strategies to Overcome Antimicrobial Resistance (AMR) Making Use of Non-Essential Target Inhibitors : A Review. **Molecules**, v. 24, 2019.
- BALBINO, E. et al. Biomedicine & Pharmacotherapy Estragole prevents gastric ulcers via cytoprotective , antioxidant and immunoregulatory mechanisms in animal models. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 130, n. July, p. 110578, 2020.
- BOLLA, J. R. et al. Assembly and regulation of the chlorhexidine-specific efflux pump AceI. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 29, p. 17011–17018, 2020.
- BONOMO, R. A. β -Lactamases: A focus on current challenges. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2017.
- BUSH, K. crossm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 10, p. 1–20, 2018.
- CHAHARDEHI, A. M.; ARSAD, H.; LIM, V. *Zebrafish* as a successful animal model for screening toxicity of medicinal plants. **Plants**, v. 9, n. 10, p. 1–35, 2020.
- COSTA, T. R. D. et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: Structural and mechanistic insights. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 343–359, 2015.
- DISEASES, H. C. *Drosophila melanogaster* , un modelo animal emergente en el estudio de enfermedades cardíacas humanas. **Rev Argent Cardiol**, v. 84, p. 424–430, 2016.
- DOS SANTOS, D. S.; FARIAS RODRIGUES, M. M. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 3, p. 29, 2017.
- ELFAKY, M. A. et al. Bioassay Guided Isolation and Docking Studies of a Potential β -

Lactamase Inhibitor from *Clutia myricoides*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 11, p. 1–13, 2020.

FAULKNER, K. C.; HURLEY, K. A.; WEIBEL, D. B. HHS Public Access. **Bioorg med chem lett**, v. 26, n. 22, p. 5539–5544, 2017.

GABALLAH, S. et al. Evaluation of developmental toxicity, developmental neurotoxicity, and tissue dose in *zebrafish* exposed to genX and other PFAS. **Environmental Health Perspectives**, v. 128, n. 4, p. 1–22, 2020.

GARCEZ, F. R. et al. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Quimica Nova**, v. 32, n. 2, p. 407–411, 2009.

GOUDARZI, M. et al. Molecular Characterization , Drug Resistance and Virulence Analysis of Constitutive and Inducible Clindamycin Resistance *Staphylococcus aureus* Strains Recovered from Clinical Samples , Tehran – Iran. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, 2020.

GULUA, L. et al. Chemical constituents , antioxidant , antimicrobial and anti-lipase activities of composites derived from green tea , lemon peels and red wine lees. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 1–11, 2019.

GUO, Y. et al. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. March, p. 1–11, 2020.

HANDZLIK, J.; MATYS, A.; KIEĆ-KONONOWICZ, K. Recent Advances in Multi-Drug Resistance (MDR) Efflux Pump Inhibitors of Gram-Positive Bacteria *S. aureus*. **Antibiotics**, p. 28–45, 2013.

HANG, Y. et al. Principles and current strategies targeting metallo - β - lactamase mediated antibacterial resistance. n. December 2019, p. 1558–1592, 2020.

HASSANZADEH, S. et al. Microbial Pathogenesis Epidemiology of e ffl ux pumps genes mediating resistance among *Staphylococcus aureus* ; A systematic review. **Microbial Pthogenesis**, v. 139, n. October 2019, p. 103850, 2020.

HILTUNEN, T.; VIRTA, M.; ANNA-LIISA, L. Antibiotic resistance in the wild: An

ecoevolutionary perspective. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, n. 1712, 2017.

HU, X. et al. Ecotoxicology and Environmental Safety Effects of cadmium on fecundity and defence ability of *Drosophila melanogaster*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 171, n. August 2018, p. 871–877, 2019.

HYUN, J. et al. Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 2015.

JANG, S. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* and their clinical. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 1–8, 2016.

KOURTESI, C. et al. Microbial Efflux Systems and Inhibitors : Approaches to Drug Discovery and the Challenge of Clinical Implementation. **The Open Microbiology Journal**, v. 7, p. 34–52, 2013.

LEKSHMI, M. et al. Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator superfamily in *Staphylococcus aureus*. v. 4, n. September 2017, p. 1–18, 2018.

LIMA, M. F. P. et al. *Staphylococcus aureus* And Nosocomial Infections - Literature Review. **Revista Uningá**, v. 21, n. 2178–2571, p. 32–39, 2015.

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

MAHIZAN ET AL. Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens. **Molecules**, v. 24, 2019.

MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 18, p. 3057–3071, 2010.

MARTINS, C. et al. Chemico-Biological Interactions Myristicin from nutmeg induces apoptosis via the mitochondrial pathway and down regulates genes of the DNA damage response pathways in human leukaemia K562 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 218, p. 1–9, 2014.

MCGUINNESS, W. A.; MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE**, v. 90, p. 269–281,

2017.

MIKLASIŃSKA-MAJDANIK, M. et al. Phenolic compounds diminish antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* clinical strains. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 10, 2018.

MORELLO, L. G. et al. Avaliação das características clínicas e epidemiológicas de pacientes com e sem sepse nas unidades de terapia intensiva de um hospital terciário Assessment. **Einstein**, v. 16, n. 4, p. 1–6, 2018.

MOUSAVIAN, M. et al. Design , synthesis , and SAR study of isopropoxy allylbenzene derivatives as 15-lipoxygenase inhibitors. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 23, p. 4–9, 2018.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **MICROBIOLOGY SPECTRUM**, v. 10, p. 1–24, 2016.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. Suppl 7, p. 521–528, 2019.

OGAWARA, H. Comparison of Antibiotic Resistance Mechanisms in Antibiotic-Producing and Pathogenic Bacteria. **Molecules**, v. 24, p. 1–55, 2019.

PALACIOS, A. R.; ROSSI, M.; MAHLER, G. S. Metallo- β -Lactamase Inhibitors Inspired on Snapshots from the Catalytic Mechanism. **Med Res Rev**, n. Figure 1, 2020.

PALZKILL, T. Metallo- β -lactamase structure and function. v. 1277, p. 91–104, 2013.

PEREIRA, A. V. et al. Effects of associations of tannins from *Anacardium occidentale* and *Anadenanthera colubrina* with cephalosporin against bovine *Staphylococcus aureus* isolates. **Arq. Inst. Biol**, v. 85, p. 1–8, 2018.

RAMACHANDRAN, G. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis. **Landes Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 213–218, 2014.

RAMONA, A. et al. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds

antibacterial activity. **Microbiological Research**, 2016.

RANAWEERA, I. et al. Structural comparison of bacterial multidrug efflux pumps of the major facilitator superfamily. **Trends Cell Mol Biol**, v. 10, p. 131–140, 2016.

REMY, U. G.; BÜRKLE, H. B. A.; LANDSIEDEL, G. H. D. R. Toxicology : a discipline in need of academic anchoring — the point of view of the German Society of Toxicology. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 10, p. 1881–1893, 2015.

ROCHA, J. D. et al. Vernonanthuran polyanthes leaves aqueous extract enhances doxorubicin genotoxicity in somatic cells of *Drosophila melanogaster* and presents no antifungal activity against *Candida* spp . **Braz. J. Biol**, v. 76, n. 4, p. 928–936, 2016.

RODR, P.; LOZANO-SANCHEZ, J.; BORR, I. Structure – Biological Activity Relationships of Extra-Virgin Olive Oil Phenolic Compounds : Health Properties and Bioavailability. **Antioxidants**, v. 9, p. 1–17, 2020.

SANDANAYAKA, V. P.; PRASHAD, A. S. Resistance to β -Lactam Antibiotics : Structure and Mechanism Based Design of β -Lactamase Inhibitors. p. 1145–1165, 2002.

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

SEUKEP, A. J. et al. Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2019.

SEUKEP, A. J. et al. Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, n. xxxx, 2020.

SPENGLER, G. et al. New roads leading to old destinations: Efflux pumps as targets to reverse multidrug resistance in bacteria. **Molecules**, v. 22, n. 3, 2017.

STRAHL, H.; ERRINGTON, J. Bacterial Membranes: Structure, Domains, and Function. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, n. June, p. 519–538, 2017.

STROM, B. L.; CLARKE, S. R.; SHEA, P. J. Efficacy of 4-allylanisole-based products for protecting individual loblolly pines from *Dendroctonus frontalis* Zimmermann (Coleoptera :

Scolytidae). **Journal of Forest Research**, v. 665, p. 659–665, 2004.

TALYN, B. et al. Roundup®, but not Roundup-ready® corn, increases mortality of *Drosophila melanogaster*. **Toxics**, v. 7, n. 3, 2019.

TODD, O. A.; PETERS, B. M. Candida albicans and *Staphylococcus aureus* pathogenicity and polymicrobial interactions: Lessons beyond Koch's postulates. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 3, 2019.

TOOKE, C. L. et al. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 18, p. 3472–3500, 2019.

TRABELSI, A. et al. Phytochemical Study and Antibacterial and Antibiotic Modulation Activity of *Punica granatum* (Pomegranate) Leaves. **Hindawi Scientifica**, v. 2020, 2020.

TRONCOSO, C. et al. Structural and physiological implications of bacterial cell in antibiotic resistance mechanisms. **International Journal of Morphology**, v. 35, n. 4, p. 1214–1223, 2017.

WAMBA, B. E. N. et al. Antistaphylococcal and Antibiotic Resistance Modulatory Activities of Thirteen Cameroonian Edible Plants against Resistant Phenotypes. **International Journal of Microbiology**, v. 2018, 2018.

WANG, D. et al. Inhibitory effects of silybin on the efflux pump of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Molecular Medicine Reports**, v. 18, n. 1, p. 827–833, 2018.

WRIGHT, H.; BONOMO, R. A.; PATERSON, D. L. New agents for the treatment of infections with Gram-negative bacteria: Restoring the miracle or false dawn? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, 2017.

ANEXOS

ANEXO A: Comprovante de submissão do manuscrito Pharmacological activities of phenolic compounds Allylbenzene and allylanisole: Inhibition of β -lactamase enzyme and the QacA/B efflux protein and toxicity profile in a *Drosophila melanogaster* model.

PHYTOmedicine Editorial Manager
 Role: Author Username: hdmcoutinho@gmail.com

Submissions Being Processed for Author Henrique Douglas Coutinho, Professor

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		Pharmacological activities of phenolic compounds allylbenzene and allylanisole: Inhibition of β -lactamase enzyme and the QacA/B efflux protein and toxicity profile in a <i>Drosophila melanogaster</i> model	Jul 03, 2021	Jul 03, 2021	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

Phytomedicine

Pharmacological activities of phenolic compounds allylbenzene and allylanisole: Inhibition of β -lactamase enzyme and the QacA/B efflux protein and toxicity profile in a *Drosophila melanogaster* model

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	2-ICNTP- Natural Toxicology & Pharmacology (Original articles)
Section/Category:	Infectious diseases
Keywords:	Phenol; Drug Resistance; Allylbenzene; Allylanisole; Pump QacA/B; alternative methods
Corresponding Author:	Henrique Douglas Coutinho, ProfessorURCA Crato, BRAZIL
First Author:	Thais Pereira Lopes
Order of Authors:	Thais Pereira Lopes
	Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa
	Nair Silva Macêdo
	Jackelyne Roberta Scherf
	Maria Apoliana Costa dos Santos
	Thiago Sampaio de Freitas

	Jaime Ribeiro Filho
	Henrique Douglas Coutinho, Professor
	Francisco Assis Bezerra da Cunha
	Alysson Pontes Pinheiro
Abstract:	<p>The increasing emergence of multidrug-resistant bacteria has demanded the discovery of new drugs capable of inhibiting bacterial resistance mechanisms, such as those mediated by efflux proteins and β-lactamase enzyme. Considering the evidence indicating that phenolic compounds are effective against bacterial resistance, the present study aimed to evaluate the antibacterial activity of allylbenzene and allylanisole against the <i>Staphylococcus aureus</i> strain SA K4414, which carries genes encoding the β-lactamase and QacA/B proteins. The Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) were determined by the broth microdilution method. The presence of β-lactamase was verified through the association of the inhibitor sulbactam with the antibiotic ampicillin, while its inhibition was analyzed through the reduction of the MIC of penicillin in the presence of phenolic compounds. The efflux pump inhibition was analyzed by the reduction in the MIC of the pump substrate Ethidium bromide. The toxicity against <i>Drosophila melanogaster</i> was determined through mortality and negative geotaxis trials following the fumigation method. The results demonstrated that the phenolic compounds did not show relevant direct antibacterial activity, with MIC values above 1024 $\mu\text{g/mL}$. The association of allylbenzene and allylanisole with penicillin potentiated its antibacterial effect, reducing its MIC (512 $\mu\text{g/mL}$) to 128 $\mu\text{g/mL}$ and 256 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The compounds also reduced the MIC of EtBr, indicating a possible inhibitory effect against the β-lactamase enzyme and the efflux protein QacA/B. Regarding toxicity, allylbenzene (after 12 h) and allylanisole (after 3 h) presented EC_{50} of 19.21 μg and 11.07 μg, respectively. These compounds also caused damage to the locomotor system of flies, which was potentiated following increasing concentrations and exposure period. It is concluded that the compounds allylbenzene and allylanisole can inhibit the resistance mechanisms mediated by the β-lactamase enzyme and the efflux protein QacA/B. However, due to the significant toxicity observed, further research is required to assess the safety of these compounds.</p>

ANEXO B: MANUSCRITO ORIGINAL

Pharmacological activities of phenolic compounds allylbenzene and allylanisole: Inhibition of β -lactamase enzyme and the QacA/B efflux protein and toxicity profile in a *Drosophila melanogaster* model

Thais Pereira Lopes^a, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa^a, Nair Silva Macêdo^b, Jackelyne Roberta Scherf^c, Maria Apoliana Costa dos Santos^a, Thiago Sampaio de Freitas^d, Jaime Ribeiro Filho^e, Henrique Douglas Melo Coutinho^{f,*}, Francisco Assis Bezerra da Cunha^a, Alysson Pontes Pinheiro^g

a Laboratory of Semi-Arid Bioprospecting (LABSEMA), Regional University of Cariri-URCA, Crato, CE, Brazil; thaishonorato001@gmail.com (T.P.L); cristinase75@gmail.com (C.R.d.S.B.); apolianacosta14@gmail.com (M. A. C.d. S); cunha.urca@gmail.com (F.A.B.d.C).

b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB), Universidade Federal do Pernambuco, Recife, PE, CE, Brazil; naiirmacedo@gmail.com(N.S.M).

c Laboratory of Antibiotics Federal University of Pernambuco - Federal do Pernambuco, Recife, PE, CE, Brazil; jackelyne_scherf@yahoo.com.br (J.R.S.)

d Laboratory of Simulations and Molecular Spectroscopy (LASEMOL), Regional University of Cariri-URCA, Crato, CE, Brazil; thiagocrato@hotmail.com (T.S.d.F.).

e Research Laboratory in Genetics and Translational Hematology, Instituto Gonçalo Moniz (IGM), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Salvador, BA, Brazil. jaime.ribeiro@ioc.fiocruz.br. (J. R. F)

f Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Regional University of Cariri-URCA, Crato, CE, Brazil; hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M.C.)

g Laboratory of Semi-Arid Crustacean Laboratory (LACRUSE), Regional University of Cariri-URCA, Crato, CE, Brazil; allyssonpp@hotmail.com (A. P. P)

* Corresponding author

Dr Henrique Douglas Melo Coutinho, Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Regional University of Cariri-URCA, Crato, CE, Brazil;
Tel: +55 88 9 92080462
E- mail address : hdmcoutinho@gmail.com (H. D. M .C)

Abstract

The increasing emergence of multidrug-resistant bacteria has demanded the discovery of new drugs capable of inhibiting bacterial resistance mechanisms, such as those mediated by efflux proteins and β -lactamase enzyme. Considering the evidence indicating that phenolic compounds are effective against bacterial resistance, the present study aimed to evaluate the antibacterial activity of compounds allylbenzene and allylanisole against the *Staphylococcus aureus* strain SA K4414, which carries genes encoding the β -lactamase and QacA/B proteins. The Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) were determined by the broth microdilution method. The presence of β -lactamase was verified through the association of the inhibitor sulbactam with the antibiotic ampicillin, while its inhibition was analyzed through the reduction of the MIC of penicillin in the presence of phenolic compounds. The efflux pump inhibition was analyzed by the reduction in the MIC of the pump substrate Ethidium bromide. The toxicity against *Drosophila melanogaster* was determined through mortality and negative geotaxis trials following the fumigation method. The results demonstrated that the phenolic compounds did not show relevant direct antibacterial activity, with MIC values above 1024 $\mu\text{g/mL}$. The association of allylbenzene and allylanisole with penicillin potentiated its antibacterial effect, reducing its MIC (512 $\mu\text{g/mL}$) to 128 $\mu\text{g/mL}$ and 256 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The compounds also reduced the MIC of EtBr, indicating a possible inhibitory effect against the β -lactamase enzyme and the efflux protein QacA/B. Regarding toxicity, allylbenzene (after 12 h) and allylanisole (after 3 h) presented EC_{50} of 19.21 μg and 11.07 μg , respectively. These compounds also caused damage to the locomotor system of flies, which was potentiated following increasing concentrations and exposure period. It is concluded that the compounds allylbenzene and allylanisole can inhibit the resistance mechanisms mediated by the β -lactamase enzyme and the efflux protein QacA/B. However, due to the significant toxicity observed, further research is required to assess the safety of these compounds.

Keywords: Phenol; Drug Resistance; Allylbenzene; Allylanisole; Pump QacA/B; alternative methods.

ABBREVIATIONS

Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA); Proton-motive force (PMF); Major Facilitator Superfamily (MFS); efflux pump inhibitors (EPIs); ethidium bromide (BrEt); m-chlorophenylhydrazonocarbonylcyanide(CCCP), chlorpromazine (CPMZ); Dimethylsulfoxide (DMSO);

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus among the main microorganisms that cause antibiotic-resistant infections. This pathogen has notable virulence factors that contribute to the development of manifestations such as toxic shock syndrome, food poisoning, and soft tissue wound infections(Olatunji et al., 2020). In recent decades, this bacterial species has become a concern in the hospital environment due to its ability to acquire resistance to several antimicrobial agents, as observed in infections caused by the Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) strain(Tsai et al., 2020).

Antibiotic resistance in *S. aureus* strains is mediated by several mechanisms, which include: alteration of extracellular membrane permeability, production of enzymes such as β -lactamase, change of drug target, and active efflux of the antibiotic. Among these mechanisms, the enzymatic mechanism of degradation by β -lactamases is remarkable for conferring resistance to β -lactam antibiotics such as penicillin. These enzymes act by degrading the β -lactam ring through hydrolytic catalysis, thus decreasing the effective concentration of the antibiotic, which results in the loss of the antibacterial effect(Kapoor et al., 2020).

Another important bacterial resistance mechanism is the active extrusion of the antibiotic promoted by proteins present in the bacterial cell membrane known as efflux pumps (EPs). These proteins are responsible for expelling harmful substances such as antibiotics, through primary transport with the expenditure of ATP, or secondary transport using the proton-motive force (PMF)(Troncoso et al., 2017).

The efflux protein QacA/B, expressed by the strain SA K4414 of *S. aureus*, belongs to the Major Facilitator Superfamily (MFS) family of transporters. This protein, encoded through plasmids, is associated with the QacR suppressor responsible for the extrusion of hydrophobic drugs such as tetracycline and other structurally distinct substances, and as such, can be classified as a Multi-Drug EP (Chatterjee et al., 2016).

The identification of chemical compounds with antibacterial activity against MDR strains plays a central role in combating bacterial resistance. In this context, β -lactamase and efflux pump inhibitors have significant potential for the development of antibiotic adjuvants (Spengler et al., 2017).

With regard to bioactive natural products, phenolic compounds stand out for their antibacterial activity against resistant strains, whose mechanism occurs through the inhibition of both efflux proteins and β -lactamases (Seukep et al., 2020). Among phenolic compounds, allylbenzene and allylanisole stand out for their industrial applications. Allylbenzene, a phenylpropanoid synthesized through an oxidation reaction between p-Cumaric and Cymenic acids, is widely used in the pharmaceutical industry as a basis for the formation of Lignans (Costa, 1999). On the other hand, allylanisole, obtained mainly from medicinal plants such as “Albahaca”, is used in the production of aromatic products (Garcez et al., 2009).

Despite their importance in the industrial context, evidence indicates that phenolic compounds can be significantly toxic to eukaryotic cells and, therefore, toxicological studies are essential to establish the risks associated with the use of these compounds. In this sense, the *Drosophila melanogaster* model has been shown an excellent tool for the investigation of genetic mechanisms and toxicity profiles of substances for human use and environmental exposure (Talyn et al., 2019).

Considering the importance of investigating new compounds to combat bacterial resistance, this research aimed to investigate the activity of phenolic compounds against a *S. aureus* (SA K4414) strain expressing the β -lactamase enzyme and the efflux protein QacA/B, as well as to evaluate their toxicity using the *D. melanogaster* model.

2. METHODOLOGY

2.1 BACTERIAL STRAIN

The antibacterial tests were performed using the SAK4414 strain of *S. aureus*, which is resistant to β -lactam antibiotics and ethidium bromide, through the expression of β -lactamase and QacA/B efflux protein, respectively. This strain was provided by Prof. Glenn Kaatz (Wayne State University) and maintained in a blood-agar culture medium

(Difcolaboratories Ltda., Brazil). Before the study, cells were grown in Heart Infusion Agar (HIA, Difco) for 24 h at 36 °C.

2.2 CULTURE MEDIA

The tests were performed using Heart Infusion Agar (HIA, Difcolaboratories Ltda.) prepared according to the manufacturer's instructions and Brain Heart Infusion (BHI, Acumedia Manufacturers Inc.) prepared at a concentration of 10%.

2.3 CHEMICALS

Antibiotics (penicillin and ampicillin+ sulbactam), ethidium bromide (BrEt), and m-chlorophenylhydrazoncarbonylcyanide (CCCP), as well as the phenolic compounds allylbenzene and allylanisole, were obtained from Sigma AldrichCo. Ltd., while chlorpromazine (CPMZ) was obtained from the Aché laboratory. Antibiotics, as well as phenolic compounds, were dissolved in Dimethylsulfoxide (DMSO) and sterile water to a concentration of 1024 µg/mL. CPMZ and BrEt were dissolved in sterile distilled water, while CCCP was dissolved in methanol/water (1:3, v/v). All substances were diluted to a concentration of 1024 µg/MI (CLSI, 2015).

2.4 MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION DETERMINATION (MIC)

The MIC was determined by the broth microdilution method. Following an incubation period of 24 h, the stock strains were transferred to test tubes containing 6 mL of sterile saline solution, and the inoculum was prepared in comparison with the 0.5 value of the Mcfarland scale, which corresponds to 10^8 CFU. Then, 160 µL of bacterial inoculum were transferred to eppendorfs® tubes containing 1440 µL of BHI liquid culture medium. Subsequently, the wells on a microdilution plate were filled with 100 µL of the final inoculum solution. The Phenolic compounds (100 µL) were then added to these wells at concentrations ranging from 512 µg/mL to 0,5 µg/mL. The plates were incubated in the oven at 36 °C for 24 h. After this period, the wells were added with 20 µL resazurin and the readings were determined by observing the change in the color of

the medium. The MIC was defined as the lowest concentration where bacterial growth was not observed (CLSI, 2015); (JAVADERPOOL et al, 1996).

2.5 ANALYSIS OF β -LACTAMASE ACTIVITY

The analysis of β -lactamase activity was determined by establishing the decrease in the MIC of ampicillin following its combination with sulbactam (50%), a β -lactamase inhibitor. According to this method, a three-fold decrease in the MIC of ampicillin following the combination with the β -lactamase inhibitor indicates the presence and activity of the resistance enzyme. In this test, CPMZ and CCCP were used as control drugs to verify the activation of efflux mechanisms (CLSI, 2015).

2.6 EVALUATION OF β -LACTAMASE ACTIVITY INHIBITION

To evaluate the inhibition of β -lactamase activity, we analyzed the ability of compounds allylbenzene and allylanisole, used at a sub-inhibitory concentration (MIC/8), to decrease the MIC of penicillin against the SAK4414 strain. Briefly, 170 μ L of bacterial inoculum suspended in sterile saline solution was added to test tubes containing the phenolic compounds diluted in BHI medium at a concentration of 128 μ g/mL and a final volume of 1700 μ L. This solution was then transferred to the wells on a microdilution plate, followed by the addition of penicillin (100 μ L) at concentrations ranging from 512 μ g/mL to 0.5 μ g/mL. After 24 h, the readings were performed as previously described (CLSI, 2015).

2.7 EVALUATION OF EFFLUX PUM INIBITION

Efflux pump (QacA/B) inhibition was determined by evaluating the ability of compounds allylbenzene and allylanisole, used at a sub-inhibitory concentration (MIC/8), to decrease the MIC of EtBr against the SAK4414 strain (CLSI, 2015). As for the analysis β -lactamase activity inhibition, 170 μ L of bacterial inoculum suspended in sterile saline solution was added to test tubes containing the phenolic compounds diluted in BHI medium at a concentration of 128 μ g/mL and a final volume of 1700 μ L. This solution was then transferred to the wells on a microdilution plate, followed by the addition of

penicillin (100 μL) at concentrations ranging from 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. After 24 h, the readings were performed as previously described. The control drugs CCCP and CPMZ were used as standard EP inhibitors at the subinhibitory concentrations (MIC/8) of 1.41 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

2.8 TOXICOLOGICAL EVALUATION

2.8.1 *Drosophilamelanogaster* culture

The strain Harwich of *Drosophila melanogaster* was obtained from the National Species Stock Center (Bowling Green, OH). The flies were bred according to the methodology described by (Da Cunha et al., 2015). The medium was prepared in glass containers containing 83% corn mass, 4% sugar, 4% freeze-dried milk, 4% soy bran, 4% wheat bran, and 1% salt in a final volume of 340 mL. The mixture was cooked and then, 1 g of Nipagin (Methylparaben) was added. After cooling in the growth flasks, 1 mL of a solution containing *Saccharomyces cerevisiae* was added. The flies were kept at a temperature of $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ and a relative humidity of 60% in a BOD oven with a 12:12 h light-dark cycle.

2.8.2 Mortality determination

Adult flies (male and female) were placed in 130 mL glass containers (6 cm high and 6.5 cm in diameter), with a filter paper on top. The compounds were added to the filter paper and volatilized using the fumigation technique. In the control group, 1 ml of a 20% sucrose solution in distilled water was added to the filter paper. For the test groups, in addition to the sucrose solution, different concentrations of the compounds allylbenzene (1 mg/mL, 5 mg/mL and 10 mg/mL) and allylanisole (1 mg/mL, 2 mg/mL and 3 mg/mL) were added mL). These procedures were carried out at a controlled temperature of $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 60% relative humidity in a BOD oven with a light: dark cycle of 12:12 h. The experiments were carried out in triplicate where each “n” was composed of two containers, containing 20 flies (male and female) each. Readings for verification of mortality were taken after 1, 3, 5, and 7 hours in the allylanisole group, and after 3, 6, 9, 12, 24, 36, and 48 hours in the allylbenzene group (Cunha et al., 2015)

2.8.3 Negative geotaxis assay

This test was used to assess damage to locomotor capacity caused by treatment with phenolic compounds, as established by Coulom and Birman (2009). Therefore, each group of live flies was exposed to the compounds allylanisole and allylbenzene, and the analyzes were performed at the same time intervals described in the previous session. Then, the flies were driven to the bottom of the containers and after one minute, the number of flies that reached 4 cm in height of the container was counted. Every analysis was repeated twice at one-minute intervals.

2.9 STATISTICAL ANALYSIS

Data were expressed the geometric means. Statistical hypothesis analysis was applied through Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test, using the Graph Pad Prism software version 7.0.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Allylbenzene e allylanisole present weak antibacterial effects

The antibacterial analysis revealed that phenolic compounds evaluated in this study had MIC values above 1024 $\mu\text{g/mL}$, while the antibiotic penicillin had a MIC of 512 $\mu\text{g/mL}$. These results indicate that allylbenzene and allylanisole do not have clinically relevant antibacterial activity. However, the antibacterial properties of phenolic compounds have been extensively reported in the literature. A study by Ahmad *et al.*, (2012) synthetic polyphenols showed antibacterial activity related to the inhibition of the ATP synthase enzyme. Furthermore, it was observed that the position of the OH groups and the modification of the molecular structure of phenols are critical factors for the effectiveness of the antibacterial activity of this class of constituents.

3.2 ASSESSMENT OF β -LACTAMASE ACTIVITY

The results of the present study demonstrated that the combination of sulbactam and ampicillin resulted in approximately a 5-fold reduction in the MIC of the antibiotic (645.08 $\mu\text{g/mL}$ to 80.63 $\mu\text{g/mL}$), against the strain SAK4414 of *S. aureus*, indicating that this strain presents bacterial resistance mediated β -lactamase enzymatic activity. On the other hand, the association of ampicillin with CMPZ and CCCP controls had no significant effect on the MIC, indicating that the inhibition of efflux proteins is not a relevant mechanism for reversing bacterial resistance to penicillin in this model (Figure 1).

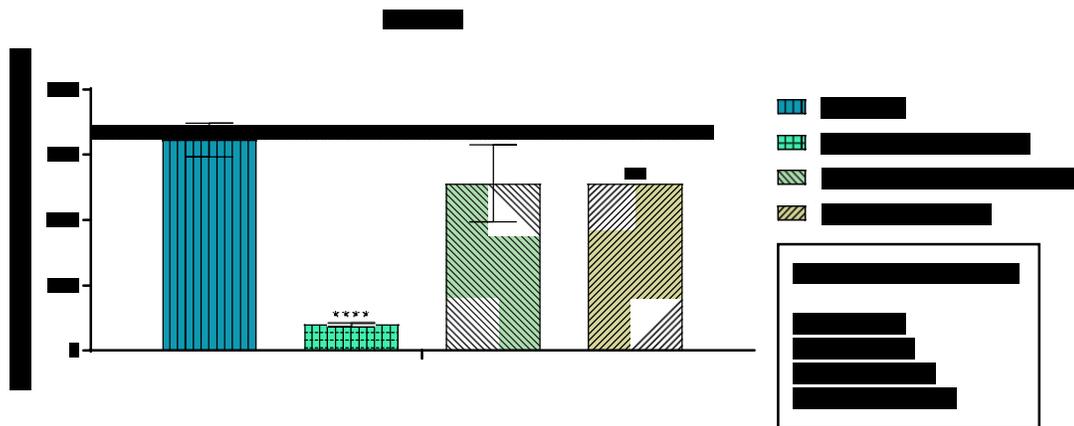


Figure 1: Assessment of β -lactamase activity in *S. aureus* strain K4414. The values represent the geometric means \pm S.E.M. (standard error of mean). Statistical analysis was performed using Two-way ANOVA, followed by the Bonferroni's post hoc test. **** $p < 0.0001$ vs control.

As demonstrated in the present study, the SA K4414 strain of *S. aureus* expresses the β -lactamase enzyme as a mechanism of resistance to penicillin. Generally, *S. aureus* strains carry resistance plasmids, which may express a single resistance determinant, or, in the case of multi-resistance plasmids, carry multiple resistance determinants (Orlović et al., 2016).

In fact, wild-type *S. aureus* strains usually present multiple resistance mechanisms due to their ability to share different phenotypic and genotypic characteristics associated with multidrug resistance, which is favored by the existence of regulatory systems that modulate gene expression according to the substrate specificity (Uddin and Ahn, 2017). In this species, penicillin resistance is mainly conferred by the β -lactamase enzyme,

whose expression is regulated by the *BlaZ*, *blaRI* and *blaI* genes (Malachowa and Deleo, 2010).

3.3 INHIBITION OF β -LACTAMASE ACTIVITY BY PHENOLIC COMPOUNDS

As observed in figure 2, the combination of phenolic compounds allylanisole and allylbenzene with penicillin reduced the MIC of this antibiotic from 512 $\mu\text{g/mL}$ to 256 $\mu\text{g/mL}$ and 128 $\mu\text{g/mL}$, respectively. According to these results, the phenolic compounds potentiated the antibacterial effect of penicillin, suggesting that they can act as potential inhibitors of the enzymatic resistance mechanism mediated by β -lactamases.

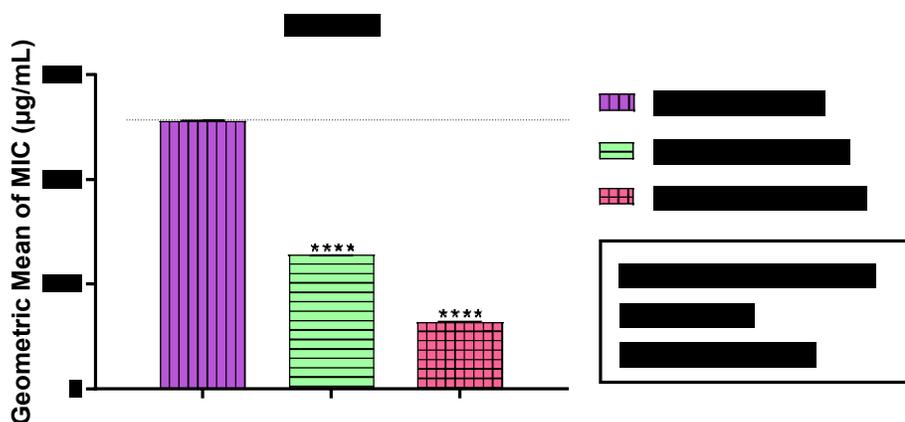


Figure 2. Inhibition of β -lactamase activity by phenolic compounds allylbenzene and allylanisole in association with penicillin. The values represent the geometric means \pm S.E.M. (standard error of mean). Statistical analysis was performed using Two-way ANOVA, followed by the Bonferroni's post hoc test.

Recent research carried out by Elfaky et al., 2020 identified natural products with significant inhibitory activity against bacterial strains carrying the β -lactamase gene, including phenolic compounds such as catechin gallate, epicatechin gallate, and epigallocatechin gallate, which demonstrated potent inhibition of the β -lactamase activity.

Trabelsi et al. (2020) identified phenolic compounds in the essential oil of the *Punica granatum*, which showed synergistic antibacterial effects in association with the β -lactam antibiotic amoxicillin against *S. aureus*, reducing the antibiotic MIC from 512 mg/mL to 64 mg/mL. The authors proposed that phenolic compounds can cause changes

in bacterial membrane permeabilization and enzymatic inhibition, resulting in a potentiated antibiotic activity. Another study by Scherf et al. (2020), demonstrated that the combination of terpinolene with oxacillin against the *S. aureus* strain K4100 reduced the antibiotic MIC from 161.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 71.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$, indicating enhanced antibiotic activity possibly due to β -lactamase inhibition by the phenolic compound.

2.7 INHIBITION OF THE QacA/BEFFLUX PUMP BY PHENOLIC COMPOUNDS

In this study, we demonstrated that the combination with the standard inhibitors CMPZ and CCCP resulted in a reduction in the EtBr MIC from 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively, proving the importance of the efflux mechanism mediated by QacA/B in the bacterial resistance of *S. aureus* strain K4414 (Figure 3). Accordingly, the association with allylanisole and allylbenzene reduced the MIC of EtBr from 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 406 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. These findings suggest that both phenolic compounds may act as inhibitors of the QacA/B efflux pump.

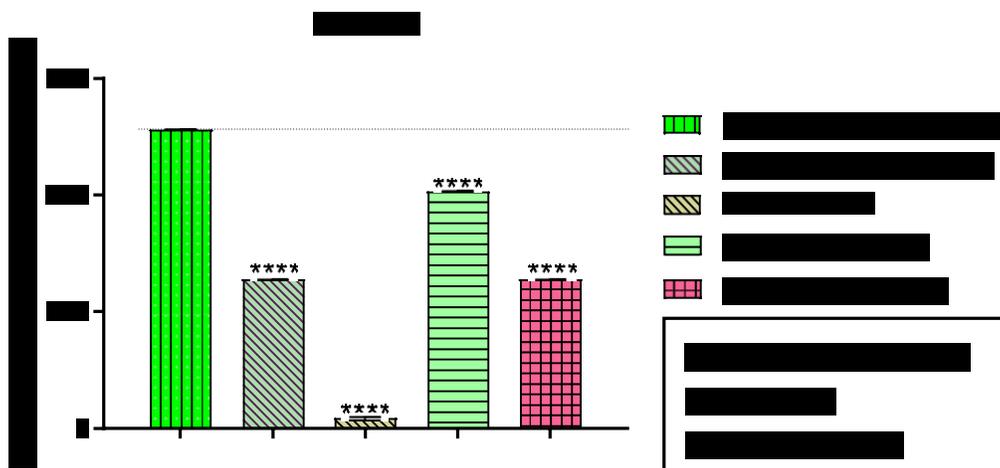


Figure 3. Inhibition of the QacA/B efflux pump by the phenolic compounds allylbenzene and allylanisolein association with EtBr against the MDR strain SA K4414 of *S. aureus*. The values represent the geometric means \pm S.E.M. (standard error of mean). Statistical analysis was performed using Two-way ANOVA, followed by the Bonferroni's post hoc test. CCCP: carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona. $P < 0,0001$ vs control.

A study by Santos et al. (2018), suggested that the phenolic compounds caffeic acid and gallic acid can inhibit the NorA efflux protein expressed by the *S. aureus* strain 1199-B, corroborating the findings of the present research since both studies investigated compounds belonging to the same chemical class against efflux proteins of the same family.

The mechanism of action of phenolic compounds as PE inhibitors is still poorly understood. Nevertheless, Tintino et al. (2017) suggested that the action of tannic acid against the TetK protein strain expressed by the IS-58 strain of *S. aureus* involves a mechanism dependent on iron chelation, which prevents the use of this ion as a cofactor to maintain the strength of the proton matrix (PMF) of this efflux pump.

The ethidium bromide assay demonstrated that the association of this substrate with phenolic compounds resulted in a potentiated antibacterial effect, which indicates an increase in the intracellular concentration and, therefore, inhibition of the Efflux protein QacA/B. In the study carried out by Wang et al. (2018) the phenolic compound silibinin inhibited the transcription of the gene of the same protein in the MrsA 41577 strain of *S.*

aureus through a mechanism related to the inhibition of the pSK1 plasmid, reversing thus bacterial sensitivity to antibiotics.

Recent studies have indicated that the combination therapy involving certain chemical compounds and antibiotics against MDR bacterial strains may cause a multidirectional pharmacokinetic effect that results in the inhibition of different resistant mechanisms, recovering the therapeutic effect of antibacterial agents (MAHIZAN et al., 2019).

3.3 EFFECTS ON MORTALITY AND NEGATIVE GEOTAXY IN *Drosophila melanogaster*

The analysis of mortality in *D. melanogaster* cultures revealed that allylbenzene had an LC50 of 19.2 μg , while allylanisole had an LC50 of 11.07 μg (not shown). It is noteworthy that these values were determined at different exposure times, corresponding to 12h and 3h, respectively, and therefore, are not directly comparable.

The highest tested concentration of allylbenzene (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$) showed significant mortality from the third hour of exposure. On the other hand, the concentration of 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ did not induce significant mortality (Figure 4). Therefore, we can state that mortality related to this compound increases in a concentration-dependent manner.

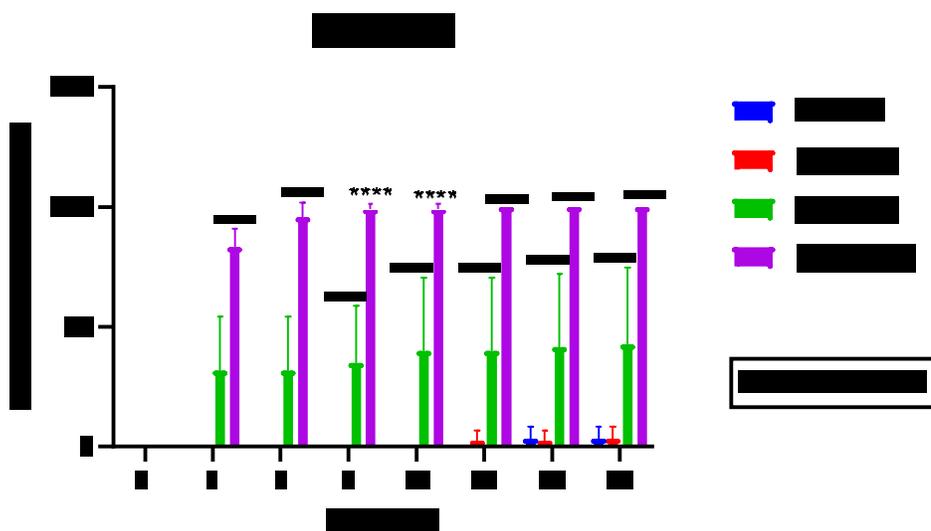


Figure 4. Mortality of *D. Melanogaster* following exposure to allylbenzene.

With regard to the effect of allylanisole on *D. melanogaster* mortality, all the concentrations caused significant mortality after the third hour of exposure (Figure 5), showing a time- and concentration-dependent toxicity.

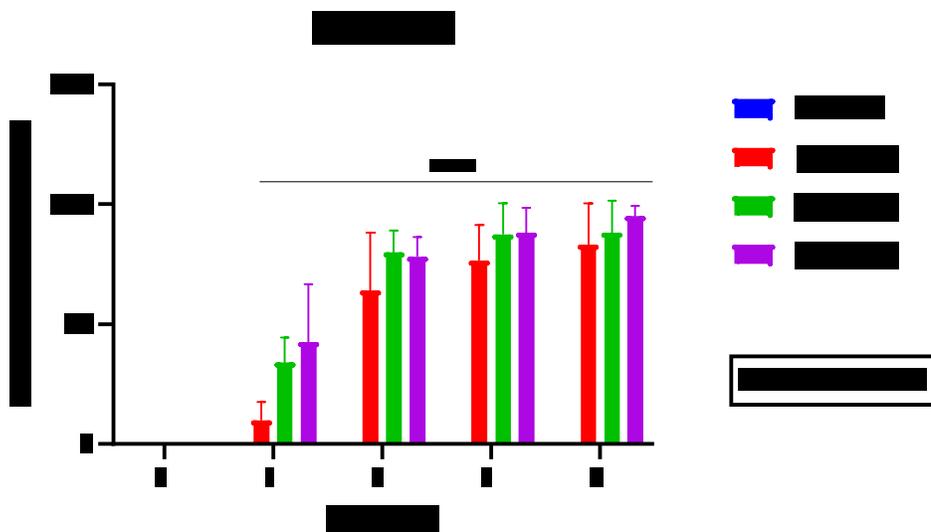


Figure 5: Mortality of *D. Melanogaster* following exposure to allylanisole.

Ebadollahi. (2020) carried out research with the essential oil obtained from the medicinal species *Saturejahortensis*, which has estragole (sinonimiaallylanisole) as a major constituent. It was demonstrated that this compound also presented significant toxicity against *Rhyzoperthadominica* after a 72 h exposure period. However, the authors assumed the high toxicity resulted from the synergistic interactions between the main constituent estragole and other phenolic compounds identified in the plant.

Accordingly, the negative geotaxis test revealed that both compounds caused damage to the flies' locomotor system. The highest concentration of allylbenzene impaired locomotion from the first reading to the third hour of exposure, while the intermediate concentration only affected locomotion from the sixth hour of exposure. On the other hand, the lowest concentration showed no considerable toxicity (Figure 6).

These findings are in agreement with those observed by Silveira et al. (2020), who demonstrated that the phenolic compounds thymol and carvacrol caused damage to the locomotor system of adult *D. melanogaster* flies in the highest concentration used from the third hour but did not cause significant changes in the lowest concentrations.

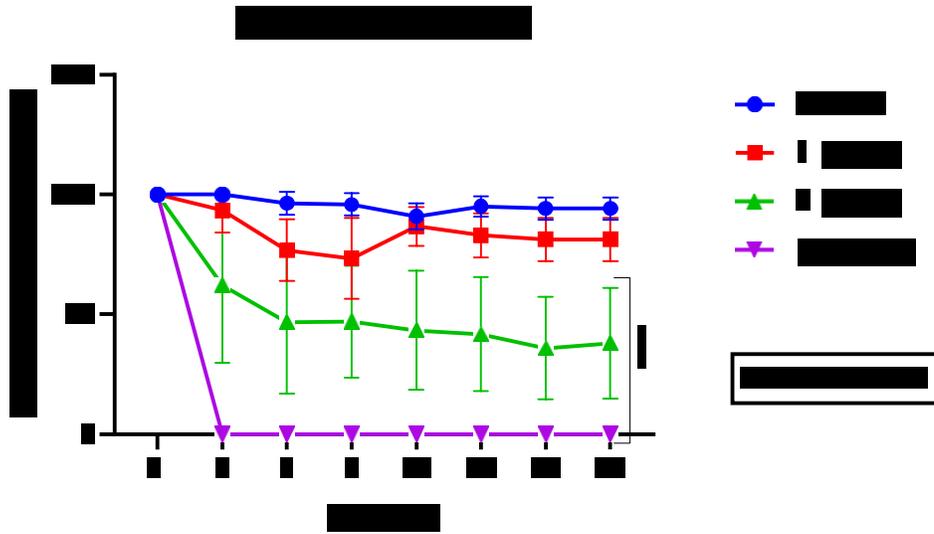


Figure 6. Effects of allylbenzene on the locomotor capacity of *D.melanogaster*

On the other hand, allylanilose impaired the locomotion of flies from the first hour at all concentrations tested, with a maximum effect at the concentration of 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$. However, at the third hour of exposure (Figure 7).

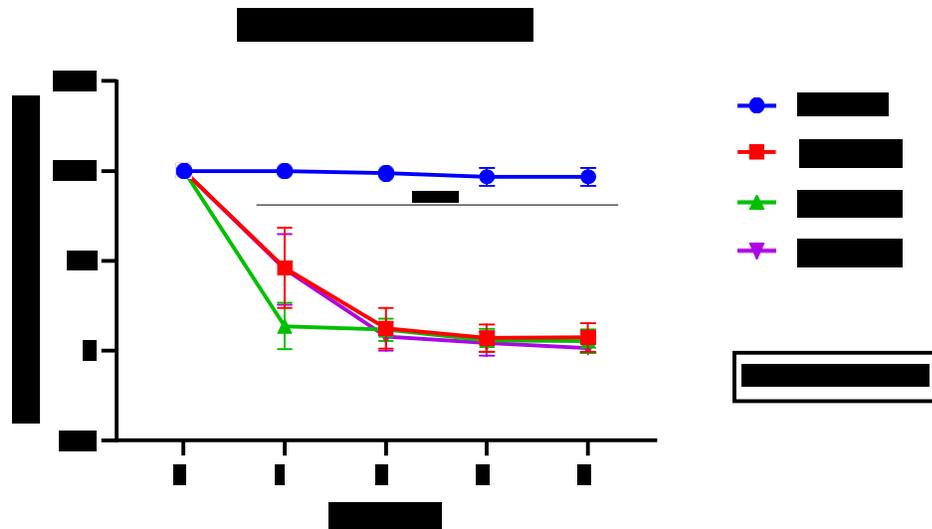


Figure 7. Effects of allylanilose on the locomotor capacity of *D.melanogaster*

In a study by Bezerra et al., (2020), the isolated compound estragole showed toxicity to the locomotor system of adult *D. melanogaster* flies after the first hour of exposure at all tested concentrations. Evidence indicates that chemical compounds and

secondary metabolites of medicinal plants affect the locomotor system mainly through mechanisms that lead to the reduction of acetylcholinesterase (AChE), resulting in prolonged neuronal activation and death(Hu et al., 2019).

In the present study, it was observed that both phenolic compounds presented significant toxicity. Although these substances are structurally related, they differ in the presence of some functional groups such as the carbonyl group, present in allylbenzene, but absent in allylanisole. However, from a chemical point of view, the presence of a carbonyl group usually confers toxic and mutagenic activity to many compounds(Semchyshyn, 2014).

6. CONCLUSION

The present research demonstrated that the phenolic compounds allylbenzene and allylanisole did not show direct antibacterial activity against the K4414 strain of *S. aureus*. However, these compounds potentiated the antibacterial effect of penicillin, which is supposedly associated with the ability of phenolic compounds to inhibit the enzymatic activity of β -lactamases.

In the efflux pump inhibition assay using the ethidium bromide method, the compounds reduced the substrate MIC, indicating that these phenolic compounds likely act as inhibitors of the QacA/B efflux protein expressed by the *S. aureus* strain SA-K4414. On the other hand, toxicity tests in a *D. melanogaster* model revealed that both compounds present significant toxicity, causing both mortality and locomotor damage in these organisms. These data encourage further studies to elucidate the molecular mechanisms of interaction with bacterial targets associated with antibiotic resistance, as well as to characterize the toxicological profile of these compounds in eukaryotic cells.

Author contributions: T.P.L.: Conceptualization; C.R.B.S., N.S.M., J.R.S.; M. A. C.d.S.: Methodology.; T.S.P.: Analysis.; J.R.-F.: Writing and critical review; F.A.B.d.C., H.D.M.C., A.P.P Conceptualization, Supervision and Coordination.

Funding: This research received no external funding

Acknowledgements: The authors are thankful to the Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP (BPI 02/2020 NÚMERO: BP4-0172-00168.01.00 / 20 SPU N°: 09673071/2020); Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - CAPES; National Council for Scientific and Technological Development - CNPq.

Conflicts of interest: The authors declare that they have no conflict of interest regarding this publication.

REFERENCES

1. Ahmad, Z., Ahmad, M., Okafor, F., Jones, J., Abunameh, A., Cheniya, R.P., Kady, I.O., 2012. Effect of structural modulation of polyphenolic compounds on the inhibition of *Escherichia coli* ATP synthase. *Int. J. Biol. Macromol.* 50, 476–486. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.01.019>
2. Bezerra, A.H., Bezerra, S.R., Macêdo, N.S., de Sousa Silveira, Z., dos Santos Barbosa, C.R., de Freitas, T.S., Muniz, D.F., de Sousa Júnior, D.L., Júnior, J.P.S., Donato, I.A., Coutinho, H.D.M., da Cunha, F.A.B., 2020. Effect of estragole over the RN4220 *Staphylococcus aureus* strain and its toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Life Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118675>
3. Chatterjee, S., Zahid, M.S.H., Awasthi, S.P., Chowdhury, N., Asakura, M., Hinenoya, A., Ramamurthy, T., Iwaoka, E., Aoki, S., Yamasaki, S., 2016. In vitro inhibition of cholera toxin production in *Vibrio cholerae* by methanol extract of sweet fennel seeds and its components. *Jpn. J. Infect. Dis.* 69, 384–389. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2015.421>
4. Clsi, 2013. Clinical and Laboratory Standards Institute Standards Development Policies and Process. *Clin. Lab. Stand. Int.*
5. Costa, P.R.R., 2000. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados Paulo. *Quim. Nova* 23, 357–369.
6. Coulom, H., Birman, S., 2004. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* 24, 10993–10998. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2993-04.2004>

7. Cunha, F.A.B., Wallau, G.L., Pinho, A.I., Nunes, M.E.M., Leite, N.F., Tintino, S.R., Da Costa, G.M., Athayde, M.L., Boligon, A.A., Coutinho, H.D.M., Pereira, A.B., Posser, T., Franco, J.L., 2015. Eugenia uniflora leaves essential oil induces toxicity in *Drosophila melanogaster*: Involvement of oxidative stress mechanisms. *Toxicol. Res. (Camb)*. 4, 634–644. <https://doi.org/10.1039/c4tx00162a>
8. Dos Santos, J.F.S., Tintino, S.R., de Freitas, T.S., Campina, F.F., Irwin, I.R., Siqueira-Júnior, J.P., Coutinho, H.D.M., Cunha, F.A.B., 2018. In vitro e in silico evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 57, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.03.001>
9. Ebadollahi, 2020. Estragole-rich essential oil of summer savory (*Satureja hortensis* L.) as an eco-friendly alternative to the synthetic insecticides in management of two stored-products insect pests 115.
10. Elfaky, M.A., El-Halawany, A.M., Koshak, A.E., Alshali, K.Z., El-Araby, M.E., Khayat, M.T., Abdallah, H.M., 2020. Bioassay Guided Isolation and Docking Studies of a Potential β -Lactamase Inhibitor from *Clutia myricoides*. *Molecules* 25, 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules25112566>
11. Garcez, F.R., Garcez, W.S., Hamerski, L., Miguita, C.H., 2009. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. *Quim. Nova* 32, 407–411. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000200026>
12. Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., Wang, Y., 2020. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107>
13. Hu, X., Fu, W., Yang, X., Mu, Y., Gu, W., Zhang, M., 2019. Ecotoxicology and Environmental Safety Effects of cadmium on fecundity and defence ability of *Drosophila melanogaster*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 171, 871–877. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.029>
14. Javadpour MM, Juban MM, Lo WC, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM, Becker CL, M.M., 1996. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J Med Chem* 39, 3107–13. <https://doi.org/doi:10.1021/jm9509410>.
15. Mahizan et al., 2019. Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens. *Molecules* 24, 2631. <https://doi.org/10.3390/molecules24142631>
16. Malachowa, N., Deleo, F.R., 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 3057–3071. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0389-4>
17. Olatunji, S., Yu, X., Bailey, J., Huang, C., Zapotoczna, M., Bowen, K., Rem, M., Müller, R., Scanlan, E.M., Geoghegan, J.A., Olieric, V., Caffrey, M., 2020.

- Structures of lipoprotein signal peptidase II from *Staphylococcus aureus* complexed with antibiotics globomycin and myxovirescin. *Nat. Commun.* 11, 140. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13724-y>
18. Orlović, J., Miljković-Selimović, B., Dinić, M., Ristić, L., 2016. Resistance in *staphylococcus Aureus*: The never-ending story. *Acta Fac. Medicae Naissensis* 33, 153–162. <https://doi.org/10.1515/afmnai-2016-0017>
 19. Scherf, J.R., Barbosa dos Santos, C.R., Sampaio de Freitas, T., Rocha, J.E., Macêdo, N.S., Mascarenhas Lima, J.N., Melo Coutinho, H.D., Bezerra da Cunha, F.A., 2020. 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. *Microb. Pathog.* 149. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104528>
 20. Semchyshyn, H.M., 2014. Reactive Carbonyl Species In Vivo : Generation and Dual Biological Effects. *Sci. World J.* 14, 27–31. <https://doi.org/10.1155/2014/417842>
 21. Seukep, A.J., Kuete, V., Nahar, L., Sarker, S.D., Guo, M., 2020. Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification. *J. Pharm. Anal.* <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.11.002>
 22. Silveira, Z.D.S., Freitas, T.S. De, Douglas, H., Coutinho, M., Balbino, V.Q., 2020. molecules Evaluation of the Antibacterial Activity and E ffl ux Pump Reversal of Thymol and Carvacrol against *Staphylococcus aureus* and Their Toxicity in 1–10. <https://doi.org/10.3390/molecules25092103>
 23. Spengler, G., Kincses, A., Gajdács, M., Amaral, L., 2017. New roads leading to old destinations: Efflux pumps as targets to reverse multidrug resistance in bacteria. *Molecules* 22. <https://doi.org/10.3390/molecules22030468>
 24. Talyn, B., Lemon, R., Badoella, M., Melchiorre, D., Villalobos, M., Elias, R., Muller, K., Santos, M., Melchiorre, E., 2019. Roundup®, but not Roundup-ready® corn, increases mortality of *Drosophila melanogaster*. *Toxics* 7. <https://doi.org/10.3390/toxics7030038>
 25. Tintino, S.R., Morais-Tintino, C.D., Campina, F.F., Costa, M. do S., Menezes, I.R.A., de Matos, Y.M.L.S., Calixto-Júnior, J.T., Pereira, P.S., Siqueira-Junior, J.P., Leal-Balbino, T.C., Coutinho, H.D.M., Balbino, V.Q., 2017. Tannic acid affects the phenotype of *Staphylococcus aureus* resistant to tetracycline and erythromycin by inhibition of efflux pumps. *Bioorg. Chem.* 74, 197–200. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.08.004>
 26. Trabelsi, A., Amine, M., Kaibi, E., Horchani, A., Chekir-ghedira, L., Ghedira, K., 2020. Phytochemical Study and Antibacterial and Antibiotic Modulation Activity of *Punica granatum* (Pomegranate) Leaves. *Hindawi Sci.* 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8271203>
 27. Troncoso, C., Pavez, M., Santos, A., Salazar, R., Barrientos Díaz, L., 2017. Structural and physiological implications of bacterial cell in antibiotic resistance

mechanisms. *Int. J. Morphol.* 35, 1214–1223. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022017000401214>

28. Tsai, H.C., Tao, C.W., Hsu, B.M., Yang, Y.Y., Tseng, Y.C., Huang, T.Y., Huang, S.W., Kuo, Y.J., Chen, J.S., 2020. Multidrug-resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from a subtropical river contaminated by nearby livestock industries. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 200, 110724. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110724>
29. Uddin, M.J., Ahn, J., 2017. Associations between resistance phenotype and gene expression in response to serial exposure to oxacillin and ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 65, 462–468. <https://doi.org/10.1111/lam.12808>
30. Wang, D., Xie, K., Zou, D., Meng, M., Xie, M., 2018. Inhibitory effects of silybin on the efflux pump of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Mol. Med. Rep.* 18, 827–833. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9021>