



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

MARIA GABRIELY DE LIMA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIMICROBIANA E
INIBIDORA DE BOMBA DE EFLUXO *in vitro* e *in sílico* DO ÁCIDO ABIÉTICO**

CRATO
2022

MARIA GABRIELY DE LIMA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIMICROBIANA E INIBIDORA DE BOMBA DE EFLUXO *in vitro* e *in sílico* DO ÁCIDO ABIÉTICO

Dissertação do Mestrado em Diversidade Biológica e Recursos Naturais apresentada à Universidade Regional do Cariri – URCA, para obtenção do título de Mestre(a) em Diversidade Biológica e Recursos Naturais.

Orientador: Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes
Coorientadora: Dra. Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins

Ficha Catalográfica elaborada pelo autor através do sistema
de geração automático da Biblioteca Central da Universidade Regional do Cariri - URCA

Silva, Maria Gabriely De Lima

S586a AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA,
ANTIMICROBIANA E INIBIDORA DE BOMBA DE EFLUXO in vitro e in
sílico DO ÁCIDO ABIÉTICO ABIÉTICO / Maria Gabriely De Lima Silva. Crato-
CE, 2022.

120p. il.

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

Orientador(a): Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Coorientador(a): Prof. Dr. Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins

1.Produto natural, 2.Ácido abiético, 3.Candida spp, 4.Bomba de efluxo;

I.Título.

CDD: 571

MARIA GABRIELY DE LIMA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIMICROBIANA E
INIBIDORA DE BOMBA DE EFLUXO *in vitro* e *in sílico* DO ÁCIDO ABIÉTICO
ABIÉTICO**

Dissertação do Mestrado em Diversidade Biológica e Recursos Naturais apresentada à Universidade Regional do Cariri – URCA, para obtenção do título de Mestre(a) em Diversidade Biológica e Recursos Naturais.

Trabalho de dissertação apresentado e aprovado em 27/10/2022

Banca examinadora:

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes
Orientador
Universidade Regional do Cariri (URCA-CE)

Prof^a. Dra Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins
Coorientadora
Universidade Regional do Cariri (URCA-CE)

Prof. Dr Luiz Marivando Barros
Examinador Interno
Universidade Regional do Cariri (URCA-CE)

Prof^a. Dra. Jacqueline Cosmo Andrade Pinheiro
Universidade Federal do Ceará (UFCA-CE)
Examinador Externo

Prof. Dra. Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga
Suplente
Universidade Regional do Cariri (URCA-CE)

Prof. Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues
Suplente
Centro Universitário Doutor Leão Sampaio (UNILEÃO-CE)

CRATO-CE
2022

Dedico esse trabalho a Deus, a minha avó Rosa Maria da Conceição de Lima (*in memoriam*) e ao meu avô Antônio Ferreira de Lima (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Deus celestial que foi meu alicerce, a pedra angular. Fez, me refez, me moldou e me fortaleceu nos momentos de crise. No meio da tempestade chorei mais o espírito santo me consolou quando nenhum ser humano pode me consolar nessa magnitude. Se hoje concluo esse mestrado sem dúvidas foi devido a força braçal dele e não minha. Louvo com respeito e maestria, pois de mim nada tem de bom. Para onde eu vou, como e o que vou fazer depois, ainda não sei, mas sei que irei viver densamente o que ele planejou para mim.

Aos meus pais Vera e Manoel (Dil), por ter dado toda força mesmo estando mais perdidos do que eu nos conselhos, obrigado por nunca desistir de mim, mesmo quando eu mesma já não acreditava em mim mesma e por me entender nos momentos mais difíceis. Minha alma existencial depende de carinho, amor e dedicação de vocês.

A minha família Lima especialmente a tia Marlene por torcer pelas minhas conquistas desde cedo, isso foi primordial para meu alicerce de referência na educação e a titia Lu, meus primos Brayan, Arthur Ruan, Cila (Priscila), Paty (Patrícia) e Sergio pelos momentos oportunos.

A Lupy meu antiestresse durante esse mestrado

A senhora Ray (senhora das senhoras) por todo o apoio na minha vida acadêmica, pela lapidação tão essencial na minha iniciação científica. Obrigada pelos conselhos generosos, sábios, engraçados e por ter enxergado meu potencial ainda na iniciação científica, sem dúvidas é uma das maiores referências que carrego comigo na pesquisa, obrigada pela amizade, te amo muito!

Ao senhor do *zebrafish*, Lucas pelo apoio, amizade, momentos descontraídos e os conselhos. E inegável sua importância na minha vida.

A Lucas Yure e Renata Pessoa por ter carregado junto comigo boa parte dos experimentos e dos meus surtos e agradeço imensamente pela disposição aos sábados, na semana, espero um dia retribuir na mesma proporção.

Aos integrantes do Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFM) Tarcísio, Eduardo, Aparecida, Roger, Isabel e Bruno. agradeço especialmente a Neto, Cecilia, e João Eudes Gabriel por todos os momentos de aprendizagem de força nos momentos difíceis, vocês um grande presente de Deus em minha vida.

Os meus amigos da Unileão Carol, Ana Paula (Paulinha), Bruna e Walber, por todo o apoio e amizade agradeço a Deus por vossas vidas. Aos meus colegas de Classe, especialmente colegas a Alita e Marcio.

A Anita pela coorientação, ensinamentos, paciência e pelas palavras no momento certo e no tempo certo. Obrigada por ter me acompanhado por toda minha trajetória.

A Thassya por todo companheirismo e amizade

Ao sexteto, Brenda Luana, Brenda Vilar, Renata, Izabele e Cíntia pelos aconselhamentos e oportunidades durante todos esses anos. Sou muito grata pela amizade de vocês.

Aos meus amigos da graduação Jéssica, Shennoy, Elizangela, Leo, Ermesson e Eduarda e do mestrado Márcio e Alita pelos momentos descontraídos de desabafos.

Ao professor Irwin por todo ensinamento

As minhas grandes professoras do ensino médio Nathallia que é minha fonte de inspiração, minha referência diária, te amo muito. A Aretha Feitosa professora de enfermagem que sempre acredito no meu potencial, “profeta Aretha”, pelas conversas gratificantes nos estágios, e a Arethucya Magalhães um verdadeiro anjo e um ombro amigo nos momentos difíceis.

Aos meus professores ou anjos da rede pública municipal Marta Regina grande historiadora, Aldinanda Frutuoso, Liraneide, Lianeide que sempre acreditaram em mim apesar da minha pouca idade na época, obrigada por compartilhar seus conhecimentos.

A Igreja Batista da Lagoinha especialmente aos Pastores Marlon e Silvia, ao líder de Jovem Daniel por todos os ensinamentos, apoio e amor. Nos momentos difíceis cada palavra foi essencial.

A Sâmara Nikele Lider de GC (Grupo de Célula) e a Alessandra Costa um dos maiores presentes de Deus e da Igreja Batista da Lagoinha. Obrigada por toda força, todas as orações e palavras afirmativas na minha vida.

A todos que participação do manifesto pela educação nova (1932) e defenderam o princípio de uma **educação única, laica, obrigatória e gratuita.**

A prof Dr^a. Flaviana Moraes minha referência na educação brasileira

Ao seu Baltazar, a Luciana (*in memoriam*), Francly e a madame funcionários da URCA

Aos camundongos, porque sem eles essa pesquisa não seria nada.

A Funcap, pela concessão e financiamento da bolsa

Não menos importante, a banca por todas as considerações

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de maneira significativa para a concretização desse estudo, meus sinceros agradecimentos.

Pela fé Abraão, quando convocado, obedeceu e dirigiu-se a um lugar que no futuro receberia como herança, embora não soubesse para onde estava sendo dirigido (Hebreus 11:8).

RESUMO

O ácido abiético é um diterpeno que atua como composto majoritário encontrado na resina de espécies de pinheiro como o *Pinus ellioti*, sendo conhecido por apresentar diversas atividades biológicas entre elas antimicrobiana e anti-inflamatória. No entanto existem poucos estudos com as metodologias utilizadas e assim como seus possíveis mecanismos de ação. O objetivo do presente trabalho foi avaliar as atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e inibidora de bomba de efluxo *in vitro* e *in silico* do ácido abiético. Realizou-se ensaios para avaliar a atividade anti-inflamatória (*In vivo*), antibacteriana e antifúngica (*in vitro* e *in silico*). Para atividade anti-inflamatória foram elucidados experimentos de triagem farmacológica, que incluem, o teste de formalina, contorções abdominais, além de edema de pata induzido por carragenina e dextrana. Enquanto, para avaliação dos mecanismos de ação sistêmicas foram realizados o teste de edema de pata induzido por histamina, ácido araquidônico (AA), prostaglandina, permeabilidade vascular e de granuloma. Avaliou-se também a influência do ácido abiético no Sistema Nervoso Central (SNC) através dos ensaios de rota-rod e campo aberto. Nos experimentos *in vitro* verificou-se a atividade antimicrobiana e potencializadora de fármacos para avaliar o potencial antibacteriano e antifúngico do ácido abiético frente a cepas de *Escherichia coli* (EC), *Staphylococcus aureus* (SA) e fungos do gênero *Candida*. Foi determinada também a concentração inibitória mínima (CIM) através do método de microdiluição em caldo e a associação com o Brometo de Etídeo (BrEt) no teste de inibição de bomba de efluxo NorA (SA 1199B) e MepA (SA K2068). Nos experimentos antifúngicos foram realizados os ensaios de Concentração Fungicida Mínima (CFM), avaliação do efeito modificador do Fluconazol e curva da viabilidade celular. Os resultados demonstraram que o ácido abiético não atuou sobre o SNC, ou seja, não agiu interferindo no comportamento animal ou na coordenação motora. Na avaliação da atividade anti-inflamatória, todas as doses testadas (50,100,200 mg/kg) demonstraram resultados significativos frente aos modelos realizados, sendo a melhor dose a de 100 mg/kg. Em relação a atividade antibacteriana o ácido abiético mostrou-se capaz de inibir o crescimento de EC 25922 e SA 10, mostrando efeito potencializador quando combinado á a gentamicina contra cepas multirresistentes. Ao ser testado frente a bomba de efluxo o ácido abiético demonstrou uma ação direta frente a *Staphylococcus aureus* atuando como potencializador do antibiótico, sugerindo uma inibição das bombas de efluxo NorA (SA 1199B) e MepA (SA K2068), com o *docking* molecular confirmando as interações de pontes de hidrogênio responsáveis pela estabilização da interação proteínas e ligantes. O ácido abiético também demonstrou efeito antifúngico ao ser testado frente as cepas *Candida albicans* (CA INCQS 40.006), *Candida krusei* (CK INCQS 40.095) e *Candida tropicalis* (CT INCQS 40.0420) tanto na atividade intrínseca como associada atuando como potencializador do antifúngico flucanazol. Diante dos resultados sugere-se que o ácido abiético possui uma ação anti-inflamatória aguda e crônica, atuando possivelmente na inibição de mediadores como histamina e prostaglandina, além de potencializar a ação de antibióticos em cepas padrões, multirresistente, bomba de efluxo. Ele também demonstra ação na potencialização dos antifúngicos sugerindo uma inibição das cepas de *Candida*. Dessa forma faz-se necessário a realização de novos ensaios visando a identificar os mecanismos de ação envolvidos.

Palavras chaves: Produto natural. ácido abiético, *Candida* spp, Bomba de efluxo.

ABSTRACT

Abietic acid is a diterpene that acts as the major compound found in the resin of pine species such as *Pinus elliotti*, being known to have several biological activities, including antimicrobial and anti-inflammatory. However, there are few studies with the methodologies used and their possible mechanisms of action. The objective of the present work was to evaluate the in vitro and in silico anti-inflammatory, antimicrobial and efflux pump inhibitory activities of abietic acid. Assays were performed to evaluate the anti-inflammatory (in vivo), antibacterial and antifungal activity (in vitro and in silico). For anti-inflammatory activity, pharmacological screening experiments were elucidated, which include the formalin test, abdominal writhing, in addition to paw edema induced by carrageenan and dextran. Meanwhile, to evaluate the systemic mechanisms of action, the paw edema test induced by histamine, arachidonic acid (AA), prostaglandin, vascular and granuloma permeability was performed. The influence of abietic acid on the Central Nervous System (CNS) was also evaluated through rota-rod and open field tests. In vitro experiments were verified the antimicrobial and potentiating activity of drugs to evaluate the antibacterial and antifungal potential of abietic acid against strains of *Escherichia coli* (EC), *Staphylococcus aureus* (SA) and fungi of the genus *Candida*. The minimum inhibitory concentration (MIC) was also determined by the broth microdilution method and the association with Ethidium Bromide (BrEt) in the NorA (SA 1199B) and MepA (SA K2068) efflux pump inhibition test. In the antifungal experiments, the Minimum Fungicide Concentration (MFC) assays, evaluation of the modifying effect of Fluconazole and cell viability curve were performed. The results showed that abietic acid did not act on the CNS, that is, it did not act interfering with animal behavior or motor coordination. In the evaluation of anti-inflammatory activity, all doses tested (50,100,200 mg/kg) showed significant results compared to the models performed, with the best dose being 100 mg/kg. Regarding antibacterial activity, abietic acid was able to inhibit the growth of EC 25922 and SA 10, showing a potentiating effect when combined with gentamicin against multidrug-resistant strains. When tested against the efflux pump, abietic acid showed a direct action against *Staphylococcus aureus* acting as an antibiotic potentiator, suggesting an inhibition of NorA (SA 1199B) and MepA (SA K2068) efflux pumps, with molecular docking confirming the interactions of hydrogen bonds responsible for stabilizing the interaction between proteins and ligands. Abietic acid also demonstrated an antifungal effect when tested against *Candida albicans* (CA INCQS 40.006), *Candida krusei* (CK INCQS 40.095) and *Candida tropicalis* (CT INCQS 40.0420) strains both in intrinsic and associated activity, acting as a potentiator of the antifungal flucanazol. In view of the results, it is suggested that abietic acid has an acute and chronic anti-inflammatory action, possibly acting on the inhibition of mediators such as histamine and prostaglandin, in addition to potentiating the action of antibiotics in standard, multidrug-resistant, efflux pump strains. It also demonstrates action in the potentiation of antifungals, suggesting an inhibition of *Candida* strains. Thus, it is necessary to carry out new tests in order to identify the mechanisms of action involved.

Keywords: Natural product. abietic acid, *Candida* spp, Efflux pump.

LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HPETE – ácido 5- hidroperoxieicosatetraenoico

5-HT – Serotonina

12- LOX- 12-Lipoxigenase

AA – Ácido araquidônico

AINES – Anti-inflamatórios não esteroides

ANOVA – Analysis of varianses (Análise de Variância)

ABC- Ligação ATP

ATP- Adenosina Trifosfato

AA- Àcido abiético

CA- *Candida albicans*

CEUA – Comissão de Experimentação e Uso de Animais

CIM – Concentração inibitória mínima

CI₅₀- Curva de viabilidade celular e determinação de Concentração Inibitória de 50% dos micro-organismos

CFM- Determinação da Concentração Fungicida Mínima

Cip- ciprofloxacina

COX – Cicloxigenase

C- Quimiocinas C

CC- Quimiocinas CC

CCR3- Receptores de quimiocinas do tipo 3

Cicloxigenase 1- COX-1

Cicloxigenase 2- COX -2

CFM- Determinação da Concentração Fungicida Mínima

CK- *Candida krusei*

CLSI-Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

CPZ – Clorpromazina

CT- *Candida tropicalis*

CXC- Quimiocinas CXC

CX3C- Quimiocinas CX3C

DMSO- Dimetilsulfóxido

EPM – Erro padrão da média

EPI- inibidores de bomba de efluxo

EtBr- Brometo de Etídio

FCZ- Fluconazol

Gen- Gentamicina

GMPC- Monofosfato Cíclico de Guanosina

HDC- Enzima L- descarboxilase

H1- Receptor de histamina do tipo 1

H2-Receptor de histamina do tipo 2

H3- Receptor de histamina do tipo 3

H4- Receptor de histamina do tipo 4

IC₅₀- Concentração Inibitória média

iNOS- NOS induzível

i.p. – Intraperitoneal

Candida krusei

IL – Interleucina

INF – Interferon

LOX – Lipoxigenase

LT – Leucotrieno

LX – Lipoxina

LTA4-Leucotrieno A4

LTB4- Leucotrieno B4

LPS- Peptidoglicano

MD- Dinâmica Molecular

MFS- Superfamília Facilitadora Principal

MATE- Multidrogas e extrusão de toxinas

MCs- Mastócito

NPs- Produtos naturais

N – Número

NFκB – Fator de necrose kappa B

NO – óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

PBS – phosphate buffered saline (tampão fosfato – salino)

PG – Prostaglandina;

PI – Prostaciclina

PKC - Proteína quinase C

rpm – Rotações por minuto

RND- Divisão de nodulação de resistência

ROS- Oxigênio reativo

SNC- Sistema Nervoso Central

SAD -*Ágar Sabouraud Dextrose*

SDB- *Sabouraud Dextrose Broth.*

TGF - Fator transformador de crescimento

TNF- Fator de necrose tumoral

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TX - Tromboxano

v.o. – Via oral

TLR- liposacarideo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.A) Resina em forma de âmbar presente em espécie de conífera.....	24
Figura 1.B) composto isolado ácido abiético.....	24
Figura 1. C) Fórmula química do ácido abiético.....	24
Figura 2. Representação do comportamento de células leucocitárias frente a um estímulo inflamatório.....	26
Figura 3. Esquema geral que representa as vias metabólicas.....	30
Figura 4. Desenho esquemático das paredes celulares Gram-positiva e Gram-negativa.....	32
Figura 5. Mecanismo envolvido na resistência bacteriana.....	35
Figura 6. As cinco classes de bombas de efluxo em bactérias.....	36
Figura 7. Diagrama esquemático de levedura.....	42

MANUSCRITO I

Figura 1. Atividade do ácido abiético no teste de formalina.....	64
Figura 2. Contorções abdominais.....	65
Figura 3. Efeito do ácido abiético na formação de edema de pata induzido por carragenina A) e B) AUC.....	66
Figura 4. Efeito do ácido abiético na formação de edema de pata induzido por dextrana A) e B) AUC.....	67
Figura 5. Efeito do ácido abiético na formação de edema de pata induzido por histamina A) e B) AUC.....	68
Figura 6. Efeito do ácido abiético na formação de edema de pata induzido por ácido araquidônico A) e B) AUC.....	69
Figura 7. Efeito do ácido abiético na formação de edema de pata induzido por prostaglandina E ₂ . A) e B) AUC.....	70
Figura 8. Efeito do ácido abiético sob a enzima mieloperoxidase.....	71
Figura 9. Atividade do ácido abiético sobre Permeabilidade vascular mensurada pelo extravasamento de Azul de <i>Evans</i>	72
Figura 10. Lesão granulomatosa induzida pela implantação de <i>pellets</i> de algodão. A) Massa dos <i>pellets</i> e B) proteínas totais.....	73

MANUSCRITO II

Figura 1. Concentração inibitória mínima (CIM) do antibiótico gentamicina, ciprofloxacina e ampicilina na presença e ausência do ácido abiético. A) <i>Escherichia coli</i> (EC-06) e B) <i>Staphylococcus aureus</i> (SA-10).....	91
Figura 2. CIM de ciprofloxacina (a) e brometo de etídio (b) isoladamente e em associação com os inibidores da bomba de efluxo NorA ou ácido abiético contra <i>S. aureus</i> SA-1199B.....	92
Figura 3. CIM de ciprofloxacina (a) e brometo de etídio (b) isoladamente e em associação com os inibidores da bomba de efluxo MepA ou ácido abiético contra <i>S. aureus</i> SA-K2068.....	93
Figura 4. Mapas de interação mostrando a ligação do ácido abiético com resíduos de sítios de ligação no MepA (a) e NorA (b).....	95
Figura 5. Região da ligação do ácido abiético nos sítios ativos no MepA (a) e NorA (b).....	96
Figura 6. Contribuição energética de cada resíduo no complexo ligante-proteína com bomba de efluxo MepA.....	96
Figura 7. Contribuição energética de cada resíduo e do ácido abiético (LIG394) no complexo com bomba de efluxo NorA.....	97

MANUSCRITO III

Figura 1: Curva de viabilidade celular da ação intrínseca do ácido ábiético e do fluconazol (FCZ), e a sua associação contra as cepas de <i>Candida albicans</i> (CA), <i>Candida tropicalis</i> (CT) e <i>Candida krusei</i> (CK).....	110
--	-----

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO II

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM, µg/mL) de ácido abiético contra cepas padrão ATCC e multirresistentes de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	90
Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM, µg/mL) de ácido abiético, brometo de etídio e dois inibidores de bomba contra dois <i>S. aureus</i>	92
Tabela 3. As afinidades de ligação das melhores poses para todos os compostos de ambas as bombas de efluxo.....	99

MANUSCRITO III

Tabela 1. Concentração Inibitória de 50% de micro-organismos (CI ₅₀) (µg/mL) por ácido abiético, fluconazol e sua combinação.....	109
Tabela 2. Concentração fúngica mínima (MFC em µg/mL) do ácido abiético em isolamento e em combinação com fluconazol.....	111

SUMÁRIO

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	19
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
3.1 Bioprospecção dos Produtos Naturais.....	22
3.2 Àcido abiético.....	23
3.3 Fisiologia da Inflamação.....	24
3.3.1 Células presentes na resposta inflamatória.....	25
3.3.1.1 Monócitos.....	25
3.3.1.2 Basófilo.....	26
3.3.1.3 Eosinófilo.....	27
3.3.1.4 Mastócito.....	27
3.4 Mediadores inflamatórios.....	28
3.4.1 Citocinas.....	28
3.4.2 Eicosanoides.....	28
3.4.3 Aminas vasoativas.....	30
3.4.4 Bradicinina e óxido nítrico.....	31
3.5 Estrutura Bacteriana.....	31
3.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>.....	33
3.6 Mecanismo de Resistência aos Agentes Antibacterianos.....	33
3.6.1 Bomba de efluxo.....	36
3.6.1 Principais transportadoras de bombas de efluxo.....	37
3.6.1.1 Superfamília de extrusão de multidroga e de compostos tóxicos (MATE).....	37
3.6.1.2 Superfamília de Divisão celular de nodulação de Resistência (RND).....	37
3.6.1.3 Superfamília ligada a ATP cassette (ABC).....	38
3.6.1.4 Pequena família de resistência a múltiplos medicamentos (SMR).....	38
3.6.1.5 Superfamília grande facilitadora (MFS).....	38
3.7 Bombas de efluxo específicas.....	39
3.7.1 Bombas de efluxo NorA.....	39
3.7.2 Bombas de efluxo MepA.....	39

3.8 Inibidores de Bomba de Efluxo.....	40
3.9 Características dos Fungos.....	42
3.10. Gênero <i>Candida</i>.....	42
2.11 Mecanismo de tolerância e resistência fúngica.....	43
REFERÊNCIAS.....	46
4. MANUSCRITO	
4.1 Manuscrito I: Avaliação da atividade antiedematogênica e anti-inflamatória do ácido abiético em camundongos.....	58
4.2 Manuscrito II: Antibacterial effect and evaluation of the inhibitory effect against efflux pump in <i>Staphylococcus aureus</i> by abietic acid: <i>in vitro</i> and <i>in silico</i> assays.....	84
4.3 Manuscrito III: Avaliação da atividade antifúngica do ácido abiético contra <i>Candida</i> sp.....	109
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	116
ANEXOS A: Declaração da Comissão de Experimentação e Uso de Animais (CEUA) da Universidade Regional do Cariri (URCA).....	117
ANEXOS B: Carta de submissão do manuscrito II.....	118

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação está organizada sob forma de manuscritos. Iniciando com uma Introdução e Objetivos, seguindo com o Referencial Teórico apresenta uma revisão sobre a bioprospecção de produtos naturais, o ácido abiético, processo inflamatório e mecanismos relacionados a resistência bacteriana e fúngica e finalizando nas Considerações Finais.

O **manuscrito 1** retrata sobre a avaliação da atividade anti-inflamatória do ácido abiético. Neste estudo foi determinado o efeito da dose de 200 mg/kg sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) e a triagem farmacológicas para atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (contorções abdominais induzidas por ácido acético e modelo de formalina) com as doses de 50, 100 e 200 mg/kg. Foi avaliado a atividade anti-inflamatória em modelos de edema de pata induzido por carragenina, dextrana e o modelo de permeabilidade vascular induzida por Azul de *Evans*. Com intuito de elucidar os possíveis mecanismos da ação relacionados aos mediadores foram realizados modelos de edema de pata induzido por histamina, ácido araquidônico e prostaglandina E₂, além de modelos como lesão granulomatosa induzida por *pellets* de algodão e dosagem da mieloperoxidase (MPO) com a melhor dose, 100 mg/kg

O **manuscrito 2** aborda a investigação do efeito antibacteriano e inibitório contra a bomba de efluxo NorA e MepA de *Staphylococcus aureus* pelo ácido abiético. Nesta pesquisa foi realizado experimento *in vitro* e *in silico*. O ensaio de determinação da concentração inibitória mínima nas cepas padrão (SA 25923 e EC 25922) e multirresistentes (SA-10 e EC-06) e sua modulação com os antibióticos ampicilina, gentamicina e ciprofloxacina. Foi realizado experimentos de inibição de bomba de efluxo da *Staphylococcus aureus* (SA-1199B e SA-K2068) com intuito de verificar o potencial inibitório do ácido abiético frente a estas bombas. Ensaio de triagem e *docking* molecular também foram realizados no presente estudo.

O **manuscrito 3** aborda a avaliação da atividade antifúngica do ácido abiético. Neste estudo foi realizado os ensaios para verificação de efeito do ácido abiético na viabilidade celular fúngica, determinação de Concentração Fungicida Mínima (CFM) frente as cepas *Candida albicans* (CA INCQS 40.006), *Candida krusei* (CK INCQS 40.095) e *Candida tropicalis* (CT INCQS 40.0420). Foi verificado a capacidade

modificadora do composto em associação ao fluconazol- e obtidas a IC_{50} e curva de viabilidade celular em função do aumento da concentração do composto avaliado.

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais oriundos de plantas, bactérias e fungos, são uma fonte essencial para o desenvolvimento de novos medicamentos e agentes terapêuticos. Portanto, são de importância para a química medicinal (LIN; NIELSEN; LIU, 2020). A diversidade dos aspectos químicos dos produtos naturais presentes em milhares de substâncias encontradas na biodiversidade terrestre também apresenta grande relevância no desenvolvimento desses bioprodutos (BOLZANI, 2016), além de sua atuação no combate de diversas enfermidades humanas como doenças cardiovasculares, câncer e doença que abrange quadros inflamatórios (YUAN *et al.*, 2006)

Dentre estes produtos naturais, o ácido abiético (AA) é um composto diterpeno do tipo abietano encontrado em espécies do gênero *Abies* (HAMULIĆ *et al.*, 2019) e o *Pinus contorta*. O AA se encontra majoritariamente presente em secreções resinosas atuando contra herbívoros e patógenos (LAFEVER; VOGEL; CROTEAU, 1994) além de apresentar propriedades antivirais, antibióticas e antifúngicas (BUOMMINO *et al.*, 2021), o ácido abiético pode ser uma alternativa para patologias que abrangem processos inflamatórios ou quadros infecciosos.

O fenômeno de resistência bacteriana vem sendo comumente associado como um problema de saúde pública devido a ineficácia de agentes antimicrobianos que são disponíveis no mercado (LIU *et al.*, 2019). Um dos mecanismos que são responsáveis pela resistência bacteriana que age ativamente para expulsar uma magnitude de compostos, como os antibióticos. A negligência de pacientes em relação ao uso de antibióticos muitas vezes oriundos de uma automedicação, tornam as drogas menos eficazes para infecções causadas por bactérias (BEZERRA *et al.*, 2021).

Diante disso, pesquisas que busquem drogas capazes de agir inibindo o crescimento dos microrganismos nocivos, são de grande importância (PEHLIVAN; SEVINDIK, 2018) assim como também, o conhecimento de medicamentos anti-inflamatórios cujos efeitos adversos são mínimos (FIKRY; HASAN; MOHAMED, 2017).

A inflamação é uma resposta imune desencadeada por uma lesão tecidual, estresse ou processo infeccioso pela presença de patógenos (fungos ou bactéria) que tem como objetivo manter a homeostase do organismo. O processo inflamatório pode apresentar uma resposta prolongada resultando no surgimento de quadros patológicos como artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal e asma (AGARWAL; SHANMUGAM, 2019; BORGES *et al.*, 2019).

Acerca destas problemáticas de saúde supracitadas, o presente trabalho buscou avaliar a atividade anti-inflamatória e antimicrobiana do ácido abiético em modelos *in vivo* e *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória (*in vivo*), antimicrobiana (*in vitro*) e inibidora de bomba de efluxo (*in vitro* e *in silico*) do ácido abiético.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade anti-inflamatória nos seguintes modelos: edema de pata (induzido por carragenina, dextrana, ácido araquidônico e histamina), permeabilidade vascular induzida por azul de *Evans* e modelo crônico de lesão granulomatosa induzida pela implantação de *pellets* de algodão;
- Avaliar a atividade antibacteriana *in vivo* e *in silico* nos experimentos de Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Potencialização da ação antibiótica, ensaio de inibição de bomba de efluxo por redução da CIM do brometo de etídio, antibiótico e *docking* e dinâmica molecular
- Avaliação da atividade antifúngica nos experimentos de Concentração Fungicida Mínima (CFM), avaliação do efeito modificador do Fluconazol e curva da viabilidade celular.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Bioprospecção dos Produtos Naturais

A busca por recursos naturais é antiga e é considerado até hoje um fator chave para sobrevivência da humanidade através da associação homem e biodiversidade. Estima-se que a busca por possíveis cura de doenças por meio da ingestão de folhas das ervas foram as primeiras formas na civilização humana da utilização de produto naturais. Com o passar dos anos, o desenvolvimento do conhecimento mais aprimorado o uso desses recursos passou a ter um destaque científico e tecnológico (NADER *et al.*, 2001; VIEGA; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

A biodiversidade ou diversidade biológica é compreendida como a variabilidade e riqueza de um conjunto de seres vivos sejam eles marinhos, terrestres ou de relações ecológicas entre populações. Uma vez que possui aspectos importantes em relação ao desenvolvimento econômico explorado de maneira ética, uma das formas de extração de valores econômicos é através da bioprospecção (JUNIOR; LUIZ, 2011).

Neste contexto, a bioprospecção é compreendida como a busca por compostos orgânicos, em plantas, animais e microrganismos com intuito de gerar novos recursos de valores sociais e econômicos (TEM; HAVE, 2021; BEATTIE *et al.*, 2011). Muitas substâncias bioativas foram isoladas dessas fontes, como a morfina, artemisinina e quinina (SAWARKAR; SHARMA, GAUTAM, 2019). A diversidade biológica é de extrema importância para as atividades de bioprospecção, tendo em vista que vários compostos bioativos são catalogados através desses estudos (TASSIA *et al.*, 2020). Apesar dos benefícios da biodiversidade para a saúde humana e sociedade, a mesma se encontra em constante ameaça de degradação ambiental muitas vezes antrópicas (YARLETT, 2019).

A pesquisa científica por fontes naturais para desenvolvimento de novos compostos bioativos com diferentes propriedades farmacêuticas continua sendo uma atividade desafiadora para bioprospecção (SANTANA *et al.*, 2021), entre essas fontes naturais temos os produtos naturais que são compreendidos como produtos químicos produzidos por organismos vivos. Estima-se que já são utilizados há séculos, principalmente na medicina tradicional, em particular os encontrados nas plantas medicinais como subsídio para fabricação de remédios. Em contraste, na farmacologia moderna, os produtos

naturais tornaram-se veículos de constante estudos para fabricação de novos fármacos (SOROKINA; STEINBECK, 2020). Além disso, vale ressaltar que os componentes químicos e os princípios ativos de produtos naturais extraídos da biodiversidade têm sido base dos estudos científicos trazendo diversos benefícios como a descoberta de novos antibióticos, antifúngicos e agentes antivirais (ALHO, 2012). Portanto, pesquisas voltadas para bioprospecção vem sendo uma grande fonte de investimento na indústria farmacêutica (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

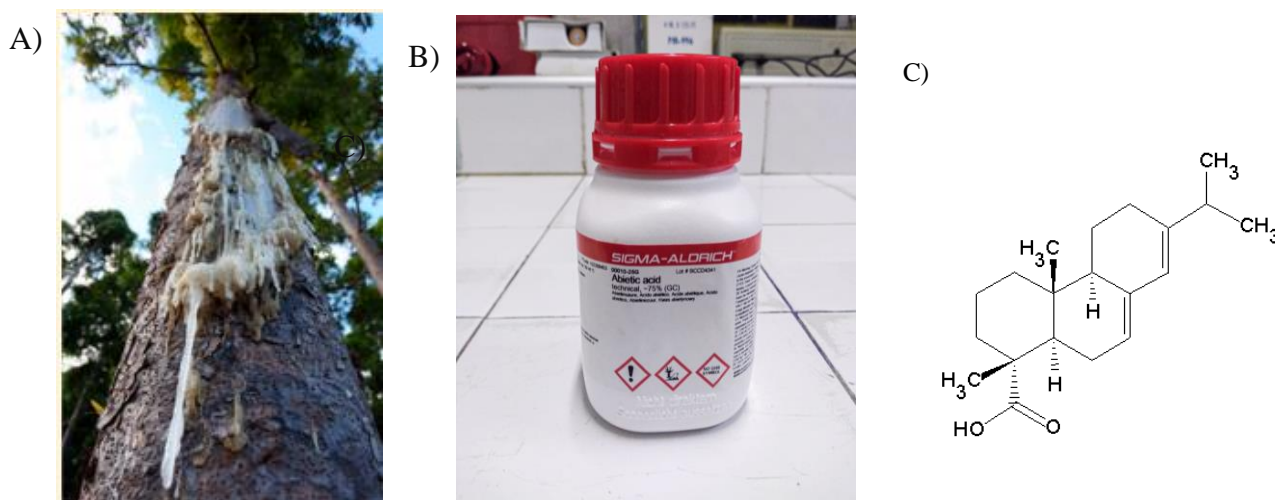
3.2 Àcido Abiético

O ácido abiético é um composto abietano diterpenoíde (LIU *et al.*, 2019) presente em resina natural extraída principalmente das Pinaceae e é produzido comercialmente por sete espécies de *Pinus*, *Pinus palustris* Mill., *Pinus pinaster* Ait., *Pinus sylvestris* L., *Pinus laricio* Poiret, *Pinus longifolia* Roxb., *Pinus densiflora* Siebold et Zucc., e *Pinus thunbergii* Parlatores (PARK *et al.*, 2017) e tem sido amplamente relatado como o principal constituinte de plantas coníferas (GONÇALVES *et al.*, 2018).

A resina presente no gênero *Pinus* e os seus derivados são utilizados principalmente para o processo de produção solventes, adesivos, materiais impermeáveis, tintas, fragrâncias, aromatizantes alimentares, na indústria farmacêutica (Figura 1) como precursores de princípios ativos (OLIVEIRA JUNKES, DE *et al.*, 2019), como matéria prima para produção de fungicida agrícola e como componente para condicionador de cabelos e cosméticos (NONG *et al.*, 2014).

O ácido abiético, assim com demais ácidos resinosos atuam como compostos de defesas nas coníferas, principalmente contra-ataques de herbívoros e patógenos (GONZÁLEZ *et al.*, 2009). Algumas atividades biológicas já foram comprovadas na literatura, entre elas estão atividade anticancerígena (LIU *et al.*, 2019), anticolvulcionante (TALEVI *et al.*, 2007) cicatrizante (PARK *et al.*, 2017) e inibidor de testosterona (ROH; PARK; KIM, 2010)

Figura 1. A) Resina em forma de âmbar presente em espécie de conífera, B) composto isolado ácido abiético e C) Fórmula química do ácido abiético.



A) (NOHRA *et al.*, 2015), B) fonte autoral e C) <https://www.rdchemicals.com>

3.3 Fisiologia da inflamação

O ser humano é constantemente exposto a uma variedade de estímulos. Do ponto de vista evolutivo foi necessário o desenvolvimento de mecanismos que atuam sob estes estímulos na tentativa de eliminá-los com intuito de manter a homeostase do organismo (VARELA *et al.*, 2018).

Neste contexto, a inflamação é compreendida como uma resposta imune a uma variedade de estímulos seja eles resultantes de processo fisiológico ou patológico, onde seu objetivo é eliminar esses estímulos nocivos, dos tecidos que foram lesados e os processos infecciosos. Embora a resposta inflamatória seja de suma importância, sua estimulação excessiva pode desencadear disfunções patológicas no indivíduo (PU *et al.*, 2020).

O processo inflamatório é frequentemente associado aos sinais clássicos que foram inicialmente propostos por Aulo Celsus (30 aC-38 dC) como: vermelhidão (Rubor), calor elevado (Calor), inchaço (Tumor) e dor que ocorre em uma resposta inflamatória aguda. Posteriormente, Galeno propôs o 5º sinal cardinal, a perda de função (KUMAR 2019; MCCUTCHEON, 2016). Esses sinais são característicos da presença de

mediadores pró-inflamatórios que são liberados por meio da ativação da cascata do ácido araquidônico (AA) (LUO *et al.*, 2020).

A inflamação é classificada em aguda e crônica. O processo agudo tem uma predominância do recrutamento de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos, linfócitos T, citocinas e enzimas (responsável pela destruição tecidual) que estão presentes na inflamação crônica que normalmente está relacionada a uma falha da inflamação aguda (TASNEEM *et al.*, 2019; LUO *et al.*, 2020).

O mecanismo de inflamação envolve eventos celulares e vasculares com recrutamento monócitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos, plasma e fluidos. Estes mecanismos são ativados após o contato do tecido com os estímulos nocivos que levam a um aumento de permeabilidade resultando na entrada de mediadores inflamatórios e na produção de edema (ABDULKHALEQ *et al.*, 2018).

Diante disso, o sistema imunológico atua por meio da ativação de interações celulares, como os linfócitos T e B, além das citocinas que realizam a sinalização de proteínas que são importantes na resposta inflamatória (ZHO *et al.*, 2020) e atua nos eventos inflamatórios da cascata do ácido araquidônico mediado pela síntese da cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) (FERREIRA *et al.*, 2021).

3.3.1 Células presentes na resposta inflamatória

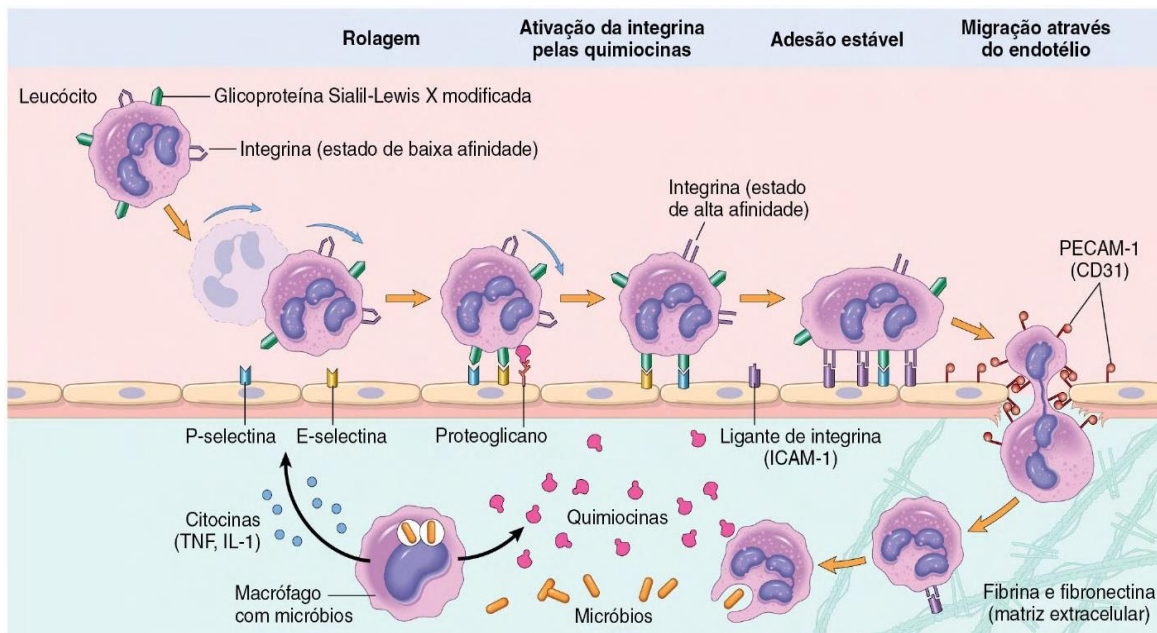
3.3.1.1 Monócitos

Os monócitos são células originadas na medula óssea precursoras dos macrófagos que são ativadas diante uma resposta imune desencadeada pela presença de um estímulo nocivo. Os macrófagos (derivados dos monócitos, M0) sofrem polarização formando o macrófago ativado classicamente (M1) e, alternativamente (M2) (GRASSIN-DELYLE *et al.*, 2020; PRAME KUMAR; NICHOLLS; WONG, 2018).

A migração dos monócitos para o local que foi danificado pelo estímulo nocivo acontece por conta da atuação das quimiocinas (Figura 2), como a CCL2, que fazem com que o monócito migre para o tecido correspondente através da corrente sanguínea, evento denominado de diapedese. Os monócitos se aderem à superfície endotelial através da ligação dos receptores a intergrinas e selectina entrando no tecido e se diferenciando em um macrófago inflamatório e passam a expressar uma variedade de receptores como os de citocina (CSF-1R, IFN γ R, IL-4R), fagocíticos (CD36, Fc γ , CD206) (POUPOT;

GOURSAT; FRUCHON, 2018), além de atuar ativamente na remoção de PAMPs e dentritos celulares (YANG *et al.*, 2014).

Figura 2. Representação do comportamento de células leucocitárias frente a um estímulo inflamatório. Primeiro os leucócitos rolam, posteriormente ocorre o processo de ativação e estes se aderem ao endotélio, então migram por meio de diapedese, sendo atraídas pelas quimosinas liberadas pela lesão.



Fonte: KUMAR, ABBAS, ASTER (2013)

3.3.1.2 Basófilo

Os basófilos são constituídos por granulócitos em seu citoplasma e são originados das células troncos hematopoiéticas. A ativação dos basófilos acontece pela presença de estímulos nocivos e pode ser por meio da via dependente de IgE e independente de IgE ambas geram a liberação de mediadores. Entretanto, a via independente é ativada por citocinas (IL-3 e IL-33), ligantes TLR (lipossacarídeo (LPS) e peptidoglicano) e a dependente sua ativação acontece pela expressão dos receptores IgE de alta afinidade FcεRI ($\alpha\beta\gamma_2$) na superfície celular do basófilos o que resulta na liberação de histaminas e proteases, por exemplo (MIYAKE *et al.*, 2021; PELLEFIGUES *et al.*, 2021).

Os basófilos oriundo da IL-4 são capazes de recrutar os monócitos que frente a um estímulo se diferenciam em macrófagos por meio da diapedese, além de serem importantes em diferentes quadros patológicos como: doença pulmonar obstrutiva

crônica, distúrbios autoimunes e auto inflamatórios e infecções causadas por helmintos (KARASUYAMA *et al.*, 2021).

3.3.1.3 Eosinófilo

Os eosinófilos são células responsáveis por realizar fagocitoses de bactérias, parasitas, fungos e vírus. Estes agentes infecciosos são reconhecidos devidos aos receptores presentes na sua membrana, entre eles de padrão molecular associados a patógenos e células lesadas e receptores de padrão molecular associados a danos (CHUSID, 2018).

O processo de degranulação dos eosinófilos é compreendido como uma estratégia de morte extracelular a partir da liberação de citotoxinas (RAMIREZ *et al.*, 2018), além de ter uma importante função nos mecanismos de armadilha dos ácidos nucleicos que consiste em liberação da cromatina e de proteínas para o meio extracelular, sendo esse processo denominado de ETose (MIYATA *et al.*, 2020).

3.3.1.4 Mastócito

O mastócito (MCs) é uma célula mononucleada com o núcleo localizado no centro da célula, seu citoplasma contém grânulos densos constituído de histamina (ANGLE, 2018) que é liberada a partir da degranulação do mastócito por meio de fatores químicos, físicos ou drogas que podem desencadear uma excessiva degranulação (MARTÍN SERRANO *et al.*, 2019).

Os MCs é uma das principais células responsável pelas respostas anafiláticas, entretanto os mastócitos desempenham papeis importante na linha de defesa como o recrutamento de neutrófilos em casos de peritonite e sepse, além liberar mediadores vasoativos (histamina) que desencadeiam aumento da permeabilidade vascular (DUDECK *et al.*, 2021).

A formação dos mastócitos acontece nas células trocos pluripotentes que são derivadas da medula óssea. O mecanismo se inicia na migração dessas células pelo sangue para o tecido (diapedese) desencadeando a maturação dos mastócitos (PANNUNZIO; COLUCCIA, 2018).

3.4 Mediadores Inflamatórios

3.4.1 Citocinas

A citocinas são proteínas secretadas numa diversidade de células entre elas os leucócitos, atuando como mensageiros de uma resposta imune (VIANNA *et al.*, 2011). O termo citocinas vem do grego e significa “colocar as células em movimento”, portanto todas as células que contém núcleo produzem citocinas e tem em suas superfícies receptores com afinidade para outras citocinas disponíveis, realizando um fenômeno denominado quimiotaxia. Citocinas pro-inflamatória como, o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 e IL-8 atuam alterando a função da célula no processo inflamatório (BUTTERFIELD; BEST; MERRICK, 2006).

As quimiocinas são proteínas consideradas pequenas que atuam no controle da migração celular, são uma das maiores subfamílias no grupo das citocinas. Os principais grupos de quimiocinas nomeadas nos grupos CXC (α), CC (β), C (γ) e CX3C (δ) (LAING; SECOMBES, 2004; ZLOTNIK, 2020). Sua liberação ocorre pela presença de estímulos como os desencadeados pelas citocinas pró-inflamatória que por sua vez realizam o recrutamento de monócitos, neutrófilos e linfócitos que passam a expressar receptores das quimiocinas permitindo, assim que as células se movimentem para locais que contém altas concentrações das mesmas (DESHMANE *et al.*, 2009).

Em relação as interleucinas as IL-1 β e IL-18. IL-1 β são liberadas a partir de uma resposta induzida por sinais exógenos e endógenos. As IL-1 β e IL- α foram as primeiras interleucinas descobertas e participam de respostas inflamatórias por meio da sinalização da via do receptor de interleucina 1 (ILL1R1) (BENT *et al.*, 2018; MENDIOLA; CARDONA, 2018).

3.4.3 Eicosanoides

Os eicosanoides são compostos com uma variedade de atividades biológicas que são originados por meio da cascata do ácido araquidônico e consequentemente suas vias (COX E LOX) (KIJ *et al.*, 2020).

A fosfolipase A2 (PLA2) é uma superfamília de enzimas responsável pela catalização de fosfolípidios. Portanto, após a catalização de um fosfolípido é gerado um ácido graxo livre e um lisofosfolípido. Essa reação desempenha papel importante na ativação do ácido araquidônico (BALSINDE; WINSTEAD; DENNIS, 2002).

O ácido araquidônico e os eicosanoides, são responsáveis pela ativação de mediadores que atuam na supressão e indução do processo inflamatório (BOGATCHEVA *et al.*, 2005). Sabe-se que o ácido araquidônico é encontrado na membrana fosfolípídica das células que podem ser liberados pela fosfolipase A2 e atuam como substrato para síntese de moléculas que estão envolvidas no processo inflamatório, por meio da ativação de duas isorformas a cicloxigenase (COX-1 e COX-2) e a 5-lipoxigenase (HUANG. *et al.*, 2020; ABDULKHALEQ *et al.*, 2018). Como é demonstrado na Figura 3.

As enzimas COX-1 e COX-2 se diferem em relação a sua distribuição e expressão nos tecidos. A COX-1 é constitutiva na maioria dos tecidos corpóreo, como por exemplo nas plaquetas, pulmões, cérebro e trato gastrointestinal e é produzida constantemente para estabelecer os processos homeostático. Em quanto que a COX-2, geralmente é produzida por indução em resposta a estímulos nocivos que desencadeiam a inflamação, fatores de crescimento ou por meio de agentes patológicos como o câncer (PANNUNZIO; COLUCCIA, 2018)

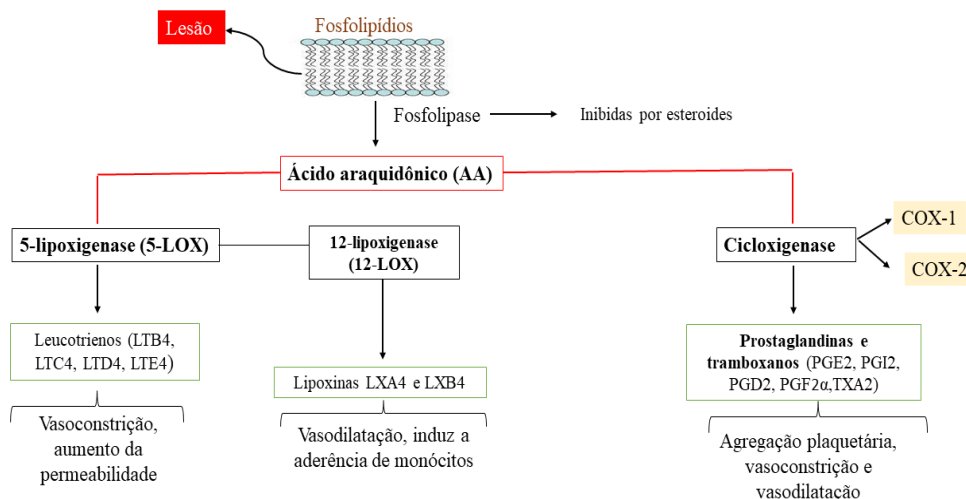
A via da cicloxigenase (COX1 e COX2) atua na conversão da prostaglandina PGH₂, um intermediário instável, PGE₂, PGD₂ e PGF₂α, prostaciclina (PGI₂) e tromboxanos (TXA₂, TXB₂), enquanto que a via da lipoxigenase (LOX) onde existe três subtipos dessa enzima: 5-Lipoxigenase (5-LOX), 12-Lipoxigenase (12- LOX) e 15-Lipoxigenase (15-LOX) que resultam na ativação dos seus produtos lipoxinas LXA₄ e LXB₄ formadas após a degradação LXA₄ (BIRINGER, 2020; HANNA; HAFEZ, 2018).

As lipoxigenase pertence a um grupo de enzimas oxidativas que estão envolvidas no processo inflamatório, gerando mediadores pró-inflamatórios como os leucotrienos e lipoxinas (WISASTRA; DEKKER, 2014). A 5-LOX catalisa a oxidação da AA para 5 (S)-hidroperóxi-6-trans-8,11,14-cis-eicosatetraenóico (5-HPETE) que posteriormente após sofrer desidratação e convertido em leucotrieno A₄ (LTA₄), em que rapidamente sofre hidrólise formando o leucotrieno B₄ (LTB₄), onde recruta neutrófilos por meio da quimiotaxia ((MICHAELIAN *et al.*, 2021; DINH *et al.*, 2020; WAN *et al.*, 2017).

Portanto, a cascata do ácido araquidônico desencadeia a liberação de mediadores inflamatório como a PGE₂ que é responsável pela vasodilatação, aumento da

permeabilidade vascular, promoção da dor e indução de interleucinas. Os LTB contribuem de eventos pró-inflamatórios causando vaso dilatação, aumento da permeabilidade, degranulação e adesão (INNES; CALDER, 2018).

Figura 3: Esquema geral que representa as vias metabólicas que levam a produtos do ácido araquidônico envolvidos no processo inflamatório. COX = ciclooxigenase, 5-LOX (5-lipoxigenase); LTs (leucotrienos); PGs(prostaglandinas). PLA2 (fosfolipase A2); TxA2 (tromboxano A2).



Fonte:Autorial

3.4.4 Aminas vasoativas

A histamina é bem relatada devido sua participação nas reações alérgicas e estimulação de terminações nervosas (KOMORI *et al.*, 2021), além de ser um importante mediador inflamatório, liberado pelas células mastro e basófilos. A histamina causa vasodilatação, hipersensibilidade vascular e contração da musculatura lisa (SI *et al.*, 2020).

O processo de síntese de histamina acontece por meio da descarboxilação do aminoácido histidina por meio da enzima L- descarboxilase (HDC), comumente expressas nas células neuronais, parietais e de mucosa gástricas, basófilos e mastócitos (BRANCO *et al.*, 2018).

A serotonina é um neurotransmissor de suma importância no Sistema Nervoso Central (SNC) e nos tecidos periféricos, entretanto a serotonina pode modular o sistema imune periférico, devido a capacidade de algumas células do sistema imune como os

macrófagos, células T, células dendríticas e mastócitos de gerar, armazenar, responde e transportar a serotonina (WU *et al.*, 2019).

Os receptores de serotonina 5-HT, quando principalmente na musculatura lisa, são responsáveis pela vasodilatação e nos tecidos imune, como o baço e timo (QUINTERO; VALDÉS, 2019).

3.4.5 Bradicinina e óxido nítrico

A bradicinina é um mediador pro-inflamatório responsável pela vasodilatação, permeabilidade vascular, recrutamento de leucócitos e produção de óxido nítrico (RICCIARDOLO *et al.*, 2018; LINDSTRÖM *et al.*, 2019). O mecanismo de ação da bradicinina consiste em ligação dos seus receptores a proteína G (DAGHER *et al.*, 2019).

O óxido nítrico é sintetizado por três enzimas de NO, denominadas NOS (nNOS, NOS1), NOS induzível (iNOS, NOS2) e NOS endotelial (eNOS, NOS3). Estas enzimas realizam a catalização de L-argenina em L-citrulina pela NO sintetase, resultando na migração do NO para o endotélio do tecido vascular liso que por sua vez liga ao GMPC (Monofosfato Cíclico de Guanosina) causando o relaxamento e consequentemente a vasodilatação (CYR *et al.*, 2020).

Portanto, óxido nítrico é sintetizado por vários tipos de células e tem uma importante função no sistema imune, especialmente diante um processo inflamatório, onde pode atuar tanto com efeitos anti-inflamatórios como pró-inflamatórios (SHARMA; AL-OMRAN; PARVATHY, 2007; COLEMAN, 2001).

3.5 Estrutura Bacteriana

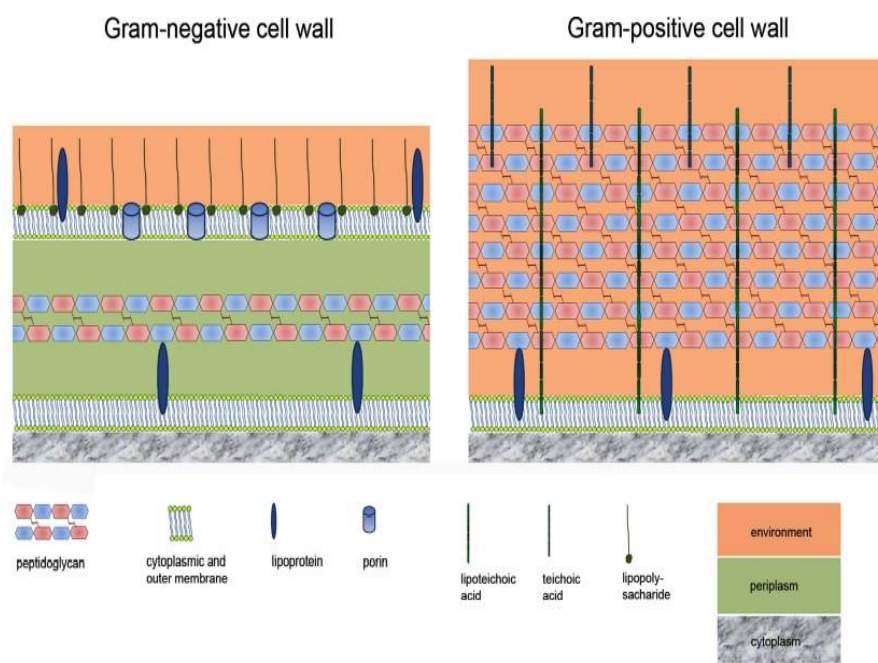
As bactérias são organismos unicelulares que colonizam diversos ambientes e tem como característica a existência da parede celular que é constituída por peptideoglicano, contendo cadeias cruzadas e ramos de peptídeos. A parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas apresentam um arranjo diferente (Figura 4), como por exemplo a presença da membrana externa e citoplasmática (Gram-negativas) e uma espessa camada de peptidoglicano e ausência da membrana externa (Gram-positiva) (ROHDE, 2019; PASQUINA-LEMONCHE *et al.*, 2020). Entre as membranas temos a presença de lipopólises (espaço periplasmático) e porinas aderidas na membrana externa (ROHDE, 2019)

A principal função da parede celular nas bactérias é atuar como proteção contra uma variedade de antibióticos, apesar que a maioria dos antibióticos conseguem ultrapassar essa barreira, atingindo seus alvos farmacológicos (IMPEY *et al.*, 2020).

Diante disso, a permeabilidade do envelope de bactérias Gram-negativa está relacionada os aspectos químicos internos em suas estruturas que se diferenciam das composições dos folhetos interno. De maneira geral a membrana bacteriana impede a entrada de moléculas com propriedade hidrofílicas, como aminoácidos, íons e açúcares, entretanto são mais permeáveis a moléculas pequenas e hidrofóbicas. Em bactérias Gram-positivas também são influenciadas pelos aspectos químicos com uma fluidez pra compostos hidrofóbicos ou hidrofílicos por meio de difusão, por exemplo (HENDERSON *et al.*, 2021).

No entanto, as proteínas de transporte também estão inclusas na seletividade da permeabilidade da membrana bacteriana controlando avidamente a movimentação de íons do espaço intracelular para o extracelular e vice-versa com intuito de manter o gradiente eletroquímico, além de participar do transporte de nutriente e solutos (KUMAR *et al.*, 2020a)

Figura 4. Desenho esquemático das paredes celulares Gram-positiva e Gram-negativa.



Fonte: ROHDE (2019)

3.5.1 *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva pertencente à família Staphylococcaceae que contém 45 espécies e 24 subespécies de caráter aeróbico ou facultativo aeróbico, conhecida por serem espécies com alto grau de virulência (FISHER; MOBASHERY, 2021; SILVA *et al.*, 2020), comumente associadas a infecções hospitalares e comunitárias, infecções de pele, osteomielite, bacteremia e pneumonia fatal (GUO *et al.*, 2020).

A resistência a antibióticos de *S. aureus* se tornou uma grande preocupação na saúde pública (KIZZIAH *et al.*, 2020) como a resistentes à meticilina (MRSA) (MATUSZEWSKA *et al.*, 2020), devido a capacidade de transferência de genes responsáveis pela resistência desencadeadas principalmente pelo uso indevido de antibióticos (ONDUSKO; NOLT, 2018).

Escherichia coli é uma enterobactéria que faz parte do grupo das Gram-negativas de colonização comensal do trato gastrointestinal, porém pode causar patologias (AGEORGES *et al.*, 2020) tem resistência a várias drogas como carbapenemases, cefalosporinas, entre outras (FREITAS *et al.*, 2020) e é uma das mais importantes causadoras de doenças humanas como a infecções do trato urinário e infecções na corrente sanguínea (HU; MATSUI; RILEY, 2020).

A resistência por *E. coli* ocorre quando ela recebe ou doa a partir de receptores genes que são responsáveis pela resistência. Esse mecanismo de troca leva a uma resistência em massa a demais cepas de *E. coli* resistente em um determinado organismo (POIREL *et al.*, 2018).

3.6 Mecanismo de Resistência aos Agentes Antibacterianos

A resistência bacteriana se inicia quando os microrganismos se tornam menos sensíveis, sendo necessário uma concentração maior da mesma droga para ter um determinado efeito e, pode ocorrer como um fenômeno de seleção natural, ou seja, a natureza seleciona todas as bactérias que apresentam graus de resistência (ZAMAN *et al.*, 2017). O aumento de bactérias resistentes é de extrema preocupação, sendo considerada (o) um crescente problema de saúde pública, interligado ao uso indevido de antibióticos por parte da população (PATINI *et al.*, 2020).

A resistência a antibióticos por bactérias pode ser de natureza intrínseca, adquirida ou adaptativa. A resistência intrínseca é definida como aquela que faz parte da natureza bacteriana, ou seja, são características fenotípicas enquanto a adquirida acontece quando uma determinada bactéria desenvolve um mecanismo de resistência por mutação ou adição exógena de material genético (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020).

Diante disso, a resistência bacteriana acontece por meio da transferência genética, sendo ela por conjugação (quando a transferência de genes ocorre por meio de um contato direto com a bactéria receptora), por transdução (via bacteriófago) e transformação (absorção de regiões do DNA disperso no meio e sua incorporação no DNA bacteriano) (STACHELEK *et al.*, 2021).

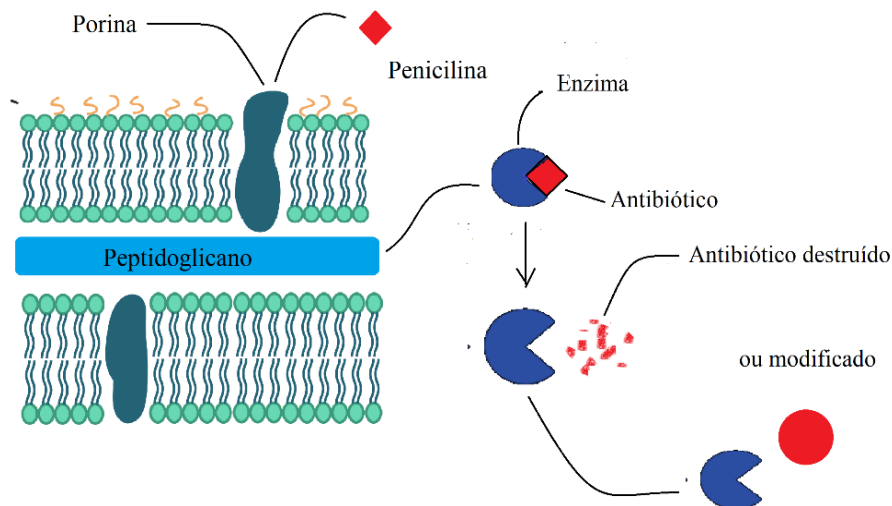
As enzimas bacterianas também participam de vários mecanismos que estão envolvidos na resistência bacteriana. De modo geral as enzimas presentes na biossíntese da parede celular, ácidos nucleicos e metabólicos são os alvos farmacológicos dos antibióticos. O mecanismo de resistência (Figura 5) envolve a modificação estrutural dessas enzimas (EGOROV; ULYASHOVA; RUBTSOVA, 2018).

Alguns microrganismos tornam-se resistentes ao β -lactam mediado pela ação da β -lactamase a partir da modificação estrutural de enzimas (CHANDRA *et al.*, 2017) que são responsáveis pela inativação de antibióticos como β -lactamases entre elas estão, as enzimas modificadoras de aminoglicosídeo e acetiltransferases de clororamfenicol (UPADHY; SHENOY; VENKATESWARAN, 2018). Essas enzimas desencadeiam a ruptura da ligação amina do anel β -lactam, conseqüentemente torna o antibacteriano ineficaz. A inativação da droga pode acontecer devido a expressão de β -lactamase endógenas ou adquiridas (PACHORI; GOTHALWAL; GANDHI, 2019).

Outros antibióticos atuam como inibidores da síntese proteica, interferindo em diversas etapas da biossíntese de proteínas como transcrição e tradução, como por exemplo, aminoglicosídeos e tetraciclina que bloqueiam a síntese na subunidade 30S. Vários são os mecanismos que as bactérias utilizam para torná-las resistentes a aminoglicosídeos, entre eles estão: mutações ribossômicas causadas por enzimas metiltransferase ribossômicas. Existem antibióticos que agem na inibição de síntese de ácido nucleicos, como as flouroquinolona utilizados contra bactérias gram-positiva e gram-negativa. As flouroquinolona é responsável pela inibição da enzima DNA girase, que desempenha um papel importante no processo de replicação do DNA bacteriano e inibidor da topoisomerase IV, que é crucial para a segregação das células filhas. Sendo

assim o mecanismo de resistência bacteriana para as flouroquinolona envolve mutação enzimática e alteração do acesso a droga (ABUSHAHEEN *et al.*, 2020).

Figura 5: Mecanismo que está envolvido na resistência bacteriana. A modificação estrutural das enzimas que são o alvo farmacológicos dos antibióticos desencadeiam resistência bacteriana.



Fonte: Autoral

3.6.1 Bomba de efluxo

As bombas de efluxo consistem em proteínas localizadas na membrana citoplasmática bacteriana que atuam bombeando substratos nocivos, como antibióticos, metabólitos secundários e produtos químicos do meio interno para o externo da célula (AUDA; ALI SALMAN; ODAH, 2020).

Quanto ao mecanismo de bombas este é organizado em grupos de transportadores de ativos primários e secundários. As proteínas transportadoras primárias são aquelas bombas de efluxo que utilizam a energia (ATP) para o transporte de drogas por meio de uma hidrólise do ATP, enquanto que o ativo secundário se usufrui de um gradiente de concentração já pré-estabelecido por um mecanismo de transporte primário para transportar um soluto através da célula membrana ou seja ela utiliza indiretamente o ATP (LEKSHMI *et al.*, 2018).

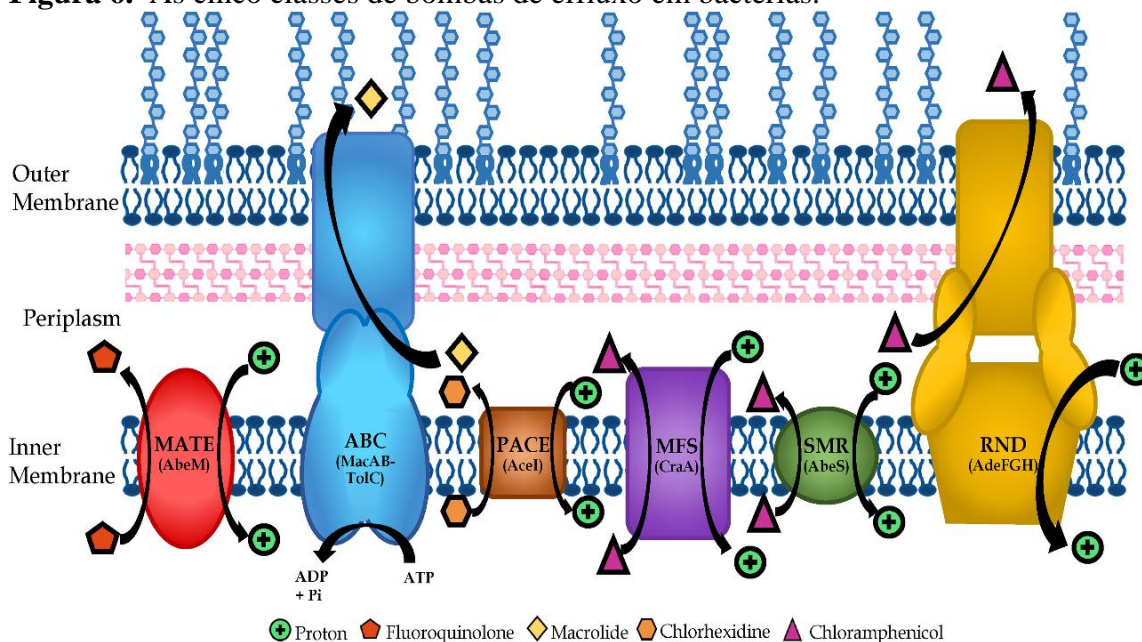
Sendo assim, as bombas de efluxo consistem em proteínas transportadoras pertencentes a superfamília de proteínas (ZGURSKAYA, 2021), encontradas em uma magnitude de espécies bacterianas divididas em seis superfamílias (KUMAR, SANATH

et al., 2020) denominadas de a) divisão de nodulação de resistência (RND), b) pequena resistência multidroga (SMR), c) superfamília facilitadora principal (MFS), d) denominadas de ligação ATP (ABC) e e) multidroga e extrusão de toxina (MATE) (ALMATAR *et al.*, 2021) (Figura 6).

As três primeiras bombas fazem o uso de energia por meio de um sistema antiporto de prótons/drogas que são necessárias para eliminar uma determinada droga do interior da célula, enquanto a família MATE utiliza troca de íons de próton ou sódio. A família ABC seu mecanismo de extrusão de drogas e por meio da hidrólise de ATP (STAVRI; PIDDOCK; GIBBONS, 2007).

Portanto, a bomba de efluxo contém determinantes para produção de fenótipos relacionados a resistência bacteriana, sendo assim, (I) a inibição desses mecanismos consiste em diminuir a expressão de genes da bomba desencadeando a inibição da expressão genica (II) bloquear a bomba interferindo na ligação ao local ativo (III) inibir o sistema de transporte energético da bomba responsável pela dissipação de energia, como o Cianeto de carbonil-m-clorofenilhidrazone (CCCP) (SHARMA;GUPTA; PATHANIA, 2020).

Figura 6. As cinco classes de bombas de efluxo em bactérias.



Fonte: KORNELSEN; KUMAR (2021)

3.6.1 Principais transportadoras de bombas de efluxo

3.6.1.1 Superfamília de extrusão de multidroga e de compostos tóxicos (MATE)

As transportadoras multidrogas e extrusão tóxica (MATE) é subdividida em três subgrupos e é pertencente a uma das maiores superfamílias que realizam transporte de lipídio, polissacarídeo e multidrogas (BROWN; DEMETER; TURNER, 2018). O Primeiro grupo está presente em mecanismos inerentes a microrganismos bacteriano, o segundo é encontrado principalmente em organismo eucariotos e o terceiro em eubactérias e nas arqueobactérias (árqueas) (VARELA; DRUG; SYSTEMS, 2020).

Os mecanismos de ação da MATE consiste em utilizar gradiente bacteriano por meio de sistema de transporte H^+ e/ou Na^+ para transportar drogas poli aromáticas e catiônica (DU *et al.*, 2018), portanto, o MATE atua no reconhecimento de uma variedade de substrato, além ser responsável pela resistência no *Staphylococcus aureus* (KUSAKIZAKO *et al.*, 2020).

Neste contexto a proteína transportadora MATE atua na inativação de medicamentos hidrofílicos frente a patógenos. Entre esses medicamentos que são inativados estão aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (DEY *et al.*, 2022).

3.6.1.2 Superfamília de Divisão celular de nodulação de Resistência (RND)

As transportadoras de RND (Divisão de Nodulação de Resistência) são uma superfamília que contém um sistema de efluxo bastante predominante em bactérias gram negativas e com frequente associação a quadros de resistência a antibiótico, como AcrB em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* e MexB em *Pseudomonas aeruginosa* (SUN; DENG; YAN, 2014).

As proteínas de RNS possuem estruturas heterotimers onde cada monômero contém aproximadamente 12 domínios transmembranas (TMD) e dois laços extracelulares, além disso elas apresentam uma capacidade de reconhecimento de uma variedade de substratos. Bactérias com transportadores do tipo RNS possuem em sua membrana uma estrutura que se fundem formando um canal contínuo nas duas camadas membranosas (BRIFFOTAUX *et al.*, 2017).

3.6.1.3 Superfamília ligada a ATP cassette (ABC)

Consiste em uma superfamília de transportadoras tanto em procariotos como em eucariotos seus mecanismos incluem importação e exportação. As membras da família ABC são bastantes conhecidos por conta do transporte de uma variabilidade de substratos, como açúcares, lipídios e aminoácidos. Portanto essa diversidade de substrato favorece a exportação de antibiótico e íon tóxicos em microrganismos que contém essa proteína transmembrânica (CHITSAZ; BROWN, 2017).

3.6.1.4 Pequena família de resistência a múltiplos medicamentos (SMR)

As SMRs estão localizadas na parede bacteriana e são divididas em quatro pequenas moléculas (TM1, TM2, TM3 E TM4) em forma de hélices que atravessam a membrana. As TM1 a TM3 formam um complexo importante para ligação do substrato, enquanto a TM4 desempenha de efluxo de substrato (MITCHELL; STONE; DEBE, 2019). Um exemplo dessa família de transportadores é o antiportador eletromagnético EmrE encontrado nas cepas de *E. coli*, que é responsável pela resistência bacteriana devido aos aspectos catiônicos e hidrofóbicos (SHRIRAM *et al.*, 2018).

O mecanismo das SMRs relacionado principalmente a capacidade de utilização da força de próton (PMF) com intuito e bombear ativamente para o espaço extracelular bacteriano corantes, antibióticos ou outras substâncias de caráter nocivo (POULSEN; DEBER, 2012). Portanto, transportadores de resistência multidroga contribuem para a resistência a antibióticos devido ao efluxo desses compostos por meio do citoplasma bacteriano (SPREACKER *et al.*, 2021).

3.6.1.5 Superfamília grande facilitadora (MFS)

A Superfamília MFS está presente em todos os domínios de vida e podem ser comumente separadas em três grupos. **Simportadores** são aquelas que atuam no transporte de dois ou mais substratos através do gradiente eletroquímico e na mesma direção, **antiportadores** que transportam dois ou mais substratos em direções opostas e **não portadores** que são aquelas que transportam apenas um substrato (KORNELSEN; KUMAR, 2021). As CraA, AmvA, TetA, TetB, CmlA, e FloR são as principais bombas

pertencentes a família MFS que foram estudadas *A. baumannii* (VERMA; TIWARI; TIWARI, 2021).

3.6.1.5 Transportadores familiares PACE (transportadores de compostos antimicrobianos proteobacteriano)

Os transportadores PACE foram recentemente identificados e atuam no transporte de compostos com propriedades antimicrobianas com estruturas bastantes diversas. Seu mecanismo de ação consiste na utilização de um gradiente de prótons que oferece energia para que ocorra o bombeamento ativo de substância ou substrato (ZHAO *et al.*, 2022).

Esta família foi encontrada na *Ancinetobacter* sp, embora seu mecanismo e sua estrutura não estejam completamente claro, há relatos que as bombas PACE contenham quatro tipos de alfas hélices transmembranas que estão distribuídas em dois domínios distintos (KORNELSEN; KUMAR, 2021)

3.7 Bombas de Efluxo Específicas

3.7.1 Bombas de efluxo NorA

A bomba de efluxo NorA consiste em uma proteína encontrada nas bactérias *Staphylococcus aureus* atuando principalmente na potencialização da resistência bacteriana a antibióticos como os brometo de ethidium (SOUSA ANDRADE, DE *et al.*, 2020). Além disso a NorA é frequentemente utilizada como modelo de estudo para avaliação da resistência bacteriana por *Staphylococcus aureus* (COSTA *et al.*, 2019).

O sistema de transporte das proteínas NorA é dependente dos mecanismos de próton-motriz pertencente a superfamília maior facilitadora (MFS) e possui 12 segmentos transmembrana, isto é, o gradiente de próton é utilizado como fonte de energia que atua na extrusão de uma magnitude de antibióticos (FAILLACE *et al.*, 2021; KAATZ *et al.*, 2000). Como os compostos hidrofóbicos, fluoroquinolones incluindo norfloxacin, ciprofloxacina, brometo de ethidium e quaternário compostos de amônio fora da célula (SALEHZADEH *et al.*, 2018).

A *Staphylococcus aureus* SA1199B é responsável por super expressar a bomba de efluxo NorA resultando na formação de bactérias resistentes a determinados antibióticos através da diminuição das concentrações intracelulares de medicamentos (KUMAR *et al.*, 2008).

Em relação a estrutura da NorA, sabe-se que ainda não foi determinada. Entretanto, a partir do sequenciamento e compartilhamento dos substratos com outras bombas de efluxo foi possível observar que a NorA apresenta região que potencializa ligações hidrofóbicas o que resulta em uma especificidade de substrato (SABATINI *et al.*, 2013).

3.7.2 Bombas de efluxo MepA

A K220 está presente na *S. aureus* que contém o gene MepA pertencente ao grupo das superfamílias de extrusão de multidroga e de compostos tóxicos (MATE) que é responsável pela resistência bacteriana a antibióticos da classe quinolones de segunda geração (FREITAS *et al.*, 2022).

A regulação da MepA é realizada pelo MepR um repressor família MaR. Estudos voltados para a identificação da estrutura e funcionalidade do gene MepA ainda e uma escassa e limitada, entretanto o que se sabe é em relação a especificidade de substratos com características hidrofóbicas, como as fluoroquinolones (SCHINDLER *et al.*, 2013).

A inibição da bomba de efluxo, incluindo a MepA acontece por meio da desvinculação do substrato seja ele competitivo ou não competitivo. Essa desvinculação desencadeia a interrupção da fonte de energia que é necessária para realização de extrusão de antibióticos. Sendo assim, os compostos que atuam nessas inibições são denominados de inibidores de bomba de efluxo (EPI) (OLIVEIRA *et al.*, 2020)

3.8 Inibidores de Bomba de Efluxo

Os inibidores de bomba de efluxo (EPI) agem no bloqueio das bombas de forma eficiente. Seu mecanismo se baseia no aumento de concentrações de antibióticos no espaço intracelular os tornando efetivos (YUAN *et al.*, 2022). Além de atuarem na redução de cepas mutantes por conta da diminuição da resistência bacteriana (CHAKRABORTY; DEY; MAZUMDER, 2021).

A eficácia dos EPIs foi demonstrada ao inibir a bomba de efluxo em medicamentos antituberculose para *Tuberculose M*, resultando na diminuição da resistência aos medicamentos produzindo um efeito sinérgico com antimicrobianos (RINDI, 2020).

Entretanto, os EPIs em altas concentrações se tornam compostos tóxicos para o ser humano (FERRER-ESPADA *et al.*, 2019). Embora, compostos naturais e sintéticos tem se mostrado uma alternativa para novos EPIs devido sua baixa toxicidade e diversidade, como vitamina K, reserpina e capsaicina (EL-BAKY *et al.*, 2019; LU, *et al.*, 2019).

A expressão de bomba de efluxo em ensaios pré-clínico pode ser avaliada utilizando os Inibidores de bomba de efluxo, como o reserpina, valinomicina, dinitrophenol (DNP), cianeto carbonil 3-clorofenilhidrazona (CCCP) e fenillanina-arginina β -naphthilamida (Pa β N) (AMIRI *et al.*, 2019) ou por meio de acumulação de corante fluorescentes como o brometo de ethidium (EtBr), um corante para avaliar a eficácia dos EPIs (FUJIWARA *et al.*, 2022).

O cianeto carbonil 3-clorofenilhidrazona (CCCP) que age como um desacoplador de fosforilação oxidativa, inibindo o potencial eletroquímico transmembranar (SANCHEZ-CARBONEL *et al.*, 2021). Portanto, a força próton-motriz é impedida consequentemente ocorre uma diminuição da produção de ATP pela célula ocasionando destruição das células vivas e por fim morte do organismo (RHEE; CHOI; KO, 2016).

O Pa β N consiste em um inibidor competitivo atuando como um substrato para diversas bombas de efluxo. No entanto, essa competição aparentemente não acontece no mesmo local de ligação da bomba (VERA-LEIVA *et al.*, 2018). Além disso, o Pa β N é considerado um inibidor específico da família de divisão celular de nodulação de resistência (RND) que atua promovendo aumento de antibióticos no citoplasma bacteriano levando a morte do microrganismo (LIN *et al.*, 2020).

O Vareapamil embora atue em mamíferos como inibidores da moamina vesicular e P-glicoproteína eles também atuam em seres procariontes inibindo os transportadores multidroga dependentes de ATP e bombas MRS (PULE *et al.*, 2016). Em relação ao θ DNP este atua como um EPI semelhante ao CCCP (SONG; WU, 2016).

A reserpina é um inibidor de bomba de efluxo e consiste em um alcaloide de origem vegetal e tem se mostrado um inibidor da bomba Bmr da *Bacillus subtilis*. Além disso esse EPI vem sendo utilizados em estudos *in vitro* cujo objetivo é buscar atividades de novos agentes antibacterianos (GARVEY; PIDDOCK, 2008).

3.9 Características dos Fungos

Os fungos são microrganismos eucariotos, encontrados em diversos ambientes. Muitas espécies são comensais nativas da flora normal humana em diversos tecidos e órgãos, como sistema geniturinário, pulmão e trato gastrointestinal. Essa comensalidade pode sofrer um desequilíbrio devido alguma resposta do sistema imune, resultando na transformação em microrganismos invasores (COSTA-DE-OLIVEIRA; RODRIGUES, 2020).

Sendo assim, das mais de 100 mil espécies que são conhecidas de fungos, apenas aproximadamente 200 são espécies de caráter patogênico aos seres humanos. Entretanto nos últimos anos o aumento de infecções fúngicas no mundo são extremamente preocupantes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016).

Em relação a sua parede celular, esta atua na proteção e participa da regulação osmótica sendo constituída por polissacarídeos ligado o beta glucano e componentes intersticiais. A estrutura e componentes enzimáticos que atuam na biossíntese da parede fúngica são constantemente alvos de drogas comercializadas e desenvolvidas (BOWMAN; FREE, 2006; GOW; LATGE; MUNRO, 2017), além de atuar como um mecanismo de regulação entre o meio externo e interno através de um sistema de adesivos e de receptores que ao serem ativados iniciam uma cascata de sinais para o interior da célula (GARCIA-RUBIO *et al.*, 2020).

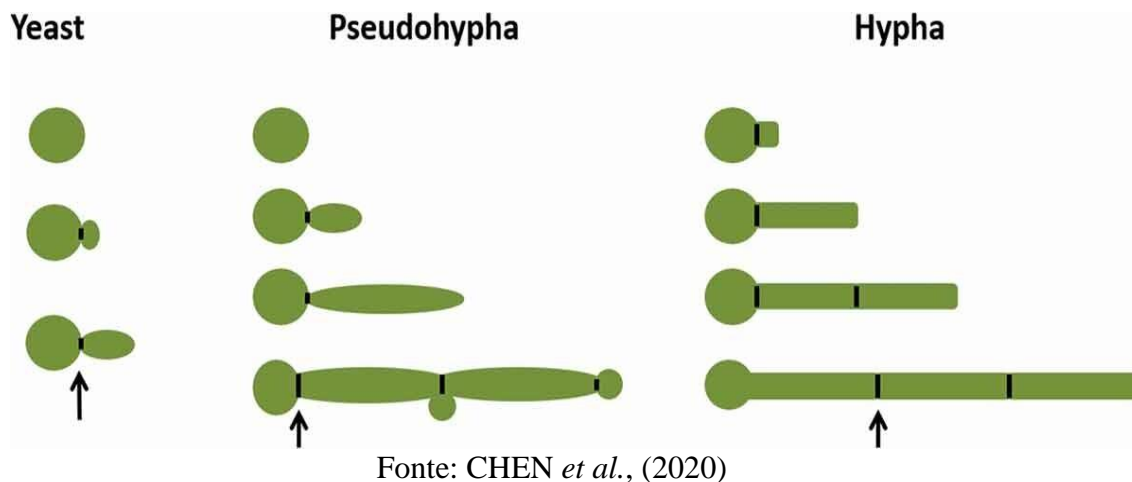
3.10 Gênero *Candida*

As espécies do gênero de *Candida* são comensais, ou seja, fazem parte da flora normal humana, entretanto podem vir a desencadear patologias em indivíduos com algum desequilíbrio do sistema imune (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020), como são candidíase vulvovaginal, candidíase oral e infecções sistêmicas da corrente sanguínea (RIBEIRO *et al.*, 2020).

A *Candida albicans* é das principais responsáveis por infecções humanas como a candidíase que apresentam quadro clínico relativamente simples a sistêmicos possuindo características oportunistas (PEREIRA *et al.*, 2021; NASCIMENTO DIAS *et al.*, 2020). Blastopores, pseudohifas e hifas são as formas morfológicas encontradas nas cepas de *Candida albicans*. Os blastopores se reproduzem de forma assexuada por meio da formação de brotos. A forma de hifa é constituída por ramificações constituídas por

células tubulares e septadas, enquanto as pseudohifas são as novas células formadas, possuem um aspecto alongado (TALAPKO *et al.*, 2021). Como demonstrado na figura 6.

Figura 7. Diagrama esquemático de levedura, pseudohifa e hifa (seta negra indica anel de septina)



A *Candida tropicalis* é considerada uma das mais virulentas espécies de *Candida* ficando atrás, apenas da *Candida albicans*, devido sua resistência a uma variedade de antifúngico como os azoles, anfoterecina B e echinocandina (ZUZA-ALVES; SILVA-ROCHA; CHAVES, 2017).

A *Candida krusei* é uma levedura comumente associada a patologias humanas principalmente em indivíduos imunossuprimidos. Essa espécie tem importância econômica devido a sua utilização para fermentação de cacau para produzir chocolate (CUOMO *et al.*, 2017). No entanto vem emergindo uma crescente preocupação médica devido a sua resistência ao flucanazol (GONG *et al.*, 2018).

3.11 Mecanismo de Tolerância e Resistência Fúngica

As Patologia causadas por fungos que são resistentes revela uma grande preocupação por serem uma das principais causas de mortes relacionadas a processos infecciosos, como as espécies de *Candida*, devido a opções de tratamento limitada. Atualmente três classes de medicamentos são bastante utilizadas na medicina terapêutica são elas: polieno (anfoterecina B), azoles (fluconazol) e equinocandina (caspofungin) (LEE *et al.*, 2021; BERMAN; KRYSAN, 2020).

Neste contexto, o uso incerto e indiscriminado de antifúngicos desencadeou mudanças epidemiológica, principalmente devido a presença de fungos patogênicos extremamente resistente a múltiplas drogas com diferentes mecanismos de ação (PRASAD; NAIR; BANERJEE 2019). Além disso uso prolongado e efeitos colaterais que estão associados ao uso faz com que pacientes negligenciem ou abandonem o tratamento, resultando na falha do tratamento e resistência microbiológica (MARTINEZ-ROSSI *et al.*, 2018).

A resistência fúngica é dividida em inata, que é desenvolvida durante um tratamento com fármacos antifúngicos e adquirida, que consiste em mutações e seleções após o contato com um antifúngico (ARASTEHFAR *et al.*, 2020). Enquanto a tolerância é compreendida como a capacidade do microrganismo crescer diante uma droga antifúngica, é vista um processo intermediário para o desenvolvimento da resistência (BERMAN; KRYSAN, 2020; LAPA *et al.*, 2020; LIMA; COLOMBO; ALMEIDA JUNIOR, DE, 2019).

As espécies do gênero *Candida* podem se tornar resistente aos azoles por meio de três mecanismo. O primeiro consiste na presença de bombas em sua parede que atuado no bombeamento de moléculas entre elas o próprio antifúngico. O segundo envolve alterações gênicas que codificas o alvo farmacológico, como por exemplo o gene ERG11 que após sofre mutação impede que a ligação de azoles ocorra e o terceiro abrange mecanismo de fuga para alterações de membrana ou seja é formado um novas rotas que não são alvos dos azoles permitindo assim que o fungo mantenha sua integridade (PRISTOV; GHANNOUM, 2019).

O uso de azoles é frequentemente associado a quadros de resistência ao flucanazol em espécies de *Candida*, sendo a *Candida tropicalis* mais propícia ao surgimento de resistência fúngica (JIN *et al.*, 2018). Outra forma de resistência é desencadeada pelo uso de drogas equinocandina (Caspofungina, micafungina e anidulafungina) cujo mecanismo de ação atua especificamente na síntese e no bloqueio da enzima 1,3-beta-glucano sintase que é um componente encontrado na célula fúngica (HEALEY; PERLIN, 2018), esse bloqueio resulta na morte do fungo. Os equinocandina são amplamente utilizados para tratamento de candidíase sistêmica (SUN *et al.*, 2020).

A classe de drogas do tipo polieno (anfotericina B, ninestatina e natamicina) são bastantes utilizadas para tratamento de *Candida spp*, *Aspergillus spp*, *Fusarium spp* e *Scedosporium spp* (LAKHANI; PATIL; MAJUMDAR, 2019). A resistência ao polieno é considera rara ao ser comparada com demais drogas antifúngica, o que em parte esse

comportamento pode ser explicado através de seu mecanismo que difere de outros antifúngicos cujo alvo farmacológico enzimas específicas e o polieno atua na membrana celular (CAROLUS *et al.*, 2020).

REFERÊNCIAS

- ABDULKHALEQ, L. A. *et al.* The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Veterinary World**, 2018. v. 11, n. 5, p. 627–635.
- ABUSHAHEEN, M. A. *et al.* Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, 2020. v. 66, n. 6.
- AGEORGES, V. *et al.* Molecular determinants of surface colonisation in diarrhoeagenic *Escherichia coli* (DEC): From bacterial adhesion to biofilm formation. **FEMS Microbiology Reviews**, 2020. v. 44, n. 3, p. 314–350.
- ALHO, C. J. R. Importância da biodiversidade para a saúde humana: Uma perspectiva ecológica. **Estudos Avancados**, 2012. v. 26, n. 74, p. 151–166.
- ALMATAR, M. *et al.* Efflux pump inhibitors: new updates. **Pharmacological Reports**, 2021. v. 73, n. 1.
- AMIRI, G. *et al.* Determination of imipenem efflux-mediated resistance in *Acinetobacte* spp., using an efflux pump inhibitor. **Iranian Journal of Microbiology**, 2019. v. 11, n. 5, p. 368–372.
- ANGLE, G. Classification et critères diagnostiques. **Horizons Héмато**, 2018. v. 08, n. 2, p. 6–8.
- ARASTEHFAR, A. *et al.* The quiet and underappreciated rise of drug-resistant invasive fungal pathogens. **Journal of Fungi**, 2020. v. 6, n. 3, p. 1–34.
- AUDA, I. G.; ALI SALMAN, I. M.; ODAH, J. G. Efflux pumps of Gram-negative bacteria in brief. **Gene Reports**, 2020. v. 20, n. April, p. 100666.
- BALSINDE, J.; WINSTEAD, M. V.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 regulation of arachidonic acid mobilization. **FEBS Letters**, 2002. v. 531, n. 1, p. 2–6.
- BEATTIE, A. J. *et al.* Ecology and bioprospecting. **Austral Ecology**, 2011. v. 36, n. 3, p. 341–356.
- BENT, R. *et al.* Interleukin-1 beta—A friend or foe in malignancies? **International Journal of Molecular Sciences**, 2018. v. 19, n. 8.
- BERMAN, J.; KRYSAN, D. J. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nature Reviews Microbiology**, 2020. v. 18, n. 6, p. 319–331.
- BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B. C. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. **Antibiotics**, 2020. v. 9, n. 6, p. 1–19.
- BIRINGER, R. G. The enzymology of human eicosanoid pathways: the lipoxygenase branches. **Molecular Biology Reports**, 2020. v. 47, n. 9, p. 7189–7207.
- BOGATCHEVA, N. V. *et al.* Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. **Microvascular Research**, 2005. v. 69, n. 3, p. 107–127.

- BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, 2006. v. 28, n. 8, p. 799–808.
- BRANCO, A. C. C. C. *et al.* Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. **Mediators of Inflammation**, 2018. v. 2018, p. 1–10.
- BRIFFOTAUX, J. *et al.* MmpS5/MmpL5 as an efflux pump in *Mycobacterium* species. **Tuberculosis**, 2017. v. 107, p. 13–19.
- BROWN, D.; DEMETER, M.; TURNER, R. J. **Prevalence of Multidrug Resistance Efflux Pumps (MDREPs) in Environmental Communities**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2018.
- BUOMMINO, E. *et al.* Synergistic effect of abietic acid with oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Antibiotics**, 1 jan. 2021. v. 10, n. 1, p. 1–12.
- BUTTERFIELD, T. A; BEST, T. M.; MERRICK, M. A. The Dual Roles of Neutrophils and Macrophages in Inflammation: A Critical Balance Between Tissue Damage and Repair. **Journal of athletic training**, 2006. v. 41, n. 4, p. 457–465.
- CAROLUS, H. *et al.* Amphotericin b and other polyenes—discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. **Journal of Fungi**, 2020. v. 6, n. 4, p. 1–20.
- CHAKRABORTY, S.; DEY, S.; MAZUMDER, I. An Introduction to Bacterial Efflux Pump Inhibitor (EPI) and Analytical Methods for Studying Efflux Pump Inhibitors for Drug Development. **International Journal of Innovative Science and Research Technology**, 2021. v. 6, n. May, p. 351–359.
- CHANDRA, H. *et al.* Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobials - A review. **Plants**, 2017. v. 6, n. 2, p. 457–462.
- CHEN, Hui *et al.* The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. **Virulence**, 2020. v. 11, n. 1, p. 337–348.
- CHITSAZ, M.; BROWN, M. H. The role played by drug efflux pumps in bacterial multidrug resistance. **Essays in Biochemistry**, 2017. v. 61, n. 1, p. 127–139.
- CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution**, 2020. v. 88, n. 1, p. 26–40.
- CHUSID, M. J. Eosinophils: Friends or Foes? **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, 2018. v. 6, n. 5, p. 1439–1444.
- COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology**, 2001. v. 1, n. 8, p. 1397–1406.
- COSTA, S. S. *et al.* Genetic diversity of norA, coding for a main efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Genetics**, 2019. v. 10, n. JAN, p. 1–11.
- COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; RODRIGUES, A. G. *Candida albicans* antifungal resistance and tolerance in bloodstream infections: The triad yeast-host-antifungal. **Microorganisms**, 2020. v. 8, n. 2, p. 2–19.

- CUOMO, C. A. *et al.* Whole genome sequence of the heterozygous clinical isolate *Candida krusei* 81-B-5. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, 2017. v. 7, n. 9, p. 2883–2889.
- CYR, A. R. *et al.* Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. **Critical Care Clinics**, 2020. v. 36, n. 2, p. 307–321.
- DAGHER, O. K. *et al.* Heteromerization fingerprints between bradykinin B2 and thromboxane TP receptors in native cells. **PLoS ONE**, 2019. v. 14, n. 5, p. 1–22.
- DESHMANE, S. L. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, 2009. v. 29, n. 6, p. 313–325.
- DEY, N. *et al.* Role of nanomaterials in deactivating multiple drug resistance efflux pumps – A review. **Environmental Research**, 2022. v. 204, n. PA, p. 111968.
- DINH, C. P. *et al.* Structure-based design, semi-synthesis and anti-inflammatory activity of tocotrienolic amides as 5-lipoxygenase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2020. v. 202, p. 112518.
- DU, D. *et al.* **Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation**. [S.l.]: [s.n.], 2018. V. 16.
- DUDECK, J. *et al.* Directional mast cell degranulation of tumor necrosis factor into blood vessels primes neutrophil extravasation. **Immunity**, 2021. v. 54, n. 3, p. 468–483.e5.
- EGOROV, A. M.; ULYASHOVA, M. M.; RUBTSOVA, M. Y. Bacterial enzymes and antibiotic resistance. **Acta Naturae**, 2018. v. 10, n. 4, p. 33–48.
- EL-BAKY, R. M. A. *et al.* A novel mechanism of action of ketoconazole: Inhibition of the nora efflux pump system and biofilm formation in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infection and Drug Resistance**, 2019. v. 12, p. 1703–1718.
- FAILLACE, M. S. *et al.* Inhibition of the NorA efflux pump of *S. aureus* by (Z)-5-(4-Fluorobenzylidene)-Imidazolidines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 2021. v. 31, p. 127–670.
- FERREIRA, M. S. *et al.* *Systematic Review of Anti-inflammatory Agents from Aspergillus Species*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2021. n. 0123456789.
- FERRER-ESPADA, R. *et al.* A permeability-increasing drug synergizes with bacterial efflux pump inhibitors and restores susceptibility to antibiotics in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Scientific Reports**, 2019. v. 9, n. 1, p. 1–12.
- FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. β -Lactams against the Fortress of the Gram-Positive *Staphylococcus aureus* Bacterium. **Chemical Reviews**, 2021. v. 121, n. 6, p. 3412–3463.
- FREITAS, P. R. *et al.* Characterization and antibacterial activity of the essential oil obtained from the leaves of *Baccharis coridifolia* DC against multiresistant strains. **Microbial Pathogenesis**, 2020. v. 145, n. April, p. 104223.

_____ *et al.* Inhibition of the MepA efflux pump by limonene demonstrated by *in vitro* and *in silico* methods. **Folia Microbiologica**, 2022. v. 67, n. 1, p. 15–20.

FUJIWARA, M. *et al.* Evaluation of efflux pump inhibitors of MexAB- or MexXY-OprM in *Pseudomonas aeruginosa* using nucleic acid dyes. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 2022. n. November 2021.

GARCIA-RUBIO, R. *et al.* The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus Species*. **Frontiers in Microbiology**, 2020. v. 10, n. January, p. 1–13.

GARVEY, M. I.; PIDDOCK, L. J. V. The efflux pump inhibitor reserpine selects multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains that overexpress the ABC transporters PatA and PatB. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2008. v. 52, n. 5, p. 1677–1685.

GONÇALVES, M. D. *et al.* Dehydroabietic acid isolated from *Pinus elliottii* exerts *in vitro* antileishmanial action by pro-oxidant effect, inducing ROS production in promastigote and downregulating Nrf2/ferritin expression in amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Fitoterapia**, 2018. v. 128, n. April, p. 224–232.

GONG, J. *et al.* Genetic differentiation, diversity, and drug susceptibility of *Candida krusei*. **Frontiers in Microbiology**, 2018. v. 9, n. NOV, p. 1–10.

GONZÁLEZ, M. A. *et al.* Synthesis and biological evaluation of abietic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2009. v. 44, n. 6, p. 2468–2472.

GOW, N. A. R.; LATGE, J. P.; MUNRO, C. A. The fungal cell wall: Structure, biosynthesis, and function. **The Fungal Kingdom**, 2017. n. May, p. 267–292.

GRASSIN-DELYLE, S. *et al.* The Role of Toll-Like Receptors in the Production of Cytokines by Human Lung Macrophages. **Journal of Innate Immunity**, 2020. v. 12, n. 1, p. 63–73.

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

HANNA, V. S.; HAFEZ, E. A. A. Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. **Journal of Advanced Research**, 2018. v. 11, n. March 2018, p. 23–32.

HAVE H., P. N. M. TEN. **Dictionary of Global Bioethics: Bioprospecting (See Biopiracy)**. 1 edição ed. [S.l.]: [s.n.], 2021.

HEALEY, K. R.; PERLIN, D. S. Fungal resistance to echinocandins and the MDR phenomenon in *Candida glabrata*. **Journal of Fungi**, 2018. v. 4, n. 3.

HENDERSON, P. J. F. *et al.* Physiological Functions of Bacterial “multidrug” Efflux Pumps. **Chemical Reviews**, 2021. v. 121, n. 9, p. 5417–5478.

HU, Y.; MATSUI, Y.; W. RILEY, L. Risk factors for fecal carriage of drug-resistant *Escherichia coli*: A systematic review and meta-analysis. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, 2020. v. 9, n. 1, p. 1–12.

- HUANG, N. *et al.* Role of arachidonic acid-derived eicosanoids in intestinal innate immunity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2020. v. 0, n. 0, p. 1–12.
- IMPEY, R. E. *et al.* Overcoming intrinsic and acquired resistance mechanisms associated with the cell wall of gram-negative bacteria. **Antibiotics**, 2020. v. 9, n. 9, p. 1–19.
- INNES, J. K.; CALDER, P. C. Omega-6 fatty acids and inflammation. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 2018. v. 132, n. March, p. 41–48.
- JIN, L. *et al.* MDR1 overexpression combined with ERG11 mutations induce high-level fluconazole resistance in *Candida tropicalis* clinical isolates. **BMC Infectious Diseases**, 2018. v. 18, n. 1, p. 1–6.
- JUNIOR, S.; LUIZ, N. **DESAFIOS DA BIOPROSPECÇÃO NO BRASIL**. [S.l.]: [s.n.], 2011.
- KAATZ, Glenn W. *et al.* Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2000. v. 44, n. 5, p. 1404–1406.
- KARASUYAMA, H. *et al.* Basophils, a neglected minority in the immune system, have come into the limelight at last. **International Immunology**, 2021. n. May.
- KIJ, A. *et al.* Development and validation of a rapid, specific and sensitive LC-MS/MS bioanalytical method for eicosanoid quantification - assessment of arachidonic acid metabolic pathway activity in hypertensive rats. **Biochimie**, 2020. v. 171–172, p. 223–232.
- KIZZIAH, J. L. *et al.* Structure of the host cell recognition and penetration machinery of a *Staphylococcus aureus* bacteriophage. **PLoS Pathogens**, 2020. v. 16, n. 2.
- KOMORI, K. *et al.* Bioelectrochemical detection of histamine release from basophilic leukemia cell line based on histamine dehydrogenase-modified cup-stacked carbon nanofibers. **Bioelectrochemistry**, 2021. v. 138, p. 107719.
- KORNELSEN, V.; KUMAR, Ayush; Update on Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Acinetobacter* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2021. v. 65, n. 7.
- KUMAR, Ashwani *et al.* Novel structural analogues of piperine as inhibitors of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2008. v. 61, n. 6, p. 1270–1276.
- KUMAR, Sanath *et al.* Functional and structural roles of the major facilitator superfamily bacterial multidrug efflux pumps. **Microorganisms**, 2020a. v. 8, n. 2.
- _____ *et al.* Functional and structural roles of the major facilitator superfamily bacterial multidrug efflux pumps. **Microorganisms**, 2020b. v. 8, n. 2.
- KUMAR, V. Inflammation research sails through the sea of immunology to reach immunometabolism. **International Immunopharmacology**, 2019. v. 73, n. May, p. 128–145.

- KUSAKIZAKO, T. *et al.* Structural biology of the multidrug and toxic compound extrusion superfamily transporters. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, 2020. v. 1862, n. 12, p. 183154.
- KORNELSEN, V.; KUMAR, A. Update on Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Acinetobacter* spp. [S.l.]: [s.n.], 2021.
- LAING, K. J.; SECOMBES, C. J. Chemokines. **Developmental and Comparative Immunology**, 2004. v. 28, n. 5, p. 443–460.
- LAKHANI, P.; PATIL, A.; MAJUMDAR, S. Challenges in the Polyene- and Azole-Based Pharmacotherapy of Ocular Fungal Infections. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, 2019. v. 35, n. 1, p. 6–22.
- LAPA, A. J. *et al.* **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Porto Alegre: Metrópole: [s.n.], [s.d.].
- LEE, Y. *et al.* Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and beyond. **Chemical Reviews**, 2021. v. 121, n. 6, p. 3390–3411.
- LEKSHMI, Manjusha; *et al.* Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator superfamily in *Staphylococcus aureus*. **AIMS Microbiology**, 2018. v. 4, n. 1, p. 1–18.
- LIMA, S. L.; COLOMBO, A. L.; ALMEIDA JUNIOR, J. N. DE. Fungal Cell Wall: Emerging Antifungals and Drug Resistance. **Frontiers in Microbiology**, 2019. v. 10, n. November, p. 1–9.
- LIN, K. H. *et al.* Synergistic Actions of Benzyl Isothiocyanate with Ethylenediaminetetraacetic Acid and Efflux Pump Inhibitor Phenylalanine-Arginine β -Naphthylamide Against Multidrug-Resistant *Escherichia coli*. **Microbial Drug Resistance**, 2020. v. 26, n. 5, p. 468–474.
- LINDSTRÖM, M. *et al.* Plasma bradykinin concentrations during septic shock determined by a novel LC-MS/MS assay. **Clinica Chimica Acta**, 2019. v. 493, n. February, p. 20–24.
- LIU, X. *et al.* Abietic acid suppresses non-small-cell lung cancer cell growth via blocking IKK β /NF- κ B signaling. **OncoTargets and Therapy**, 2019a. v. 12, p. 4825–4837.
- _____ *et al.* Abietic acid suppresses non-small-cell lung cancer cell growth via blocking IKK β /NF- κ B signaling. **OncoTargets and Therapy**, 2019b. v. 12, p. 4825–4837.
- LU, W. J. *et al.* Brown and Red Seaweeds Serve as Potential Efflux Pump Inhibitors for Drug-Resistant *Escherichia coli*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2019. v. 2019, n. i.
- LUO, C. *et al.* A Review of the Anti-Inflammatory Effects of Rosmarinic Acid on Inflammatory Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, 2020. v. 11, n. February, p. 1–11.

- MARTÍN SERRANO, P. *et al.* Anaphylactic risk due to systemic mastocytosis: Perioperative management in cardiac surgery. **Revista Española de Anestesiología y Reanimación (English Edition)**, 2019. v. 66, n. 6, p. 346–349.
- MARTINEZ-ROSSI, N. M. *et al.* Dermatophyte resistance to antifungal drugs: Mechanisms and prospectus. **Frontiers in Microbiology**, 2018. v. 9, n. MAY, p. 1–18.
- MATUSZEWSKA, M. *et al.* The Evolutionary Genomics of Host Specificity in *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, 2020. v. 28, n. 6, p. 465–477.
- MCCUTCHEON, K. Once upon a time. **Journal of perioperative practice**, 2016. v. 26, n. 5, p. 95.
- MENDIOLA, A. S.; CARDONA, A. E. The IL-1 β phenomena in neuroinflammatory diseases. **Journal of Neural Transmission**, 2018. v. 125, n. 5, p. 781–795.
- MICHAELIAN, N. *et al.* Structural insights on ligand recognition at the human leukotriene B4 receptor 1. **Nature Communications**, 2021. v. 12, n. 1, p. 1–12.
- MITCHELL; C. J.; STONE; T. A.; DEBE, C. M. Peptide-Based Efflux Pump Inhibitors of the Small Multidrug Resistance Protein from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2019. v. 63, n. 9, p. 1–10.
- MIYAKE, K. *et al.* Basophils and their effector molecules in allergic disorders. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2021. v. 76, n. 6, p. 1693–1706.
- MIYATA, J. *et al.* Cysteinyl leukotriene metabolism of human eosinophils in allergic disease. **Allergology International**, 2020. v. 69, n. 1, p. 28–34.
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. D. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quimica Nova**, 2001. v. 24, n. 1, p. 105–111.
- NADER, W. *et al.* Bioprospecting. 2001. n. January 2001.
- NASCIMENTO DIAS, J. DO *et al.* Mechanisms of action of antimicrobial peptides ToAP2 and NDBP-5.7 against *Candida albicans* planktonic and biofilm cells. **Scientific Reports**, 2020. v. 10, n. 1, p. 1–14.
- NOHRA, Y. A. *et al.* Chemical Characterization and Botanical Origin of French Ambers. **Journal of Natural Products**, 2015. v. 78, n. 6, p. 1284–1293.
- NONG, W. J. *et al.* Isolation and characterization of abietic acid. **Advanced Materials Research**, 2014. v. 887–888, p. 551–556.
- OLIVEIRA JUNKES, C. F. DE *et al.* Resin tapping transcriptome in adult slash pine (*Pinus elliottii* var. *elliottii*). **Industrial Crops and Products**, 2019. v. 139, n. July, p. 111545.
- OLIVEIRA, M. M. *et al.* Spectroscopic characterization and efflux pump modulation of a thiophene curcumin derivative. **Journal of Molecular Structure**, 2020. v. 1215.
- ONDUSKO, D. S.; NOLT, D. *Staphylococcus aureus*. **Pediatrics in Review**, 2018. v. 39, n. 6, p. 287–298.

- PACHORI, P.; GOTHALWAL, R.; GANDHI, P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. **Genes and Diseases**, 2019. v. 6, n. 2, p. 109–119.
- PANNUNZIO, A.; COLUCCIA, M. Cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-1 inhibitors in cancer: A review of oncology and medicinal chemistry literature. **Pharmaceuticals**, 2018. v. 11, n. 4, p. 1–20.
- PARK, J. Y. *et al.* **Abietic acid isolated from pine resin (Resina Pini) enhances angiogenesis in HUVECs and accelerates cutaneous wound healing in mice.** [S.l.]: Elsevier Ireland Ltd, 2017. V. 203.
- PASQUINA-LEMONCHE, L. *et al.* The architecture of the Gram-positive bacterial cell wall. **Nature**, 2020. v. 582, n. 7811, p. 294–297.
- PATINI, R. *et al.* The effect of different antibiotic regimens on bacterial resistance: a systematic review. **Antibiotics**, 2020. v. 9, n. 1.
- PELLEFIGUES, C. *et al.* Diverse innate stimuli activate basophils through pathways involving Syk and I κ B kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2021. v. 118, n. 12, p. 1–11.
- PEREIRA, R. *et al.* Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **Journal of Applied Microbiology**, 2021. v. 131, n. 1, p. 11–22.
- POIREL, L.; *et al.* Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Sepsis. **Pediatric Infectious Disease Journal**, 2018. v. 23, n. 10, p. 979–980.
- POULSEN, B. E.; DEBER, C. M. Drug efflux by a small multidrug resistance protein is inhibited by a transmembrane peptide. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2012. v. 56, n. 7, p. 3911–3916.
- POUPOT, R.; GOURSAT, C.; FRUCHON, S. Multivalent nanosystems: Targeting monocytes/ macrophages. **International Journal of Nanomedicine**, 2018. v. 13, p. 5511–5521.
- PRAME KUMAR, K.; NICHOLLS, A. J.; WONG, C. H. Y. Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. **Cell and Tissue Research**, 2018. v. 371, n. 3, p. 551–565.
- PRASAD, R.; NAIR, R.; BANERJEE, Atanu. Multidrug transporters of *Candida* species in clinical azole resistance. **Fungal Genetics and Biology**, 2019. v. 132, n. July, p. 103252.
- PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, 2019. v. 25, n. 7, p. 792–798.
- PU, W. Ling *et al.* Anti-inflammatory effects of *Rhodiola rosea* L.: A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2020. v. 121, n. June 2019.
- PULE, C. M. *et al.* Efflux pump inhibitors: targeting mycobacterial efflux systems to enhance TB therapy. 2016. n. October 2015, p. 17–26.

QUINTERO-VILLEGAS, A.; VALDÉS-FERRER, S. I. Role of 5-HT₇ receptors in the immune system in health and disease. **Molecular Medicine**, 2019. v. 26, n. 1, p. 4–11.

RAMIREZ, G. A. *et al.* Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review. **BioMed Research International**, 2018. v. 2018, n. Figure 1.

RHEE, J. Y.; CHOI, J. Y.; KO, K. S. Efflux pump inhibitor carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP) enhances bacteriostatic activity of trimethoprim-sulfamethoxazole against clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from Korea. **Journal of Bacteriology and Virology**, 2016. v. 46, n. 4, p. 185–192.

RIBEIRO, F. C. *et al.* Action mechanisms of probiotics on *Candida* spp. and candidiasis prevention: an update. **Journal of Applied Microbiology**, 2020. v. 129, n. 2, p. 175–185.

RICCIARDOLO, F. L. M. *et al.* Bradykinin in asthma: Modulation of airway inflammation and remodelling. **European Journal of Pharmacology**, 2018. v. 827, n. September 2017, p. 181–188.

RINDI, L. Efflux pump inhibitors against nontuberculous mycobacteria. **International Journal of Molecular Sciences**, 2020. v. 21, n. 12, p. 1–13.

ROH, S.S; PARK, M. K.; KIM, Y. U. Abietic acid from Resina *Pini* of *Pinus* species as a testosterone 5 α -reductase inhibitor. **Journal of Health Science**, 2010. v. 56, n. 4, p. 451–455.

ROHDE, M. The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. **Microbiology Spectrum**, 2019. v. 7, n. 3.

SABATINI, S. *et al.* Re-evolution of the 2-phenylquinolines: Ligand-based design, synthesis, and biological evaluation of a potent new class of staphylococcus aureus NorA efflux pump inhibitors to combat antimicrobial resistance. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2013. v. 56, n. 12, p. 4975–4989.

SALEHZADEH, A. *et al.* The Effect of Thyme (*Thymus vulgaris*) Extract on the Expression of norA Efflux Pump Gene in Clinical Strains of *Staphylococcus aureus*. **J Genet**, 2018. v. 4, n. 1, p. 26–36.

SANCHEZ-CARBONEL, A. *et al.* The effect of the efflux pump inhibitor Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone (CCCP) on the susceptibility to imipenem and cefepime in clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. **PLoS ONE**, 2021. v. 16, n. 12 December, p. 1–12.

SANTANA, K. *et al.* Applications of Virtual Screening in Bioprospecting: Facts, Shifts, and Perspectives to Explore the Chemo-Structural Diversity of Natural Products. **Frontiers in Chemistry**, 2021. v. 9, n. April.

SAWARKAR, A.; SHARMA, R. K.; GAUTAM, V. Bioprospecting : Creating value for biodiversity. 2019. v. 8, n. 4, p. 256–265.

SCHINDLER, B. D. *et al.* Mutagenesis and modeling to predict structural and functional characteristics of the *Staphylococcus aureus* MepA multidrug efflux pump. **Journal of Bacteriology**, 2013. v. 195, n. 3, p. 523–533.

- SHARMA, A.; GUPTA, V. K.; PATHANIA, R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. **he Indian Journal of Medical Research**, 2020. v. 149, n. 2, p. 129.
- SHARMA, J. N.; AL-OMRAN, A.; PARVATHY, S. S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology**, 2007. v. 15, n. 6, p. 252–259.
- SHRIRAM, V. *et al.* Inhibiting bacterial drug efflux pumps via phyto-therapeutics to combat threatening antimicrobial resistance. **Frontiers in Microbiology**, 2018. v. 9, n. DEC, p. 1–18.
- SI, H. *et al.* Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels are responsible for histamine-induced Ca²⁺ entry, permeability increase, and interleukin synthesis in lymphatic endothelial cells. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, 2020. v. 318, n. 5, p. H1283-G1295.
- SILVA, V. *et al.* Molecular epidemiology of staphylococcus aureus lineages in wild animals in europe: A review. **Antibiotics**, 2020. v. 9, n. 3, p. 1–28.
- SONG, Lele; WU, X. Development of efflux pump inhibitors in antituberculosis therapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2016. v. 47, n. 6, p. 421–429.
- SOROKINA, M.; STEINBECK, C. Review on natural products databases: Where to find data in 2020. **Journal of Cheminformatics**, 2020. v. 12, n. 1, p. 1–51.
- SOUSA ANDRADE, L. M. DE *et al.* Antimicrobial activity and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by extract and isolated compounds from *Arrabidaea brachypoda*. **Microbial Pathogenesis**, 2020. v. 140, p. 103935.
- SPREACKER; P. J. *et al.* A new substrate triggers susceptibility by uncoupling a bacterial multidrug resistance efflux pump. **bioRxiv**, 2021. p. 1–28.
- STACHELEK, M. *et al.* Overcoming bacterial resistance to antibiotics: The urgent need – A review. **Annals of Animal Science**, 2021. v. 21, n. 1, p. 63–87.
- STAVRI, M.; PIDDOCK, L. J. V.; GIBBONS, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2007. v. 59, n. 6, p. 1247–1260.
- SUN, J.; DENG, Z.; YAN, A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2014. v. 453, n. 2, p. 254–267.
- SUN, Q. *et al.* Inhibiting fungal echinocandin resistance by small-molecule disruption of geranylgeranyltransferase type i activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2020. v. 64, n. 2, p. 1–12.
- TALAPKO, J. *et al.* *Candida albicans*-the virulence factors and clinical manifestations of infection. **Journal of Fungi**, 2021. v. 7, n. 2, p. 1–19.

- TALEVI, A. *et al.* Discovery of anticonvulsant activity of abietic acid through application of linear discriminant analysis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 2007. v. 17, n. 6, p. 1684–1690.
- TASNEEM, S. *et al.* Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. **Pharmacological Research**, 2019. v. 139, p. 126–140.
- TASSIA, S. *et al.* ASPECTOS TAXONÔMICOS DA BIOPROSPECÇÃO NO BRASIL: TENDÊNCIA. **Oecologia Australis**, 2020. v. 24, n. 4, p. 770–780.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia (12 a Edição)**. [S.l.]: [s.n.], 2016.
- UPADHYA R, K.; SHENOY, L.; VENKATESWARAN, R. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, 2018. v. 34, n. 3, p. 46–50.
- VARELA, M. F.; DRUG, A.; SYSTEMS, E. **Bacterial Antimicrobial Efflux Pumps**. [S.l.]: [s.n.], 2020.
- VARELA, M. L. *et al.* Acute Inflammation and Metabolism. **Inflammation**, 2018. v. 41, n. 4, p. 1115–1127.
- VERA-LEIVA, A. *et al.* The efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine β -naphthylamide (PA β N) increases resistance to carbapenems in Chilean clinical isolates of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2018. v. 12, p. 73–76.
- VERMA, P.; TIWARI, M.; TIWARI, V. Efflux pumps in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: Current status and challenges in the discovery of efflux pumps inhibitors. **Microbial Pathogenesis**, 2021. v. 152, n. October 2020.
- VIANNA, H. R. *et al.* Inflammation in chronic kidney disease : the role of cytokines. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 2011. v. 33, n. 3, p. 351–364.
- VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. Da S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, 2006. v. 29, n. 2, p. 326–337.
- WAN, M. *et al.* Biosynthesis of leukotriene B4. **Seminars in Immunology**, 2017. v. 33, n. May, p. 3–15.
- WISASTRA, R.; DEKKER, F. J. Inflammation, cancer and oxidative lipoxygenase activity are intimately linked. **Cancers**, 2014. v. 6, n. 3, p. 1500–1521.
- WU, H. *et al.* Beyond a neurotransmitter: The role of serotonin in inflammation and immunity. **Pharmacological Research**, 2019. v. 140, n. June 2018, p. 100–114.
- YANG, J. *et al.* Monocyte and macrophage differentiation: Circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomarker Research**, 2014. v. 2, n. 1, p. 1–9.
- YARLETT, R. The Nagoya Protocol: sharing the benefits of pharmaceutical products and protecting biodiversity. **European Pharmaceutical Review**, 2019.

- YUAN, Yi *et al.* Evaluation of Heterocyclic Carboxamides as Potential Efflux Pump Inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiotics**, 2022. v. 11, n. 1.
- ZAMAN, S. Bin *et al.* Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. **Cureus**, 2017. v. 9, n. 6.
- ZGURSKAYA, H. I. Introduction: Transporters, Porins, and Efflux Pumps. **Chemical Reviews**, 2021. v. 121, n. 9, p. 5095–5097.
- ZHAO, J. *et al.* Assembly and Functional Role of PACE Transporter PA2880 from *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology Spectrum**, 27 abr. 2022. v. 10, n. 2.
- ZHOU, Y. X. *et al.* A review on the pharmacokinetics of paeoniflorin and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2020. v. 130, n. May.
- ZLOTNIK, A. Perspective: Insights on the Nomenclature of Cytokines and Chemokines. **Frontiers in Immunology**, 2020. v. 11, n. May, p. 1–4.
- ZUZA-ALVES, D. L.; SILVA-ROCHA, W. P.; CHAVES, G. M. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. **Frontiers in Microbiology**, 2017. v. 8, n. OCT, p. 1–25.

4. MANUSCRITO

4.1 Manuscrito I: Avaliação da atividade antiedematogênica e anti-inflamatória do ácido abiético em camundongos

Maria Gabriely de Lima Silva^a, Lucas Yure Santos da Silva^a, Renata Torres Pessoa ^a, Maria Rayane Correia de Oliveira^{a,b}, Francisco Lucas Alves Batista^a, Isabel Sousa Alcântara, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins^a, Irwin Rose Alencar de Menezes^{a*}.

^aLaboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry (LFQM), Departamento of Biological Chemistry, Regional University of Cariri-URCA, Crato, Ceará, Brazil.

^b Graduate Program in Biotechnology-Northeast Biotechnology Network (RENORBIO); State University of Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brazil.

Resumo: A inflamação consiste em uma resposta imune com eventos vasculares e celulares que são desencadeados por estímulos nocivos. O ácido abiético é um diterpeno frequentemente encontrado como composto majoritário em espécies de pinheiro entre elas o *Pinus elliotis*. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antiedematogênica e anti-inflamatória do ácido abiético em camundongos. Os animais utilizados nos ensaios foram os camundongos *Swiss (Mus musculus)* (20-30 g). As doses utilizadas foram, 100, 200, 50 mg/kg. Os efeitos no SNC foram avaliados por meio dos ensaios de campo aberto e *rota rod*. A triagem antinociceptiva e anti-inflamatória foi determinada pelos modelos de contorções abdominais induzida por ácido acético e formalina. A atividade antiedematogênica foi investigada a partir dos ensaios de edema de pata por carragenina, dextrana, histamina, ácido araquidônico, prostaglandina, além de permeabilidade vascular e granuloma (CEUA 00104/2021-1). Os resultados demonstraram que o ácido abiético (200 mg/kg) ao ser administrado por via oral não causou alterações no SNC. Na avaliação da atividade antiedematogênica e anti-inflamatória todas as doses testadas (50, 100 e 200 mg/kg) com exceção da dose de 50 mg/kg no teste de formalina, apresentaram significância nos modelos-avaliados, sendo escolhido a dose de 100 mg/kg para realização dos mecanismos inflamatórios, que demonstrou redução de edema em todos os modelos testados. Conclui-se que, o ácido abiético apresentou atividade anti-inflamatória promissora nos modelos de inflamação aguda e crônica em camundongos.

Palavras-chave: Ácido abiético, inflamação, camundongos.

Introdução

A inflamação consiste na primeira linha de defesa do organismo, desencadeada após o corpo sofrer uma lesão tecidual, infecção ou outros estímulos nocivos. O objetivo final desse fenômeno é remover estes agentes nocivos, como os patógenos levando a uma homeostasia do organismo (KIM *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2021). As principais manifestações clínicas da inflamação são os cinco sinais cardinais (rubor, edema, calor, dor e perda da função do órgão afetado) (MCCUTCHEON, 2016).

O mecanismo do processo inflamatório inclui eventos vasculares e celulares que envolve a liberação de células imunológicas, como leucócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos que atuam na secreção de substâncias especializadas incluindo aminas,

peptídeos vasoativos, eicosanoides e citocinas pró-inflamatória (ABDULKHALEQ *et al.*, 2018). No entanto, a liberação intensa e contínua de mediadores inflamatórios pode desencadear falhas no mecanismo de regulação podendo resultar em danos nos tecidos, sendo comumente acompanhado de dor evoluindo para um processo crônico (LI *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2021). Neste contexto, o desenvolvimento de novos fármacos para resolução da inflamação é visto como uma estratégia terapêutica (WANG *et al.*, 2021).

Diante do exposto, a caracterização de compostos químicos a partir de produtos naturais aponta para a existência de fontes importantes para o desenvolvimento de medicamentos (DEMARQUE *et al.*, 2020), que além de possuírem baixa toxicidade podem possuir efeitos colaterais menores (DENG *et al.*, 2020).

Plantas do gênero *Pinus* L., os pinheiros vem sendo objeto de estudo nos últimos anos, principalmente devido as resinas que são encontradas nessas espécies, sendo estas utilizadas na produção de tinta de impressão, borracha sintética, papel e adesivos. Uma vez que, são constituídas principalmente por terpeno (LI, YUANLIN *et al.*, 2019). De acordo (PRADO-AUDELO, DEL *et al.*, 2021), os terpenos possuem uma alta diversidade na química estrutural, além de importantes aplicações terapêuticas.

O ácido abiético (AA) é um diterpeno (KIM *et al.*, 2021), composto majoritário de caráter hidrofóbico, encontrado principalmente nas resinas de espécies de pinheiros, como *Pinus* sp (CHAUHAN *et al.*, 2019; GULNUR; EVINC; ASLANERDEMC, 2020). O AA tem sido amplamente estudado devido sua abundância, baixo custo e modificações químicas fáceis (GNANASEKAR *et al.*, 2020). Na literatura, o ácido abiético tem atividades biológicas comprovadas como: antineoplástico (LIU *et al.*, 2019) inibidor de testosterona (ROH; PARK; KIM, 010), antibacteriana (ITO *et al.*, 2020), anticonvulsivo (TALEVI *et al.*, 2007) e antiobesidade (HWANG *et al.*, 2011).

Tendo em vista a importância de novas opções terapêuticas que envolvem o processo inflamatório, estudos relacionados a atividade anti-inflamatória do ácido abiético são de grande relevância, uma vez que este pode vir a se tornar uma alternativa para tratamentos com baixo custo. Portanto, o presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade antiedematogênica e anti-inflamatória do ácido abiético em camundongos.

Materiais e métodos

Drogas e reagentes

O ácido abiético, ácido araquidônico, histamina, prostaglandina, carragenina, dextrana, azul de Evans, ácido acético, formalina e o-dianisidina composta (usado para ensaio de mieloperoxidase) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA); A xilazina e a cetamina compradas adquiridas da Ceva Santé Animale (Paulínia, SP, Brasil). Os kits para quantificação das proteínas totais foram fornecidos pelo Labtest (Lagoa Santa, Brasil). Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes de serem administrados por via oral (v.o) ou intraperitoneal (i.p) de acordo com o peso do animal (0,01 mL/g de peso corporal). O grupo controle recebeu salina 0,9%, enquanto o ácido abiético foi diluído em 10 µL de solução aquosa de Tweer-80, 15 µL de etanol e 2000 µL de solução salina.

Animais e aspectos éticos do estudo

Para análise *in vivo*, camundongos *swiss* machos e fêmeas (*Mus musculus*) pesando entre 20 e 30 g foram mantidos em caixas de polipropileno à temperatura ambiente (23±2 °C) com alimentos (Labina, Purina ®) e com livre acesso a água, sob um ciclo claro/escuro de 12 h. Todos os protocolos descritos neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa em Animais (CEUA/Brasil) da Universidade Regional do Cariri (número de referência 00104/2021-1).

Caracterização dos efeitos do ácido abiético no SNC

Teste do campo aberto

A capacidade motora dos animais foi verificada por meio de um campo aberto quadrangular com 30 cm de lado, tendo em sua base 9 quadrados de 10 cm lado. Os animais foram separados em (n=6/grupo) e pré-tratados com veículo (salina 0,9 %, v.o.), ácido abiético (2000 mg/kg, v.o). 1h após o tratamento os animais foram levados individualmente para o campo aberto, ambientados por 1 min e, em seguida, observados por 4 min, quanto ao número de campos explorados (LAPA *et al.*, 2003b).

Teste do Rota-rod

Os animais foram selecionados em sessões de 3 min de duração antes do tratamento, sendo selecionados aqueles que permaneceram durante esse período na barra giratória. Dessa forma, os animais (n=3/grupo) foram tratados com veículo (salina 0,9%, v.o.), ou ácido abiético (2000 mg/kg, v.o), foram avaliados durante 1 minuto (16 rpm) quanto ao número de quedas e o tempo de permanência na barra giratória (DUNHAM; MIYA, 1957).

Avaliação da triagem anti-inflamatória e antinociceptiva do ácido abiético

Nociceção visceral induzida por ácido acético

Camundongos (n=6/grupo) foram tratados, via oral, com salina 0,9% (controle negativo) ou ácido abiético (50, 100 e 200 mg/kg,v.o), 1 hora antes da administração intraperitoneal (*i.p.*) de ácido acético 0,6%. Após a administração do ácido acético, o número de contorções abdominais foi registrado, para cada animal, durante um período de 30 minutos (LAPA, 2003).

Ensaio de formalina

Os animais foram pré-tratados com solução com salina 0,9% (controle negativo) (v.o), ácido abiético (50,100 e 200 mg/kg, v.o). Após 30 minutos foi administrada por via intraplantar, formalina 2,5% (20µL) na superfície ventral da pata direita do animal. A resposta nociceptiva (lambida e/ou mordida da pata) foram observadas de 0-5 min (1° fase) de 15-30 min (2° fase) após injeção de formalina (TJØLSEN, 1992).

Avaliação da atividade anti-inflamatória

Edema de pata induzido pela injeção intra-plantar de carragenina e dextrana

Nos edemas de pata induzido pela injeção intra-plantar de carragenina e dextrana. (n=6/grupo), os animais tiveram o volume inicial das patas traseiras direita e esquerda avaliadas por pletismometria. Posteriormente, os animais foram pré-tratados oralmente com salina 0,9 % (controle negativo) e 50,100 e 200 mg/kg por via oral do ácido abiético. Após 1h, os animais receberam carragenina ou dextrana a 1% (20 µL/pata) na pata direita

e água de injeção (20 µl) na pata esquerda. O volume das patas traseiras de cada animal foi registrado nos tempos 1, 2, 3 e 4 h após a aplicação de carragenina ou dextrana (LAPA, 2003). Após o edema de pata induzido por carragenina foi realizado a dosagem de mieloperoxidase.

Dosagem da mieloperoxidase

Os níveis da atividade de mieloperoxidase (MPO) foram determinados conforme técnica descrita por Bradley;Christensen (1982), utilizando peróxido de hidrogênio 0,0005% como substrato para MPO. Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade capaz de converter 1 µmol de peróxido de hidrogênio a água em 1 min a 22° C. A variação da densidade óptica da mistura das amostras com a solução de o-dianisidina em função do tempo de reação foi avaliada por espectrofotômetro à 600 nm. Os resultados foram expressos como UMPO/µl de lavado.

Edema de pata induzido pela injeção intra-plantar de ácido araquidônico, histamina e prostaglandina

Os volumes basais das patas traseiras de cada animal (n=6/grupo) foram mensuradas por pletismometria. Posteriormente, os animais foram pré-tratados (v.o.) com solução 0,9 % salina (controle negativo) e ácido abiético (100 mg/kg, v.o). Após 1 h, os animais receberam ácido araquidônico (1%), histamina (1%) ou prostaglandina na pata (20 µl / pata) e veículo água de injeção (histamina e prostaglandina) ou PBS (ácido araquidônico) na pata esquerda. O volume das patas traseiras foi medido aos 15, 30, 45 e 60 min após injeção do ácido araquidônico (DIMARTINO *et al.*, 1989). No ensaio de histamina, o volume da pata traseira de cada animal foi registrado após 30, 60, 90 e 120 min (MALING, 1974) e nos tempos 15, 30, 45 e 60 minutos após a injeção da prostaglandina foram realizados a avaliação do volume das patas traseiras (CAMPOS; CALIXTO, 1995).

Permeabilidade vascular mensurada pelo extravasamento de Azul de Evans

Camundongos (n=6/grupo) foram tratados por via oral, com salina 0,9% (controle negativo) e o ácido abiético (100 mg/kg). O grupo naive não recebeu nenhum tratamento. Imediatamente após os tratamentos, os animais receberam azul de *Evans* (0,2

mL/animal/plexo retro orbital). Após 1h dos tratamentos, os animais receberam injeção intraperitoneal de carragenina 1%. Seguidas 4 horas, os animais foram eutanasiados sendo injetado na cavidade peritoneal 3 mL de tampão PBS. As amostras foram centrifugadas por 2 min a 6000 rpm e a leitura do sobrenadante foi realizada por espectroscopia com filtro de 520 nm (LAPA, 2003).

Lesão granulomatosa induzida pela implantação de pellets de algodão

Camundongos (n=6/grupo) foram anestesiados com xilazina (20 mg/kg) e ketamina (80 mg/kg). Em seguida, foram colocados quatro *pellets* de algodão com peso de 10 mg (0,01 g) no dorso de cada animal. Sendo estes tratados até o décimo dia, via oral com salina 0,9% (controle negativo) e ácido abiético (100 mg/kg). No décimo primeiro dia, os animais foram eutanasiados e os pellets foram retirados da região dorsal e colocados em estufa para secagem durante 24 h, a uma temperatura de 37 °C. Logo após, foram pesados. Em seguida, foi feito o homogenato para a dosagem de proteínas totais, aplicando ao homogenato um reagente contendo biureto que reage com as proteínas presentes na amostra e desenvolve uma coloração roxa proporcional a concentração proteica. Após 10 min, a amostra foi lida por espectroscopia com filtro de 550 nm (SWINGLE; SHIDEMAN, 1972).

Análise Estatística

Os dados foram analisados pela ANOVA (*one-way* ou *two-way*), seguida pelo teste pós-hoc de *Tukey*, *Bonferoni* ou teste T, usando o software *Graphpad prism* versão 7.00 (GraphPad, San Diego, CA, EUA, 2016). A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$.

Resultados

Caracterização dos efeitos do ácido abiético no SNC

Em relação ao ensaio de campo aberto não houve redução das reações comportamentais (autolimpeza, cruzamentos e exploração) dos camundongos, ao ser administrado o ácido abiético (200 mg/kg, *v.o*) quando comparado ao grupo controle.

Indicando que provavelmente ou possivelmente o AA não interfere na atividade ansiolítica ou sedativa.

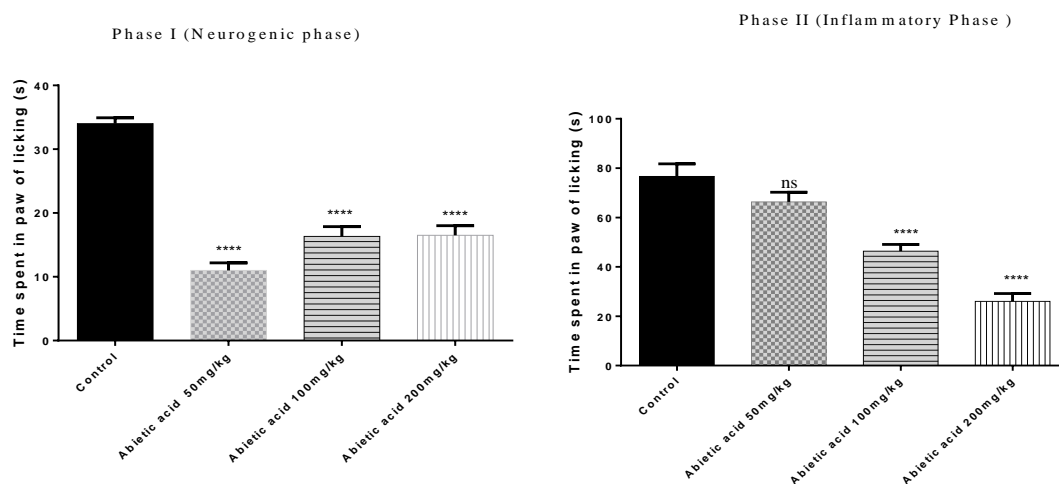
No experimento de *Rota-rod* os grupos de animais tratados com o ácido abiético (200 mg/kg, *v.o*) não promoveu aumento o tempo de queda e não houve alterações no tempo de permanência ao ser comparado com o controle negativo.

Avaliação da triagem antinociceptiva e anti-inflamatória do ácido abiético

Teste de Formalina

No teste de formalina, o ácido abiético (50, 100 e 200mg/kg) apresentou significância na primeira fase (figura 2A) (fase neurogênica) ao ser comparado com o controle negativo, com 67 (p<0,0001), 52 (p<0,0001) e 51,48% (p<0,0001) respectivamente. Na segunda fase (Figura 2B) (fase inflamatória), os grupos tratados com o ácido abiético (100 e 200 mg/kg), apresentaram redução do tempo de lambertura em 34,57 (p<0,0001) e 66,07% (p<0,0001) respectivamente, em comparação ao grupo controle negativo. Sugerindo que o ácido abiético apresenta possível atividade antinociceptiva associado ao mecanismo anti-inflamatório.

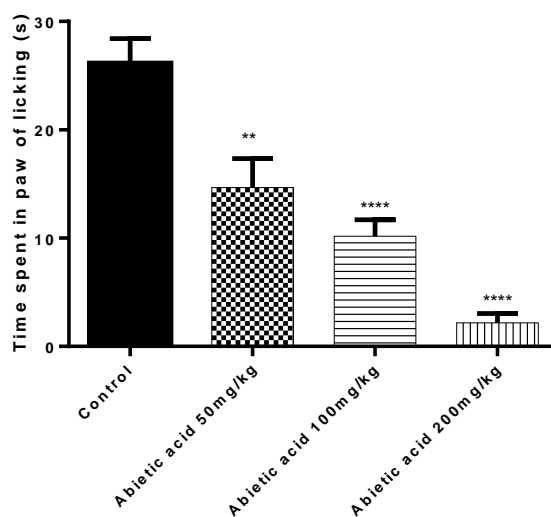
Figura 1. Atividade do Ácido abiético no teste de formalina e contorções abdominais. 1a fase (neurogênica) 2a fase (inflamatória) Os valores apresentam a média ± E. P. M (Erro Padrão da Média). A análise estatística foi feita por one way ANOVA seguida do teste de Tukey. (**** p<0,001; vs. controle negativo).



Contorções abdominais induzidas por ácido acético

No ensaio de contorções abdominais, os grupos tratados com o ácido abiético nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg apresentaram redução de contorções em 43,97 ($p < 0,01$), 61,17 ($p < 0,0001$) e 91,48% ($p < 0,0001$) respectivamente, quando comparados ao controle negativo (Figura 2).

Figura 2. Atividade do Ácido abiético no teste de formalina e contorções abdominais A) 1a fase (neurogênica) 2a fase (inflamatória) e C) Atividade do Àcido abiético sob o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os valores apresentam a média \pm E. P. M (Erro Padrão da Média). A análise estatística foi feita por one way ANOVA seguida do teste de Tukey. (** $p < 0,01$; **** $p < 0,001$; vs. controle negativo).



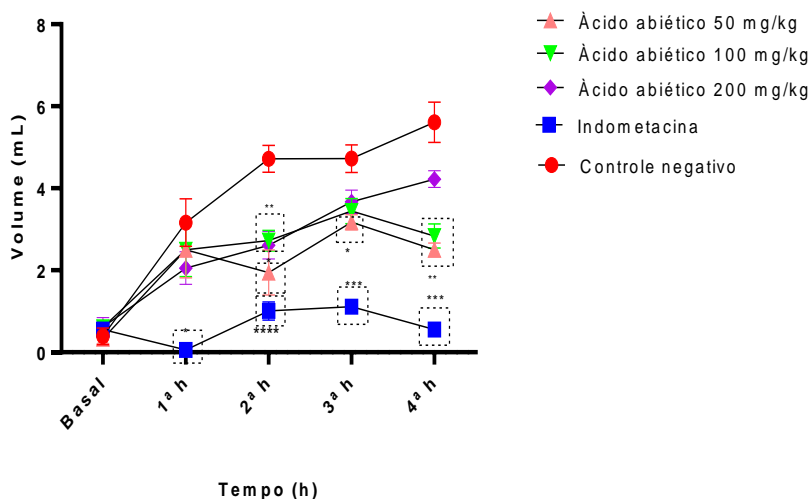
Efeito do ácido abiético no modelo edema de pata induzido pela injeção intra-plantar de carragenina

No edema de pata induzido por carragenina (figura 3A), a partir da segunda hora, o AA (50, 100, 200mg/kg) apresentou redução significativa do edema 60 ($p < 0,05$), 39,29 ($p < 0,01$), 46,29 % ($p < 0,01$) e a indometacina (10 mg/kg) 78,81 ($p < 0,0001$). Já na terceira hora apenas a dose de 50 mg/kg ácido abiético e indometacina apresentaram resultados significantes com 35 ($p < 0,05$) e 76,48 % ($p < 0,0001$) de inibição de edema. Na quarta hora de avaliação os grupos: ácido abiético (50 e 200 mg/kg) e indometacina (10 mg/kg) obtiveram um percentual de inibição de 52,23 ($p < 0,01$), 42 ($p < 0,01$) e 90,19% ($p < 0,001$) de acordo com a ordem apresentada. A análise da área sob a curva (AUC) (Figura 3B) mostrou que o ácido abiético (50, 100, 200 mg/kg) e a indometacina (10 mg/kg) reduziu

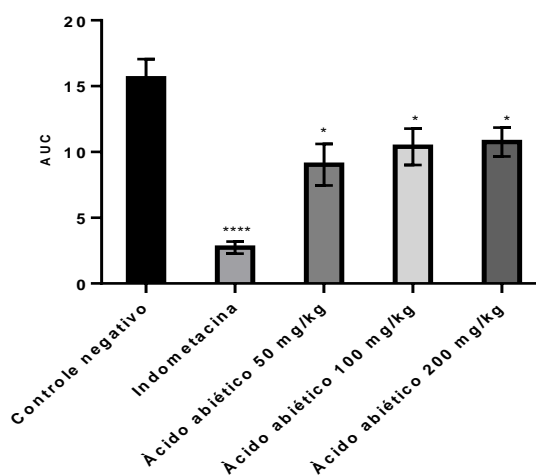
a formação de edema em 42 ($p<0,05$), 33 ($p<0,05$), 31 ($p<0,05$) e 81,10% ($p<0,001$) respectivamente ao ser comparado com o controle negativo.

Figura 3. Efeito do ácido abiético na formação de edema de pata induzido por carragenina. (A) Esses dados também são representados como área sob a curva (AUC) (B). Análise foi feita por *one way* ANOVA seguida pelo teste de *Tukey* (** $p<0,01$; **** $p<0,0001$ vs. controle negativo).

A)



B)



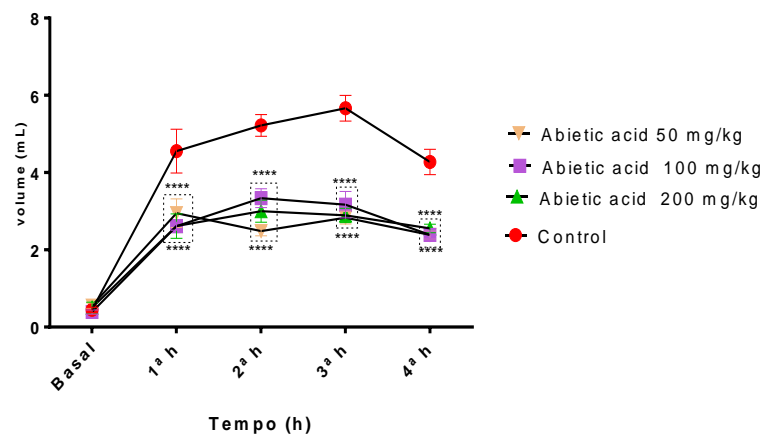
Efeito do ácido abiético no modelo edema de pata induzido pela injeção intra-plantar de dextrana

Na análise do edema de pata induzido por dextrana (Figura 4A), o ácido abiético em todas as doses foi capaz de inibir significativamente o edema. Na primeira hora, as doses 50, 100, 200 mg/kg apresentaram uma redução de edema de 35,8 ($p<0,0001$), 42,63 ($p<0,0001$), 35,38 % ($p<0,0001$), respectivamente, durante a segunda hora essas doses causaram redução de 52,49 ($p<0,0001$), 36,20 ($p<0,0001$), 42,52 ($p<0,0001$). Na terceira

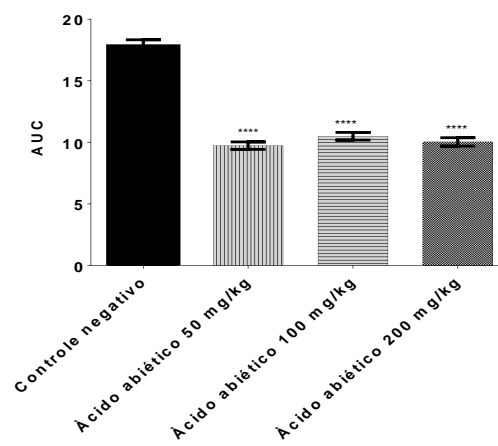
hora, esses tratamentos causaram inibições de 50 ($p < 0,001$), 44 ($p < 0,0001$), 48,93% ($p < 0,0001$), enquanto que na quarta hora houve um percentual de inibição de 44,26 ($p < 0,0001$), 44,26 ($p < 0,0001$) e 40,28 ($p < 0,0001$). Em relação a análise da área sob a curva (AUC) (Figura 4B), o ácido abiético inibiu significativamente o edema em todas as doses 50, 100, 200 mg/kg com 47,25 ($p < 0,0001$), 41,01 ($p < 0,0001$), 43,59% ($p < 0,0001$), respectivamente.

Figura 4. Efeito do ácido abiético na formação de edema de pata induzido por dextrana. (A) Esses dados também são representados como área sob a curva (AUC) (B). Análise foi feita por *one way* ANOVA seguida pelo teste de *Tukey* (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ vs. controle negativo).

A)



B)



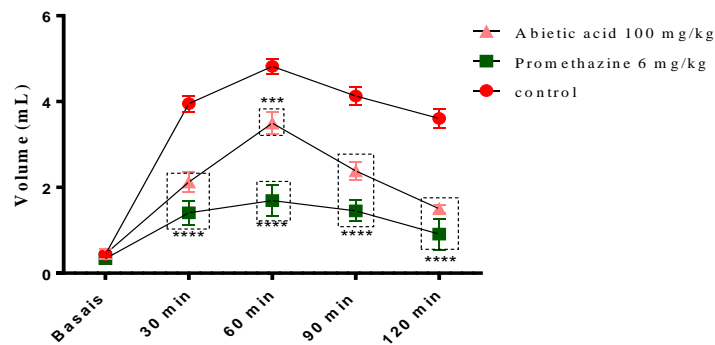
Mecanismo envolvido na ação anti-inflamatória do ácido abiético

Efeito do ácido abiético nos modelos edema de pata induzido pela injeção intra-plantar de histamina

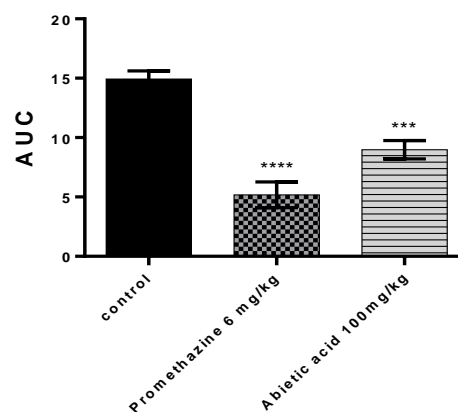
No edema de pata induzido por histamina (Figura 5A), os resultados demonstraram que o ácido abiético (100 mg/Kg) e prometazina (6 mg/kg) promoveu uma redução de 46,32 (p<0.0001) e 69%(p<0.0001) no tempo de 30 minutos respectivamente, em 60 minutos 30 (p<0.0001) e 64,93 (p<0.0001), em 90 minutos 42(p<0.0001) e 65,37% (p<0.0001), 120 minutos com uma redução de 58 (p<0.0001) e 74,72(p<0.0001), respectivamente. Na análise sob a curva (AUC) (Figura 3B), o ácido abiético e prometazina inibiram significativamente o edema em 39,91% e 65,37% (p<0.0001), respectivamente ao ser comparado ao grupo controle.

Figura 5. Efeito do ácido abiético na formação de edema de pata induzido por histamina. (A) Esses dados também são representados como área sob a curva (AUC) (B). Análise foi feito por *one way* ANOVA seguida pelo teste de *Tukey* (**p<0,01; ****p<0,0001 vs. controle negativo).

A)



B)

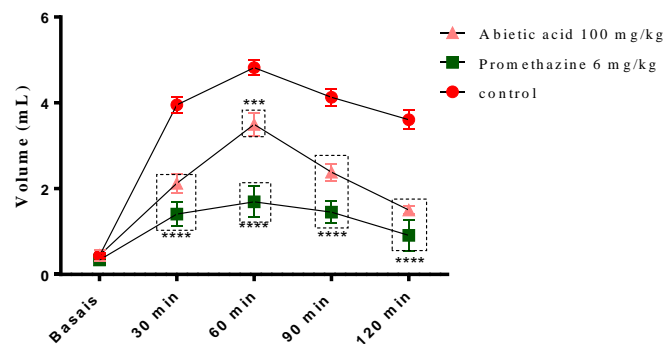


Efeito do ácido abiético no modelo edema de pata induzido pela injeção intra-plantar de ácido araquidônico

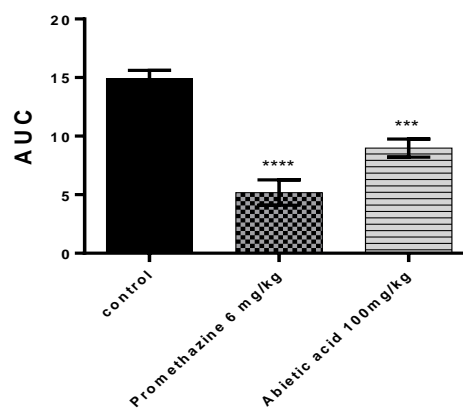
Em relação ao edema de pata induzido por ácido araquidônico (Figura 6A), o ácido abiético 100 mg/kg não apresentou significância no tempo de 15 minutos, enquanto a indometacina 10 mg/kg inibiu 39,91% ($p < 0.0001$) do edema. No tempo de 30 minutos, o ácido abiético e indometacina inibiu 26 % ($p < 0,01$) e 39% ($p < 0,0001$) respectivamente. Nos tempos de 45 min 30% ($p < 0.001$) e 80% ($p < 0.0001$) e 60 minutos 19,51 ($p < 0,05$) e 74,96% ($p < 0.0001$) na mesma ordem. Em relação a área sobre a curva (Figura 6B) ambos os tratamentos também reduziram significativamente o edema ao ser comparado com o controle negativo com 20,68% ($p < 0.0001$) (ácido abiético) e 55% ($p < 0.0001$) (indometacina).

Figura 6. Efeito do ácido abiético na formação de edema de pata induzido por ácido araquidônico. (A) Esses dados também são representados como área sob a curva (AUC) (B). Análise foi feito por *one way* ANOVA seguida pelo teste de *Tukey* (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ vs. controle negativo).

A)



B)

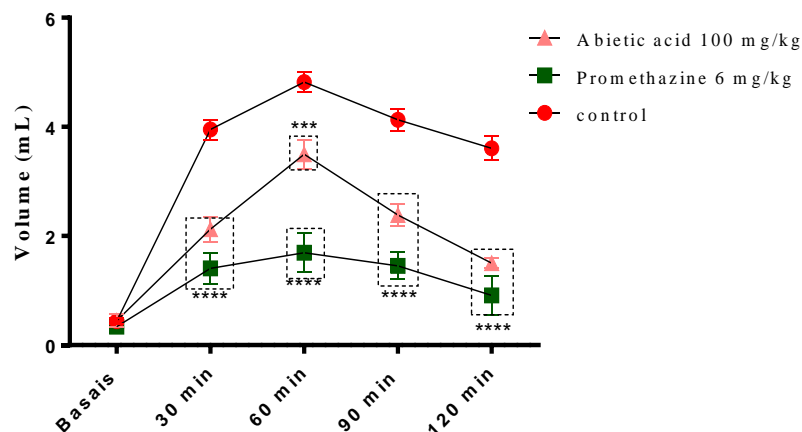


Efeito do ácido abiético nos modelos edema de pata induzido pela injeção intra-plantar de prostaglandina E₂

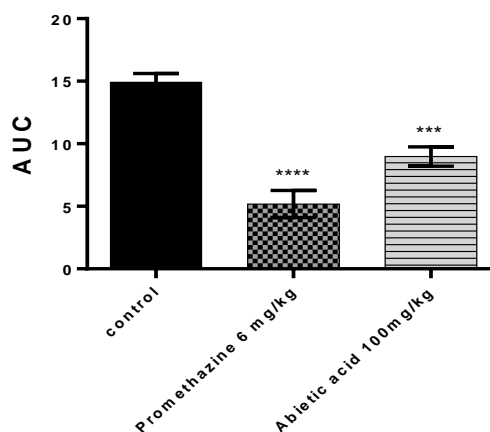
Os resultados do edema de pata induzido por prostaglandina E₂ (Figura 7A) demonstraram que o ácido abiético ao ser comparado com o controle negativo apresentou inibição de edema significativa apenas nos tempos de 15 e 30 minutos com 33,03 (p<0,0001) e 47,82% (p<0,0001) assim como, na análise sobre a curva (Figura 7B) com 31,12% (p<0,0001).

Figura 7. Efeito do ácido abiético na formação de edema de pata induzido por prostaglandina E₂. (A) Esses dados também são representados como área sob a curva (AUC) (B). Análise foi feita por *one way* ANOVA seguida pelo teste de *Tukey* (**p<0,01; ****p<0,0001 vs. controle negativo).

A)



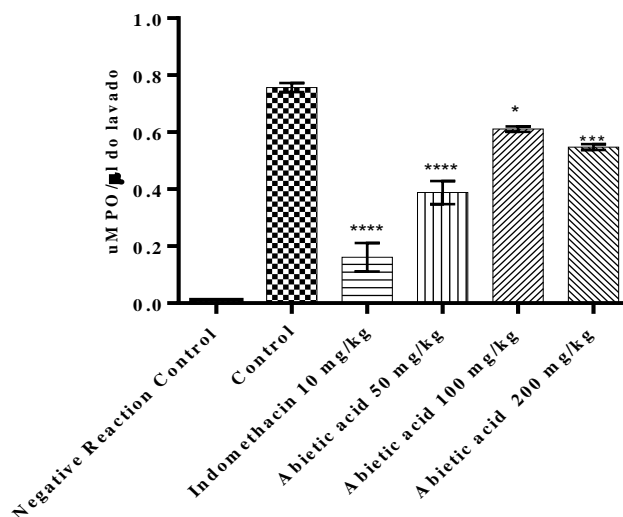
B)



Dosagem da mieloperoxidase

Em relação a MPO, o ácido abiético (50, 100, 200 mg/kg) e a indometacina (10 mg/kg) reduziram significativamente a enzima mieloperoxidase (Figura 8) em 48, 67 (p<0,0001), 19,31 (p<0,01), 27,64 (p<0,05) e 83,99% (p<0,0001) respectivamente.

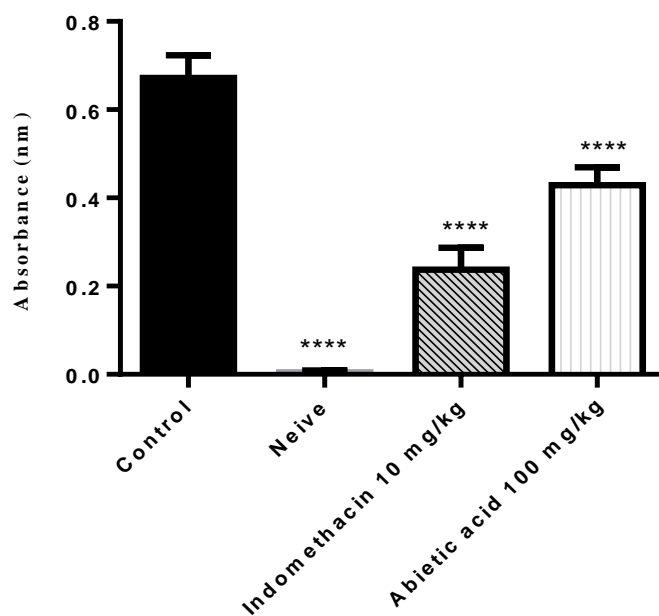
Figura 8. Efeito do ácido abiético sob a enzima mieloperoxidase. Os valores apresentam a média ± E. P. M (Erro Padrão da Média). One-way ANOVA seguida do teste de *Tukey* (*p<0,05, ****p<0,0001 vs. controle negativo).



Permeabilidade vascular mensurada pelo extravasamento de Azul de Evans

A administração intraperitoneal de carragenina (Figura 9) causou o aumento no extravasamento do azul de Evans nos grupos do controle negativo ao ser comparado ao grupo de animais não tratados. O ácido abiético (100 mg/kg) e a indometacina (10 mg/kg) reduziram significativamente a permeabilidade vascular em 36% (p<0.0001) e 64,66% (p<0.0001), respectivamente ao ser comparação com o controle negativo.

Figura 9. Atividade do ácido abiético sobre Permeabilidade vascular mensurada pelo extravasamento de Azul de *Evans*. Os valores apresentam a média \pm E. P. M (Erro Padrão da Média). Análise foi feita por *Two-way* ANOVA seguida do teste de *Tukey* e *Bonferroni*. (**** $p < 0,0001$ vs. controle negativo).

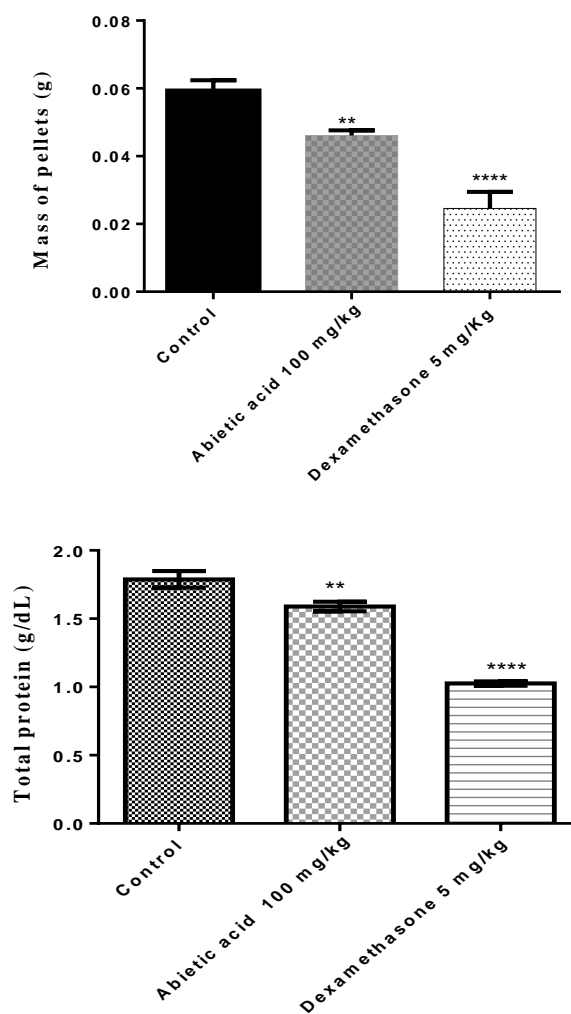


Lesão granulomatosa induzida pela implantação de pellets de algodão

O tratamento via oral do ácido abiético (100 mg/kg) e dexametasona reduziram a formação de granuloma induzido pela implantação de *pellets* de algodão (Figura 10A). Ao ser comparado com o grupo controle a massa dos *pellets* secos do ácido abiético e dexametasona apresentaram um percentual de inibição de 22,03 ($p < 0,01$) e 51,85 % ($p < 0,0001$), respectivamente (Figura 6). Em relação as proteínas totais (figura 10B) dos homogenatos, o ácido abiético (100 mg/kg) e a dexametasona inibiram em 11,23 ($p < 0,01$) e 42,69% ($p < 0,0001$), respectivamente a resposta inflamatória

Figura 10. Lesão granulomatosa induzida pela implantação de *pellets* de algodão. A) Massa dos *pellets* e B) proteínas totais. Análise foi feita por *one way* ANOVA seguida pelo teste de *Tukey* (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ vs. controle negativo).

A)



Discussão

Experimentos que avaliam edema e dor (nocicepção) são bastantes utilizados nas pesquisas farmacológicas com intuito de produzir novos fármacos com efeitos anti-inflamatório e analgésicos (GOMES JÚNIOR *et al.*, 2020). Neste contexto, produtos naturais análogos a anti-inflamatórios podem se tornar uma alternativa para anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (DHARA; CHAKRABORTY, 2020).

No presente estudo, o ácido abiético não exerceu efeitos sedativos ou relaxantes nos modelos utilizados. Uma vez que, *Roda rod* e campo aberto são testes clássicos da triagem para avaliar a condenação motora, relaxamento muscular, depressão e sedação

(MELO *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2019). Segundo Figuiêredo *et al.*, (2019) alterações nos parâmetros avaliativos do teste de campo aberto sugere efeitos estimulantes quando é apresentado aumento dos parâmetros e efeitos depressivos caso aconteça uma redução.

Portanto, o ácido abiético não atuou na potencialização de alteração de parâmetros comportamentais e motores que são avaliados por estes modelos. Portanto, possivelmente não atua sobre o SNC o que poderia interferir em demais modelos experimentais farmacológicos, como por exemplo contorções abdominais induzido por ácido acético (JAMAL; ANSARI; RIZVI, 2008) tendo em vista que substâncias com propriedades analgésicas podem causar sedação e comprometimento cognitivo (ROCCA, LA *et al.*, 2017) podendo comprometer a resposta do animal.

O teste de formalina é constituído de duas fases. A primeira fase consiste na ativação dos nociceptores por meio do aumento de atividade nas fibras C, A δ e liberação de substância P, enquanto que a segunda fase representa a fase inflamatória mediada por prostaglandinas, óxido nítrico, histamina e bradicinina (ALONSO-CASTRO *et al.*, 2021; LEE *et al.*, 2020). A administração oral do ácido abiético no teste de nocicepção cutânea induzida por formalina, com a exceção da dose de 50 mg/kg que apresentou significância em ambas as fases, sugerindo sua possível interferência nos mecanismos neurogênicos e anti-inflamatórios que estão associados com as respostas antinociceptiva

A classe dos diterpeno possuem atividades antinociceptiva no modelo de formalina relatado na literatura. (ORTIZ-MENDOZA *et al.*, 2020) através de seus estudos relatou que o neo-clerodano reduziu significativamente a resposta nociceptiva do tempo de lambadura tanto na fase neurogênica como inflamatória.

O modelo de contorções abdominais induzido por ácido acético é usado como triagem de substâncias que podem ter atividade antinociceptiva, embora a injeção intraperitoneal do ácido acético atua na liberação de mediadores inflamatório como, prostaglandinas, citocinas,(GONÇALVES *et al.*, 2021) bradicinina, histamina, fator necrose tumoral alfa, interleucina-1 β e interleucina-8 (SHAHRANI *et al.*, 2021).Os resultados deste estudo demonstraram que o ácido abiético reduziu significativamente o número de contorções abdominais, o que sugere sua atuação na redução desses mediadores.

Outros estudos que avaliaram a atividade de diterpenos corroboraram como o presente estudo, uma vez que (JIN *et al.*, 2021) relatou que dezessete diterpenóides reduziram o número de contorções abdominais. Em outra avaliação com dois diterpenos

do tipo Kalman reduziram o número de contorções induzido por ácido acético (CHAI; LI, YONG; YU, 2020).

A carragenina consiste em um polissacarídeo encontrado principalmente em algas marinhas (GIAS *et al.*, 2020). O modelo de edema é bifásico, onde a fase inicial (0-1h) é mediada principalmente pela liberação de histamina, serotonina e bradicinina e a segunda fase (2,4 e 6h) acontece a produção de prostaglandinas, infiltração de leucócitos PMN em várias citocinas (TNF α , IL-1 β e IL-6) (KUMAR, *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020).

Fernández *et al.*, (2001a), evidenciou que o ácido abiético ao ser administrado por via oral reduziu o edema de pata induzido por carragenina. Corroborando com o presente estudo, o AA também inibiu o edema significativamente, o que sugere sua atuação pode ocorrer por meio da redução de histamina e prostaglandina—ou a inibição de seus receptores.

A inflamação induzida por dextrana envolve principalmente a liberação de histamina, serotonina e outras células de mastro, resultando na formação de edema com uma pequena quantidade de neutrófilos e proteínas (GUEDES *et al.*, 2020; VYSAKH *et al.*, 2020). Portanto, neste ensaio o ácido abiético pode apresentar um efeito antagônico em relação a esses mediadores inflamatórios, por meio da atuação nos receptores da histamina.

A histamina é um mediador da resposta inflamatória produzidas pelas células mastro, como os basófilos e mastócitos e apresentam quatro receptores denominados de H1, H2, H3 e H4 (IWASAKI *et al.*, 2021), sendo um potente vasodilatador responsável por causar aumento da permeabilidade vascular (HOSSAIN *et al.*, 2020). Enquanto os anti-histamínicos, como a prometazina atua no bloqueio do receptor H1, o que resulta em efeitos antialérgicos e anti-inflamatórios desencadeando a inibição da histamina de células de mastro (HUANG *et al.*, 2021; OSAFO *et al.*, 2021). Diante do exposto, sugere-se e que o ácido abiético pode agir na inibição da liberação da histamina, reduzindo assim o processo inflamatório.

O ácido araquidônico (AA) consiste em um ácido graxo poli-insaturado presente na membrana fosfolipídica, sendo um importante precursor dos eicosanoides entre eles, as prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (BURSTEIN, 2021; JANG; KIM; HWANG, 2020). O mecanismo de ativação da cascata do ácido araquidônico se inicia quando a fosfolipase citosólica A2 (PLA2) degrada os fosfolipídios presente na membrana plasmática desencadeando a liberação do AA e ácido linfosfísico (CANTONERO *et al.*, 2020). O ácido araquidônico após sua liberação é oxidado por duas isoformas

denominadas cicloxigenase (COX) e enzimas lipoxigenase (LOX) que atuam na produção de vários mediadores pró-inflamatórios (eicosanoides) (GOWDA *et al.*, 2021). Sendo assim sugere-se que o ácido abiético pode atuar na inibição da via da cascata do ácido araquidônico, resultando na supressão de citocinas inflamatórias e mediadores.

Estudos realizados por Takahashi *et al* (2003), demonstraram que o ácido abiético atua na supressão proteica do fator de necrose tumoral α e cicloxigenases, indicando sua atuação como ligante PPAR γ (Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma tipo Gama) que em parte explica sua atividade anti-inflamatória. Segundo Wang *et al.*, (2017) e Kang; Zhang; Yuan (2018) PPAR γ é um fator de transcrição nuclear que ao ser ativado por ligantes desencadeiam a regulação das sinalizações de células pró-inflamatórias e fatores de transcrição, o que justificaria sua atuação em importantes mecanismos anti-inflamatórios. Corroborando com os achados do presente estudo, uma vez que o ácido abiético causou uma redução dos mediadores inflamatórios nos modelos utilizados.

A síntese de prostaglandina é dependente da oxidação do ácido araquidônico, sendo a PGE₂ mais abundante do corpo (FAMITAFRESHI; KARIMIAN, 2020). As prostaglandinas são sintetizadas durante o processo inflamatório causando principalmente vasodilatação e estimulação de citocinas pró-inflamatória, como interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (AMORIM *et al.*, 2021). Neste contexto, foi relatado que o ácido abiético atua na inibição de PGE₂ (FERNÁNDEZ *et al.*, 2001b). Takahashi *et al.*, (2003), sugere que efeito supressivo de prostaglandina E2 pode estar envolvido na supressão da COX2 em macrófagos. Corroborando com o presente estudo, onde o ácido abiético apresentou resultados significativos na redução de prostaglandina.

No sistema imune a mieloperoxidase (MPO) é uma proteína com atividade enzimática essencial (KARGAPOLOVA *et al.*, 2021) cuja produção ocorre principalmente por meio dos granulócitos e monócitos (TRENTINI *et al.*, 2020). A inibição da MPO é um indicativo de uma atividade anti-inflamatória (CALOU *et al.*, 2008). Nos resultados obtidos nesse estudo sugerem que o ácido abiético reduziu a migração de leucócitos. Corroborando com as pesquisas realizadas por Fernández *et al* (2001a). Em que o ácido abiético reduziu a MPO avaliada no edema de orelha por TPA (Acetato o-Tetradecanoylphorbol), o que sugere sua participação na regulação da migração de leucócitos.

Com relação ao processo inflamatório envolvendo a administração de azul de Evans seu objetivo é atuar como um biomarcador que se liga a albumina diante de

condições patológicas, desencadeando o extravasamento aos tecidos vizinhos e formando o complexo corante-albumina (OLIVEIRA *et al.*, 2020; SULEKHA; SUDARSANAN; CHANDRASEKHARAN, 2020). Os resultados demonstraram uma redução do transudato, evidenciado pela redução do azul de Evans. Portanto, sugere que o ácido abiético diminuiu significativamente a permeabilidade vascular.

O teste de lesão granulomatosa induzida pela implantação de *pellets* de algodão tem como objetivo avaliar a formação de granuloma durante as três fases transudativa, exsudativa e proliferativa em uma resposta infamatória crônica (MOHAMMED, 2020; SRINIVASAN *et al.*, 2021). Portanto, a implantação subcutânea do corpo estranho é responsável por desencadear a formação do granuloma que é composto pelo acúmulo de macrófagos, neutrófilos e linfócitos, bem como interleucinas e fibroblasto (MARTIN THIERRY *et al.*, 2018; SARMA *et al.*, 2019). De acordo com (PAVAN *et al.*, 2019), a inibição de um tecido granulomatoso indica um efeito antiproliferativo de um medicamento ou composto testado. No presente estudo o ácido abiético ao ser administrado por via oral foi capaz de reduzir a massa dos *pellets* secos e as proteínas totais sugerindo sua possível ação na inibição do processo de formação de tecidos granulomatoso devido a supressão de reações inflamatórias.

Conclusão

Os resultados demonstraram que o ácido abiético não interfere no Sistema Nervoso Central (SNC) e apresentou atividade anti-inflamatória nos modelos tanto da fase aguda quanto crônica. Entretanto, são necessárias outras pesquisas que abrangem os aspectos de mecanismos moleculares a fim de avaliar melhor a resposta inflamatória e histopatológicos.

Referências

- ABDULKHALEQ, L. A. *et al.* The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Veterinary World**, 2018. v. 11, n. 5, p. 627–635.
- ALONSO-CASTRO, A. J. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Cuphea aequipetala* Cav (Lythraceae). **Inflammopharmacology**, 2021. v. 29, n. 1, p. 295–306.
- AMORIM, V. R. *et al.* Anti-inflammatory mechanisms of fruits and by-products from *Mauritia flexuosa*, an exotic plant with functional benefits. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, 2021. v. 84, n. 11, p. 441–457.

- BRADLEY, P.; CHRISTENSEN, D. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, 1982. v. 60, n. 3, p. 618–622.
- BURSTEIN, S. Molecular Mechanisms for the Inflammation-Resolving Actions of Lenabasum. **Molecular Pharmacology**, 2021. v. 99, n. 2, p. 125–132.
- CALOU, I. B. F. *et al.* Topically applied diterpenoids from *Egletes viscosa* (Asteraceae) attenuate the dermal inflammation in mouse ear induced by tetradecanoylphorbol 13-acetate- and oxazolone. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 2008. v. 31, n. 8, p. 1511–1516.
- CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Involvement of B1 and B2 receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. **British Journal of Pharmacology**, 1995. v. 114, n. 5, p. 1005–1013.
- CANTONERO, C. *et al.* Arachidonic acid attenuates cell proliferation, migration and viability by a mechanism independent on calcium entry. **International Journal of Molecular Sciences**, 2020. v. 21, n. 9, p. 1–18.
- CHAI, B.; LI, Yong; YU, S. S. Three new antinociceptive diterpenoids from the roots of *Rhododendron micranthum*. **Journal of Asian Natural Products Research**, 2020. v. 22, n. 10, p. 895–904.
- CHAUHAN, P. *et al.* Improved mechanical properties of flexible bio-based polymeric materials derived from epoxy mono/di-abietic acid and soyabean oil. **Industrial Crops and Products**, 2019. v. 138, n. May, p. 111437.
- CHEN, H. S. *et al.* GABA and 5-HT systems are involved in the anxiolytic effect of Gan-Mai-da-Zao decoction. **Frontiers in Neuroscience**, 2019. v. 13, n. JAN, p. 1–11.
- DEMARQUE, D. P. *et al.* Mass spectrometry-based metabolomics approach in the isolation of bioactive natural products. **Scientific Reports**, 2020. v. 10, n. 1, p. 1–9.
- DENG, L. J. *et al.* Natural products and their derivatives: Promising modulators of tumor immunotherapy. **Journal of Leukocyte Biology**, 2020. v. 108, n. 2, p. 493–508.
- DHARA, S.; CHAKRABORTY, K. Anti-inflammatory xenicane-type diterpenoid from the intertidal brown seaweed *Sargassum ilicifolium*. **Natural Product Research**, 2020. v. 0, n. 0, p. 1–11.
- DIMARTINO, M. J. *et al.* The pharmacology of arachidonic acid-induced rat PMN leukocyte infiltration. **Agents and Actions**, 1989. v. 27, n. 3–4, p. 325–327.
- DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association. American Pharmaceutical Association**, 1957. v. 46, n. 3, p. 208–209.
- FAMITAFRESHI, H.; KARIMIAN, M. Prostaglandins as the Agents That Modulate the Course of Brain Disorders. **Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease**, 2020. v. Volume 10, p. 1–13.

- FERNÁNDEZ, M. A. *et al.* Anti-inflammatory activity of abietic acid, a diterpene isolated from *Pimenta racemosa* var. *grisea*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2001a. v. 53, n. 6, p. 867–872.
- FERNÁNDEZ, M. A. *et al.* Anti-inflammatory activity of abietic acid, a diterpene isolated from *Pimenta racemosa* var. *grisea*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2001b. v. 53, n. 6, p. 867–872.
- GIAS, Z. T. *et al.* A mechanistic approach to HPLC analysis, antinociceptive, anti-inflammatory and postoperative analgesic activities of panch phoron in mice. **BMC complementary medicine and therapies**, 2020. v. 20, n. 1, p. 102.
- GNANASEKAR, P. *et al.* Sustainable Shape-Memory Polyurethane from Abietic Acid: Superior Mechanical Properties and Shape Recovery with Tunable Transition Temperatures. **ChemSusChem**, 2020. v. 13, n. 21, p. 5749–5761.
- GOMES JÚNIOR, A. L. *et al.* Anti-Inflammatory, Antinociceptive, and Antioxidant Properties of Anacardic Acid in Experimental Models. **ACS Omega**, 2020. v. 5, n. 31, p. 19506–19515.
- GONÇALVES, G. M. *et al.* Essential oil of *Myrciaria tenella* (DC.) O. Berg: effects of distillation time on its chemical composition and evaluation of its anti-inflammatory and antinociceptive effects. **Journal of Essential Oil Research**, 2021. v. 33, n. 4, p. 394–409.
- GOWDA, M. D. M. *et al.* Syringol Isolated From *Eleusine Coracana* (L.) Gaertn Bran Suppresses Inflammatory Response Through the Down-Regulation of cPLA2, COX-2, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, p38 and MPO Signaling in sPLA2 Induced Mice Paw Edema. **Inflammopharmacology**, 2021. p. 1–33.
- GUEDES, A. *et al.* Antiedematogenic and Anti-Inflammatory Activity of the Monoterpene Isopulegol and Its β -Cyclodextrin (β -CD) Inclusion Complex in Animal Inflammation Models. **Foods**, 2020. v. 9, n. 630, p. 1–16.
- GULNUR, E.; EVINC, K.; ASLANERDEMC, S. Chapter 9 - Analysis of diterpenes and diterpenoids. *Em: ELSEVIER (Org.)*. **GulnurEksiumSevincKurbanoglubSinem AslanErdemc**. [S.l.]: [s.n.], 2020, V. 148, p. 313–345.
- HOSSAIN, K. H. *et al.* Hot methanol extract of *Leea macrophylla* (Roxb.) manages chemical-induced inflammation in rodent model. **Journal of King Saud University - Science**, 2020. v. 32, n. 6, p. 2892–2899.
- HUANG, Y. *et al.* Preliminary experience with promethazine hydrochloride injection in the sclerotherapy of oral mucocele. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 2021. v. 50, n. 4, p. 516–521.
- HWANG, K. H. *et al.* Abietic acid has an anti-obesity effect in mice fed a high-fat diet. **Journal of Medicinal Food**, 2011. v. 14, n. 9, p. 1052–1056.
- ITO, Y. *et al.* Antimicrobial and antibiofilm effects of abietic acid on cariogenic *Streptococcus mutans*. **Odontology**, 2020. v. 108, n. 1, p. 57–65.

- IWASAKI, N. *et al.* Th2 cells and macrophages cooperatively induce allergic inflammation through histamine signaling. **PLoS ONE**, 2021. v. 16, n. 3 March 2021, p. 1–18.
- JAMAL, H.; ANSARI, W. H.; RIZVI, S. J. Evaluation of chalcones - A flavonoid subclass, for, their anxiolytic effects in rats using elevated plus maze and open field behaviour tests. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, 2008. v. 22, n. 6, p. 673–681.
- JANG, Y.; KIM, M.; HWANG, S. W. Molecular mechanisms underlying the actions of arachidonic acid-derived prostaglandins on peripheral nociception. **Journal of Neuroinflammation**, 2020. v. 17, n. 1, p. 1–27.
- JIN, P. *et al.* Structurally diverse diterpenoids with eight carbon skeletons from *Rhododendron micranthum* and their antinociceptive effects. **Bioorganic Chemistry**, 2021. v. 111, n. February, p. 104870.
- KANG, S.; ZHANG, J.; YUAN, Y. Abietic acid attenuates IL-1 β -induced inflammation in human osteoarthritis chondrocytes. **International Immunopharmacology**, 2018. v. 64, n. July, p. 110–115.
- KARGAPOLOVA, Y. *et al.* The enzymatic and non-enzymatic function of myeloperoxidase (Mpo) in inflammatory communication. **Antioxidants**, 2021. v. 10, n. 4.
- KIM, E. *et al.* Dehydroabietic acid suppresses inflammatory response via suppression of Src-, Syk-, and TAK1-mediated pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019. v. 20, n. 7.
- KIM, W. J. *et al.* Dehydroabietic acid is a novel survivin inhibitor for gastric cancer. **Plants**, 2021. v. 10, n. 6, p. 1–10.
- KUMAR, S. S. *et al.* New synthetic coumarinolignans as attenuators of pro-inflammatory cytokines in LPS-induced sepsis and carrageenan-induced paw oedema models. **Inflammopharmacology**, 2020. v. 28, n. 5, p. 1365–1373.
- LAPA, A. J. Et Al. **Métodos para avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Porto Alegre: Metrópole: [s.n.], 2003.
- LEE, H. Y. *et al.* Antinociceptive effects of intrathecal cimifugin treatment: a preliminary rat study based on formalin test. **Anesthesia and Pain Medicine**, 2020. v. 15, n. 4, p. 478–485.
- LI, L. Q. *et al.* Anti-inflammation activity of exopolysaccharides produced by a medicinal fungus *Cordyceps sinensis* Cs-HK1 in cell and animal models. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020. v. 149, p. 1042–1050.
- LI, Yuanlin *et al.* Thermal Stability of Abietic Acid and Its Oxidation Products. **Energy and Fuels**, 2019. v. 33, n. 11, p. 11200–11209.
- LIU, Xueping *et al.* Abietic acid suppresses non-small-cell lung cancer cell growth via blocking IKK β /NF- κ B signaling. **OncoTargets and Therapy**, 2019. v. 12, p. 4825–4837.

- MALING, H. M. . Et Al. Inflammation induced by histamine, serotonin, bradykinin and compound 48/80 in the rat: antagonists and mechanisms of action. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 1974. v. 192, n. 2, p. 300–310.
- MARTIN THIERRY, B. N. *et al.* Anti-inflammatory Effects of the Stem Barks from *Albizia Ferruginea* (Mimosaceae) on Chronic Inflammation Induced in Rats. **International Journal of Innovative Research in Medical Science**, 2018. v. 3, n. 09.
- MCCUTCHEON, K. Once upon a time. **Journal of perioperative practice**, 2016. v. 26, n. 5, p. 95.
- MELO, F. H. C. *et al.* Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: Involvement with GABAergic transmission. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, 2010. v. 24, n. 4, p. 437–443.
- MOHAMMED, G. E. Anti-inflammatory effect of *Capparis decidua* stems methanolic extract in acute and chronic inflammation models in rats. **Sudan Journal of Science and Technology**, 2020. v. 21, n. 1, p. 1–7.
- OLIVEIRA, A. *et al.* Characterization of the *Croton rhamnifolioides* Essential Oil Inclusion Complex in β -Cyclodextrin. **Biology**, 2020. v. 2, n. 9, p. 2–25.
- OLIVEIRA, M. R. C. DE *et al.* Biological activities of the essential oil from the leaves of *Lantana montevidensis* (Spreng) Briq. in mice. **Environment, Development and Sustainability**, 2021. v. 23, n. 10, p. 14958–14981.
- ORTIZ-MENDOZA, N. *et al.* Antinociceptive and anxiolytic-like effects of a neoclerodane diterpene from *Salvia semiatrata* aerial parts. **Pharmaceutical Biology**, 2020. v. 58, n. 1, p. 620–629.
- OSAFO, N. *et al.* Cutaneous and systemic anti-allergic potential of xylopic acid in rodents. **Advances in Traditional Medicine**, 2021. n. 0123456789.
- PAVAN, D. P. *et al.* Inflammation lowering property of *Pistacia atlantica* incotton pellet granuloma. **International Journal of Review in Life Sciences**, 2019. v. 9, n. 2, p. 14–17.
- PRADO-AUDELO, M. L. DEL *et al.* Therapeutic Applications of Terpenes on Inflammatory Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, 2021. v. 12, n. August, p. 1–7.
- ROCCA, V. LA *et al.* Geraniol Induces Antinociceptive Effect in Mice Evaluated in Behavioural and Electrophysiological Models. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, 2017. v. 120, n. 1, p. 22–29.
- ROH, S. S.; PARK, M. K.; KIM, Y. U. Abietic acid from Resina Pini of *Pinus* species as a testosterone 5 α -reductase inhibitor. **Journal of Health Science**, 2010. v. 56, n. 4, p. 451–455.
- SARMA, R. M. *et al.* Anti-inflammatory and Anti-granuloma effect of the extract of the leaf of *Terminalia arjuna* (Roxb.) Wight & Arn. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, 2019. v. 11, n. 11, p. 3579–3586.

SHAHRANI, M. *et al.* *Astragalus fasciculifolius* manna: Antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant properties in mice. **Immunopathologia Persa**, 2021. v. 7, n. 1, p. e02–e02.

SILVA, N. L. *et al.* Chemical composition, anti-inflammatory and antinociceptive effects of the butanolic fraction of *Annona nutans* (Annonaceae) leaves. **Natural Product Research**, 2020. v. 0, n. 0, p. 1–6.

SOBREIRA DANTAS NÓBREGA DE FIGUÊIREDO, F. R. *et al.* Effects of the *Hyptis martiusii* Benth. leaf essential oil and 1,8-cineole (eucalyptol) on the central nervous system of mice. **Food and Chemical Toxicology**, 2019. v. 133, n. April, p. 110802.

SRINIVASAN, K. *et al.* Evaluation Of Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Ethanolic Extract of *Sida Cordata* In Animal Model. **Nat. Volatiles & Essent. Oils**, 2021. v. 8, n. 5, p. 5645–5653.

SULEKHA, S.; SUDARSANAN, D.; CHANDRASEKHARAN, D. Fruit Extract of *Pithecellobium dulce* (FPD) ameliorates carrageenan-induced acute inflammatory responses via regulating pro-inflammatory mediators. **J Food Biochem.**, 2020. n. January, p. 1–12.

SWINGLE, K. F.; SHIDEMAN, F. Phases of the inflammatory response to subcutaneous implantation of a cotton pellet and their modification by certain antiinflammatory agents. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 1972. v. 183, n. 1, p. 226–234.

TAKAHASHI, N. *et al.* Abietic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) in RAW264.7 macrophages and 3T3-L1 adipocytes to regulate gene expression involved in inflammation and lipid metabolism. **FEBS Letters**, 2003a. v. 550, n. 1–3, p. 190–194.

_____ *et al.* Abietic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) in RAW264.7 macrophages and 3T3-L1 adipocytes to regulate gene expression involved in inflammation and lipid metabolism. **FEBS Letters**, 2003b. v. 550, n. 1–3, p. 190–194.

TALEVI, A. *et al.* Discovery of anticonvulsant activity of abietic acid through application of linear discriminant analysis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 2007. v. 17, n. 6, p. 1684–1690.

TJØLSEN, A. Et Al. O teste da formalina: uma avaliação do método. **Pain**, 1992. v. 51, n. 1, p. 5–17.

TRENTINI, A. *et al.* Development, optimization and validation of an absolute specific assay for active myeloperoxidase (MPO) and its application in a clinical context: Role of MPO specific activity in coronary artery disease. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, 2020. v. 58, n. 10, p. 1749–1758.

VYSAKH, A. *et al.* Acute oral toxicity and anti-inflammatory evaluation of methanolic extract of *Rotula aquatica* roots in Wistar rats. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, 2020. v. 11, n. 1, p. 45–52.

WANG, D. *et al.* Activation of PPAR γ inhibits pro-inflammatory cytokines production by upregulation of miR-124 in vitro and in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2017. v. 486, n. 3, p. 726–731.

WANG, R. X. *et al.* The Role of Chronic Inflammation in Various Diseases and Anti-inflammatory Therapies Containing Natural Products. **ChemMedChem**, 2021. v. 16, n. 10, p. 1576–1592.

YANG, A. *et al.* Role of specialized pro-resolving lipid mediators in pulmonary inflammation diseases: mechanisms and development. **Respiratory Research**, 2021. v. 22, n. 1, p. 1–17.

4.2 Manuscrito II: Antibacterial effect and evaluation of the inhibitory effect against efflux pump in *Staphylococcus aureus* by abietic acid: *in vitro* and *in silico* assays.

Maria Gabriely de Lima Silva^a, Lucas Yure Santos da Silva^a, Thiago Sampaio de Freitas^b, Janaina Esmeraldo Rocha^b, Raimundo Luiz Silva Pereira^b, Saulo Relison Tintino^b, Maria Rayane Correia de Oliveira^{a,c}, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins^a, Maria Carolina Pacheco Lima^d, Gabriel Costa Alverni da Hora^e, Henrique Douglas Melo Coutinho^b, Irwin Rose Alencar de Menezes^{a*}.

^a Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry (LFQM), Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri-URCA, Crato, Ceará, Brazil.

^b Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri-URCA, Crato, Ceará, Brazil.

^c Graduate Program in Biotechnology-Northeast Biotechnology Network (RENORBIO); State University of Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brazil.

^d Department of Medicinal Chemistry, University of Utah, Salt Lake City, 84112, United States

^e Department of Chemistry, University of Utah, Salt Lake City, 84112, United States

Abstract

Abietic acid is a diterpene found in resins mainly from diverse species of genus *Pinus*. The present study evaluated the antibacterial and inhibitory effect against the NorA and MepA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by abietic acid using *in vitro* and *in silico* assays. The microdilution bacterial assay was used to evaluate antibacterial activity in standard bacteria (SA 25923 and EC 25922) and clinical isolates bacteria multiresistant (SA-10 and EC-06). Their association with antibiotics ampicillin, gentamicin, and ciprofloxacin was also estimated. *Staphylococcus aureus* (SA-1199B and SA-K2068) was used with a NorA and MepA pump machine, respectively, to verify the inhibitory effect using MIC methodology proposed by CLSI and Ethidium Bromide, an indicator of an efflux pump. Molecular dynamics and molecular docking calculations were used to evaluate and validate the interaction of abietic acid with NorA and MepA efflux pumps. The results demonstrated a significant reduction of MIC values to EC 25922 and SA 10 and showed a synergistic effect when combined with increased gentamicin susceptibility against multiresistant strains. The abietic acid showed direct activity against *Staphylococcus aureus* overexpressing gene of efflux pump, demonstrating the possibility of interference in the efflux pump NorA (SA 1199B) and MepA (SA K2068) mediated by hydrogen bonds and hydrophobic interactions. Together, these findings are promising validating the potential antimicrobial activity and the possibility of using abietic acid as antibiotic adjuvant resistance breakers (ARBs) to treat infections caused by multiresistant bacteria. However, other studies are necessary to confirm this potential using the *in vivo* model.

Keywords: Antibiotic adjuvant resistance breakers (ARBs); Efflux pump; Abietic acid; Bacterial resistance; Antibacterial activity.

Introduction

The increasing increase in bacterial infectious diseases may be related to infections acquired in the hospital and community environments, reduced defensive capacity of the organism, or progressively developed different resistance mechanisms.

Antimicrobial resistance to antibiotics is understood as the adaptive capacity that microorganisms develop to grow in the presence of an antibiotic capable of killing them (ALLCOCK *et al.*, 2017). This natural selection process is often a consequence of the misuse of antimicrobials and represents a public health problem worldwide for both humans and animals (FARHADI *et al.*, 2019). Among the adaptation and resistance mechanisms, the most consistent is the expression of efflux pumps through plasmid transfer or quorum sensing by pathogenic bacteria with a resistance profile (LEKSHMI *et al.*, 2018). Gram-positive and Gram-negative bacteria, such as *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, are among the bacteria with the most significant capacity to induce the expression of the efflux pump (FRIMODT-MØLLER; LØBNER-OLESEN, 2019) or specific adaptive processes such as the formation of biofilms that increase virulence that facilitates growth in the presence of antibiotics (PALUCH *et al.*, 2020).

Escherichia coli is classified as Gram-negative bacteria that inhabit the commensal microbiota of the human and animal intestine. However, its virulent forms can cause enterohemorrhagic infections in the digestive tract, kidney damage resulting from hemolytic-uremic syndrome (HUS), sepsis in the bloodstream, prostate infections, and colonize other organs, where they are capable of causing a variety of illnesses (POIREL *et al.*, 2018). *Staphylococcus aureus* is a Gram-positive bacterium belonging to the Staphylococcaceae family, known to cause infections in a wide variety of local and systemic lesions in humans and animals. Infections caused by this bacterium, usually acquired in hospital environments, can be fatal (CHAKRABORTY *et al.*, 2018), principally when NorA or MepA efflux pumps are characterized in this organism. This pump is responsible for the moderate resistance of *S. aureus* to fluoroquinolone antibiotics (MONTEIRO *et al.*, 2020)

In this context, considering the importance of the NorA or MepA efflux pump as a mediator of antibiotic resistance and the ineffectiveness of drugs used in treating infections caused by efflux pump-inducing bacteria, the search for new medicines with antibacterial activity are of great importance (SHARMA; GUPTA; PATHANIA, 2020). Natural products extracted from plants can act as structural models for synthesizing new substances or active prototypes to develop novel chemical entities with antibacterial effects that can originate new possibilities of mechanisms of action against the bacterial target (GONZÁLEZ-BELLO, 2017). One promissory alternative for a break of bacterial resistance is a combination of isolate natural compounds with therapeutic antibiotics that

are now being exploited in different studies.(DA COSTA *et al.*, 2021a; FREITAS *et al.*, 2020; DOS SANTOS BARBOSA *et al.*, 2021a).

Among these natural products, abietic acid (AA) is a diterpene compound found as a major component in resins from the *Pinus* genus and many other species of conifers (KEELING; BOHLMANN, 2006). Abietic acid has been reported to show various activities: as antiviral (AGUDELO-GÓMEZ; BETANCUR-GALVIS; GONZÁLEZ, 2012), antibacterial (BUOMMINO *et al.*, 2021), antimycotic (GONZÁLEZ *et al.*, 2010), antiparasitic (OLMO *et al.*, 2015), antioxidant (ESTEVEZ *et al.*, 2001), anti-inflammatory (KANG; ZHANG; YUAN, 2018), wound healing [22], anti-allergic (GAO *et al.*, 2016), anticonvulsant activities (TALEVI *et al.*, 2007) and inhibitory effects in the cancer cell (LIU *et al.*, 2019). So, given the increased bacterial resistance to therapeutic drugs, the research of new antibiotic adjuvant is necessary. The diversity of activity present in literature data to abietic acid and your antibacterial activity can be represented a pharmacological potential significant against bacterial resistance. The paper aims to verify the antibacterial effect and the inhibitory effect of abietic acid against efflux pump in *Staphylococcus aureus* by *in vitro* and *in silico* assays.

Materials and Methods

Bacterial Cultures

In this study, we have used strains standard ATCC of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* (SA 25923 and EC25922), and your respective multiresistant strains (SA10 and EC06) obtained from clinical isolates and present resistance profiles described in Table 1. Bacterial strains were stocked at 4°C on Brain Infusion Heart agar (BHIA, Himedia, India). Before the assay, the cells were activated and grown at 37 °C in Brain Heart Infusion (BHI, Himedia, India) for 24 hours. The strains were suspended at turbidity equivalent to 0.5 on the McFarland scale, corresponding to 10⁵ CFU. The *Staphylococcus aureus* strains carrying genes the NorA (SA 1199B) and MepA (SA-K2068), kindly provided by Prof. S. Gibbons (University of London), were used in bacterial-resistance efflux pump inhibition assays. These bacteria were maintained in Heart Infusion Agar (HIA, Difco) medium at 4°C and, posteriorly, samples of strains

were transferred to test tubes containing sterile saline, and turbidity was assessed using a value of 0.5 on the McFarland scale, corresponding to 10^5 CFU.

Drugs

The abietic acid, the antibiotics – Norfloxacin (Nor), Ampicillin (Amp), Subactan (Sub), Gentamicin (Gen) and ciprofloxacin (Cip) –, the Ethidium Bromide (EtBr) and the efflux pump inhibitors – carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) and Chlorpromazine (CPZ) – were obtained from Sigma Chemical Corp., St. Louis.

Antimicrobial Susceptibility Testing (MIC)

The Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) of abietic acid and antibiotics against bacterial isolates were evaluated by the agar dilution technique, according to the established guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The stock solutions of compounds were previously prepared in DMSO or saline followed by dilution in sterile water to a final concentration of 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$. For the MIC determinations, 100 μL of bacterial inoculum were suspended in saline solution, followed by the addition of 900 μL brain heart infusion (BHI) in Eppendorf tubes and transferred to 96-well microdilution plates. Then, the bacterial suspensions (10^5 CFU/mL) were exposed to abietic acid that was 2-fold serial diluted in concentrations ranging from 0.5 to 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. The bacterial growth was evaluated by adding 20 μL of resazurin (0.01% w/v in sterile distilled water) to each well. The growth is observed by a color change from blue to pink. The MICs values were defined as the lowest concentration at which no bacterial growth. The antibacterial assays were performed in triplicates, and the results were expressed as the geometric mean of MIC value.

Modulatory activity of antibiotic resistance assay by MIC reduction

This technique consists of the same procedure as the previous assay with some modifications. The bacterial inoculum of multiresistant strains (SA10 and EC06) were

transferred to 96-well microdilution plates and incubated with Ciprofloxacin, gentamicin, or ampicillin, diluted with ranging from 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and supplemented a subinhibitory concentration (MIC/8) of abietic acid. The control plates were prepared with only the 10% BHI medium and bacterial inoculum of multiresistant strains (SA10 and EC06). The synergic effect was observed by MIC reduction of antibiotic and evaluated through the use of Resazurin. The antibacterial assays were performed in triplicates, and the results were expressed as the geometric mean of MIC value.

Analysis of efflux pump inhibition by MIC reduction

To investigate the activity of the abietic acid as efflux pump inhibitors is previously determined the MIC of norfloxacin and ethidium bromide against the *S. aureus* strains that express the NorA and MepA machines pump. For this assay, suspensions of strains SA-1199B and SA-K2068 corresponding to 0.5 of the McFarland scale were vortexed with 1350 μL of brain heart infusion (BHI). Then, 150 μL of this bacterial inoculum was transferred to 96-well plates and vortexed with a solution of EtBr or norfloxacin at concentrations ranging from 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the presence of chlorpromazine (101 $\mu\text{g}/\text{mL}$), carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or abietic acid in subinhibitory concentrations (1/8 MIC). The positive control was prepared with a bacterial suspension, and EtBr (8 $\mu\text{g ml}^{-1}$) or norfloxacin. The blank controls were prepared with abietic acid in saline solution. The saline inoculum in brain heart infusion (BHI) was used as growth control. These tests were transferred to 96-well microdilution plates, and serial dilutions of 100 μL were performed. The microtitre plates were incubated at 37°C for 24 h, and bacterial growth was revealed through the use of Resazurin. All tests were executed in triplicates, and the final results were described as a geometric mean of the replicates. (TINTINO *et al.*, 2016).

Docking and Molecular Dynamics Studies

The docking procedure and three-dimensional (3D) structure efflux pump MepA and NorA were performed conform established by Morais Oliveira-Tintino *et al.* (2021) Santos *et al.* (2018). All structures were carried out using the virtual screening workflow available at the Autodock Tools (<http://autodock.scripps.edu>). Molecular docking was carried out using the Autodock Vina algorithm. For comparison, docking of the ligands

was also performed Molegro Virtual Docker (BITENCOURT-FERREIRA; AZEVEDO, DE, 2019). The most favorable binding free energy poses were analyzed using the Discovery Studio visualizer program version 3.1 (SYSTÈMES, 2019).

Molecular Dynamics (MD) simulations were used to evaluate the interaction of the abietic acid with the protein structures of MepA and NorA. The abietic molecules were positioned at the active sites of each protein. The simulations were carried out using the program AMBER 20 (BITENCOURT-FERREIRA; AZEVEDO, DE, 2019). The Antechamber (WANG *et al.*, 2006) was used to generate the parameters for the abietic acids using the General AMBER Force Field 2 (GAFF2) (HE *et al.*, 2020). At the same time, the all-atom ff19SB force field (TIAN *et al.*, 2020) was employed to describe the protein molecules. OPC water molecules (IZADI; ANANDAKRISHNAN; ONUFRIEV, 2014). and Cl⁻ counterions (2 for MepA, 13 for NorA) were added to solvate and neutralize the charge of the octahedron simulation boxes. The distance between the solute and the edges of the boxes was set to 10 Å. Periodic boundary conditions were applied in each direction. The systems were minimized using the steepest descent method, with restraints on heavy atoms for the first 1000 steps. Then, the restraints were steadily removed through an eight-step equilibration process of 50 fs each. The final step was an equilibration of 100 fs without any restraints. Then, the simulations were produced using a 2-fs time-step, using Langevin dynamics (SCHNEIDER; STOLL, 1978) to keep the temperature at 300K with a time constant of 1 ps, and Berendsen barostat (BERENDSEN *et al.*, 1984)

to hold the pressure at 1 bar. Finally, an 8 Å cutoff was used to calculate the long-range electrostatics using the Particle-mesh Ewald method (DARDEN *et al.*, 1993). Both simulations were performed during 4 μs under NPT conditions. The CPPTRAJ package (ROE; CHEATHAM, 2013) was used for the analysis, and the MM-PBSA (GENHEDEN; DISCOVERY; 2015) method to estimate ligand-binding affinities.

Statistical analysis

The results were expressed as geometric means and statistical analyses by one-way ANOVA and subsequent post hoc test with Holm Sidak's correction or a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test using GraphPad (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The obtained p-Values below 0.05 were considered significant

Results

Intrinsic antibacterial activity effect and modulatory activity against clinical ciprofloxacin-resistant strains

The antibacterial activity of abietic acid was obtained by microdilution method against strains standard ATCC of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* (SA 25923 and EC25922). The respective multiresistant strains (SA10 and EC06) are presented in Table 1. The MIC results showed a clinically relevant inhibitory effect to SA-10 and EC-25922.

Table 1. Minimal inhibitory concentration (MIC, $\mu\text{g/mL}$) of abietic acid against strains standard ATCC and multiresistant of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

	Strains standard ATCC		Strains multiresistant of clinical isolated			
	MIC SA 25923	MIC EC 25922	MIC SA-10	Resistanc e profile	MIC EC-06	Resistance profile
Abietic Acid	1024 $\mu\text{g/mL}$	64 $\mu\text{g/mL}$	102 $\mu\text{g/mL}$	Ca, Cef, Cf, Cro	1024 $\mu\text{g/mL}$	Amc, Amox, Amp, Asb, Azi, Ca, Cef, Cf, Cip, Cla, Clin, Eri, Lev, Mox, Oxa, Pen

Amc - Amoxicillin + Ac. clavulanic; Amox - Amoxicillin; Amp - Ampicillin; Asb - Ampicillin + Sulbactam; Azi - Azithromycin; Ca - Cefadroxil; Cef - Cephalexin; Cf - Cephalotin; Cip - Ciprofloxacin; Cla - Clarithromycin; Clin - Clindamycin; Cro - Ceftriaxone; Eri - Eritromycin; Lev - levofloxacin; Mox - Moxifloxacin; Oxa - oxacillin; Pen - Penicillin.

To verify the modulatory effect of the abietic acid against Gram-positive and Gram-negative bacteria was used three different antibiotic classes gentamicin (aminoglycoside), ampicillin (beta-lactam), and ciprofloxacin (fluoroquinolone). So, our findings firmly indicate a significant modulating activity for *Escherichia coli* (EC-06) for both antibiotics: gentamicin, with MIC reduction of 102 to 64 $\mu\text{g/mL}$; and ciprofloxacin with a decrease of MIC of 50.8 to 20.2 $\mu\text{g/mL}$; thus, causing an increase the activity of these antibiotics (Figure 1A). However, for the Gram-positive strain *Staphylococcus aureus* (SA-10), the results presented modulating activity for all antibiotics tested: a MIC reduction of 20.2 to 12.7 $\mu\text{g/mL}$ to ampicillin; 16 to 0.5 $\mu\text{g/mL}$ gentamicin; and 40 to 16 $\mu\text{g/mL}$ to ciprofloxacin (Figure 1B). In this essay, we use Ampicilin with subactan and chlorpromazine to evidence possibles resistance mechanisms by efflux pump and the presence of β -lactamase. So, the results of the abietic acid did not demonstrate a

significant effect against the β -lactamase activity. However, they show relevant effects similar to chlorpromazine, a pump efflux inhibitor.

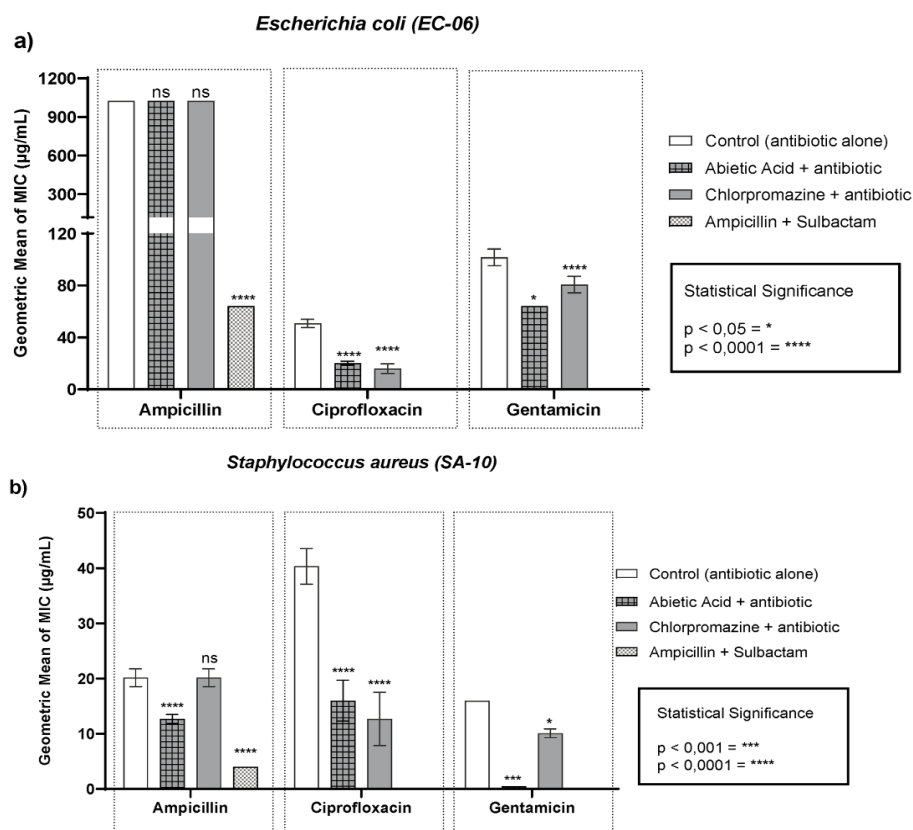


Figure 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the antibiotic's gentamicin, ciprofloxacin, and ampicillin in the presence and absence of the abietic acid. A) *Escherichia coli* (EC-06) e B) *Staphylococcus aureus* (SA-10). The value was expressed as the geometric mean of three simultaneous experiments. (***) Statistically significant values in ANOVA analysis; ns: no significance.

Assessment of efflux pump inhibition of *NorA* or *MepA* by MIC reduction test

The evaluation of the inhibitory capacity of the efflux pump was performed against two strains of *S. aureus* SA-1199B (overexpresses the *NorA* gene encoding) and multi-drug resistant (MDR) mutant strain SA-K2068 (overexpresses the *MepA* gene encoding). Initially, we performed a MIC against SA-1199B, and K2068 was determined for all the molecules (Table 2). Interestingly, except for chlorpromazine, all other compounds demonstrated a slight activity ($\text{MIC} < 512 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Table 2).

Table 2. Minimal inhibitory concentration (MIC, $\mu\text{g/mL}$) of abietic acid, ethidium bromide, and two pump inhibitors against two *S. aureus* overexpress the efflux pump gene encoding.

EC-06											
Antibiotic (ANT)	Mean of MIC		Chlorpromazine+ANT			Abietic acid+ANT			Ampicillin+sulbactam		
	Mean of MIC	SD	Mean of MIC	SD	MF (%)	Mean of MIC	SD	MF (%)	Mean of MIC	SD	MF (%)
Ampicillin	1024	0	1024	0	0	1024	0	0	64	0	93.75
Ciprofloxacin	50.8	3.2	16	3.6	68.50	20.1	1.6	60.31	0	0	100
Gentamicin	101.5	6.4	80.63	6.4	20.63	64	0	37.00	0	0	100
SA-10											
Ampicillin	20.16	1.6	20.16	1.6	0.00	12.7	0.8	37.00	4	0	80.16
Ciprofloxacin	40.32	3.2	12.7	4.8	68.50	16	3.6	60.32	0	0	100
Gentamicin	16	0	10.08	0.8	37.00	0.5	0	96.88	0	0	100

Mean of MIC = geometric mean of minimum inhibitory concentrations ($\mu\text{g/mL}$), SD = standard error of triplicate; MF(%) = percentage of modulation factors in comparison with compound alone

Evaluation of the modulatory effect of fluoroquinolone resistance was procedure using the SA-1199B strain. The observed results show that abietic acid increases the activity of norfloxacin, reducing the antibiotic MIC from 362.04 to 161.27 $\mu\text{g/mL}$ (figure 2A). Effects similar were observed to chlorpromazine (362.04 to 203.09 $\mu\text{g/mL}$) and CCCP (80 to 64 $\mu\text{g/mL}$) that are known to your inhibitory capacity in pump efflux as NorA and MepA. Abietic acid can also modulate resistance to EtBr by reducing the MIC from 80 to 32 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 2B), which confirms the potential for inhibition of the efflux pump since EtBr is a known substrate that interacts exclusively with efflux pumps like NorA or MepA.

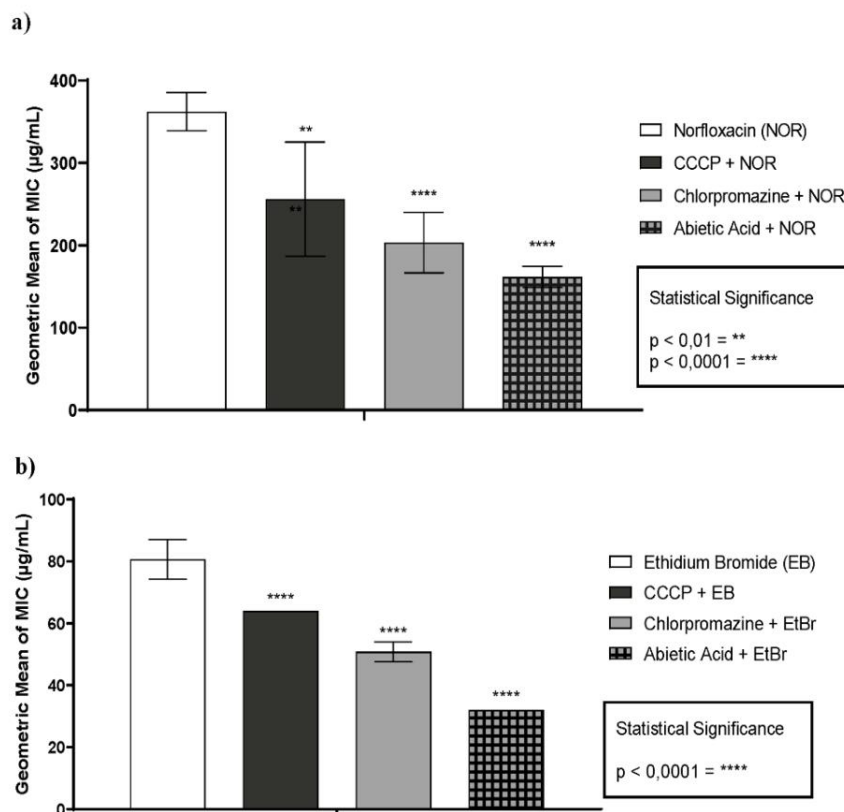


Figure 2. MIC of ciprofloxacin (a) and ethidium bromide (b) alone and in association with the NorA efflux pump inhibitors or abietic acid against *S. aureus* SA-1199B. The value was expressed as the geometric mean of three simultaneous experiments. (***) Statistically significant values in ANOVA analysis; ns: no significance.

The modulatory activity of abietic acid on resistance to ciprofloxacin or EtBr was also evaluated using the SA-K2068 strain that overexpressing efflux pump MepA. The results showed a significant change in MICs when abietic acid was tested in combination with antibiotics ciprofloxacin 101.6 to 64 µg/mL (Figure 3A) or EtBr with MIC reduction 256 to 64 µg/mL (Figure 3b). Similar results in the MIC are observed when chlorpromazine (256 to 128 µg/mL) or CCCP (256 to 8 µg/mL) were added to the bacterial broth with EtBr. All these results indicate the modulation of resistance to these antibacterial agents by the interference of pump machine function.

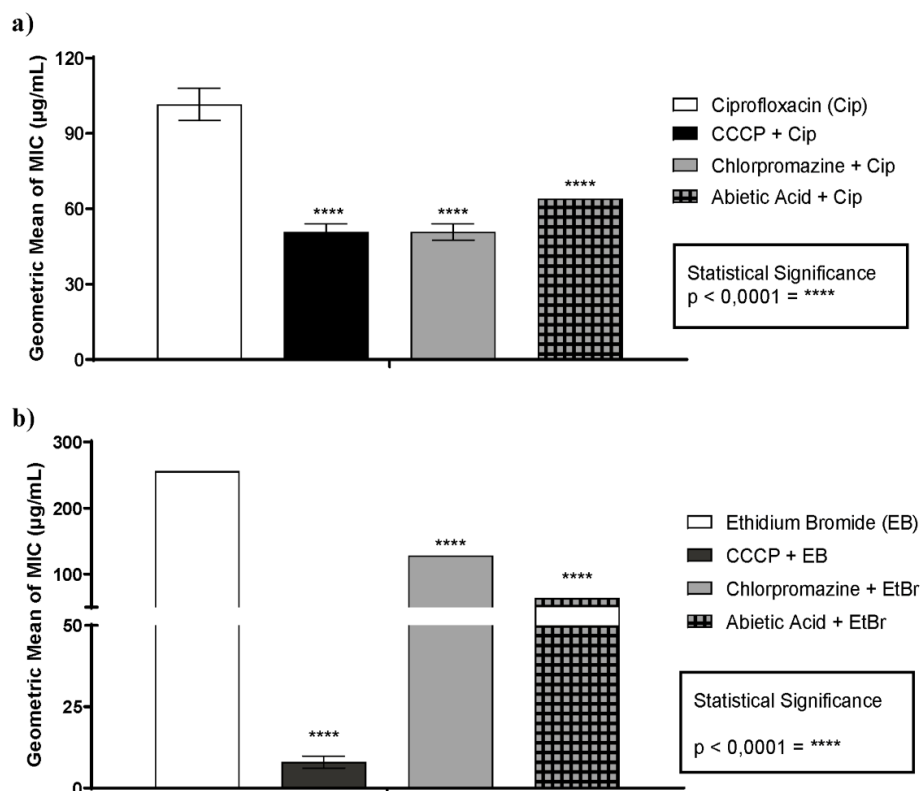


Figure 3. MIC of ciprofloxacin (a) and ethidium bromide (b) alone and in association with the MepA efflux pump inhibitors or abietic acid against *S. aureus* SA-K2068. The value was expressed as the geometric mean of three simultaneous experiments. (***) Statistically significant values in ANOVA analysis; ns: no significance.

Docking and Molecular Dynamics of abietic acid on the active sites of NorA and MepA

For the molecular docking study, two different docking algorithms were proposed to be validated by self-docking. As a result, the comparison of docked positions has exhibited root mean square deviation (RMSD) values of 0.85Å for the position with the best interaction energy of each algorithm. This procedure was adopted by the absence of X-ray crystal structures of these efflux pumps. Table 3 shows the best interaction energy of the docked compounds from the molecular docking procedure.

Table 3: The binding affinities of the best poses for all compounds of both efflux pumps.

Compounds	Strains multiresistant	
	MIC 1199B	MIC K2068
Ethidium bromide (EtBr)	80.63 $\mu\text{g/mL}$	256 $\mu\text{g/mL}$
Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP)	8 $\mu\text{g/mL}$	8 $\mu\text{g/mL}$
Chlorpromazine (CPMZ)	≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$	≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$
Abietic Acid (AB)	322.54 $\mu\text{g/mL}$	406.37 $\mu\text{g/mL}$

As mentioned before, EtBr is a known substrate of efflux pumps as present in the *S. aureus* 1199B and K2068 and, carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) and chlorpromazine are knowledge in literature as an inhibitor of these pumps conform effect observed in the reduction of the MIC of EtBr (figure 2 and 3). A similar inhibitor effect is observed when the abietic acid is used in an association, causing a reduction of the function of the pump machine for both targets. Table 2 demonstrated the binding energy of interactions against MepA and NorA targets compared to abietic acid (AB), carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP), and chlorpromazine displayed favorable binding energy value by ~ 3 kcal/mol of difference. The observed trend in the binding free energy of abietic acid was found to be more consistent with the NorA efflux pump corroborating with the antimicrobial assay, which can be explained by hydrogen bond interactions and aromatic–aromatic interactions involving the stabilizations of NorA-AB complex. Similar results were also observed with MepA, where the binding free energy of abietic acid was more consistent than chlorpromazine. However, as observed in the antimicrobial assay, the CCCP presents a more significant inhibitor powder that can be explained by better hydrogen bond interactions that contribute to stabilizing the complex with the MepA efflux pump.

Furthermore, A complete description of all interactions of the abietic acid with MepA and NorA active site is shown as a 2D protein-ligand interaction diagram (Figure 4). We found pi–Alkyl, Alkyl, van der Waals and hydrogen bonds interactions involved in stabilizing the complexes for both targets. As it happens to other efflux pumps, such as NorA, there is a hydrophobic patch in the distal site, consisting of several amino acids, such as PHE153, VAL149, ALA146, etc. binding site, displaying a hydrogen bond interaction of 2.25 Å with ASN205. van der Waals interactions with residues THR201,

SER175, VAL176, ASN179, SER32, and many others are also present. A complete description of all interactions of the chalcone is shown as a 2D protein-ligand interaction diagram in Figure 4.

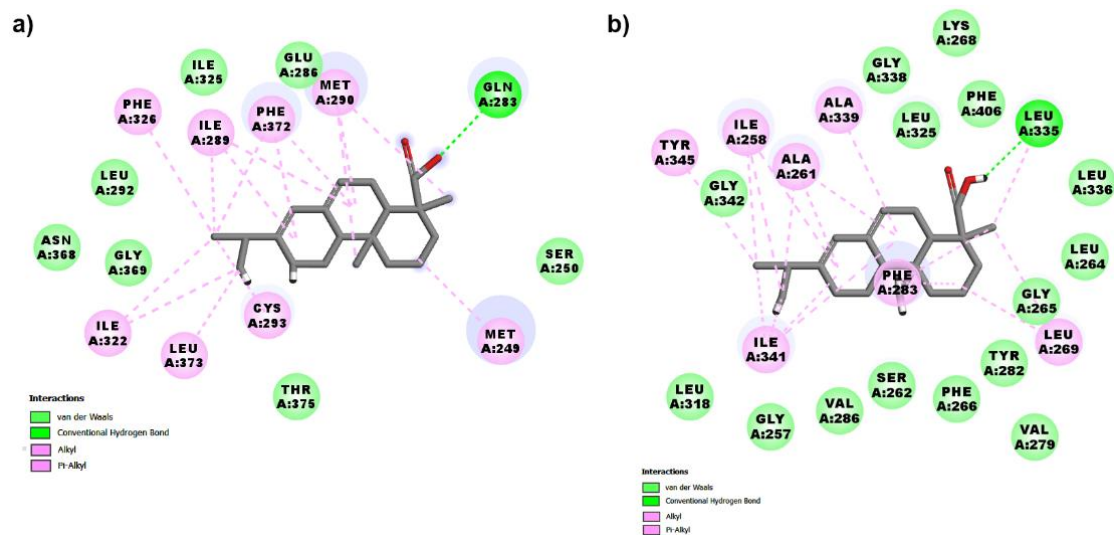


Figure 4: Interaction maps showing the binding of Abietic acid with residues of binding sites in the MepA (a) and NorA (b).

In order to analyze these interactions and calculate their free energy contributions, Molecular Dynamics simulations were performed with the abietic acid in the active site of each protein. Each receptor's active site was defined as the amino acids within a radius of 5 Å from the ligand (Figure 5).

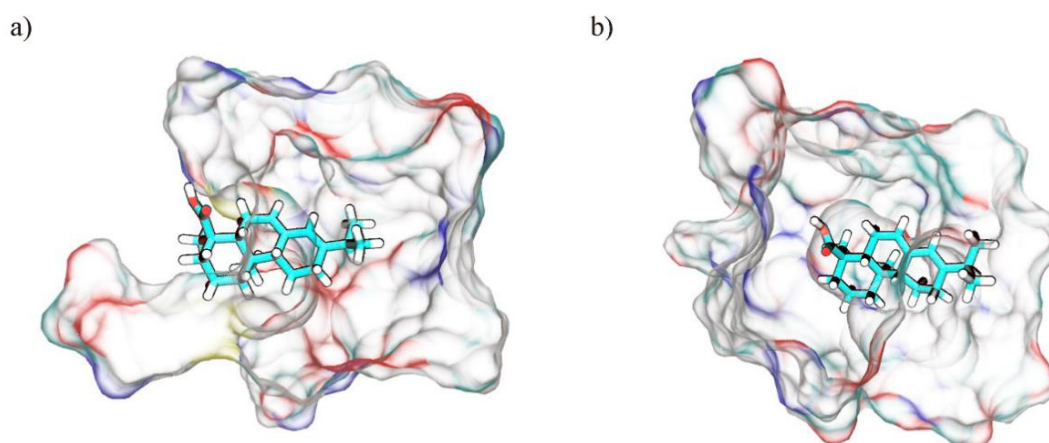


Figure 5: Region of the binding of Abietic acid in the active sites in the MepA (a) and NorA (b). Residues within 5 Å of the ligand are represented as surfaces. Colors scheme according to the atom types (red = oxygen, blue = nitrogen, carbon = green, sulfur = yellow, white = hydrogen). Water molecules were omitted for better visualization

Using the MM-PBSA method, we were able to calculate the total binding free energy for each protein: -4.13 kcal/mol for the MepA and -8.35 kcal/mol for the NorA. The standard error of the mean was 0.75 and 0.87 kcal/mol, respectively. Furthermore, we also calculated the contribution of each residue and ligand in the complexes' interaction and its binding energy, as shown in Figure 6 and Figure 7.

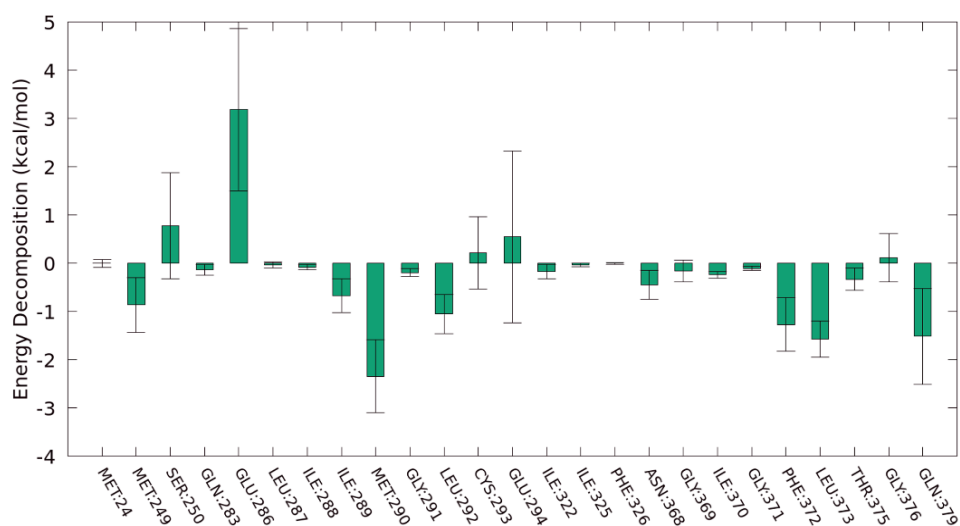


Figure 6: Energy contribution from each residue in the ligand-protein complex with MepA efflux pump. The energy contribution of the abietic acid was -17.859 (\pm 1.342) kcal/mol. Residues selected were within 5 Å of the ligand.

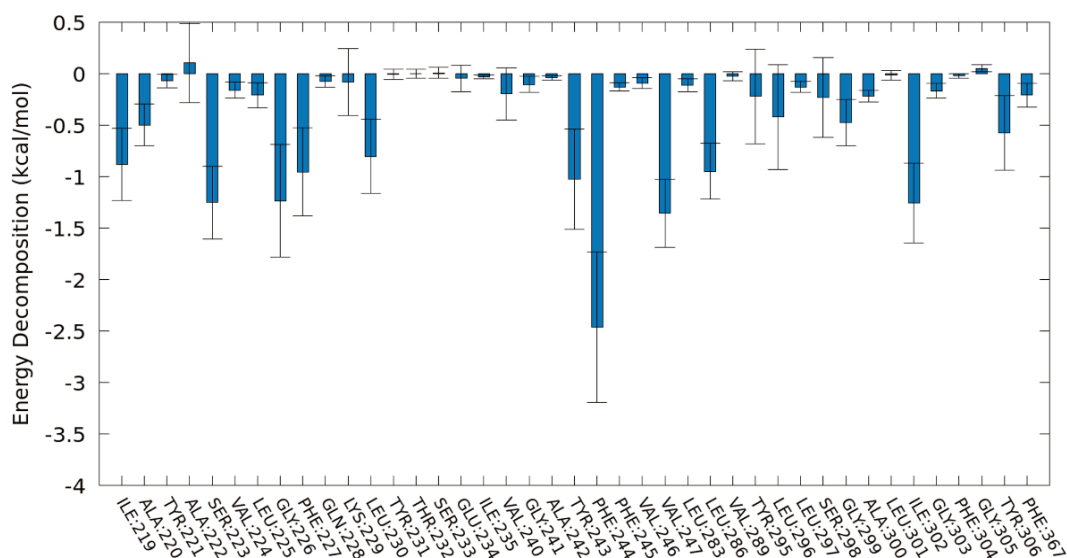


Figure 7: Energy contribution from each residue and the abietic acid (LIG394) in the complex with NorA efflux pump. The energy contribution of the abietic acid was -15.551 (\pm 1.356) kcal/mol. Residues selected were within 5 Å of the ligand.

The residues of MepA that contribute to the binding energies with the abietic acid are MET249, ILE289, MET290, LEU292, PHE372, THR375, GLN379. The MET290 stands out as the amino acid that most promotes the binding energy with the abietic acid. On the other hand, the GLU286 creates some challenges for binding the ligand, probably due to its strong positive charge. For the NorA, most of the residues interactions favor the binding with the ligand: ILE219, SER223, GLY226, PHE227, LEU230, TYR243, VAL247, LEU286, ILE302, and especially the PHE244. Interestingly, for both efflux pumps, a neutral and nonpolar residue is the one that most contributes to the binding energy with the abietic acid.

Discussion

The results clearly demonstrated that abietic acid presents two significant developments: synergic effect when combined with ampicillin, gentamicin, and ciprofloxacin against multiresistant strains and also presented promissory results against strain which overexpresses the efflux pump NorA (SA-1199B) and MepA (SA-K2068), resulting in a decrease of bacterial resistance. The antimicrobial activity of abietic acid was described previously against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (GANEWATTA *et al.*, 2015), *Staphylococcus pseudintermedius* (BUOMMINO *et al.*, 2021), and *Streptococcus mutans* (ITO *et al.*, 2020). The proposed mechanism of antibacterial activity can be explained by the hydrophobicity of the rigid hydrophenanthrene skeleton and carboxylic functionality that interacts with the lipid component of the bacterial cell membrane altering the membrane functions (ARANDA; VILLALAIN, 1997) and lysis of cell membranes. Others studies were showed low concentrations of abietic acid produce bacteriostatic effects.

Therapy based on the synergic association is an important strategy in modern medicine. It permits old antimicrobial drugs with a history of bacterial resistance to restore their efficacy (DOUAFER *et al.*, 2019). The interesting alternative therapeutics for this problem is the use of phytomedicines in combination with antibiotics. The terpenes are usually found in essential oil or resin and present bacteriostatic and bactericidal activities (MAHIZAN *et al.*, 2019), with promising effects in reducing bacterial resistance (SANTOS BARBOSA, DOS *et al.*, 2021b). The synergism between

terpenes and antibiotics and their interference in the bacterial resistance is present in the literature for different associations: e.g., carvacrol or thymol (DOS SANTOS BARBOSA *et al.*, 2021b) or eugenol (MUNIZ *et al.*, 2021) or estragole (COSTA *et al.*, 2021b) with norfloxacin, thymol with tetracycline (SILVEIRA *et al.*, 2020), 1,8 cineole with mupirocin (KIFER *et al.*, 2016), α -bisabolol (OLIVEIRA *et al.*, 2017) or d-limonene (COSTA *et al.*, 2019) or β -citronellol (PEREIRA *et al.*, 2021) in combination with gentamicin. The results in this work confirm synergic effects observed in the literature and corroborating with studies of Buommino *et al.* (2021) and Helfenstein *et al.* (2017) that reported the antimicrobial activity of abietic acid against different strains with antibiotic resistance.

On the other hand, for the first time, the data presented show that the association of abietic acid with ethidium bromide promotes the reduction of MIC statistically significant, indicating that the efflux pump mechanism was inhibited, attributing this effect to a previously observed synergism. Other terpenes as estragole, eugenol, Carvacrol and Thymol, α -Pinene, and Limonene also demonstrate similar capacity of efflux pump inhibition (DA COSTA *et al.*, 2021b; DE ARAÚJO *et al.*, 2021b; DOS SANTOS BARBOSA *et al.*, 2021b; MUNIZ *et al.*, 2021; PEREIRA *et al.*, 2021). These results confirm that both physical-chemical characteristics, lipophilicity, and hydrophobicity are essential to explain the possibility of interactions with these pumps. As observed in abietic acid, the carbon skeleton and hydroxyl groups are responsible for the binding with the efflux pump and essential to the cell membrane interactions. The docking and molecular dynamics results suggest the, possibly, the abietic acid can interact with NorA and MepA efflux pump by competition mechanism decreasing the effect of pump binding with antibiotic. The outcomes of the docking analysis reflect and agree with the MD and PBSA calculations. These findings suggest a possible use as antibiotic resistance breakers (ARBs), confirming the hypothesis proposed by Laws *et al.*, (2019). Therefore, the co-administration of ARBs as adjuvants to antibiotics associated with conventional antibiotics can bring health benefits, impacting the reduction of high levels of bacterial resistance.

Conclusions

The rise and alarming rate of antibiotic resistance require urgent global attention. At this point, several strategies have been developed to break bacterial resistance levels; thus, the search for new ARAs may represent a promising avenue. This study highlighted

the observation that abietic acid inhibited the growth of standard gram-positive and gram-negative bacteria strains. Furthermore, when combined with the antibiotic, it demonstrated a significant synergistic effect against multidrug-resistant strains. Thus, these results allow us to infer two hypotheses: abietic acid may interfere with the function of the efflux pump mechanism, and the synergistic effect against multidrug-resistant bacteria may result from the interaction with the bacterial cell membrane, promoting permeability changes. However, further studies are needed to verify its effectiveness using *in vivo* models.

Author Contributions

M.G.L.S., L.Y.S.S., T.S.F. and J.E.R. designed the study and performed the experiments. R.L.S.P. and S.R.T. isolated and identified the human strains. M.G.L.S., M.R.C.O. and A.O.B.P.B.M. drafted and wrote the manuscript. S.R.T., H.D.M.C. and I.R.A.M. edited and revised the manuscript. M.C.P.L and G.C.A.H. performed the computational simulations, data analysis, interpretation and writing. H.D.M.C. and I.R.A.M. collaborated intellectually with the conception, structuring, and orientation of experiments. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research received no external funding.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest

Acknowledgments

We thank the Universidade Regional de Cariri - URCA, for the equipment, materials and laboratory space used to perform the experiments. This work was supported by Cearense Foundation to Support Scientific and Technological Development (FUNCAP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES—Finance Code 001), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Financier of Studies and Projects (FINEP). This article is a contribution of

the National Institute of Science and Technology - Ethnobiology, Bioprospecting and Nature Conservation/CNPq/FACEPE. The support and resources from the Center for High Performance Computing (CHPC) at the University of Utah are gratefully acknowledged.

References

- AGUDELO-GÓMEZ, L. S.; BETANCUR-GALVIS, L. A.; GONZÁLEZ, M. A. Anti HHV-1 and HHV-2 activity in vitro of abietic and dehydroabietic acid derivatives. **Pharmacologyonline**, 2012. v. 1, n. SPL. 1, p. 36–42.
- ALLCOCK, S. *et al.* Antimicrobial resistance in human populations: Challenges and opportunities. **Global Health, Epidemiology and Genomics**, 2017. v. 2.
- ARANDA, F. J.; VILLALAÍN, J. The interaction of abietic acid with phospholipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, 1997. v. 1327, n. 2, p. 171–180.
- ARAÚJO, A. C. J. DE *et al.* *In Vitro* and *In Silico* Inhibition of *Staphylococcus aureus* Efflux Pump NorA by α -Pinene and Limonene. **Current Microbiology**, 1 Sep. 2021. v. 78, n. 9, p. 3388–3393. Acesso em: 31 aug. 2021.
- BERENDSEN, H.; H.J.C.; POSTMA, J.P.M.; VAN GUNSTEREN, W.F.; DINOLA, A.; HAAK, J.R., Undefined. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **aip.scitation.org**, 1984. v. 81, n. 8, p. 234505. Disponível em: <<https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.448118>>. Acesso em: 21 sep. 2021.
- BITENCOURT-FERREIRA, G.; AZEVEDO, W. F. DE. Molegro virtual docker for docking. **Methods in Molecular Biology**, 2019. v. 2053, p. 149–167. Acesso em: 28 aug. 2021.
- BUOMMINO, E *et al.* Synergistic effect of abietic acid with oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **mdpi.com**, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/962154>>. Acesso em: 27 aug. 2021.
- BUOMMINO, Elisabetta *et al.* Synergistic effect of abietic acid with oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Antibiotics**, 2021. v. 10, n. 1, p. 1–12.
- CHAKRABORTY, S. *et al.* Antimicrobial activity of *Cannabis sativa*, *Thuja orientalis* and *Psidium guajava* leaf extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Integrative Medicine**, 2018. v. 16, n. 5, p. 350–357.
- COSTA, M. D. S. *et al.* Comparative analysis of the antibacterial and drug-modulatory effect of d-limonene alone and complexed with β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Feb. 2019. v. 128, p. 158–161. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092809871830527X>>.

COSTA, R. H. S. DA *et al.* Evaluation of antibacterial activity and reversal of the NorA and MepA efflux pump of estragole against *Staphylococcus aureus* bacteria. **Archives of Microbiology**, 2021a.

_____ *et al.* Evaluation of antibacterial activity and reversal of the NorA and MepA efflux pump of estragole against *Staphylococcus aureus* bacteria. **Archives of Microbiology**, 1 Aug. 2021b. v. 203, n. 6, p. 3551–3555. Acesso em: 31 aug. 2021.

DARDEN, T. *et al.* Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. **aip.scitation.org**, 1993. v. 98, n. 12, p. 5648. Disponível em: <<https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.464397>>. Acesso em: 21 sep. 2021.

DOUAFER, H. *et al.* Antibiotic Adjuvants: Make Antibiotics Great Again! **Journal of Medicinal Chemistry**, 10 Oct. 2019. v. 62, n. 19, p. 8665–8681. Acesso em: 30 aug. 2021.

ESTEVES, M. A. *et al.* Synthetic derivatives of abietic acid with radical scavenging activity. **Journal of Natural Products**, 2001. v. 64, n. 6, p. 761–766.

FARHADI, F. *et al.* Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. **Phytotherapy Research**, 2019. v. 33, n. 1, p. 13–40.

FREITAS, P. R. *et al.* Characterization and antibacterial activity of the essential oil obtained from the leaves of *Baccharis coridifolia* DC against multiresistant strains. **Microbial Pathogenesis**, 2020. v. 145, n. April, p. 104223.

FRIMODT-MØLLER, J.; LØBNER-OLESEN, A. Efflux-Pump Upregulation: From Tolerance to High-level Antibiotic Resistance? **Trends in Microbiology**, 2019. v. 27, n. 4, p. 291–293.

GANEWATTA, M. *et al.* Antibacterial and biofilm-disrupting coatings from resin acid-derived materials. **ACS Publications**, 12 Oct. 2015. v. 16, n. 10, p. 3336–3344. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.biomac.5b01005>>. Acesso em: 30 aug. 2021.

GAO, Y. *et al.* Abietic acid attenuates allergic airway inflammation in a mouse allergic asthma model. **International Immunopharmacology**, 2016. v. 38, p. 261–266.

GENHEDEN, S.; DISCOVERY, U. R.-E. Opinion On Drug; 2015, Undefined. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. **Taylor & Francis**, 1 May. 2015. v. 10, n. 5, p. 449–461. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/17460441.2015.1032936>>. Acesso em: 21 sep. 2021.

GONZÁLEZ, M. A. *et al.* Synthesis and biological evaluation of dehydroabietic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2010. v. 45, n. 2, p. 811–816.

GONZÁLEZ-BELLO, C. Antibiotic adjuvants – A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 2017. v. 27, n. 18, p. 4221–4228.

- HE, X. *et al.* A fast and high-quality charge model for the next generation general AMBER force field. **Journal of Chemical Physics**, 21 Sep. 2020. v. 153, n. 11. . Acesso em: 21 sep. 2021.
- HELFENSTEIN, A. *et al.* Antibacterial profiling of abietane-type diterpenoids. **Bioorganic & medicinal chemistry**, 2017. v. 25, n. 1, p. 132–137.
- ITO, Y. *et al.* Antimicrobial and antibiofilm effects of abietic acid on cariogenic *Streptococcus mutans*. **Odontology**, 2020. v. 108, n. 1, p. 57–65.
- IZADI, S.; ... R. A.-T. Journal Of Physical; 2014, Undefined. Building water models: a different approach. **ACS Publications**, 6 Nov. 2014. v. 5, n. 21, p. 3863–3871. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jz501780a>>. Acesso em: 21 sep. 2021.
- KANG, S.; ZHANG, J.; YUAN, Y. Abietic acid attenuates IL-1 β -induced inflammation in human osteoarthritis chondrocytes. **International Immunopharmacology**, 2018. v. 64, n. July, p. 110–115.
- KEELING, C. I.; BOHLMANN, J. Diterpene resin acids in conifers. **Phytochemistry**, 2006. v. 67, n. 22, p. 2415–2423.
- KIFER, D. *et al.* Antimicrobial potency of single and combined mupirocin and monoterpenes, thymol, menthol and 1, 8-cineole against *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm. **nature.com**, [s.d.]. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ja201610>>. Acesso em: 31 aug. 2021.
- LAWS, M. *et al.* Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. **academic.oup.com**, [s.d.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsre/article-abstract/43/5/490/5509578>>. Acesso em: 30 aug. 2021.
- LEKSHMI, M. *et al.* Efflux pump-mediated quorum sensing: New avenues for modulation of antimicrobial resistance and bacterial virulence. **Biotechnological Applications of Quorum Sensing Inhibitors**, 2018. p. 127–142.
- LIU, X. *et al.* Abietic acid suppresses non-small-cell lung cancer cell growth via blocking IKK β /NF- κ B signaling. **OncoTargets and Therapy**, 2019. v. 12, p. 4825–4837.
- MAHIZAN, N. *et al.* Terpene derivatives as a potential agent against antimicrobial resistance (AMR) pathogens. **mdpi.com**, 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/499520>>. Acesso em: 30 aug. 2021.
- MUNIZ, D. *et al.* In vitro and in silico inhibitory effects of synthetic and natural eugenol derivatives against the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus*. **Elsevier**, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814620316381>>. Acesso em: 31 aug. 2021.
- OLIVEIRA, F. D. S. F. De S. *et al.* Evaluation of the antibacterial and modulatory potential of α -bisabolol, β -cyclodextrin and α -bisabolol/ β -cyclodextrin complex.

Biomedicine and Pharmacotherapy, Aug. 2017. v. 92, p. 1111–1118. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332216319886>>.

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. De M. *et al.* Chemical synthesis, molecular docking and MepA efflux pump inhibitory effect by 1,8-naphthyridines sulfonamides. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2021. v. 160, n. February.

OLMO, F. *et al.* Prospects of an alternative treatment against *Trypanosoma cruzi* based on abietic acid derivatives show promising results in Balb/c mouse model. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2015. v. 89, p. 863–890.

PALUCH, E. *et al.* Prevention of biofilm formation by quorum quenching. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2020. v. 104, n. 5, p. 1871–1881.

PEREIRA, R. *et al.* Antibacterial and modulatory activities of β -cyclodextrin complexed with (+)- β -citronellol against multidrug-resistant strains. **Elsevier**, [s.d.]. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S088240102100200X>>. Acesso em: 31 aug. 2021.

POIREL, L.; *et al.* Antimicrobial Resistance in Escherichia coli Sepsis. **Pediatric Infectious Disease Journal**, 2018. v. 23, n. 10, p. 979–980.

ROE, D. R.; CHEATHAM, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 9 Jul. 2013. v. 9, n. 7, p. 3084–3095. Acesso em: 21 sep. 2021.

SANTOS BARBOSA, C. R. DOS *et al.* Effect of Carvacrol and Thymol on NorA efflux pump inhibition in multidrug-resistant (MDR) *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, 2021a. v. 53, n. 4, p. 489–498.

_____ *et al.* Effect of Carvacrol and Thymol on NorA efflux pump inhibition in multidrug-resistant (MDR) *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, 1 Aug. 2021b. v. 53, n. 4, p. 489–498. Acesso em: 31 aug. 2021.

SANTOS, J. Dos *et al.* In vitro e in silico evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid. **Elsevier**, [s.d.]. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147957118300201>>. Acesso em: 28 aug. 2021.

SCHNEIDER, T.; B, E. S.-P. R.; 1978, Undefined. Molecular-dynamics study of a three-dimensional one-component model for distortive phase transitions. **APS**, 1978. v. 17, n. 3, p. 1302–1322. Disponível em: <<https://journals.aps.org/prb/abstract/10.1103/PhysRevB.17.1302>>. Acesso em: 21 sep. 2021.

SHARMA, A.; GUPTA, V. K.; PATHANIA, R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. **he Indian Journal of Medical Research**, 2020. v. 149, n. 2, p. 129.

SILVEIRA, Z. S. *et al.* Evaluation of the antibacterial activity and efflux pump reversal of thymol and carvacrol against *Staphylococcus aureus* and their toxicity in drosophila melanogaster. **mdpi.com**,2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/704914>>. Acesso em: 31 aug. 2021.

SYSTEMES, D. **Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio visualizer, v. 3.1.**

TALEVI, A. *et al.* Discovery of anticonvulsant activity of abietic acid through application of linear discriminant analysis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 15 Mar. 2007. v. 17, n. 6, p. 1684–1690.

TIAN, C. *et al.* Ff19SB: Amino-Acid-Specific Protein Backbone Parameters Trained against Quantum Mechanics Energy Surfaces in Solution. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 14 Jan. 2020. v. 16, n. 1, p. 528–552. Acesso em: 21 sep. 2021.

TINTINO, SAULO R. *et al.* Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, 2016. v. 97, p. 9–13.

WANG, J *et al.* Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. **Elsevier**, 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1093326305001737>>. Acesso em: 21 sep. 2021

3 Manuscrito III: Avaliação da atividade antifúngica do ácido abiético contra *Candida* spp.

Maria Gabriely de Lima Silva^a, Luciene Ferreira de Lima^c, Lucas Yure Santos da Silva^a, Ana Cecília Calixto Donelardy^a, Maria Rayane Correia de Oliveira^{a,b} Francisco Lucas Alves Batista^a, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins^a, Maria Flaviana Bezerra de Moraes Braga^c, Irwin Rose Alencar de Menezes^a

^aLaboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry (LFQM), Departamento of Biological Chemistry, Regional University of Cariri-URCA, Crato, Ceará, Brazil.

^bGraduate Program in Biotechnology-Northeast Biotechnology Network (RENORBIO); State University of Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brazil.

^cLaboratory of Applied Mycology of Cariri- LMAC, University Regional of Cariri – URCA, Crato, CE Brazil.

Resumo

O aumento da resistência fúngica a fármacos já utilizados na terapia convencional faz necessário a busca por novos antifúngicos. O ácido abiético consiste em um diterpeno encontrado em espécies de *Pinus* sp. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antifúngica do ácido abiético contra *Candida* spp. Para

a realização dos ensaios, foram utilizadas as cepas: *Candida albicans* (CA INCQS 40.006), *Candida krusei* (CK INCQS 40.095) e *Candida tropicalis* (CT INCQS 40.042) O efeito do ácido abiético foi avaliado de forma intrínseca e combinada com o fluconazol. A IC_{50} e a curva de viabilidade celular foram determinadas por meio do método de microdiluição seriada. A concentração fúngica mínima (CFM) foi realizada por subcultivo em meio sólido. Os resultados demonstraram que a CI_{50} dos produtos testados isoladas variou entre 1065 a 3255 $\mu\text{g/mL}$ e a combinação de concentração subinibitória do ácido abiético + Fluconazol foi verificada entre 7.563 a 160.1 $\mu\text{g/mL}$. Em relação a CFM, o ácido abiético tanto sozinho quanto em associação como fluconazol foi $> 1024 \mu\text{g/mL}$ contra CA, CK e CT. Conclui-se que o ácido abiético sozinho inibiu o crescimento fúngico em concentração elevada, mas ao ser associado ao Fluconazol potencializou o efeito do fármaco.

Palavras-chave: *Candida*, ácido abiético, fluconazol

Introdução

Os microrganismos do gênero *Candida* embora sejam comensais podem se apresentar como oportunistas e causar infecções. Além disso, são frequentemente associados como um grande problema de saúde pública, devido principalmente a alta taxa de mortalidade (BEZERRA *et al.*, 2020; PRISTOV; GHANNOUM, 2019). As espécies do gênero *Candida* são responsáveis por causar infecções na corrente sanguínea adquiridas em ambientes hospitalares. Desta forma, a candidíase humana é um dos principais quadros de infecção causados por estes microrganismos, especialmente *Candida albicans* (SUN *et al.*, 2021).

Candida tropicalis é uma das principais espécies do gênero *Candida* responsável pela candidíase (CHEN *et al.*, 2021), encontrada prevalentemente na Ásia- pacífica e América Latina e acomete principalmente pacientes com alguma alteração hematológicas (O'BRIEN *et al.*, 2021). Outras espécies como *Candida albicans* embora seja um comensal encontrado na cavidade oral é uma das principais causadoras de candidíase invasiva, (LEE *et al.*, 2021). Por outro lado, *Candida krusei* é uma levedura comensal presente na mucosa de indivíduos considerados saudáveis (JAMIU *et al.*, 2021).

A grande maioria dos fármacos, como o fluconazol tem desenvolvido resistência fúngica. Sendo assim, faz-se necessário a busca por novos fármacos que tenha ação antifúngica ou que atuem na potencialização dos agentes terapêuticos convencionais (SILVA *et al.*, 2021). Diante disso, pesquisa com produtos naturais são bastantes promissoras devido a descobertas de novas drogas, como as que são utilizadas para tratamento de infecções, entre elas a candidíase e outras infecções que são causadas por espécies do gênero *Candida* (ALYOUSEF, 2021; LIU *et al.*, 2019).

Neste contexto, as coníferas são consideradas fontes importantes de resinas. Embora se tenha uma escassez de caracterização química dos compostos sabe-se que o

ácido abiético é um diterpeno visto como composto majoritário encontrado nestas resinas (SIMONEIT *et al.*, 2018). Na literatura existem algumas atividades biológicas do ácido abiético comprovadas como: inibidor da lipoxigenase (NURAY ULUSU *et al.*, 2002), atividade antiparasitária (OLMO *et al.*, 2015), anti-inflamatória (FERNÁNDEZ *et al.*, 2001) e antibacteriana (ITO *et al.*, 2020).

Considerando a necessidade atual da busca de novos fármacos com resultados promissores como agentes antifúngicos com efeitos colaterais baixos e economicamente viável, este presente estudo objetivou-se avaliar atividade antifúngica do ácido abiético contra *Candida* spp.

Metodologia

Drogas utilizadas

O ácido abiético, foi adquirido pela *Sigma-Aldrich Corporation*. O flucanazol foi obtido do laboratório globo e diluído em água destilada estéril. O Dimetilsulfóxido (DMSO Merck, Darmstadt, Alemanha) foi usado para diluição do produto.

Microrganismos

As linhagens padrão *Candida albicans* INCQS 40006 (ATCC 10231), *C. tropicalis* INCQS 40042 (ATCC 13803) e *C. krusei* INCQS 40095 (ATCC 34135) foram obtidas do Instituto Brasileiro de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS), Coleção de Cultura Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Meios de cultura

Foi utilizado o meio sólido de ágar *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), preparado de acordo com as instruções do fabricante, e o meio líquido *Sabouraud Dextrose Broth*

(SDB) adquiridos da HIMEDIA®. Os meios foram solubilizados com água destilada e esterilizados em autoclave, a 121°C por 15 min.

Preparação do inóculo

Todas as linhagens foram inicialmente mantidas em ASD inclinado, sob refrigeração (8 °C), no Laboratório de Micologia Aplicada do Cariri - LMAC da Universidade Regional do Cariri - URCA. Para os testes de atividade antifúngica intrínseca e combinada com fármaco, realizados por microdiluição, inicialmente as linhagens foram cultivadas em meio ASD vertido em placa de Petri a 37 °C por 24 horas (overnight). A partir destas, foram preparadas suspensões dos micro-organismos em tubos contendo 4 mL de solução estéril (NaCl a 0,9 %), tendo sua turbidez comparada e ajustada à escala 0.5 de MacFarland (SOUZA *et al.*, 2007).

Curva de viabilidade celular e determinação de Concentração Inibitória de 50% dos micro-organismos (CI₅₀)

Neste ensaio cada poço em uma placa de microdiluição foi preenchido com 100 µL de SDB (Sabouraud Dextrose Broth). Em seguida 100 µL do ácido abiético foram adicionados no primeiro poço para diluição em série. A diluição seriada foi realizada com concentrações variando de 1024 µg/mL a 1 µg/mL para testes fúngicos. Posteriormente, foi adicionado 10 µL do inóculo da cepa fúngica (correspondente a 10% da solução total). Todos os testes foram realizados em quadruplicada. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C e, em seguida, as leituras foram realizadas em 630 nm, utilizando um espectrofotômetro (Thermoplate®). As leituras das placas foram realizadas no aparelho de ELISA (Thermoplate®), utilizando um comprimento de onda de 630 nm, sendo os resultados utilizados para obter uma curva de viabilidade celular e IC₅₀. Foram realizados também controles de diluição dos compostos e do fluconazol (com solução de Cloreto de sódio 0,9% no lugar do inóculo) e controle de esterilidade do meio.(MORAIS-BRAGA *et al.*, 2016).

Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

O ensaio da concentração fúngica mínima foi determinada pela presença ou ausência do crescimento fúngico a partir da transferência de uma pequena alíquota (10 µL). Após a homogeneização um subcultivo na placa de *petri* contendo SAD (*Ágar Saboraud Dextrose*) com o auxílio de uma placa guia fixada na parte inferior da placa. O crescimento de colônias de *Candida* foi analisado 24 horas após serem incubadas a uma temperatura de 37° C (ERNST *et al.*, 1999; MORAIS-BRAGA *et al.*, 2016). O CFM foi definido como a concentração capaz de inibir o crescimento de colônias de fungo.

Avaliação da atividade potencializadora de antifúngicos em associação com fluconazol

Para constatar se houve ou não potencialização da ação do antifúngico, a atividade combinada foi avaliada conforme descrita por (COUTINHO *et al.*, 2008), com modificações, no qual o produto é testado em concentração subnibitória baseada na CFM. Para aqueles cujos CFM não pode ser visualizada, a Concentração subnibitória foi baseada na Concentração Matriz (CM) de diluição dos produtos (2048 µg/mL), ou seja, CM/8. As placas foram preenchidas com 100 µL do produto e do meio de cultura referente. Em seguida, foi realizada a microdiluição seriada com 100 µL de fluconazol em concentrações variando de 1024 a 1 µg/mL. Posteriormente, foi adicionado 10 µL da suspensão microbiana (correspondente a 10% da solução). Os controles de crescimento e de diluição também foram preparados. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e em seguida, as leituras foram realizadas conforme descrito anteriormente (MORAIS-BRAGA *et al.*, 2016).

Análise estatística

Os dados foram analisados por meio da variância ANOVA (*two-way*), seguida pelo teste *post hoc* de *Bonferroni* ou ANOVA (*one-way*) seguido do teste *post hoc* de *Tukey*, foi utilizado para análise de os resultados experimentais usando o software *GraphPad* 6.0. Para todas as análises, o nível de significância estatística foi definido a 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Determinação de Concentração Inibitória de 50% de micro-organismos (CI₅₀) e curva de viabilidade celular – atividade intrínseca e combinada a fármaco

Na determinação da CI₅₀ os resultados mostram (Tabela 1) que o ácido abiético não demonstrou resultados clinicamente significativo, tendo efeito em concentrações elevadas, porém quando associado ao fluconazol foi observado uma potencialização do mesmo contra CA INCQC 40.006 e CT INCQS 40.042. Enquanto para CK INCQS 40.095 a combinação do ácido abiético com o fármaco fluconazol provocou uma redução no efeito inibidor deste antifúngico.

Tabela 1. Concentração Inibitória de 50% de micro-organismos (CI₅₀) (µg/mL) por ácido abiético, fluconazol e sua combinação.

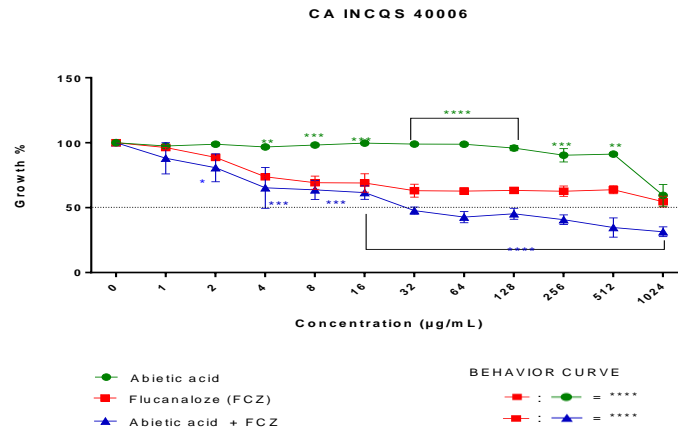
Substância	<i>Candida albicans</i> (INCQS 40,006)	<i>Candida krusei</i> (INCQS 40,095)	<i>Candida tropicalis</i> (INCQS 40,042)
ácido abiético	1258	1502	2189
fluconazol	1881	89.71	223.2
ácido abiético + fcz	31,81	153.2	11.38

INCQS 40.006; *Candida krusei* CK INCQS 40.095; *Candida tropicalis* CT INCQS 40.042; INCQS Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; FCZ fuconazol

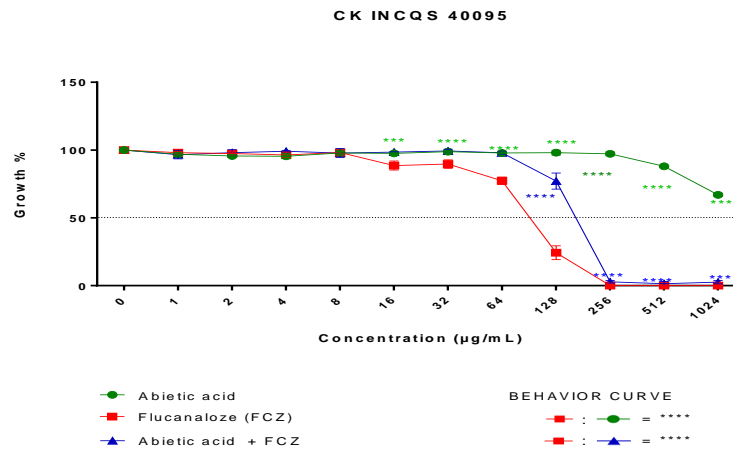
Conforme demonstrado na curva de viabilidade (Figura 1 – A, B e C) o ácido abiético não causou inibição significativa do crescimento fúngico frente as três cepas testadas. No entanto quando combinado com o agente antifúngico fluconazol, o ácido abiético potencializou o efeito do fármaco, sendo observado um possível efeito sinérgico contra CA INCQC 40.006 (2 a 1024 µg/mL), e CT INCQS 40.042 (2 a 1024 µg/mL). Sobre a cepa CK INCQS 40.095 (128 µg/mL) resultou em antagonismo. No entanto o crescimento de *Candida krusei* foi inibindo apenas quando exposto nas concentrações de 256 a 1024 µg/mL.

Figura 1: Curva de viabilidade celular da ação intrínseca do ácido ábiético e do Fluconazol (FCZ), e a sua associação contra as cepas de *Candida albicans* (CA), *Candida tropicalis* (CT) e *Candida krusei* (CK). INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Os dados foram analisados por um método unidirecional ANOVA seguida de comparações múltiplas do teste post-hoc de Bonferroni. * Diferença significativa (p < 0,05) * Significância estatística com p < 0,05; ** Significância estatística com p < 0,01; *** Significância estatística com p < 0,001; **** Significância estatística com p < 0.0001.

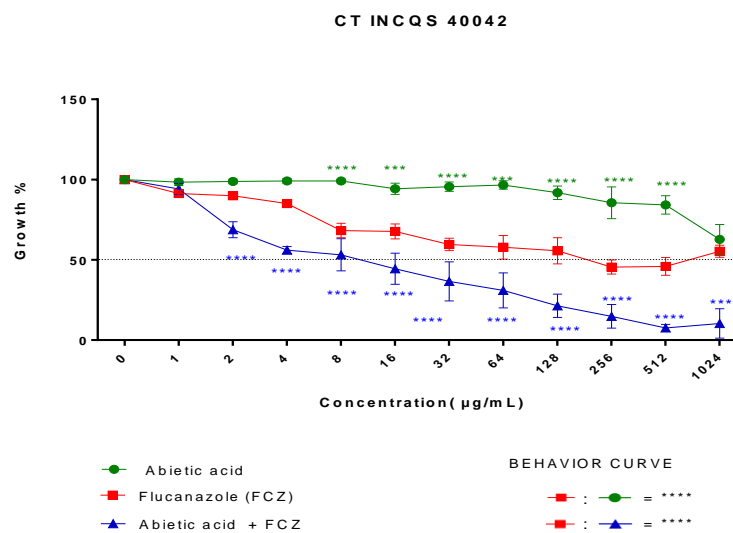
A)



B)



C)



Concentração Fungicida Mínima

Em relação a Concentração Fungicida Mínima, todos os compostos (ácido abiético e fluconazol) apresentaram efeito fungicida em concentração > 1024 µg/mL contra as cepas CA INCQS 40.006, CK INCQS 40.095 e CT INCQS 40.042, sendo verificado o mesmo efeito na associação do ácido abiético e fluconazol.

Tabela 2. Concentração fúngica mínima (MFC em µg/mL) do ácido abiético em isolamento e em combinação com fluconazol.

Substância	<i>Candida albicans</i> (INCQS 40.06)	<i>Candida krusei</i> (INCQS 40.095)	<i>Candida tropicalis</i> (INCQS 40.042)
ácido abiético	>1024 µg/mL	>1024 µg/mL	>1024 µg/mL
fluconazol	>1024 µg/mL	>1024 µg/mL	>1024 µg/mL
ácido abiético + FCZ	>1024 µg/mL	>1024 µg/mL	>1024 µg/mL

Candida albicans: CA INCQS 40.006; *Candida krusei* CK INCQS 40.095; *Candida tropicalis* CT INCQS 40.042; INCQS.

Discussão

O presente estudo apresenta pela primeira vez o efeito antifúngico do ácido abiético *in vitro* frente a cepas de *Candida* spp. A partir dos resultados obtidos, sugere-se o potencial antifúngico desse composto, uma vez que apresentou efeitos significativos nas metodologias utilizadas.

Estes achados não corroboram com os estudos de González *et al.*, (2009) e González *et al.*, (2010) que avaliou as atividades biológicas de uma série de derivados do C18 oxigenados ácido abiético, incluindo ensaios antifúngicos. Segundo os autores esse comportamento está associado a isomeração das duplas ligações presente no ácido abiético que resultou em compostos menos ativos. Tendo em vista que, os achados de Tret'yakova *et al.*, (2018) e Savluchinske-Feio *et al.*, (2006) demonstram que os derivados do ácido abiético entre eles o 7-formiltransferase inibiu efetivamente o crescimento de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*. Outro fator relacionado a divergência dos resultados se deve as possíveis diferenças fenotípicas dos microrganismos que podem modificar os resultados obtidos nos estudos (HIRAKAWA *et al.*, 2015).

Não há relatos na literatura referentes a atividade antifúngica com o ácido abiético, apenas com seus derivados. Portanto, este estudo apresenta resultados promissores quanto a atividade biológica avaliada.

O fluconazol é um tiazol que atua na inibição do citocromo P450 dependente da enzima ionosterol presente no fungo, causando a diminuição da biossíntese de ergosterol desencadeando o rompimento da membrana fúngica Além de atuar no bloqueio do regulador transcricional causando lesão metabólica (HURT *et al.*, 2021; LEE; LEE, 2018). O rompimento da membrana fúngica é uma consequência da redução do ergosterol que leva uma maior permeabilização do antifúngico e alteração da H-ATPase (SUN.; LIAO, 2021). De acordo com Sekido *et al.* (1990), o ácido abiético causa uma alteração da constituição da membrana celular que desencadeia uma inibição inespecífica da ATPase.

Diante disso, sugere-se que o ácido abiético ao ser associado como o flucanazol potencializa a ação do antifúngico a partir do acúmulo de esteróis tóxico na membrana fúngica ativando assim, cascata de inibição de enzima dependente do ergosterol.

Alguns diterpenos na literatura mostraram atividade antifúngica sinérgica contra cepas do gênero *Candida*. O Eucalipto D, um formil-floroglucinolmeroterpenóide aumentou significativamente a atividade anti-*Candida* do fluconazol (XU *et al.*, 2019). Além disso, o pimaradiene mostrou resultados relevantes frente as cepas *C. albicans* e *C. tropicalis* (DEMIRCI *et al.*, 2009).

Estudos realizados por Mónico *et al.*, (2017), relatam que os diterpenos podem atuar como inibidores de transportadores ABC e MFS, desencadeando a reversão da resistência antifúngica. Segundo (URZÚA *et al.*, 2008), a atividade antimicrobiana dos diterpenos está relacionado ao aspecto estrutural, como a presença de região hidrofóbica e um fragmento hidrofílica que atuam como grupos doadores de ligações de hidrogênio.

Conclusão

Este estudo demonstrou efeito antifúngico do ácido abiético frente a cepas do gênero de *Candida* spp. do ácido abiético e a sua participação na potencialização da ação do fluconazol. Novos estudos poderão ser realizados tanto para elucidar mecanismos de ação sobre células planctônicas, quanto para avaliar o potencial do terpeno na inibição de fatores de virulência, como a transição morfológica, assim como na reversão da resistência em testes anti-biofilme.

Referências

- ALYOUSEF, A. A. Antifungal Activity and Mechanism of Action of Different Parts of *Myrtus communis* Growing in Saudi Arabia against *Candida* Spp. **Journal of Nanomaterials**, 2021. v. 2021.
- BEZERRA, C. F. *et al.* Antifungal activity of farnesol incorporated in liposomes and associated with fluconazole. **Chemistry and Physics of Lipids**, 2020. v. 233.
- CHEN, P. *et al.* Mechanisms of Azole Resistance and Trailing in *Candida tropicalis* Bloodstream Isolates. **J. Fungi** **2021**, 2021. v. 7, n. 612.
- COUTINHO, Henrique D.M. *et al.* Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, 2008. v. 54, n. 4, p. 328–330.
- DEMIRCI, B. *et al.* Anticandidal pimaradiene diterpene from *Phlomis* essential oils. **Comptes Rendus Chimie**, 2009. v. 12, n. 5, p. 612–621.
- ERNST, E. J. *et al.* In vitro pharmacodynamic characteristics of flucytosine determined by time-kill methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 1999. v. 36, n. 2, p. 101–105.
- FERNÁNDEZ, M. A. *et al.* Anti-inflammatory activity of abietic acid, a diterpene isolated from *Pimenta racemosa* var. *grisea*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2001. v. 53, n. 6, p. 867–872.
- GONZÁLEZ, M. A. *et al.* Synthesis and biological evaluation of abietic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2009. v. 44, n. 6, p. 2468–2472.
- _____ *et al.* Synthesis and biological evaluation of dehydroabietic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2010. v. 45, n. 2, p. 811–816.
- HIRAKAWA, M. P. *et al.* Genetic and phenotypic intra-species variation in *Candida albicans*. **Genome research**, 2015. v. 25, n. 3, p. 413–425.
- HURT, W. J. *et al.* Combination therapy for HIV-associated cryptococcal meningitis—A success story. **Journal of Fungi**, 2021. v. 7, n. 12.
- ITO, Y. *et al.* Antimicrobial and antibiofilm effects of abietic acid on cariogenic *Streptococcus mutans*. **Odontology**, 2020. v. 108, n. 1, p. 57–65.
- JAMIU, A. T. *et al.* Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. **Medical Mycology**, 2021. v. 59, n. 1, p. 14–30.
- LEE, W.; LEE, D. G. A novel mechanism of fluconazole: Fungicidal activity through dose-dependent apoptotic responses in *Candida albicans*. **Microbiology (United Kingdom)**, 2018. v. 164, n. 2, p. 194–204.
- LEE, Y. *et al.* Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and beyond. **Chemical Reviews**, 2021. v. 121, n. 6, p. 3390–3411.
- LIU, X. *et al.* Abietic acid suppresses non-small-cell lung cancer cell growth via blocking IKK β /NF- κ B signaling. **OncoTargets and Therapy**, 2019. v. 12, p. 4825–4837.

- MÓNICO, A. *et al.* Lathyrol and epoxyathyrol derivatives: Modulation of Cdr1p and Mdr1p drug-efflux transporters of *Candida albicans* in *Saccharomyces cerevisiae* model. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2017. v. 25, n. 13, p. 3278–3284.
- MORAIS-BRAGA, Maria Flaviana B. *et al.* *Psidium guajava* L., from ethnobiology to scientific evaluation: Elucidating bioactivity against pathogenic microorganisms. **Journal of Ethnopharmacology**, 2016. v. 194, n. December 2015, p. 1140–1152.
- NURAY ULUSU, N. *et al.* Abietic acid inhibits lipoxygenase activity. **Phytotherapy Research**, 2002. v. 16, n. 1, p. 88–90.
- O'BRIEN, C. E. *et al.* Population genomics of the pathogenic yeast *Candida tropicalis* identifies hybrid isolates in environmental samples. **PLoS Pathogens**, 2021. v. 17, n. 3, p. 1–27.
- OLMO, F. *et al.* Prospects of an alternative treatment against *Trypanosoma cruzi* based on abietic acid derivatives show promising results in Balb/c mouse model. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2015. v. 89, p. 863–890.
- PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, 2019. v. 25, n. 7, p. 792–798.
- SAVLUCHINSKE-FEIO, S. *et al.* Antimicrobial activity of resin acid derivatives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2006. v. 72, n. 3, p. 430–436.
- SILVA, T. G. DA *et al.* Phytochemical characterization and inhibition of *Candida* sp. by the essential oil of *Baccharis trimera* (Less.) DC. **Archives of Microbiology**, 2021. v. 203, n. 6, p. 3077–3087.
- SIMONEIT, B. R. T. *et al.* Terpenoid compositions of resins from *Callitris* species (Cupressaceae). **Molecules**, 2018. v. 23, n. 12, p. 1–13.
- SUN, F. J. *et al.* Recent progress on anti-*Candida* natural products. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 2021. v. 19, n. 8, p. 561–579.
- SUN, L.; LIAO, K. The effect of honokiol on ergosterol biosynthesis and vacuole function in *Candida albicans*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2021. v. 30, n. 12, p. 1835–1842.
- TRET'YAKOVA, E. V. *et al.* Convenient one-pot synthesis of resin acid Mannich bases as novel anticancer and antifungal agents. **Medicinal Chemistry Research**, 2018. v. 27, n. 9, p. 2199–2213.
- URZÚA, A. *et al.* A structure-activity study of antibacterial diterpenoids. **Molecules**, 2008. v. 13, n. 4, p. 882–891.
- XU, J. *et al.* Eucalyptal D enhances the antifungal effect of fluconazole on fluconazole-resistant *Candida albicans* by competitively inhibiting efflux pump. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2019. v. 9, n. JUN, p. 1–10.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

- ✓ O ácido abiético não atuou no SNC;
- ✓ Nos edemas de pata induzido pela injeção intra-plantar de carragenina, dextrana, ácido araquidônico, histamina e prostaglandina E2 o ácido abiético apresentou redução do potencial de edema;
- ✓ No modelo de lesão granulomatosa induzida pela implantação de *pellets* de algodão o ácido abiético atuou na inibição da inflamação crônica;
- ✓ O ácido abiético causou diminuição da permeabilidade vascular no modelo de permeabilidade vascular mensurada por azul de *Evans*, sugerindo sua participação na redução da permeabilidade;
- ✓ Na atividade antimicrobiana o ácido abiético atuou na potencialização dos antibióticos, ampicilina, gentamicina e ciprofloxacina;
- ✓ Nos ensaios de inibição de efluxo o ácido abiético inibiu o funcionamento das bombas MepA e NorA;
- ✓ Na atividade antifúngica o ácido abiético potencializou a ação do fluconazol frente as cepas *Candida albicans*, e *Candida tropicalis*;

ANEXOS A: Declaração da Comissão de Experimentação e Uso de Animais (CEUA) da Universidade Regional do Cariri (URCA).



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE EXPERIMENTAÇÃO E USO DE ANIMAIS

Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta
Fones: (088) 3102.1291 / Fax: (088) 3102.1291
CEP 63105-000 – Crato - CE - Brasil
propp@urca.br - www.urca.br/ceua



Declaração

Declaro para devidos fins, que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÁCIDO ABIÉTICO" - processo **00104/2021-1** foi APROVADO pela Comissão de Experimentação e Uso de animais-CEUA-URCA .

Roseli Barbosa

Coordenadora do CEUA-URCA

ANEXOS B: Carta de Aceite do manuscrito II

CC: isabelle.chevalot@univ-lorraine.fr

Manuscript Number: PRBI-D-22-00461R3

Antibacterial effect and evaluation of the inhibitory effect against efflux pump in *Staphylococcus aureus* by abietic acid: in vitro and in silico assays.

Dear Dr Coutinho,

Thank you for submitting your manuscript to Process Biochemistry.

We are pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication.

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department. We will create a proof which you will be asked to check, and you will also be asked to complete a number of online forms required for publication. If we need additional information from you during the production process, we will contact you directly.

We appreciate you submitting your manuscript to Process Biochemistry and hope you will consider us again for future submissions.

We encourage authors of original research papers to share the research objects – including raw data, methods, protocols, software, hardware and other outputs – associated with their paper. More information on how our open access Research Elements journals can help you do this is available at https://www.elsevier.com/authors/tools-and-resources/research-elements-journals?dgcid=ec_em_research_elements_email.

Kind regards,

Isabelle Chevalot , Guest Editor