



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA – DQB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA – PPQB**

**CRISTINA RODRIGUES DOS SANTOS BARBOSA**

**CARVACROL E TIMOL COMO POTENCIAIS INIBIDORES DA BOMBA DE  
EFLUXO NorA EM LINHAGENS RESISTENTES DE *Staphylococcus aureus***

**Crato – CE**

**2021**

**CARVACROL E TIMOL COMO POTENCIAIS INIBIDORES DA BOMBA DE  
EFLUXO NorA EM LINHAGENS RESISTENTES DE *Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha

Coorientador: Prof. Dr. Saulo Relison Tintino

**Crato – CE**

**2021**

Dissertação defendida e aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha

Orientador

(URCA)

---

Prof. Dr. Saulo Relison Tintino

Coorientador

(URCA)

---

Profa. Dra. Roseli Barbosa

Membro Interno

(URCA)

---

Profa. Dra. Jacqueline Cosmo Andrade Pinheiro

Membro Externo

(UFCA)

---

Prof. Dr. Raimundo Nonato Pereira Teixeira  
Suplente Interno  
(URCA)

---

Prof. Dr. Francisco Nascimento Pereira Júnior  
Suplente Externo  
(UFCA)

*Dedico este trabalho ao meu esposo, Joaquim Eduardo, aos meus pais Marilene e Inácio, e aos meus irmãos, que sempre fizeram o possível e o impossível por mim. Amo muito vocês!*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus que me mostrou o caminho para mudar minha vida, que me fortalece todos os dias e que nunca me abandona.

Aos meus pais, Marilene Macário e Inácio Rodrigues e ao meu marido, Joaquim Eduardo. Vocês são minha base, meu porto seguro, meu tudo. Sempre me incentivaram a estudar e me instruíram a seguir o melhor caminho para realização de meus sonhos.

Aos meus irmãos Maria do Carmo Rodrigues, Jair Rodrigues e José Alberto Rodrigues, que estiveram do meu lado durante toda essa trajetória me dando apoio.

A meu orientador Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha, uma pessoa muito boa, de muitas qualidades e dono de uma inteligência colossal. Obrigado por ter me permitido ser sua orientanda e por ter me dado a chance de pertencer a família LABSEMA.

Agradeço a meu Coorientador Prof. Dr. Saulo Relison Tintino, por sempre disponibilizar seu tempo para me ajudar.

Aos meus amigos da família LABSEMA, Jackelyne Roberta Scherf, Joycy Sampaio, Dárcio Luís, Sarah Patrício e Thais Pereira Lopes, e aos meus amigos da família LMBM, Raimundo Luiz, Thiago Freitas, Janaína Esmeraldo, Carol Justino, Priscila Freitas e Ray Almeida, pessoas muito especiais e muito sábias, que ajudaram com suas habilidades, competências e experiência de vida, para que esse trabalho fosse realizado.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro.

A todos, que de alguma forma, seja direta ou indiretamente, ajudaram na realização desse sonho.

*“Acredite, corra a trás, a única coisa entre você  
e seus sonhos é o seu medo de falhar.”*

*Roger Stankewski*

## RESUMO

A extrusão de antibióticos mediada por bombas de efluxo, reflete negativamente sobre a eficácia desses fármacos no tratamento de infecções causadas por bactérias, portanto, a inibição do mecanismo de efluxo, tornou-se uma estratégia promissora, tendo em vista, que as bombas de efluxo conseguem transportar para fora da membrana bacteriana a maioria dos antibióticos de utilidade clínica. Nesse sentido, o presente estudo buscou avaliar a atividade dos terpenos Carvacrol e Timol como possíveis inibidores de bombas de efluxo (IBEs) através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da associação desses compostos em concentrações subinibitórias com o antibiótico padrão Norfloxacino e com o substrato de efluxo, Brometo de Etídio (EtBr) contra as cepas SA-1199 (selvagem) e SA-1199B (superexpressa NorA) de *Staphylococcus aureus*. Com o intuito de verificar as interações dos terpenos com a proteína de efluxo NorA, um estudo *in silico* de modelagem molecular foi realizado. Os ensaios para obtenção da CIM do Carvacrol e Timol e os ensaios de verificação da inibição de bomba de efluxo, por modificação da CIM do antibiótico Norfloxacino e do EtBr, foram realizados por métodos de microdiluição em caldo. O *docking* foi realizado por meio do programa Molegro Virtual Docker (MVD). Os resultados do presente estudo demonstraram que Carvacrol e Timol apresentam moderada atividade antibacteriana, com CIM de 256 µg/mL para os terpenos. Com relação aos ensaios de associação com os substratos, foi verificada a redução da CIM do Norfloxacino de 64 µg/mL para 32 µg/mL, frente a cepa SA-1199 e de 128 µg/mL para 64 µg/mL, frente a cepa SA-1199B, para ambos os terpenos. Em relação a modificação da CIM do EtBr, foi verificada uma redução de 32 µg/mL para 25,39 µg/mL na associação com o Carvacrol e de 32 µg/mL para 16 µg/mL na associação com o Timol, frente a cepa SA-1199. Já para a cepa SA-1199B, a CIM do EtBr teve uma redução de 80,63 µg/mL para 64 µg/mL, para ambos os terpenos. Os resultados do *docking* revelaram o possível mecanismo molecular responsável pela interação do Carvacrol e do Timol com a proteína NorA, corroborando que possivelmente esses terpenos atuam como inibidores competitivos das bombas de efluxo. Esses resultados evidenciam o potencial promissor desses compostos como possíveis IBEs, concluindo por meio deste estudo que os compostos Carvacrol e Timol atuam como potenciais inibidores da bomba de efluxo NorA, podendo vir a ser investigados como adjuvantes em terapias de associação objetivam reduzir a resistência bacteriana.

**Palavras-chave:** Multirresistência. Inibidores de Bomba de Efluxo. NorA. Produtos Naturais.



## ABSTRACT

The extrusion of antibiotics mediated by efflux pumps, reflects negatively on the effectiveness of these drugs in the treatment of infections caused by bacteria, therefore, the inhibition of the efflux mechanism has become a promising strategy, considering that efflux pumps can transport most antibiotics for clinical use out of the bacterial membrane. In this sense, the present study sought to evaluate an activity of the Carvacrol and Thymol terpenes as possible inhibitors of efflux pumps (EPIs) by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the association of these compounds in the efflux substrate, Norfloxacin and Ethidium Bromide (EtBr) against SA-1199 (wild) and SA-1199B (overexpressed NorA) strains of *Staphylococcus aureus*. To verify the interactions of terpenes with the NorA efflux protein, an in silico molecular modeling study was carried out. The tests for obtaining the MIC of Carvacrol and Thymol and the tests for checking the efflux pump inhibition, by modifying the MIC of the antibiotic Norfloxacin and EtBr, were carried out by broth microdilution methods. Docking was performed using the Molegro Virtual Docker (MVD) program. The results of the present study demonstrated that Carvacrol and Thymol have moderate antibacterial activity, with MIC of 256 µg/mL for terpenes. Regarding the association tests with the substrates, the reduction of Norfloxacin MIC from 64 µg/mL to 32 µg/mL was verified, against the strain SA-1199 and from 128 µg/mL to 64 µg/mL, against the strain SA-1199B, for both terpenes. Regarding the modification of the EtBr MIC, a reduction from 32 µg/mL to 25.39 µg/mL was found in association with Carvacrol and from 32 µg/mL to 16 µg/mL in association with Thymol, against the strain SA-1199. For the SA-1199B strain, the EtBr MIC decreased from 80.63 µg/mL to 64 µg/mL, for both terpenes. The docking results revealed the possible molecular mechanism responsible for the interaction of Carvacrol and Thymol with the NorA protein, corroborating that possibly these terpenes act as competitive inhibitors of the efflux pumps. These results show the promising potential of compounds as possible EPIs, concluding through this study that the compounds Carvacrol and Thymol act as potential inhibitors of the NorA efflux pump, and may be investigated as adjuvants in combination therapies aimed at reducing bacterial resistance.

**Keywords:** Multidrug resistance. Efflux Pump Inhibitors. NorA. Natural Products.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I: REFERENCIAL TEÓRICO

<b>Figura 1</b> - Mecanismo de resistência bacterianos.....	21
<b>Figura 2</b> - Principais famílias de bombas de efluxo.....	23
<b>Figura 3</b> - Estruturas químicas dos terpenos Carvacrol e Timol.....	26
<b>Figura 4</b> - Representação 3D da estrutura da bomba de efluxo NorA.....	27

### CAPÍTULO II: MANUSCRITO

<b>Figura 1</b> - Representação do Mapa de interações com a bolsa de ligação de NorA.....	43
---	----

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1</b> - Avaliação da capacidade de modificação da CIM pela associação de Norfloxacino e EtBr com CAR e THY e com os inibidores padrão CPMZ e CCCP contra cepas de <i>S. aureus</i> portadoras de <i>NorA</i> .....	32
<b>Tabela 2</b> - Energia dos compostos ancorados obtidos a partir de estudos de ancoragem molecular.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC:	<i>ATP-binding cassette</i>
ATP:	Adenosina trifosfato
BHI:	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
CIM:	Concentração Inibitória Mínima
CCCP:	Cianeto de Carbonila m-Clorofenil-Hidrazona
CPMZ:	Clorpromazina
DMSO:	Dimetilsulfóxido
EtBr:	Brometo de etídio
IBEs:	Inibidores de bombas de efluxo
LABSEMA:	Laboratório de Bioprospecção do Semiárido e Métodos Alternativos
LMBM:	Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular
MATE:	<i>Multidrug and Toxic Compound Extrusion</i>
MDR:	<i>Multi-Drug Resistance</i>
MFS:	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
RND:	<i>Resistance-Nodulation-cell Division</i>
PACE:	<i>superfamily and the proteobacterial antimicrobial compound efflux</i>
SMR:	<i>Small Multidrug Resistance</i>
CAR:	Carvacrol
THY:	Timol
(BHI)-Agar:	<i>Brain Heart Infusion (BHI)-Agar</i>
CLSI:	<i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i>
MVD:	Molegro Virtual Docker
RMSD:	Limiar de Desvio de Media Quadrática
Hbond:	Interações de Hidrogênio
Gly:	Glicina
Ala:	Alanina
Val:	Valina
Leu:	Leucina
Ile:	Isoleucina

Phe: Fenilalanina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Objetivos e questionamentos .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 Estratégias de pesquisa .....</b>	<b>17</b>
<b>1.3 Estrutura da dissertação .....</b>	<b>18</b>
<b>2. CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Resistencia bacteriana .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Resistência mediada pelos sistemas de efluxo e identificação de moléculas inibidoras de efluxo ativo .....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Terpenos como moléculas inibidoras de efluxo ativo .....</b>	<b>24</b>
<b>2.4 Os monoterpenos Carvacrol e Timol .....</b>	<b>25</b>
<b>2.5 <i>Staphylococcus aureus</i> e a resistência mediada por NorA .....</b>	<b>26</b>
<b>3. CAPÍTULO II: MANUSCRITO.....</b>	<b>39</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>40</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>41</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>44</b>
<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>46</b>
<b>Conclusão .....</b>	<b>48</b>
<b>Referências .....</b>	<b>49</b>
<b>4. CAPÍTULO III: CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 Conclusões gerais.....</b>	<b>54</b>
<b>4.2 Perspectivas de investigações futuras .....</b>	<b>54</b>
<b>5. ANEXOS .....</b>	<b>55</b>
<b>5.1 Produção científica ligada ao mestrado.....</b>	<b>55</b>
<b>5.2 Produção científica externa ao mestrado .....</b>	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Objetivos e questionamentos

Estima-se que as infecções causadas por bactérias resistentes aos antibióticos provoquem aproximadamente 700.000 mortes por ano, segundo o relatório de O' Neill (2016), caso medidas urgentes não sejam empregues, estima-se que essa taxa de mortalidade aumente gradualmente, chegando ao nível de 10 milhões de pessoas mortas ao ano em 2050. A resistência aos antimicrobianos é um processo natural dos micro-organismos (HOLMES *et al.*, 2016) entretanto, diversos fatores ambientais externos tem contribuído para aceleração desse processo, dando origem a micro-organismos altamente virulentos, como bactérias resistentes a múltiplas drogas- MDR (*Multidrug-Resistant*) ou “superbactérias”(FERBER, 2010; GRAY; WENZEL, 2020; SINGER *et al.*, 2016).

O advento da multirresistência, abriu espaço para que infecções causadas por bactérias como *Staphylococcus aureus*, tornem-se ainda mais difíceis de serem tratadas, visto que essa bactéria, ao logo de cinco décadas de exposição indiscriminada a antibacterianos desenvolveu e adquiriu sofisticados mecanismos de resistência à maioria dos antibióticos de utilidade clínica (AKANBI *et al.*, 2017; GUO *et al.*, 2020).

Um dos eficazes mecanismos de resistência empregados por *S. aureus* é a extrusão ativa de antimicrobianos por transportadores de membrana, conhecidos como bombas de efluxo (JANG, 2016; RAO *et al.*, 2018). As bombas de efluxo são capazes de expulsar diversos tipos de substratos quimicamente diferentes, como antibióticos, biocidas, detergentes e corantes (COSTA *et al.*, 2013; HASSANZADEH *et al.*, 2020), contribuindo para um alto nível de resistência.

Objetivando minimizar a resistência antibiótica promovida pelas bombas de efluxo, novos tratamentos estão sendo desenvolvidas, sendo uma das mais promissoras o uso de inibidores de bombas de efluxo (IBEs), pois representam uma maneira possível de reverter a resistência aos antibióticos (SPENGLER *et al.*, 2017). A coadministração de tais IBEs, juntamente com um antibiótico, pode reduzir a quantidade necessária para que se obtenha o efeito da droga, e conseqüentemente reduzir os efeitos colaterais. Esses inibidores destacam-se ainda mais, pela possibilidade de restaurarem a utilidade de antibióticos considerados

cl clinicamente ineficazes, visto que o desenvolvimento de novos antibióticos tem se tornado cada vez mais complexo (PRASCH; BUCAR, 2015; SEUKEP *et al.*, 2020).

Derivados de plantas medicinais, como óleos essenciais e seus constituintes isolados mostraram-se bastante promissores na inibição de bombas de efluxo (MIKULÁŠOVÁ; CHOVANOVÁ; VAVERKOVÁ, 2016), e vem ganhando espaço como compostos líderes no desenvolvimento de fármacos inibidores de bomba, por geralmente apresentarem baixa toxicidade e diversas bioatividades (PRASCH; BUCAR, 2015; RAO *et al.*, 2018).

Alguns Compostos terpênicos de óleos essenciais como, Farnesol, Geraniol Carvacrol e Timol, já demonstram efeito inibidor, evidenciando que seriam excelentes fontes de IBEs, apresentando baixo risco de toxicidade para células eucarióticas normais, o que favoreceria sua exploração no desenvolvimento de drogas e, portanto, seu uso clínico (SEUKEP *et al.*, 2020).

Diante dos aspectos apresentados, é notório que a humanidade está caminhando para um período crítico da resistência antibiótica. Tendo percepção sobre a necessidade do desenvolvimento de estratégias que minimizem os impactos causados pela resistência aos antibióticos, o presente grupo de pesquisa tem desenvolvido trabalhos em colaboração com outros grupos da Universidade Regional do Cariri - URCA, que levaram a identificação de pequenas moléculas com potencial antibacteriano, tais como os terpenos Carvacrol e Timol (SILVEIRA *et al.*, 2020), 4-Alil-2,6-dimetoxifenol, Alilbenzeno (MUNIZ *et al.*, 2021) Estragol (BEZERRA *et al.*, 2020) e Terpinoleno (SCHERF *et al.*, 2020), Naftiridinas sintéticas (OLIVEIRA-TINTINO *et al.*, 2020) e ácidos Gálico e Cafeico (DOS SANTOS *et al.*, 2018).

Essas moléculas atuam por meio da inibição do mecanismo bombas de efluxo, revertendo a resistências de bactérias, como *S. aureus*, que nos últimos anos tem sido listada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como alta prioridade para o desenvolvimento de novas terapias que possam retardar o processo de resistência aos antibióticos por *S. aureus* (TACCONELLI; MAGRINI, 2017). Atualmente, o presente grupo segue desenvolvendo diversos trabalhos dentro do campo de inibição de bombas de efluxo, objetivando o desenvolvimento de estratégias efetivas contra a resistência aos antibióticos, por meio da descoberta de compostos antibacterianos derivados de produtos naturais.



Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade direta dos terpenos, Carvacrol e Timol e a capacidade desses compostos de modificarem a CIM do antibiótico de uso padrão Norfloxacino e do Brometo de Etídio (EtBr) contra as cepas, SA-1199 (selvagem) e SA-1199B (superexpressa NorA) de *Staphylococcus aureus*, portadoras dos genes de resistência *norA*, as quais expressam a proteína de efluxo NorA. Assim como, avaliar o efeito *in silico* das interações dos terpenos Carvacrol e Timol, com a proteína de efluxo NorA, por meio de docagem molecular.

## 1.2 Estratégias de pesquisa

O aprofundamento sobre o papel das bombas de efluxo na mediação do processo de resistência aos antibióticos, tornou sua inibição uma via promissora para minimizar o fenômeno de resistência em bactérias (SEUKEP *et al.*, 2020). Uma excelente alternativa voltada a inibição de bombas de efluxo é a utilização de pequenas moléculas derivadas de produtos naturais em combinação com antimicrobianos de uso convencional (TEGOS *et al.*, 2011).

Métodos comumente aplicáveis para avaliação de potenciais IBEs derivados de produtos naturais, incluem teste de atividade direta, para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), teste de verificação da modificação da CIM por ensaios de associação com substratos (SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013) como, antibióticos (Norfloxacino) e corantes tóxicos (Brometo de Etídio) e a avaliação das interações moleculares por docagem molecular *in silico* (SHRIRAM *et al.*, 2018).

Nesses ensaios é frequente a utilização de estirpes selvagens e superexpressoras de efluxo, um exemplo de cepas bem caracterizadas utilizadas em testes de inibição de efluxo, são as cepas SA-1199B (Superexpressora de NorA) e SA-1199 (Selvagem) de *S. aureus*, que expressam a bomba de efluxo NorA (KAATZ; SEO, 1995; KAATZ; SEO; RUBLE, 1993).

No presente estudo, a determinação da CIM foi verificada de acordo com a metodologia de microdiluição em caldo, em placa de 96 poços proposta pela CLSI (2015), com adaptações. Este método é bastante utilizado por ser rápido, eficaz e economicamente viável, fornecendo dados quantitativos confiáveis (NUH *et al.*, 2020). Optou-se também, por utilizar o método proposto pela CLSI (2015), com adaptações, para avaliar a capacidade dos candidatos a IBEs de potencializarem as CIMs dos antimicrobianos utilizados. Geralmente

nesses ensaios os resultados são expressos pela observação da potencialização da atividade dos antimicrobianos ou como redução da concentração inibitória mínima (CIM) em concentrações específicas (LAMUT *et al.*, 2019).

Outro método utilizado, foram simulações *in silico* de docagem molecular, com o objetivo de identificar as interações moleculares entre os potenciais candidatos a IBEs e a bomba de efluxo. O acoplamento molecular permite a compreensão de como os IBEs bloqueiam o transporte de antibacterianos pelas bombas de efluxo (SCHWEIZER, 2012). A compreensão dessas interações permite a modificação de IBEs proporcionando melhor interação com a bombas de efluxo alvo causando uma inibição mais eficiente (RAO *et al.*, 2018).

### 1.3 Estrutura da dissertação

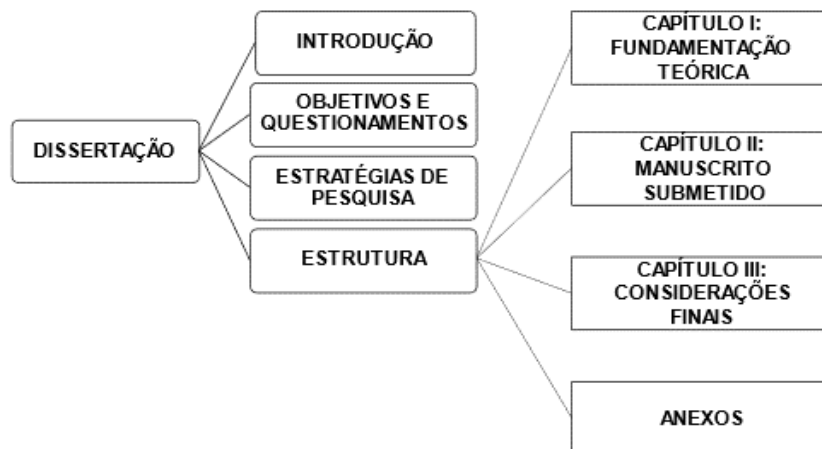
Esta dissertação está organizada em três capítulos (Fundamentação teórica, Manuscrito submetido e Considerações finais), seguido pelos Anexos.

- ✚ **Capítulo I:** Fundamentação teórica, o qual foi dividido em seis subtópicos:
  - **Resistência bacteriana e o desenvolvimento de moléculas adjuvantes de antibióticos:** Relato sobre os principais fatores relacionados a resistência bacteriana, bem como, os mecanismos de resistência utilizados pelas bactérias para diminuir a eficácia dos antibióticos, contando com atualizações referentes ao tema e ao desenvolvimento de novas pesquisas que objetivam minimizar os impactos promovidos pela resistência aos antibióticos.
  - **Resistência mediada pelos sistemas de efluxo e identificação de Inibidores de Bomba de efluxo (IBEs):** Breve introdução sobre as principais famílias de proteínas de efluxo e sobre o papel do mecanismo de efluxo na resistência bacteriana aos antibióticos. Este tópico também faz uma abordagem sobre o uso de IBEs como uma alternativa promissora para a inibição do mecanismo de efluxo e para a restauração da eficácia de antibióticos que perderam a utilidade clínica.
  - **Terpenos como moléculas inibidoras de efluxo:** Abordagem sobre o potencial dos

terpenos presente em óleos essenciais como reversores dos mecanismos de resistência bacterianos, atuando como uma promissora fonte natural de novos IBEs.

- **Os monoterpenos Carvacrol e Timol:** Características químicas e farmacológicas dos compostos utilizados neste trabalho.
- ***Staphylococcus aureus* e a resistência mediada pela proteína de efluxo NorA:** Explicação sobre importantes características de *S. aureus*, assim como as principais características da bomba de efluxo NorA, presente nos estipes de *S. aureus* SA-1199 e SA-1199B, utilizados no presente estudo.
- ✚ **Capítulo II:** Manuscrito Submetido: Neste capítulo encontra-se o manuscrito intitulado: **Carvacrol and Thymol Potential Inhibitors of NorA Efflux Pump in *Staphylococcus aureus*** que foi desenvolvido ao longo do curso de mestrado, e submetido em 11/11/2020, no International Journal of Molecular Sciences, com QUALIS A2 em Ciências Biológicas II e Fator de Impacto 4,556.
- ✚ **Capítulo III:** Considerações Finais, que está dividido em dois subtópicos:
  - Conclusões Gerais: As principais descobertas deste trabalho.
  - Perspectivas de Investigações Futuras.
- ✚ **Anexos:** Anexos das publicações realizadas durante o curso de mestrado.

### Fluxograma:



## 2. CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Resistencia bacteriana

O desenvolvimento de antibióticos para uso clínico durante o século XX, revolucionou a forma de tratar infecções causadas por bactérias e possibilitou a realização de vários procedimentos médicos como, cirurgias, tratamento de câncer, transplantes de órgãos e vários outros, elevando a expectativa e a qualidade de vida dos seres humanos, iniciando a “era de ouro dos antibióticos” (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019; VENTOLA, 2015).

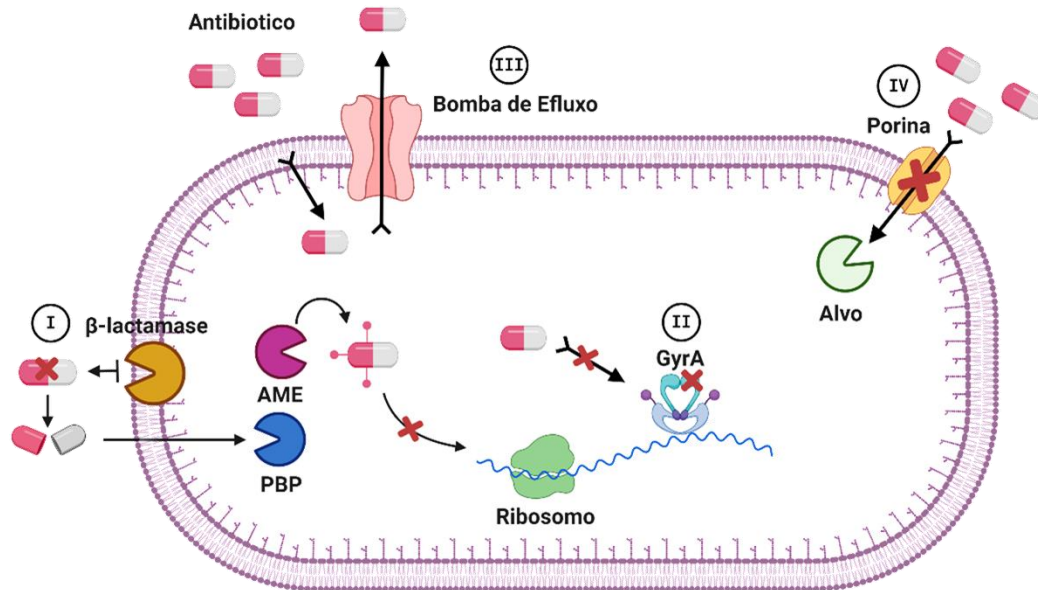
Entretanto, ao longo dos anos uso indiscriminado de antibióticos em vários âmbitos da medicina, indústria alimentícia e pecuária, bem como, a manipulação genética de microorganismos tem acelerado o processo natural de resistência (BLAIR *et al.*, 2015), colaborando com o surgimento de “superbactérias” que apresentam resistência a maioria ou a todos os antibióticos disponíveis no mercado farmacêutico, tornando doenças que antes eram facilmente tratáveis, mortais novamente, iniciando a “era da resistência” (BROWN; WRIGHT, 2016; VENTOLA, 2015).

A resistência aos antibióticos pode se desenvolver em nível celular e comunitário (PENESYAN; GILLINGS; PAULSEN, 2015). No primeiro caso, é causada por mutação cromossômica ou por transferência horizontal mediada por mecanismos de transformação, transdução ou conjugação. No último caso, reflete um mecanismo de resistência adaptativa aos desafios ambientais, que envolve a mudança de uma forma de vida livre (planctônica) para uma comunidade sésil multiestratificada (biofilme) (SCHILLACI *et al.*, 2017)

Os quatro principais mecanismos de resistência a antibióticos apresentados pelas bactérias são: (I) a inativação de antibióticos, como a produção de enzimas  $\beta$ -lactamase que hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico desativando assim esta classe de antibióticos, ou modificação do antibiótico por enzimas, como enzimas modificadoras de aminoglicosídeos – AME (*aminoglycoside-modifying enzymes*); (II) modificação do alvo, como modificações na proteína GyrA conferem resistência a fluoroquinolonas; (III) efluxo ativo, onde as bombas de efluxo de drogas removem o antibiótico da célula bacteriana, reduzindo assim a concentração de antibiótico para níveis subtóxicos e (IV) prevenção da entrada do fármaco através da membrana pela expressão de porinas mais seletivas, mutações nas porinas ou perda

de porinas (GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016; VENTER, 2019; YELIN; KISHONY, 2018), como pode ser conferido na figura 1.

**Figura 1:** Mecanismo de resistência bacterianos



Fonte: (Elaborada pelo autor).

**Legenda:** (I) Inativação do antibiótico pela enzima  $\beta$  - lactamase e modificação do antibiótico pela enzima modificadora de aminoglicosídeos (AME), Proteína ligadora de penicilina (PBP); (II) modificação do alvo (proteína GyrA); (III) Extrusão de antibióticos por bombas de efluxo; (IV) prevenção da entrada de antibióticos através da membrana pela modificação de porinas.

Diante dos aspectos apresentados, a necessidade do desenvolvimento de novos antibióticos é notória, entretanto há pouco interesse por parte da indústria farmacêutica para a produção deste tipo de fármaco, devido ao alto custo e o baixo retorno monetário (FERNANDES; MARTENS, 2017; PAYNE *et al.*, 2015). Contudo, pesquisas inovadoras que objetivam reverter os impactos da resistência antibiótica, estão analisando a utilização de pequenas moléculas que aplicadas em combinação com antibióticos conseguem potencializar e revigora seus efeitos frente as bactérias para qual a resistência se desenvolveu revelando uma nova saída terapêutica (VENTER, 2019). Segundo dados recentes do *The Pew Charitable Trusts* (2019), quatro dos 13 tratamentos com antibióticos em testes de Fase III, são combinações de antibióticos com pequenas moléculas projetadas para superar a resistência bacteriana.

Os compostos que reverterem a resistência, normalmente são desprovidos ou apresentam pouca atividade antibacteriana, porém quando coadministrados com um antibiótico eles ampliam o espectro de ação deste restaurando a sensibilidade da bactéria. A maioria dos reversores de resistência atuam inibindo um dos três mecanismos de resistência a seguir: (I) inibição das enzimas  $\beta$ -lactamase que inativam os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, (II) atuação na membrana plasmática bacteriana para romper a barreira de permeabilidade, (III) inibição das bombas de efluxo de antibióticos, permitindo o acúmulo do antibiótico dentro da célula bacteriana (BLAIR *et al.*, 2015; VENTER, 2019).

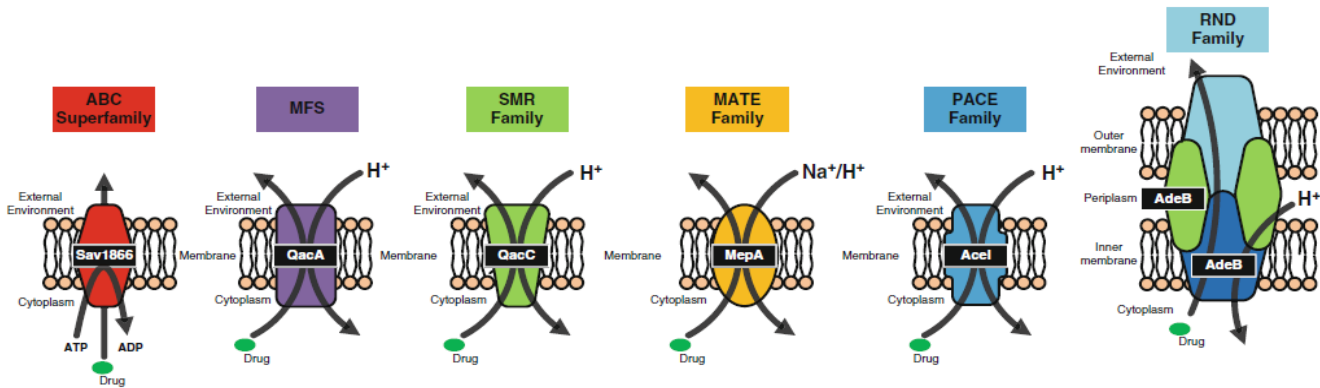
## **2.2 Resistência mediada pelos sistemas de efluxo e identificação de moléculas inibidoras de efluxo ativo**

Bombas de efluxo bacterianas são comumente conhecidas como proteínas de membrana capazes de expulsar drogas estruturalmente diversas para o exterior da célula, reduzindo assim, as concentrações de antibióticos para níveis subtóxicos (CHITSAZ; BROWN, 2017). Entretanto, a atuação do mecanismo de efluxo vai muito além dessa função, desempenhando importantes papéis na fisiologia, metabolismo e patogenicidade da célula bacteriana, sendo capazes de eliminar metabólitos endógenos tóxicos, para a secreção de determinantes de virulência, participando da resposta ao estresse celular e da formação de biofilmes. Além disso, a excreção de compostos tóxicos pelas bombas de efluxo pode servir como uma ferramenta de proteção que permite que bactérias sobrevivam ao processo de colonização durante o processo de infecção em um hospedeiro (BLANCO *et al.*, 2016; DU *et al.*, 2018).

Os sistemas de bombas de efluxo de bactérias, figura 2, são classificados em seis principais famílias, de acordo com a energia utilizada para expulsar os compostos tóxicos, são elas: a superfamília facilitadora principal – MFS (*major facilitator superfamily*), a família de cassetes de ligação de ATP – ABC (*ATP-binding cassette*), a superfamília de divisão celular de nodulação de resistência – RND (*resistance-nodulation-cell division*), a família de extrusão de multidrogas e toxinas – MATE (*multidrug and toxin extrusion*), a família de resistência a pequenas múltiplas drogas – SMR (*family, the small multidrug resistance*), e a superfamília de efluxo de compostos antimicrobianos de proteobactérias – PACE

(*superfamily and the proteobacterial antimicrobial compound efflux*) (HASSAN *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2020; SAPULA; BROWN, 2016). Todos esses sistemas utilizam-se do gradiente de prótons ( $H^+/Na^+$ ) como energia para transportar os substratos, exceto a família de cassetes de ligação de ATP – ABC, que utiliza a hidrólise de ATP (DU *et al.*, 2018).

**Figura 2:** Principais famílias de bombas de efluxo



Fonte: (Sapula & Bown, 2016).

A resistência mediada pelo sistema de bombas de efluxo, tem sido o foco principal de diversas pesquisas que visam conter a resistência aos antibióticos, visto que quando superexpressas, as proteínas de efluxo podem conferir altos níveis de resistência, tornando ineficazes antibióticos clinicamente úteis, fazendo com que infecções causadas por bactérias sejam mais difíceis de tratar (BLANCO *et al.*, 2016). Conseqüentemente, as bombas de efluxo tornaram-se alvos promissores para a inibição e pesquisas significativas foram feitas nos últimos anos, levando a descoberta de moléculas capazes de inibir o mecanismo de efluxo de bactérias (SCHILLACI *et al.*, 2017). Essas moléculas são conhecidos como inibidores da bomba de efluxo (IBEs) e podem potencializar o efeito dos antibióticos quando coadministradas, promovendo novamente a sensibilidade das bactérias aos mesmos, permitindo o retorno de certos antibióticos à prática clínica e a ampliação de seu espectro de ação (SEUKEP *et al.*, 2020).

Os IBEs seguem alguns mecanismos gerais de inibição do efluxo, como o bloqueio da proteína de efluxo, para evitar a ligação do substrato ao sítio ativo, e o colapso do mecanismo de energia utilizado para transportar o substrato, como o gradiente de prótons ou

ATPases (SCHINDLER; KAATZ, 2016). Além disso, os IBEs são capazes de causar danos estruturais na membrana das bactérias, interagindo com importantes reguladores da expressão gênica de proteínas de efluxo, promovendo sua inibição (TINTINO *et al.*, 2020).

Os IBEs, geralmente derivados de produtos naturais, tendo como principais fontes as plantas medicinais devido à presença de metabólitos secundários quimicamente e estruturalmente diversos, com múltiplas propriedades farmacológicas, como Terpenos, Alcalóides, Flavonoides, Compostos Fenólicos e muitos outros (SEUKEP *et al.*, 2020; SHARMA; GUPTA; PATHANIA, 2019; ZACCHINO *et al.*, 2017).

Estudos com extratos e óleos essenciais de plantas medicinais, mostraram a eficácia de moléculas que atuam como IBEs, inibindo o mecanismo de efluxo de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (RAO *et al.*, 2018; SEUKEP *et al.*, 2020; SHRIRAM *et al.*, 2018). Entretanto, embora os IBEs estejam em experimentação em laboratório desde a década de 1990, nenhum foi liberado para uso clínico, principalmente por causa da baixa eficácia *in vivo*, propriedades farmacocinéticas fracas ou problemas de toxicidade, tornando essa uma perspectiva futurística. (LAMUT *et al.*, 2019; SHARMA; GUPTA; PATHANIA, 2019).

Com tudo, apesar dos caminhos que levam um IBE ao uso clínico apresentarem muitos obstáculos de natureza diversa, desde científicos e acadêmicos até administrativos e econômicos, isso em nada deve prejudicar a importância e a vantagem que eles oferecem contra a resistência bacteriana, o que leva a comunidade científica a realizar investigações contínuas para identificar e desenvolver IBEs menos tóxicos e terapeuticamente eficazes, visando a utilidade clínica dessas moléculas no futuro (SHARMA; GUPTA; PATHANIA, 2019).

### **2.3 Terpenos como moléculas inibidoras de efluxo ativo**

Os terpenos compõem a maior classe de compostos encontrados nos óleos essenciais, esses compostos são constituídos de moléculas de isopreno onde cada uma contém cinco átomos de carbono com ligações entre si (BUCKLE, 2015). Dependendo do número de unidades de carbono, os terpenos são classificados como monoterpênicos, sesquiterpênicos, diterpênicos, sesterpênicos e triterpênicos (C<sub>10</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>20</sub>, C<sub>25</sub> e C<sub>30</sub>, respectivamente)



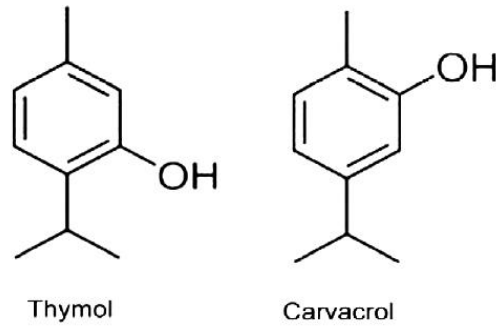
(PERVEEN, 2018). Devido seu aroma agradável e diversas bioatividades os terpenos possuem uma ampla utilização na indústria, estando presentes em alimentos, medicamentos, cosméticos, hormônios e vitaminas (GUIMARÃES *et al.*, 2019; MEWALAL *et al.*, 2017; PERVEEN, 2018).

Nos últimos anos, os terpenos também tem sido investigados como potenciais reversores de mecanismos de resistência bacterianos (CAPPIELLO *et al.*, 2020; MAHIZAN *et al.*, 2019; SIENIAWSKA *et al.*, 2017), e a capacidade dessas moléculas como inibidores de efluxo vem sendo avaliada (DA CRUZ *et al.*, 2020; DE MORAIS OLIVEIRA-TINTINO *et al.*, 2018; MUNIZ *et al.*, 2021; RAMALHETE *et al.*, 2011; SILVEIRA *et al.*, 2020). Como mencionado anteriormente, muitos terpenos já estão inseridos na indústria de medicamentos e alimentícia, levando a crer que essas moléculas poderiam apresentar menos riscos de serem tóxicas para seres humanos (KOPEČNÁ *et al.*, 2019; PADUCH *et al.*, 2007) e portando, bons candidatos a futuros IBEs.

#### **2.4 Os monoterpenos Carvacrol e Timol**

Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) e o Timol (2-isopropyl-5-methylphenol) Figura 2, são isômeros monoterpênicos naturais bastante conhecidos e presentes em diversos óleos essenciais de plantas medicinais (MEMAR *et al.*, 2017). Esses terpenos possuem grande relevância clínica por apresentarem diversas bioatividades como atividade antibacteriana (GUIMARÃES *et al.*, 2019; KACHUR; SUNTRES, 2019), antifúngica (CHAVAN; TUPE, 2014; MARCHESE *et al.*, 2016), antioxidante (GÜVENÇ *et al.*, 2019), anti-inflamatória (GAMES *et al.*, 2016), inseticida (PARK *et al.*, 2017) e anticarcinogênica (SHARIFI-RAD *et al.*, 2018). Além disso, existe uma perspectiva positiva sobre a utilidade do Carvacrol e do Timol como modelos naturais para semissíntese farmacêutica de agentes terapêuticos (BOYE *et al.*, 2020; SHARIFI-RAD *et al.*, 2018).

**Figura 3:** Estruturas químicas dos terpenos Carvacrol e Timol.



Fonte:(MEMAR *et al.*, 2017).

Outro fator positivo desses isômeros é a sua ampla atividade antibacteriana, atuando sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GUIMARÃES *et al.*, 2019; MARCHESE *et al.*, 2016), agindo nos mais diversos mecanismos de resistência, operando na inibição do crescimento de cepas bacterianas, na redução de biofilmes, no rompimento da membrana celular, na inibição de ATPases ligadas à membrana e principalmente sobre a inibição de bombas de efluxo (KACHUR; SUNTRES, 2019; SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015).

### **2.5 *Staphylococcus aureus* e a resistência mediada por NorA**

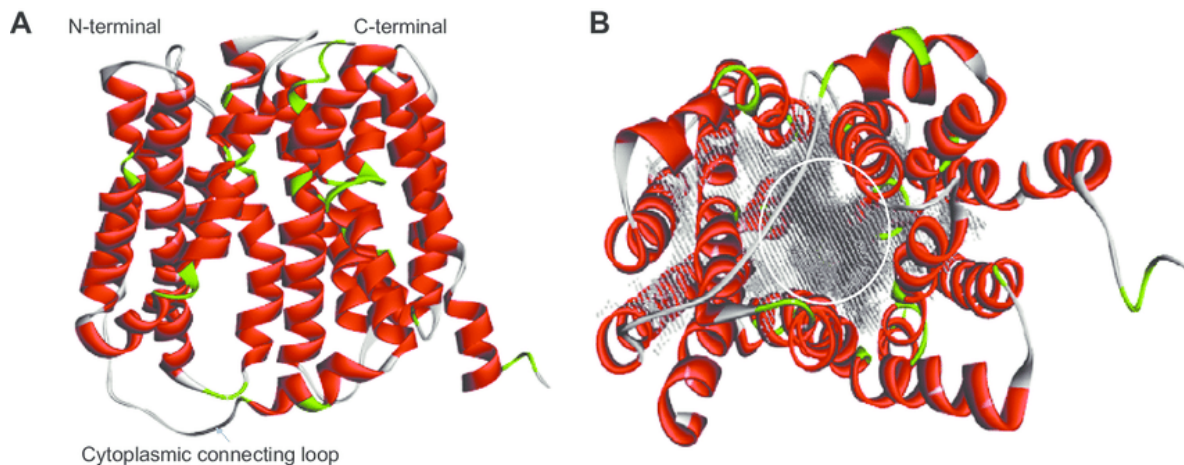
A bactéria *Staphylococcus aureus* é comumente encontrada na pele e nas membranas mucosas de animais de sangue quente, podendo existir comensalmente com humanos, como colonizador ou como patógeno (NEMEGHAIRE *et al.*, 2014). Ao atuar como patógeno, *S. aureus* causa um processo infeccioso que pode ocorrer por duas vias, a produção de toxinas e a colonização, causando a invasão e a destruição dos tecidos do hospedeiro (YILMAZ; ASLANTAŞ, 2017).

O processo infeccioso provocado por *S. aureus*, pode dar origem a patologias graves, como bacteremias, endocardite, e infecções graves relacionadas a dispositivos protéticos (TONG *et al.*, 2015). Outro agravante, é que a maioria das cepas disseminadas de *S. aureus* apresentarem resistência a maior parte dos antibióticos de uso clínico, como fluoroquinolonas, penicilina, vancomicina, tetraciclina,  $\beta$ -lactâmicos e vários outros, dificultando o tratamento clínico, e aumentando expressivamente as taxas de morbidade e mortalidade e os custos relacionados à saúde (PAL *et al.*, 2020).

Em decorrência dos problemas citados, *S. aureus* está listada pela OMS como um micro-organismo altamente virulento e com prioridade crítica para o desenvolvimento de novos fármacos que contenham seus mecanismos de resistência (TACCONELLI *et al.*, 2018; WILLYARD, 2017), destes, as bombas de efluxo estão em notoriedade, pois provavelmente as mesmas atuam como importantes fatores de resistência aos antibióticos, impactando na virulência e até na formação de biofilmes (JANG, 2016; LAMUT *et al.*, 2019; HASSANZADEH *et al.*, 2020).

Das bombas de efluxos expressas por *S. aureus*, 31 foram identificadas (SCHINDLER *et al.*, 2015), destas, a proteína de efluxo NorA destaca-se por ser um alvo universal para uma infinidade de inibidores da bomba de efluxo (KUMAR *et al.*, 2020). A proteína de efluxo NorA, foi descrita pela primeira vez em 1986 em isolados resistentes à fluoroquinolonas (UBUKATA; ITOH-YAMASHITA; KONNO, 1989). A bomba NorA, pertence à família MFS e está localizada na membrana citoplasmática das bactérias, sendo expressa cromossomicamente pelo gene *norA* (DENG *et al.*, 2012; YOSHIDA *et al.*, 1990). NorA é constituída por cerca de 388 aminoácidos, que compreendem 12 segmentos transmembrana  $\alpha$ -hélices., com domínios N- e C-terminais dispostos numa pseudo-dupla simetria (BHASKAR *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2019).

**Figura 4:** Representação 3D da estrutura da bomba de efluxo NorA



Fonte:(BHASKAR *et al.*, 2016)

Legenda: (A) Modelo de homologia da bomba de efluxo NorA com domínios N- e C-terminais

conectados por uma alça de conexão citoplasmática. (B) 12 transmembrana  $\alpha$ -hélices.

A bomba NorA, utiliza a força próton-motriz ( $H^+$ /droga) para transportar diversos tipos de substratos estrutural e quimicamente diferentes, tais como, Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina e Norfloxacino), Puromicina, Pentamidina, compostos de amônio quaternário e antissépticos (Berberina, Tetrafenilfosfônio, Cloreto de Benzalcônio, Tioxantiazinas e Ceftriaxona), Fenotioxamida e Omeprazol e terpenóides (Totarol, Ferruginol, Salvia e Ácido Carnósico), Reserpina e corantes (como Brometo de Etídio (EtBr), Rodamina, Acridinas e biocidas) (DEMARCO *et al.*, 2007; KAATZ *et al.*, 2003; NARGOTRA *et al.*, 2009; PAPKOU *et al.*, 2020).

A bomba de efluxo NorA, foi a primeira proteína de efluxo resistente a fluoroquinolonas descoberta em *S. aureus* (TRUONG-BOLDUC; HOOPER, 2007; YOSHIDA *et al.*, 1990) e devido a variedade de compostos antimicrobianos transportados por essa proteína, a mesma é caracterizada como um modelo experimental eficaz, sendo utilizadas em estudos de homologia que visam desenvolver IBEs para *S. aureus* (BHASKAR *et al.*, 2016; THAI *et al.*, 2015), visto que NorA, encontra-se comumente expressa por cepas resistentes de *S. aureus* geograficamente diversas (KOSMIDIS *et al.*, 2012).

## REFERÊNCIAS

AKANBI, O. E.; NJOM, H. A.; FRI, J.; OTIGBU, A. C.; CLARKE, A. M. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Recreational Waters and Beach Sand in Eastern Cape Province of South Africa. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 9, p. 1001, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph14091001>

BHASKAR, B. V.; BABU, T. M. C.; REDDY, N. V.; RAJENDRA, W. Homology modeling, molecular dynamics, and virtual screening of NorA efflux pump inhibitors of *Staphylococcus aureus*. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume 10, p. 3237–3252, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S113556>

BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>

BLANCO, P.; HERNANDO-AMADO, S.; REALES-CALDERON, J.; CORONA, F.; LIRA, F.; ALCALDE-RICO, M.; BERNARDINI, A.; SANCHEZ, M.; MARTINEZ, J. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. **Microorganisms**, v. 4, n. 1, p. 14, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms4010014>

BOYE, A.; ADDO, J. K.; ACHEAMPONG, D. O.; THOMFORD, A. K.; ASANTE, E.; AMOANING, R. E.; KUMA, D. N. The hydroxyl moiety on carbon one (C1) in the monoterpene nucleus of thymol is indispensable for anti-bacterial effect of thymol. **Heliyon**, v. 6, n. 3, p. e03492, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03492>

BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 336–343, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature17042>

BUCKLE, J. Basic Plant Taxonomy, Basic Essential Oil Chemistry, Extraction, Biosynthesis, and Analysis. In: **Clinical Aromatherapy**. [S. l.]: Elsevier, 2015. p. 37–72. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5440-2.00003-6>. Acesso em: 24 set. 2020.

CAPPIELLO, F.; LOFFREDO, M. R.; DEL PLATO, C.; CAMMARONE, S.; CASCIARO, B.; QUAGLIO, D.; MANGONI, M. L.; BOTTA, B.; GHIRGA, F. The Revaluation of Plant-Derived Terpenes to Fight Antibiotic-Resistant Infections. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 325, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060325>

CHAVAN, P. S.; TUPE, S. G. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. **Food Control**, v. 46, p. 115–120, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.007>

CHITSAZ, M.; BROWN, M. H. The role played by drug efflux pumps in bacterial multidrug resistance. **Essays in Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 127–139, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/EBC20160064>

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement Clinical and Laboratory Standards Institute**. [S. l.: s. n.]. v. 32

COSTA, S. S.; SOBKOWIAK, B.; PARREIRA, R.; EDGEWORTH, J. D.; VIVEIROS, M.; CLARK, T. G.; COUTO, I. Genetic Diversity of norA, Coding for a Main Efflux Pump of *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. JAN, p. 1–11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00710>

COSTA, S. S.; VIVEIROS, M.; AMARAL, L.; COUTO, I. Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. **The Open Microbiology Journal**, v. 7, n. 1, p. 59–71, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1874285801307010059>. Acesso em: 2 dez. 2020.

DA CRUZ, R. P. *et al.* Effect of  $\alpha$ -bisabolol and its  $\beta$ -cyclodextrin complex as TetK and NorA efflux pump inhibitors in *Staphylococcus aureus* strains. **Antibiotics**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010028>

DE MORAIS OLIVEIRA-TINTINO, C. D. *et al.* Inhibition of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L. and  $\alpha$ -terpinene on the NorA efflux-pump of *Staphylococcus aureus*. **Food Chemistry**, v. 262, n. April, p. 72–77, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.040>

DEMARCO, C. E.; CUSHING, L. A.; FREMPONG-MANSO, E.; SEO, S. M.; JARAVAZA, T. A. A.; KAATZ, G. W. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3235–3239, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.00430-07>

DENG, X.; SUN, F.; JI, Q.; LIANG, H.; MISSIAKAS, D.; LAN, L.; HE, C. Expression of Multidrug Resistance Efflux Pump Gene norA Is Iron Responsive in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 7, p. 1753–1762, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.06582-11>

DOS SANTOS, J. F. S.; TINTINO, S. R.; DE FREITAS, T. S.; CAMPINA, F. F.; DE A. MENEZES, I. R.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; COUTINHO, H. D. M.; CUNHA, F. A. B. In vitro e in silico evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 57, n. November 2017, p. 22–28, 2018. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.03.001>

DU, D.; WANG-KAN, X.; NEUBERGER, A.; VAN VEEN, H. W.; POS, K. M.; PIDDOCK, L. J. V.; LUISI, B. F. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 523–539, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0048-6>

FERBER, D. From Pigs to People: The Emergence of a New Superbug. **Science**, v. 329, n. 5995, p. 1010–1011, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.329.5995.1010>

FERNANDES, P.; MARTENS, E. Antibiotics in late clinical development. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 152–163, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.025>

GAMES, E.; GUERREIRO, M.; SANTANA, F. R.; PINHEIRO, N. M.; DE OLIVEIRA, E. A.; LOPES, F. D. T. Q. S.; OLIVO, C. R.; TIBÉRIO, I. F. L. C.; MARTINS, M. A.; LAGO, J. H. G.; PRADO, C. M. Structurally Related Monoterpenes p-Cymene, Carvacrol and Thymol Isolated from Essential Oil from Leaves of *Lippia sidoides* Cham. (*Verbenaceae*) Protect Mice against Elastase-Induced Emphysema. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1390, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules21101390>.

GRAY, D. A.; WENZEL, M. Multitarget Approaches against Multiresistant Superbugs. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 6, p. 1346–1365, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00001>

GUIMARÃES, A. C.; MEIRELES, L. M.; LEMOS, M. F.; GUIMARÃES, M. C. C.; ENDRINGER, D. C.; FRONZA, M.; SCHERER, R. Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 2471, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24132471>

GUO, Y.; SONG, G.; SUN, M.; WANG, J.; WANG, Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. March, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107>

GÜVENÇ, M.; CELLAT, M.; GÖKÇEK, İ.; YAVAŞ, İ.; YURDAGÜL ÖZSOY, Ş. Effects of thymol and carvacrol on sperm quality and oxidant/antioxidant balance in rats. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 125, n. 5, p. 396–403, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1476979>

HASSAN, K. A. *et al.* Pacing across the membrane: the novel PACE family of efflux pumps is widespread in Gram-negative pathogens. **Research in Microbiology**, v. 169, n. 7–8, p. 450–454, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.01.001>

HASSANZADEH, S.; GANJLOO, S.; POURMAND, M. R.; MASHHADI, R.; GHAZVINI, K. Epidemiology of efflux pumps genes mediating resistance among *Staphylococcus aureus*; A systematic review. **Microbial Pathogenesis**, v. 139, n.

November 2019, p. 103850, 2020. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103850>

HOLMES, A. H.; MOORE, L. S. P.; SUNDSFJORD, A.; STEINBAKK, M.; REGMI, S.; KARKEY, A.; GUERIN, P. J.; PIDDOCK, L. J. V. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176–187, 2016. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0)

HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, n. Figure 1, p. 72–80, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>

JANG, S. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* and their clinical implications. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 1–8, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12275-016-5159-z>

KAATZ, G. W.; MOUDGAL, V. V.; SEO, S. M.; KRISTIANSEN, J. E. Phenothiazines and Thioxanthenes Inhibit Multidrug Efflux Pump Activity in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 719–726, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.719-726.2003>

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

KAATZ, G. W.; SEO, S. M.; RUBLE, C. A. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 1086–1094, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.37.5.1086>

KACHUR, K.; SUNTRES, Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1675585>

KOPEČNÁ, M.; MACHÁČEK, M.; NOVÁČKOVÁ, A.; PARASKEVOPOULOS, G.; ROH, J.; VÁVROVÁ, K. Esters of terpene alcohols as highly potent, reversible, and low toxic skin penetration enhancers. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51226-5>

KOSMIDIS, C.; SCHINDLER, B. D.; JACINTO, P. L.; PATEL, D.; BAINS, K.; SEO, S. M.; KAATZ, G. W. International Journal of Antimicrobial Agents Expression of multidrug resistance efflux pump genes in clinical and environmental isolates of *Staphylococcus aureus*. v. 40, p. 204–209, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.04.014>

KUMAR, S.; LEKSHMI, M.; PARVATHI, A.; OJHA, M.; WENZEL, N.; VARELA, M. F. Functional and Structural Roles of the Major Facilitator Superfamily Bacterial Multidrug Efflux Pumps. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 266, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020266>



LAMUT, A.; PETERLIN MAŠIČ, L.; KIKELJ, D.; TOMAŠIČ, T. Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, n. 6, p. 2460–2504, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/med.21591>

MAHIZAN, N. A.; YANG, S.-K.; MOO, C.-L.; SONG, A. A.-L.; CHONG, C.-M.; CHONG, C.-W.; ABUSHELAIBI, A.; LIM, S.-H. E.; LAI, K.-S. Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2631, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24142631>

MARCHESE, A.; ORHAN, I. E.; DAGLIA, M.; BARBIERI, R.; DI LORENZO, A.; NABAVI, S. F.; GORTZI, O.; IZADI, M.; NABAVI, S. M. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, v. 210, p. 402–414, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>

MEMAR, M. Y.; RAEI, P.; ALIZADEH, N.; AGHDAM, M. A.; KAFIL, H. S. Carvacrol and thymol: Strong antimicrobial agents against resistant isolates. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 63–68, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MRM.000000000000100>

MEWALAL, R.; RAI, D. K.; KAINER, D.; CHEN, F.; KÜLHEIM, C.; PETER, G. F.; TUSKAN, G. A. Plant-Derived Terpenes: A Feedstock for Specialty Biofuels. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 227–240, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.08.003>

MIKULÁŠOVÁ, M.; CHOVANOVÁ, R.; VAVERKOVÁ, Š. **Synergism between antibiotics and plant extracts or essential oils with efflux pump inhibitory activity in coping with multidrug-resistant staphylococci.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9458-0>

MUNIZ, D. F. *et al.* In vitro and in silico inhibitory effects of synthetic and natural eugenol derivatives against the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus*. **Food Chemistry**, v. 337, n. November 2019, p. 127776, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127776>

NARGOTRA, A.; SHARMA, S.; KOUL, J. L.; SANGWAN, P. L.; KHAN, I. A.; KUMAR, A.; TANEJA, S. C.; KOUL, S. Quantitative structure activity relationship (QSAR) of piperine analogs for bacterial NorA efflux pump inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 10, p. 4128–4135, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.05.004>

NEILL, J. O. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired. n. December, 2016.

NEMEGHAIRE, S.; ARGUDÍN, M.; HAESEBROUCK, F.; BUTAYE, P. Epidemiology and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage isolates from bovines. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 1, p. 153, 2014.

Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-153>

NUH, A.; RAMADAN, N.; SCHELENZ, S.; ARMSTRONG-JAMES, D. Comparative Evaluation of MIRONAUT-AM and CLSI broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species against four commonly used antifungals. **Medical Mycology**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa020>. Acesso em: 28 set. 2020.

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. de M. *et al.* Do 1,8-naphthyridine sulfonamides possess an inhibitory action against Tet(K) and MsrA efflux pumps in multiresistant *Staphylococcus aureus* strains? **Microbial Pathogenesis**, v. 147, n. June, p. 104268, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104268>

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. **Terpenes: Substances useful in human healthcare**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00005-007-0039-1>

PAL, M.; KERORSA, G. B.; MARAMI, L. M.; KANDI, V. Epidemiología, patogenicidad, infecciones animales, resistencia a los antibióticos, importancia para la salud pública y Impacto económico de *Staphylococcus aureus*: Una revisión completa. **American Journal of Public Health Research**, v. 8, n. 1, p. 14–21, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.12691/ajphr-8-1-3>

PAPKOU, A.; HEDGE, J.; KAPEL, N.; YOUNG, B.; MACLEAN, R. C. Efflux pump activity potentiates the evolution of antibiotic resistance across *S. aureus* isolates. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 3970, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17735-y>

PARK, J. H.; JEON, Y. J.; LEE, C. H.; CHUNG, N.; LEE, H. S. Insecticidal toxicities of carvacrol and thymol derived from *Thymus vulgaris* Lin. against *Pochazia shantungensis* Chou & Lu., newly recorded pest. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep40902>. Acesso em: 8 mar. 2021.

PAYNE, D. J.; MILLER, L. F.; FINDLAY, D.; ANDERSON, J.; MARKS, L. Time for a change: Addressing R&D and commercialization challenges for antibacterials. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1670, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0086>

PENESYAN, A.; GILLINGS, M.; PAULSEN, I. Antibiotic Discovery: Combatting Bacterial Resistance in Cells and in Biofilm Communities. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 5286–5298, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules20045286>

PERVEEN, S. Introductory Chapter: Terpenes and Terpenoids. *In: Terpenes and Terpenoids*. [S. l.]: IntechOpen, 2018. p. 13. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.79683>

PRASCH, S.; BUCAR, F. Plant derived inhibitors of bacterial efflux pumps: an update.

**Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 6, p. 961–974, 2015. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1007/s11101-015-9436-y>

RAMALHETE, C.; SPENGLER, G.; MARTINS, A.; MARTINS, M.; VIVEIROS, M.; MULHOVO, S.; FERREIRA, M.-J. U.; AMARAL, L. Inhibition of efflux pumps in meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* resistant strains by triterpenoids from *Momordica balsamina*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, n. 1, p. 70–74, 2011. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.09.011>

RAO; S, P.; KM, D.; S, K.; BB, N.; MF, V. Antimicrobial Compounds of Plant Origin as Efflux Pump Inhibitors: New Avenues for Controlling Multidrug Resistant Pathogens. **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 04, n. 01, p. 1–6, 2018. Disponível em:  
<https://doi.org/10.4172/2472-1212.1000159>

SAPULA, S. A.; BROWN, M. H. **Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria**. Cham: Springer International Publishing, 2016. *E-book*. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-39658-3>

SCHERF, J. R.; BARBOSA DOS SANTOS, C. R.; SAMPAIO DE FREITAS, T.; ROCHA, J. E.; MACÊDO, N. S.; MASCARENHAS LIMA, J. N.; MELO COUTINHO, H. D.; BEZERRA DA CUNHA, F. A. Effect of terpinolene against the resistant *Staphylococcus aureus* strain, carrier of the efflux pump QacC and  $\beta$ -lactamase gene, and its toxicity in the *Drosophila melanogaster* model. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104528, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104528>

SCHILLACI, D.; SPANÒ, V.; PARRINO, B.; CARBONE, A.; MONTALBANO, A.; BARRAJA, P.; DIANA, P.; CIRINCIONE, G.; CASCIOFERRO, S. Pharmaceutical Approaches to Target Antibiotic Resistance Mechanisms. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 20, p. 8268–8297, 2017. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00215>

SCHINDLER, B. D.; JACINTO, P.; KAATZ, G. W. **Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: Current status of potentiating existing antibiotics**. [S. l.]: Future Microbiol, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb.13.16>. Acesso em: 28 set. 2020.

SCHWEIZER, H. P. Understanding efflux in Gram-negative bacteria: opportunities for drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 7, n. 7, p. 633–642, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/17460441.2012.688949>

SEUKEP, A. J.; KUETE, V.; NAHAR, L.; SARKER, S. D.; GUO, M. **Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification**. Elsevier Ltd, 2020. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.11.002>

SHARIFI-RAD, M.; VARONI, E. M.; IRITI, M.; MARTORELL, M.; SETZER, W. N.;

- DEL MAR CONTRERAS, M.; SALEHI, B.; SOLTANI-NEJAD, A.; RAJABI, S.; TAJBAKHS, M.; SHARIFI-RAD, J. Carvacrol and human health: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 9, p. 1675–1687, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr.6103>
- SHARMA, A.; GUPTA, V.; PATHANIA, R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. **Indian Journal of Medical Research**, v. 149, n. 2, p. 129, 2019. Disponível em: [https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR\\_2079\\_17](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_2079_17)
- SHRIRAM, V.; KHARE, T.; BHAGWAT, R.; SHUKLA, R.; KUMAR, V. Inhibiting bacterial drug efflux pumps via phyto-therapeutics to combat threatening antimicrobial resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. DEC, p. 1–18, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02990>
- SIENIAWSKA, E.; SWATKO-OSSOR, M.; SAWICKI, R.; SKALICKA-WOŹNIAK, K.; GINALSKA, G. Natural Terpenes Influence the Activity of Antibiotics against Isolated *Mycobacterium tuberculosis*. **Medical Principles and Practice**, v. 26, n. 2, p. 108–112, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000454680>
- SILVEIRA, Z. de 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*. **Molecules**, v. 25, n. 9, p. 2103, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25092103>
- SINGER, A. C.; SHAW, H.; RHODES, V.; HART, A. Review of Antimicrobial Resistance in the Environment and Its Relevance to Environmental Regulators. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. NOV, p. 1–22, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01728>
- SPENGLER, G.; KINCSES, A.; GAJDÁCS, M.; AMARAL, L. New Roads Leading to Old Destinations: Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 468, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules22030468>
- SUNTRES, Z. E.; COCCIMIGLIO, J.; ALIPOUR, M. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 304–318, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.653458>
- TACCONELLI, E. *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318–327, 2018. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- TACCONELLI, E.; MAGRINI, N. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. [s. l.], 2017. Disponível em: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>. Acesso em: 31 jan. 2021.

TEGOS, P. G.; HAYNES, M.; JACOB STROUSE, J.; MD. T. KHAN, M.; G. BOLOGA, C.; I. OPREA, T.; A. SKLAR, L. Microbial Efflux Pump Inhibition: Tactics and Strategies. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 13, p. 1291–1302, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/138161211795703726>

THAI, K.; NGO, T.; PHAN, T.; TRAN, T.; NGUYEN, N. Virtual Screening for Novel *Staphylococcus aureus* NorA Efflux Pump Inhibitors From Natural Products. p. 135–155, 2015.

TINTINO, S. R. *et al.* Effect of Vitamin K3 Inhibiting the Function of NorA Efflux Pump and Its Gene Expression on *Staphylococcus aureus*. **Membranes**, v. 10, n. 6, p. 130, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/membranes10060130>

TONG, S. Y. C.; DAVIS, J. S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T. L.; FOWLER, V. G. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>

TRUONG-BOLDUC, Q. C.; HOOPER, D. C. The transcriptional regulators NorG and MgrA modulate resistance to both quinolones and  $\beta$ -lactams in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 8, p. 2996–3005, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.01819-06>

UBUKATA, K.; ITOH-YAMASHITA, N.; KONNO, M. Cloning and expression of the *norA* gene for fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, n. 9, p. 1535–1539, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.33.9.1535>

VENTER, H. Reversing resistance to counter antimicrobial resistance in the World Health Organisation's critical priority of most dangerous pathogens. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 4, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BSR20180474>

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P & T : a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 40, n. 4, p. 277–83, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5796/electrochemistry.82.749>

WILLYARD, C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. **Nature**, v. 543, n. 7643, p. 15–15, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature.2017.21550>

YILMAZ, E. Ş.; ASLANTAŞ, Ö. Antimicrobial resistance and underlying mechanisms in *Staphylococcus aureus* isolates. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 11, p. 1059–1064, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.10.003>

YOSHIDA, H.; BOGAKI, M.; NAKAMURA, S.; UBUKATA, K.; KONNO, M. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 12, p. 6942–6949, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.172.12.6942-6949.1990>

ZACCHINO, S. A.; BUTASSI, E.; LIBERTO, M. Di; RAIMONDI, M.; POSTIGO, A.; SORTINO, M. Plant phenolics and terpenoids as adjuvants of antibacterial and antifungal drugs. **Phytomedicine**, v. 37, p. 27–48, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.10.018>

### 3. CAPÍTULO II: MANUSCRITO

Submetido em 11/11/2020, no International Journal of Molecular Sciences, com QUALIS A2 em Ciências Biológicas II e Fator de Impacto 4,556.



International Journal of  
*Molecular Sciences*



Article

## Carvacrol and Thymol Potential Inhibitors of NorA Efflux Pump in *Staphylococcus aureus*

Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa <sup>1</sup>, Jackelyne Roberta Scherf <sup>1</sup>, Thiago Sampaio de Freitas <sup>1</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes <sup>1</sup>, Raimundo Luiz Silva Pereira <sup>1</sup>, Joycy Francely Sampaio dos Santos <sup>1</sup>, Sarah Silva Patrício de Jesus <sup>1</sup>, Thais Pereira Lopes <sup>1</sup>, Zildene de Sousa Silveira <sup>1</sup>, Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino <sup>2</sup>, José Pinto Siqueira Júnior <sup>3</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho <sup>1</sup>, Saulo Relison Tintino <sup>1</sup>, Marcello Iriti <sup>4,\*</sup> and Francisco Assis Bezerra da Cunha <sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato 63105-000, CE, Brazil; cristinase75@gmail.com (C.R.d.S.B.); jackelyne\_scherf@yahoo.com.br (J.R.S.); thiagocrato@hotmail.com (T.S.d.F.); irwinalencar@yahoo.com.br (I.R.A.d.M.); raimundoluizbio@gmail.com (R.L.S.P.); joycy.sampaio22@gmail.com (J.F.S.d.S.); sarahpatricio09@gmail.com (S.S.P.d.J.); thaishonorato001@gmail.com (T.P.L.); zildenesousa15@gmail.com (Z.d.S.S.); hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M.C.); saulorelison@gmail.com (S.R.T.); cunha.urca@gmail.com (F.A.B.d.C.)
- <sup>2</sup> Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, UFPE, Recife 50670-901, PE, Brazil; datianemorais@hotmail.com (C.D.d.M.O.-T)
- <sup>3</sup> Department of Molecular Biology, Federal University of Paraiba, UFPB, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; siqueira@dbm.ufpb.br (J. P. S.J.)
- <sup>4</sup> Department of Agricultural and Environmental Sciences, Milan State University, via G. Celoria 2, 20133 Milan, Italy
- \* Correspondence: marcello.iriti@unimi.it (M.I)

Received: date; Accepted: date; Published: date

**Resumo:** A exposição indevida a antimicrobianos tem levado à aquisição e ao desenvolvimento de sofisticados mecanismos de resistência bacteriana, como bombas de efluxo, que são capazes de expelir ou reduzir a concentração intracelular de vários antibióticos, tornando-os ineficazes. Portanto, inibir esse mecanismo é uma forma promissora de minimizar os impactos causados pelo fenômeno da resistência bacteriana aos antibióticos. Nesse sentido, o presente estudo buscou avaliar a atividade dos terpenos Carvacrol (CAR) e Timol (THY) como possíveis inibidores de efluxo (IBEs), por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da associação desses compostos em concentrações subinibitórias com o antibiótico Norfloxacin e com Brometo de Etídio (EtBr) contra as cepas SA-1199 (tipo selvagem) e SA-1199B (superexpressa NorA) de *Staphylococcus aureus*. Para verificar as interações dos terpenos com a proteína de efluxo, foi realizado um estudo

*in silico* de modelagem molecular. Os resultados do estudo revelaram que CAR e THY apresentam atividade bacteriana moderada e são capazes de reduzir a CIM do antibiótico Norfloxacino e do Brometo de Etídio em cepas de *S. aureus* portadoras da bomba de efluxo NorA. Os resultados de *docking* mostraram que esses terpenos atuam como possíveis inibidores competitivos de NorA e podem ser investigados como adjuvantes em terapias combinadas que visam reduzir a resistência.

**Palavras-chaves:** terpenos; inibidores da bomba de efluxo; NorA; fluoroquinolonas

---

## 1. Introdução

*Staphylococcus aureus* está relacionada a uma ampla variedade de patologias invasivas que podem levar a um estado de bacteremia severa, algumas dessas doenças são endocardite, pneumonia, infecções ósseas, articulares e dos tecidos moles. As bacteremias causadas por *S. aureus* são uma das principais causas de mortalidade, tanto no ambiente hospitalar quanto no ambulatorial [1].

A ampla variedade de mecanismos de resistência a agentes antimicrobianos de *S. aureus* torna seu potencial patogênico mais agravante [2]. Contudo, o mecanismo de bombas de efluxo expresso por este microrganismo se destaca por sua eficácia ao extrudar antibióticos de primeira linha e diversos agentes tóxicos para o meio extracelular, impactando diretamente sobre a eficácia desses compostos, promovendo a falha de antibioticoterapias [3].

Provavelmente as bombas de efluxo presentes em *S. aureus*, atuam como importantes mediadores de resistência a antibióticos de alto nível, impactando na virulência e até na formação de biofilmes [3–5]. Das bombas de efluxos apresentadas por *S. aureus*, 31 foram identificadas [6], destas, a proteína de efluxo NorA, destaca-se por ser comumente expressa em cepas geograficamente diversas de *S. aureus* [5], sendo caracterizada como principal modelo experimental na busca de agentes que funcionem como Inibidores de Efluxo (IBEs) [7].

A identificação de IBEs é uma estratégia promissora e necessária contra a resistência bacteriana, já que são capazes de restaurar a sensibilidade da bactéria ao antibiótico utilizado, e quando associados em concentrações com este último, podem potencializar a eficácia do mesmo aumentando seu espectro de ação [8]. Além disso, os IBEs também podem atuar minimizando a resistência adquirida e intrínseca, impedindo a formação de biofilmes e reduzindo a virulência de bactérias [9–11].

Alguns compostos que apresentam a capacidade de inibir a atividade das bombas de efluxo já foram descritos pela literatura, entretanto, singularidades como pouca estabilidade molecular, baixa seletividade do alvo de ação, limitada biodisponibilidade, alta citotoxicidade e fracos efeitos farmacológicos, impedem o uso clínico desses inibidores [12].

Apesar desses desafios, é notória a urgência de estudos que possibilitem a descoberta de compostos de baixo peso molecular, que possam ser coadministrados com os antibióticos convencionais, a fim de bloquear os sistemas de efluxo de múltiplas drogas [13], visto que o uso desses inibidores pode proporcionar a recuperação da atividade antibiótica de drogas consideradas ineficazes para tratamento de infecções bacterianas, sendo de extrema importância para a saúde pública [14].

Os isômeros Carvacrol (CAR) e Timol (THY) são fitoconstituintes majoritários de diversas plantas aromáticas [15], sendo utilizados na indústria alimentícia e cosmética como agentes aromatizantes e conservantes em decorrência de suas características antimicrobianas, antioxidantes e bons perfis toxicológicos [16–18]. Esses terpenos também apresentam moderada atividade



antibacteriana intrínseca, sobre uma extensa variedade de cepas microbianas [19], apresentando baixo peso molecular [20]. Essas são características importantes de candidatos a futuros IBEs [4], supondo que esses compostos possam agir como inibidores de NorA em cepas de *S. aureus*, possibilitando a diminuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de compostos antibacterianos, atuando como uma possível alternativa terapêutica.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade direta de Carvacrol (CAR) e Timol (THY) e a associação desses compostos em concentrações subinibitórias com o antibiótico de uso padrão Norfloxacino e com o Brometo de Etídio, contra as cepas SA-1199 (selvagem) e SA-1199B (superexpressa NorA) de *Staphylococcus aureus* portadoras dos genes de resistência *norA*, as quais expressam a proteína de efluxo NorA. Um estudo de Modelagem molecular também foi realizado para avaliar o efeito *in silico* das interações dos terpenos CAR e THY com a proteína de efluxo NorA

## 2. Resultados

### 2.1. Atividade antibacteriana por concentração inibitória mínima (CIM)

Conforme verificado no presente estudo, os terpenos CAR e THY obtiveram um MIC equivalente contra as duas cepas de *S. aureus* testadas, com ambos os terpenos mostrando uma atividade antibiótica moderada, com valores de CIM de 256 µg/mL contra o SA-1199 (tipo selvagem) e cepas SA-1199B (superexpressa NorA). Quanto ao antibiótico Norfloxacino, foi verificada uma CIM de 64 µg/mL para a cepa SA-1199 (tipo selvagem) e 128 µg/mL para a cepa SA-1199B (superexpressa NorA), demonstrando que a cepa que superexpressa NorA é menos sensível ao antibiótico do que o tipo selvagem, que expressa NorA de forma basal. Com relação ao inibidor padrão cianeto de Carbonil m-clorofenil hidrazona (CCCP), foi demonstrada uma CIM de 8 µg/mL para a cepa SA-1199 (tipo selvagem) e 16 µg/mL para SA-1199B (superexpressa NorA), revelando que as cepas têm alta sensibilidade a este composto. Já o inibidor clorpromazina (CPMZ) obteve CIM  $\geq$  1024 µg/mL, para as duas estirpes, indicando a ausência de atividade direta relevante contra cepas de *S. aureus* portadoras da bomba de efluxo NorA.

### 2.2. Avaliação da inibição da bomba de efluxo NorA pela redução das CIMs de Norfloxacino e Brometo de Etídio (EtBr)

Em relação à modificação da CIM dos substratos Norfloxacino e EtBr por associação com CAR e THY em Concentração Subinibitória (CIM/8) Tabela 1, observou-se que tanto CAR quanto THY, reduziram significativamente a CIM do Norfloxacino para a cepa SA-1199 (tipo selvagem), levando a uma diminuição de 64 µg/mL para 32 µg/mL (2x). O mesmo efeito adjuvante também foi observado para ambos os terpenos contra a cepa SA-1199B (superexpressa NorA), reduzindo a CIM do Norfloxacino de 128 µg/mL para 64 µg/mL (2x), indicando que CAR e THY potencializaram a eficácia do Norfloxacino, aumentando a sensibilidade das cepas de *S. aureus* ao antibiótico.

**Tabela 1.** Avaliação da capacidade de modificação da CIM pela associação de Norfloxacino e EtBr com CAR e THY e com os inibidores padrão CPMZ e CCCP contra cepas s de *S. aureus* portadoras de NorA

Substratos	Redução de X vezes na CIM do substrato na presença do inibidor	
	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	SA-1199	SA-1199B
Norfloxacino	64	128
CPMZ + Norfloxacino	28,51 (2,3x)	64 (2x)
CCCP + Norfloxacino	25,39 (2,5x)	64 (2x)
Carvacrol + Norfloxacino	32 (2x)	64 (2x)
Timol + Norfloxacino	32 (2x)	64 (2x)
EtBr	32	80,63
CPMZ + EtBr	5,04 (6,3x)	64 (1,3x)
CCCP + EtBr	11,31 (2,8x)	20,16 (4x)
Carvacrol + EtBr	25,39 (1,3x)	64 (1,3x)
Timol + EtBr	16 (2x)	64 (1,3x)

Em relação à associação com o inibidor padrão CPMZ, foi observada uma redução de 64  $\mu\text{g/mL}$  para 28,51  $\mu\text{g/mL}$  (2,3x) na CIM do Norfloxacino contra a cepa SA-1199 (tipo selvagem) e de 128  $\mu\text{g/mL}$  para 64  $\mu\text{g/mL}$  (2x), contra SA-1199B (superexpressa NorA), enquanto a associação com o inibidor padrão CCCP, reduziu a CIM do Norfloxacino de 64  $\mu\text{g/mL}$  para 25,39  $\mu\text{g/mL}$  (2,5x), contra SA-1199 (tipo selvagem) e de 128  $\mu\text{g/mL}$  a 64  $\mu\text{g/mL}$  (2x), contra a cepa SA-1199B (superexpressa NorA), exibindo uma redução semelhante à dos terpenos CAR e THY para esta cepa. Em relação ao EtBr, observou-se que a associação com CAR modificou moderadamente a CIM do mesmo contra SA-1199 (tipo selvagem), promovendo uma redução de 32  $\mu\text{g/mL}$  para 25,4  $\mu\text{g/mL}$  (1,3x).

Na associação com o inibidor padrão CPMZ, a redução da CIM do EtBr foi de 32  $\mu\text{g/mL}$  para 5,04  $\mu\text{g/mL}$  (6,3x), contra SA-1199 (tipo selvagem) e de 80,63 para 64  $\mu\text{g/mL}$  (1,3x), contra SA-1199B (superexpressa NorA). Já na associação com o CCCP, foi verificada uma redução na CIM do EtBr de 32  $\mu\text{g/mL}$  para 11,31  $\mu\text{g/mL}$  (2,8x), contra SA-1199 (tipo selvagem) e de 80,63 para 20,16  $\mu\text{g/mL}$  (4x), contra SA-1199B (superexpressa NorA). Esses resultados demonstram que, assim como os inibidores padrão CPMZ e CCCP, tanto CAR quanto THY foram capazes de reduzir a CIM dos substratos Norfloxacino e EtBr, potencializando a eficácia desses compostos contra as cepas de *S. aureus* SA-1199 (selvagem -tipo) e SA-1199B (superexpressa NorA).

### 2.3. Resultados do Docking

A triagem *in silício* como um procedimento de *docking*, tem sido uma técnica poderosa para identificar compostos líderes efetivos em muitos alvos farmacológicos. Os resultados presentes na Tabela 2, mostraram uma afinidade de ligação significativa para os compostos testados, com faixa de pontuação MolDock de -66,95 a -126,901 kcal/mol contra NorA. Os diferentes ligantes foram ancorados profundamente na região de bolsa de ligação, formando ligações Van der Waals (VdW),

Ligações de hidrogênio (HBond) e outras interações apolares entre os sítios de ligação dos receptores e os ligantes que interagem.

A classificação das seleções de pose (conformações) foi realizada com base nos *scores* do *dock*, energias de interação, energia HBond, VdW e número de ligações de hidrogênio. Então, podemos assumir que quanto mais negativos forem os valores de energia de ligação previstos, mais estável é a energia de ligação termodinamicamente favorável, contribuindo para a estabilidade do complexo proteína/ligante.

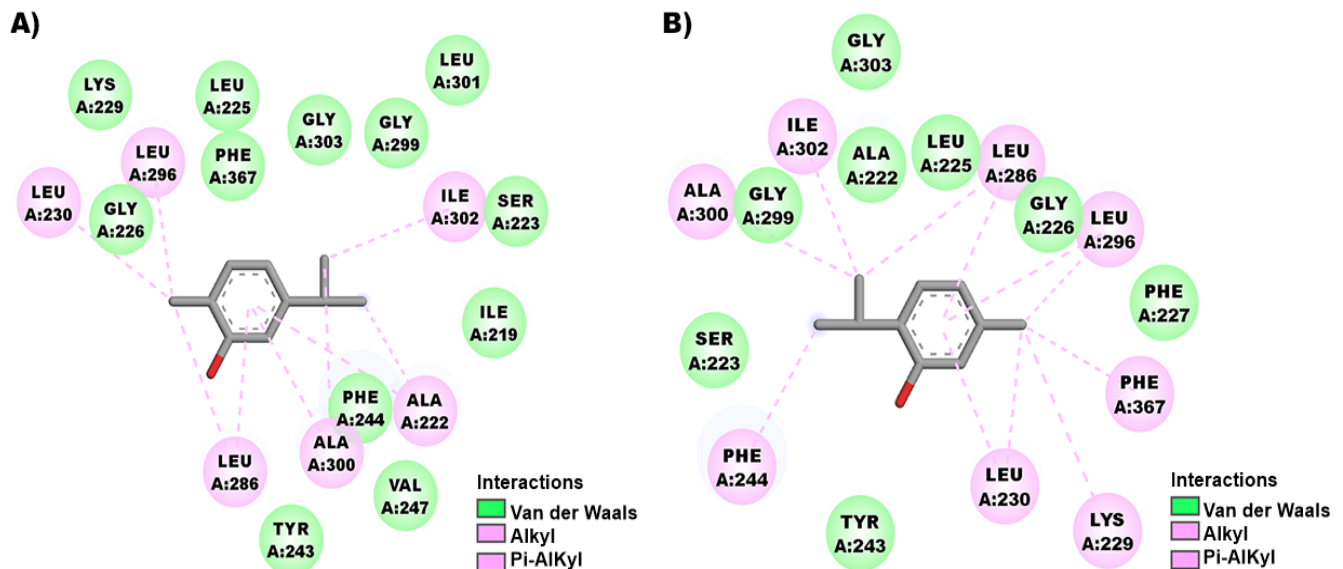
**Tabela 2.** Energia dos compostos ancorados obtidos a partir de estudos de ancoragem molecular.

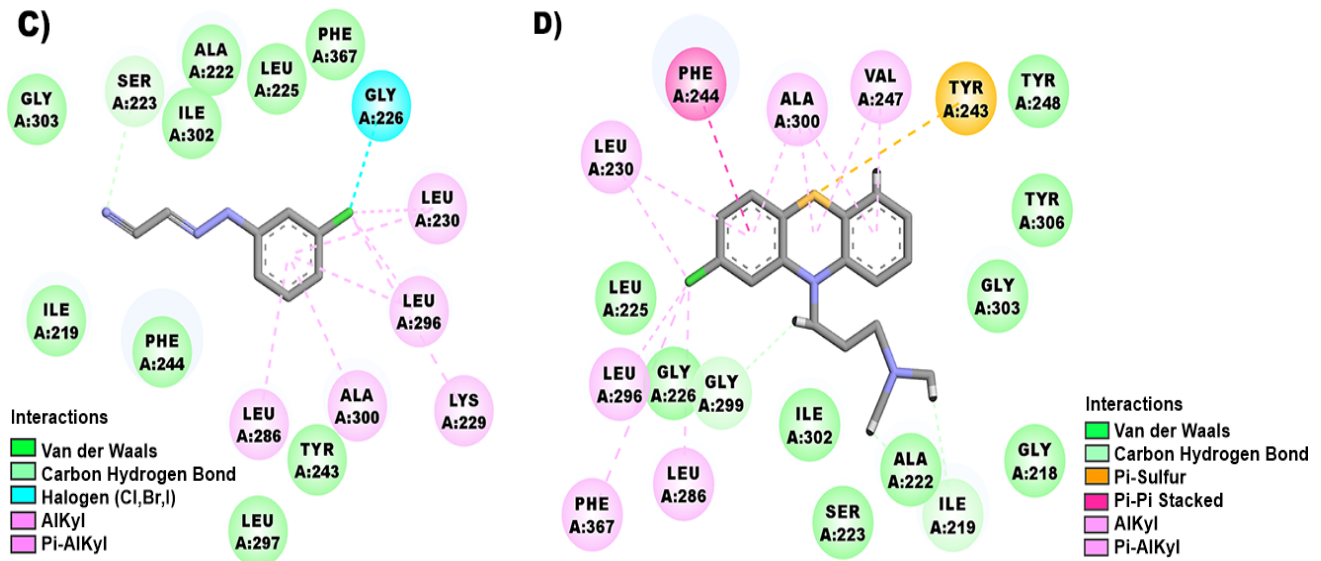
Ligantes	MolDock Score (kcal/mol)	Interações (kcal/mol)	HBond (kcal/mol)	LE
EtBr	-126,84	-154,23	-1,88	-2,64
CPMZ	-110,55	-118,24	0	-1,52
CCCP	-90,66	-95,363	-4,74	-5,39
THY	-85,10	-93,46	-2,5	-6,12
CAR	-67,16	-76,79	-2,5	-5,42

LE = Eficiência do ligante calculada a partir do score Moldock. **Hbond** = energia das interações das ligações de hidrogênio.

A fim de mapear os aspectos qualitativos dos estudos de *docking* molecular, observamos diferentes interações moleculares, por interação hidrofóbica, hidrofílica e eletrostática presentes no sítio de ligação. A região de ligação é formada principalmente como uma bolsa hidrofóbica, com a parede interna sendo formada pelas cadeias laterais de aminoácidos glicina (Gly), alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile) e fenilalanina (Phe).

O interior da bolsa de ligação é predominantemente apolar, mas contém dois aglomerados de resíduos polares, sendo um interno voltado para o fundo da bolsa (Tyr243, Ser223), Figura 3. No entanto, Carvacrol (CAR) e Timol (THY) exibem interação semelhantes com o local de ligação NorA por meio de âncoras com Gly303, Ser223, Ile302, Ala222, Leu225, Phe367, Gly226, Leu230, Leu296, Ala300, Tyr243, Leu286, que também estão presentes com os inibidores específicos CCCP e Clorpromazina (CPMZ).





**Figura 1.** Representação do Mapa de interação com bolsa de ligação da proteína de efluxo NorA: (A) CAR, (B) THY, (C) CCCP e (D) CPMZ

### 3. Discussão

Considerando que praticamente todos os antibióticos, são atualmente suscetíveis ao mecanismo de bomba de efluxo, a identificação de biomoléculas capazes de inibir esse mecanismo tornou-se uma estratégia válida na tentativa de minimizar os danos causados pela resistência bacteriana [4,21-23]. Os terpenos CAR e THY, são conhecidos por suas diversas bioatividades, incluindo atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [24], despertando interesse no uso potencial desses agentes contra à resistência bacteriana aos antibióticos, por meio da inibição de mecanismos de resistência como bombas de efluxo [19,25]. Além disso, há uma perspectiva positiva sobre a utilidade de CAR e THY como modelos naturais para semissíntese farmacêutica de agentes terapêuticos [26,27].

Conforme avaliado neste estudo, tanto CAR quanto THY, apresentaram atividade antibacteriana intrínseca moderada contra as cepas SA-1199 e SA-1199B de *S. aureus* portadoras da proteína de efluxo NorA. No entanto, para possíveis candidatos a IBEs um efeito antibacteriano moderado é visto como uma vantagem, pois evita que os efeitos antibacterianos e inibitórios do mecanismo de efluxo se sobreponham [28].

Além disso, vários estudos relacionam a atividade antibacteriana de CAR e THY à presença de um grupo Hidroxila (Grupo OH) localizado no carbono 1 (C1) desses terpenos, por ser altamente reativo, formando ligações de hidrogênio com sítios enzimáticos-alvo ativos, inativando-os e, conseqüentemente, induzindo a disfunção ou ruptura da membrana celular, o que resulta na morte da célula bacteriana [24,26,29-32].

Esses achados corroboram os observados no presente estudo, uma vez que a proteína de efluxo NorA atua transportando substratos através da membrana, usando gradientes de íons como força próton-motriz [33,34]. Além disso, o grupo OH e a presença de um grupo de elétrons deslocalizados (ligações duplas), permitem que CAR e THY atuem como um trocador de prótons, reduzindo o

gradiente de íons através da membrana citoplasmática, resultando na perda da força próton-motriz e a perda de ATP, levando à morte celular [35].

Essas interações poderiam explicar a atividade direta do CAR THY contra cepas bacterianas que expressam o mecanismo de efluxo, como as avaliadas no presente estudo, visto que proteínas de efluxo, como NorA, também desempenha funções fisiológicas importantes para a célula bacteriana [34,36], desempenhando um papel significativo no equilíbrio osmótico celular, e na manutenção do gradiente de prótons [37].

A combinação de vários medicamentos tem sido eficaz no uso clínico para o tratamento de infecções bacterianas graves. Essa conquista é alcançada através da associação de um ou mais antibióticos para uso clínico [38]. Portanto, futuros tratamentos realizados através de combinações de antibióticos com produtos naturais de origem vegetal, podem se tornar a melhor estratégia para inibir diversos mecanismos de resistência bacteriana, visto que essas pequenas moléculas quando associadas ao antibiótico, podem atuar em múltiplos alvos promotores de resistência [39], incluindo bombas de efluxo. Esta informação é corroborada por dados do *The Pew Charitable Trusts* [40], que revelaram que dos 13 tratamentos com antibióticos em testes de fase III, 04 tratamentos são combinações de antibióticos com pequenas moléculas destinadas a superar a resistência bacteriana através da inibição de mecanismos de resistência.

Os ensaios realizados no presente estudo mostraram que CAR e THY foram capazes de reduzir a CIM do Norfloxacino contra as cepas de *S. aureus* SA-1199 (tipo selvagem) e SA-1199B (superexpressa NorA) demonstrando uma relação de sinergia, tornando essas estirpes mais suscetíveis aos efeitos do antibiótico, tabela 1.

Os potenciais efeitos sobre a CIM de antibióticos de uso padrão em associações com CAR e THY, já foram verificados em cepas de *S. aureus* que expressoras do mecanismo de bomba de efluxo NorA. No entanto, os resultados do presente estudo divergem dos observados por Cirino et al. [41] para a cepa SA-1199B (superexpressa NorA), no qual foi verificado, que a CIM do Norfloxacino não foi modificada em associações do mesmo com CAR e THY em concentrações subinibitórias (CIM/4). Atividade semelhante, também foi observada por Cirino et al. (2015) quando CAR e THY foram associados a Ciprofloxacina contra a Cepa de *S. aureus* RN-4220 portadora da bomba MsrA. Entretanto, verificou-se no mesmo estudo que as associações do CAR e THY com a Tetraciclina potencializaram a eficácia da mesma contra a cepa de *S. aureus* IS-58, reduzindo a CIM desse antibiótico de 64 µg/mL para 32 µg/mL.

Embora o estudo de Cirino et al. [41] discorde dos achados do presente estudo para a cepa SA-1199B, os autores não definiram a CIM de CAR e THY usada em concentrações subinibitórias, para avaliar sua atividade modificadora da CIM dos antibióticos contra a cepa SA-1199B, portanto, não é possível verificar a diferença entre os dois estudos. No entanto, a inibição da expressão do gene *norA*, que codifica a bomba de efluxo NorA, foi verificada contra cepas clínicas de *S. aureus* em um estudo que avaliou a atividade do extrato de *Thymus vulgaris*, na redução da CIM da ciprofloxacina e na inibição de bomba de efluxo NorA, o qual continha CAR (6,47%) e THY (3,04%), entre seus principais fitoquímicos [42].

Além disso, estudos de lipofilicidade demonstraram que CAR e THY são capazes de permear as membranas fosfolipídicas, assim, esses terpenos podem interagir com componentes intracelulares importantes, desse modo subentende-se que estes compostos podem facilitar a penetração do antibiótico no interior da célula bacteriana promovendo a comunicação desse agente tóxico com componentes essenciais ao funcionamento da bactéria [43]

De acordo com Maia et al. [44], a lipofilicidade dos terpenos é uma característica comum de vários IBEs, que pode comprometer a integridade dos fosfolipídios e afetar proteínas incorporadas à membrana bacteriana, como as que formam as bombas de efluxo [45]. Esses achados podem explicar

o aumento da sensibilidade das cepas SA-1199 (tipo selvagem) e SA-1199B (superexpressa NorA) promovido pela associação de terpenos com substratos, Norfloxacino e EtBr.

O EtBr, tem sido amplamente utilizado como um substrato modelo para testes de verificação de bomba de efluxo [46-49]. Além disso, o EtBr é caracterizado como um substrato bem conhecido da proteína de efluxo NorA [50,51], que é capaz de se interpor com DNA de bactérias e como consequência causar a morte celular. Para evitar que isso ocorra, proteínas de efluxo como NorA, são ativadas e expõem EtBr do meio intracelular. Este processo também ocorre com outras substâncias tóxicas, como antibióticos [52].

No presente estudo observou-se que os terpenos CAR e THY promovem a redução da CIM do EtBr, aumentando a eficiência deste substrato contra cepas de *S. aureus* portadoras da bomba de efluxo NorA, tabela 1. Corroborando com os resultados do presente estudo, Miladi et al. [19] demonstraram através de ensaios de fluorescência, o efeito promissor de CAR e THY na inibição do efluxo do EtBr contra cepas de *S. aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium* LT2 DT104, utilizando concentrações inibitórias que variaram de 250 µg/mL a 500 µg/mL.

Estudos anteriores, destacaram que CAR e THY são capazes de romper a membrana citoplasmática das células bacterianas, causando a eliminação e inibição da circulação de íons e consequentemente a redução da força próton-motriz [29,53-55]. Como a ativação de NorA está ligada diretamente a força próton-motriz [56], CAR e THY podem estar atuando por esta via, podendo também causar alterações no ambiente intracelular, corrompendo a integridade da membrana bacteriana [57].

A análise *in silico* é usada para identificar as interações moleculares entre o IBEs e a bomba de efluxo. O acoplamento molecular, ajuda a entender como os IBEs bloqueiam o transporte de moléculas antibacterianas por bombas de efluxo [58]. A compreensão dessas interações permite que os IBEs sejam modificados, visando uma interação mais eficaz entre as bombas de efluxo alvo e os possíveis candidatos a inibidores, causando a inibição mais eficiente da proteína de efluxo [59].

Os resultados de *docking* mostraram que CAR e THY atuam em competição com os substratos Norfloxacino e EtBr pelos sítios de ligação de NorA e podem ser investigados como adjuvantes em terapias combinadas destinadas a combater a resistência. Assim, pode-se argumentar que essas substâncias dificultam a ligação do Norfloxacino e EtBr a NorA, podendo ser excretadas da célula bacteriana no lugar desses substratos. De acordo com Aron; Opperman, [60] é provável que alguns inibidores se liguem à bolsa hidrofóbica com maior afinidade do que os substratos de efluxo, permitindo-lhes evitar a ligação do substrato a bomba, o que justificaria o mecanismo competitivo de CAR e THY.

Os dados da literatura corroboram os resultados apresentados, levantando a hipótese de que a hidrofobicidade é uma característica essencial que resulta na estabilização da formação de um complexo de diferentes classes de compostos capazes de interferir na funcionalidade da bomba de efluxo por meio de interações hidrofóbicas e flexíveis de hidrogênio [6,61-63]. É notório, que as interações hidrofóbicas e flexíveis de hidrogênio desempenham um papel importante na estabilização dos ligantes na interface de ligação, otimizando a estabilidade do ligante ao local alvo, ajudado a aumentar a afinidade de ligação e a eficácia do complexo proteína/ligante [64].

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Cepas bacterianas

As cepas de *S. aureus* utilizadas foram: SA-1199 (tipo selvagem) e SA-1199B (superexpressa NorA), que expressam a proteína de efluxo NorA resistente a substratos da classe das

fluoroquinolonas, como Norfloxacin [65] e corantes de DNA intercalantes, tais como EtBr [66]. As cepas foram fornecidas pelo Prof. S. Gibbons (*University of London, Malet St, Bloomsbury, London WC1E 7HU, UK*), sendo mantidas em ágar sangue (Laboratories Difco Ltda., São Paulo-SP, Brasil) e, antes dos experimentos, foram cultivados por 24 h a 37 °C em *Brain Heart Infusion-Agar (BHI-Agar, Acumedia Manufacturers Inc.)*

#### 4.2. Meios de cultura

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

#### 4.3. Substâncias

A Clorpromazina (CPMZ) e o Brometo de Etídio (EtBr) foram dissolvidos em água destilada estéril, enquanto o Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) foi dissolvido em metanol/água (1:3, v/v). O Norfloxacin, assim como o Carvacrol (CAR) e o Timol (THY), foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e em água estéril. Todas as substâncias foram diluídas para uma concentração padrão de 1024 µg/mL. A proporção de DMSO usado foi inferior a 5%. Nos testes de obtenção do CIM, a cada microdiluição a concentração de DMSO foi reduzida pela metade, estando presente em cada poço das placas nas seguintes proporções: 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,3125%, 0,15625%, 0,078125%, 0,0390625%, 0,01953125%. Nos testes de associação dos terpenos com Norfloxacin e EtBr, a proporção de DMSO foi de 0,16% em todos os poços das placas.

#### 4.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As cepas utilizadas nos ensaios foram semeadas 24h antes dos experimentos. Após esse período, o inóculo bacteriano foi suspenso em solução salina, correspondendo a 0,5 na escala de McFarland, aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  (UFC)/mL. Os *Eppendorfs*® foram então preenchidos com 900 µL de BHI e 100 µL do inóculo e as placas foram preenchidas com 100 µL da solução final. A microdiluição foi realizada com 100 µL em diluições seriadas até o penúltimo poço da placa (1:1), sendo este último utilizado como controle de crescimento. As concentrações dos compostos variaram de 512 µg/mL a 8,0 µg/mL. Após 24 h de incubação, as leituras foram realizadas adicionando Resazurina (7-hidroxi-10-oxidofenoxazin-10-ium-3-ona) na concentração de 400 µg/mL. A resazurina foi oxidada na presença do meio ácido causado pelo crescimento bacteriano, promovendo a mudança da cor do azul para o rosa [67]. A CIM foi definida como a concentração mais baixa em que nenhum crescimento pode ser observado [68]. Os testes foram realizados em triplicata.

#### 4.5. Avaliação da inibição da bomba de efluxo por modificação da CIM do Norfloxacin e do Brometo de Etídio (EtBr)

Para observar se CAR e THY, atuam como potenciais inibidores da bomba de efluxo NorA, foi utilizado um estudo comparativo entre os efeitos dos inibidores padrão da bomba de efluxo, avaliando a capacidade de ambos em diminuir a CIM de EtBr e do antibiótico Norfloxacin. Os inibidores padrão, CCCP (concentração de 2 µg/mL para SA-1199B e 1 µg/mL para SA-1199) e CPMZ (concentração de 128 µg/mL para SA-1199B e SA-1199) foram usados para fornecer a expressão de a bomba NorA pelas cepas testadas. A inibição da bomba de efluxo foi testada usando uma concentração subinibitória (CIM/8) dos inibidores e CAR e THY. Nos testes, 170 µL de cada inóculo bacteriano suspenso em solução salina, correspondente a 0,5 da escala de McFarland, aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  (CFU)/mL, foi adicionado junto com os inibidores e CAR e THY (CIM/8)

e completado com BHI *Eppendorf*®. Estes foram então transferidos para placas de microdiluição de 96 poços, às quais, 100 µL de antibiótico ou EtBr foram adicionados em diluições em série (1:1) variando de 512 a 0,25 µg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24h e o crescimento bacteriano foi avaliado com resazurina (7-hidroxi-10-oxidofenoxazin-10-ium-3-ona) na concentração de 400 µg/mL. A resazurina foi oxidada na presença de um meio ácido causado pelo crescimento bacteriano, causando a mudança de cor de azul para rosa [67]. A CIM foi definida como a concentração mais baixa em que nenhum crescimento pode ser observado [68]. A CIM dos controles foi avaliada utilizando apenas placas com antibiótico Norfloxacino e com EtBr.

#### 4.6. Controle negativo

Para o controle negativo, foram utilizadas as últimas fileiras das cavidades da placa de microdiluição, onde foram adicionados apenas o meio de cultura e o inóculo bacteriano, sem adição das substâncias testadas, tendo em vista a formação máxima do número de colônias bacterianas, além de comprovar que o inóculo foi adicionado corretamente ao *Eppendorfs*®. No entanto, esses números não foram somados as tabelas de resultados devido à impossibilidade de mensurar o número de colônias formadas em um período de 24 horas após os testes microbiológicos. Porém, após esse período, foi constatada a presença de bactérias vivas com adição de 20 µL de Resazurina nos últimos poços da placa de microdiluição.

#### 4.7. Docking

Neste estudo, um procedimento de *docking* molecular foi realizado usando o programa Molegro Virtual Docker (MVD). O procedimento foi avaliado automaticamente usando o algoritmo de previsão de cavidade baseado em grade. O procedimento flexível teve os ângulos de torção nas cadeias laterais, em torno de 5 Å do centro do local de ligação que foram modificados, enquanto o resto da coluna foi mantido rígido. Os protocolos usados no procedimento de *docking* contemplam o otimizador MolDock como um algoritmo de busca, as execuções foram configuradas para 10, o tamanho máximo da população de 50, iteração máxima de 2000 com fator de escala de 0,50 e taxa de crossover de 0,90. As poses selecionadas foram definidas com um valor padrão de 10. Todos os encaixes foram realizados em 1,0 Å limiar do desvio de média quadrática (RMSD).

#### 4.8. Análise estatística

Os resultados dos testes foram expressos como a média geométrica. A análise de hipótese estatística foi aplicada usando *Two-Way ANOVA*, seguido do teste *post hoc* de Bonferroni, eventuais discrepâncias foram submetidas ao teste T de *Student* para a validação do resultado usando o *software GraphPad Prism 7.0*.

### 5. Conclusão

Os resultados demonstraram que os terpenos Carvacrol e Timol apresentaram moderada atividade antibacteriana contra as cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*, SA-1199 (selvagem) e SA-1199B (superexpressa NorA). Além disso, tanto Carvacrol quanto Timol foram capazes de potencializar a CIM do antibiótico Norfloxacino e do Brometo de etídio, aumentando a eficácia desses substratos contra as cepas de *S. aureus* que expressam NorA. Os resultados do *docking* demonstraram o possível mecanismo molecular responsável pelas interações do Carvacrol e do Timol com a bolsa de ligação da proteína de efluxo NorA, corroborando que possivelmente esses terpenos atuam como inibidores competitivos de NorA. Esses achados, enfatizam a importância de pesquisas voltas ao uso de produtos naturais como alternativas terapêuticas contra a resistência bacteriana, ressaltando o



potencial farmacêutico de Carvacrol e Timol como promissores inibidores da bomba de efluxo NorA, visando o possível futuro uso desses compostos como adjuvantes de antibióticos em terapias que tratem infecções bacterianas.

**Contribuições dos autores:** F.A.B.d.C., S.R.T., H.D.M.C., M.I.; Conceptualização, Supervisão, Coordenação, C.R.d.S.B.; Investigação, Escrita, Preparação do Rascunho Original, J.R.S., R.L.S.P., J.F.S.d.S., S.S.P.d.J., T.P.L., Z.d.S.S.; Realização dos ensaios microbiológicos, I.R.A.d.M.; Realizou a análise in Silico, T.S.d.F., C.D.d.M.O.-T.; Realização da análise estatística, J.P.S.J.; Contribuiu com recursos para a realização do trabalho. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

**Financiamento:** Este estudo foi financiado pela Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP [BP3-0139-00077.01.00 / 18]; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

**Agradecimentos:** Geopark Araripe; FUNCAP; CAPES.

**Conflitos de interesse:** Os autores declaram não haver conflito de interesses.

#### Lista de Abreviações

Ala	Alanina
BHI	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
BHI-Agar	<i>Brain Heart Infusion-Agar</i>
CAR	Carvacrol
CCCP	Carbonil Cianeto m-Clorofenil-Hidrazona
CPMZ	Clorpromazina
DMSO	Dimetilsulfóxido
IBEs	Inibidores de bomba de efluxo
EtBr	Brometo de Etídio
Gly	Glicina
HBond	Ligações de hidrogênio
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Phe	Fenilalanina
RMSD	Desvio de raiz quadrada média
THY	Timol
Val	Valina

#### Referências

1. Youssef, D.; Molony, K. *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Adults. In *Frontiers in Staphylococcus aureus; InTech*, 2017; Vol. 395, pp. 116–124.
2. Grace, D.; Fetsch, A. *Staphylococcus aureus* — A Foodborne Pathogen. In *Staphylococcus aureus; Elsevier*, 2018; pp. 3–10 ISBN 9780128096710.
3. Jang, S. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* and their clinical implications. *J. Microbiol.* **2016**, *54*, 1–8, doi:10.1007/s12275-016-5159-z.

4. Lamut, A.; Peterlin Mašič, L.; Kikelj, D.; Tomašič, T. Efflux Pump Inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria. *Med. Res. Rev.* **2019**, *39*, 2460–2504, doi:10.1002/med.21591.
5. Hassanzadeh, S.; Ganjloo, S.; Pourmand, M.R.; Mashhadi, R.; Ghazvini, K. Epidemiology of efflux pumps genes mediating resistance among *Staphylococcus aureus*; A systematic review. *Microb. Pathog.* **2020**, *139*, 103850, doi:10.1016/j.micpath.2019.103850.
6. Schindler, B.D.; Frempong-Manso, E.; DeMarco, C.E.; Kosmidis, C.; Matta, V.; Seo, S.M.; Kaatz, G.W. Analyses of Multidrug Efflux Pump-Like Proteins Encoded on the *Staphylococcus aureus* Chromosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 747–748, doi:10.1128/AAC.04678-14.
7. Buonerba, F.; Lepri, S.; Goracci, L.; Schindler, B.D.; Seo, S.M.; Kaatz, G.W.; Cruciani, G. Improved Potency of Indole-Based NorA Efflux Pump Inhibitors: From Serendipity toward Rational Design and *Development*. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 517–523, doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01281.
8. Kapp, E.; Malan, S.F.; Joubert, J.; Sampson, S.L. Small Molecule Efflux Pump Inhibitors in *Mycobacterium tuberculosis*: A Rational Drug Design Perspective. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2017**, *18*, 72–86, doi:10.2174/1389557517666170510105506.
9. P. Tegos, G.; Haynes, M.; Jacob Strouse, J.; Md. T.; Khan, M.; G. Bologna, C.; I. Oprea, T.; A. Sklar, L. Microbial Efflux Pump Inhibition: Tactics and Strategies. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 1291–1302, doi:10.2174/138161211795703726.
10. Baugh, S.; Phillips, C.R.; Ekanayaka, A.S.; Piddock, L.J. V.; Webber, M.A. Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69*, 673–681, doi:10.1093/jac/dkt420.
11. El Meouche, I.; Dunlop, M.J. Heterogeneity in efflux pump expression predisposes antibiotic-resistant cells to mutation. *Science* **2018**, *362*, 686–690, doi:10.1126/science.aar7981.
12. Wang, Y.; Venter, H.; Ma, S. Efflux Pump Inhibitors: A Novel Approach to Combat Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. *Curr. Drug Targets* **2016**, *17*, 702–719, doi:10.2174/1389450116666151001103948.
13. Spengler, G.; Kincses, A.; Gajdács, M.; Amaral, L. New Roads Leading to Old Destinations: Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria. *Molecules* **2017**, *22*, 468, doi:10.3390/molecules22030468.
14. Pu, Y.; Zhao, Z.; Li, Y.; Zou, J.; Ma, Q.; Zhao, Y.; Ke, Y.; Zhu, Y.; Chen, H.; Baker, M.A.B.; et al. Enhanced Efflux Activity Facilitates Drug Tolerance in Dormant Bacterial Cells. *Mol. Cell* **2016**, *62*, 284–294, doi:10.1016/j.molcel.2016.03.035.
15. Peixoto-Neves, D.; Silva-Alves, K.S.; Gomes, M.D.M.; Lima, F.C.; Lahlou, S.; Magalhães, P.J.C.; Ceccatto, V.M.; Coelho-de-Souza, A.N.; Leal-Cardoso, J.H. Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2009**, *24*, 341–350, doi:10.1111/j.1472-8206.2009.00768.x.
16. Dhifi, W.; Bellili, S.; Jazi, S.; Bahloul, N.; Mnif, W. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines* **2016**, *3*, 25, doi:10.3390/medicines3040025.
17. Maisanaba, S.; Llana-Ruiz-Cabello, M.; Gutiérrez-Praena, D.; Pichardo, S.; Puerto, M.; Prieto, A.I.; Jos, A.; Cameán, A.M. New advances in active packaging incorporated with essential oils or their main components for food preservation. *Food Rev. Int.* **2017**, *33*, 447–515, doi:10.1080/87559129.2016.1175010.
18. Güvenc, M.; Cellat, M.; Gökçek, İ.; Yavaş, İ.; Yurdagül Özsoy, Ş. Effects of thymol and carvacrol on sperm quality and oxidant/antioxidant balance in rats. *Arch. Physiol. Biochem.* **2019**, *125*, 396–403, doi:10.1080/13813455.2018.1476979.
19. Miladi, H.; Zmantar, T.; Chaabouni, Y.; Fedhila, K.; Bakhrouf, A.; Mahdouani, K.; Chaieb, K. Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens. *Microb. Pathog.* **2016**, *99*, 95–100, doi:10.1016/j.micpath.2016.08.008.
20. Walsh, D.J.; Livinghouse, T.; Goeres, D.M.; Mettler, M.; Stewart, P.S. Antimicrobial Activity of Naturally Occurring Phenols and Derivatives Against Biofilm and Planktonic Bacteria. *Front. Chem.* **2019**, *7*, 1–13, doi:10.3389/fchem.2019.00653.

21. Schmitz, D.; Shubert, V.A.; Giuliano, B.M.; Schnell, M. The broadband microwave spectra of the monoterpenoids thymol and carvacrol: Conformational landscape and internal dynamics. *J. Chem. Phys.* **2014**, *141*, 034304, doi:10.1063/1.4887337.
22. Seuкеp, A.J.; Kuete, V.; Nahar, L.; Sarker, S.D.; Guo, M. Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification. *J. Pharm. Anal.* **2020**, *10*, 277–290.
23. Shriram, V.; Khare, T.; Bhagwat, R.; Shukla, R.; Kumar, V. Inhibiting bacterial drug efflux pumps via phytotherapeutics to combat threatening antimicrobial resistance. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–18, doi:10.3389/fmicb.2018.02990.
24. Guimarães, A.C.; Meireles, L.M.; Lemos, M.F.; Guimarães, M.C.C.; Endringer, D.C.; Fronza, M.; Scherer, R. Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules* **2019**, *24*, 2471, doi:10.3390/molecules24132471.
25. Silveira, Z. de S.; Macêdo, N.S.; Sampaio dos Santos, J.F.; Sampaio de Freitas, T.; Rodrigues dos Santos Barbosa, C.; Júnior, D.L. de S.; Muniz, D.F.; Castro de Oliveira, L.C.; Júnior, J.P.S.; Cunha, F.A.B. da; et al. Evaluation of the Antibacterial Activity and Efflux Pump Reversal of Thymol and Carvacrol against *Staphylococcus aureus* and Their Toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Molecules* **2020**, *25*, 2103, doi:10.3390/molecules25092103.
26. Boye, A.; Addo, J.K.; Acheampong, D.O.; Thomford, A.K.; Asante, E.; Amoaning, R.E.; Kuma, D.N. The hydroxyl moiety on carbon one (C1) in the monoterpene nucleus of thymol is indispensable for antibacterial effect of thymol. *Heliyon* **2020**, *6*, e03492, doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03492.
27. Sharifi-Rad, M.; Varoni, E.M.; Iriti, M.; Martorell, M.; Setzer, W.N.; del Mar Contreras, M.; Salehi, B.; Soltani-Nejad, A.; Rajabi, S.; Tajbakhsh, M.; et al. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phyther. Res.* **2018**, *32*, 1675–1687, doi:10.1002/ptr.6103.
28. Sundaramoorthy, N.S.; Mitra, K.; Ganesh, J.S.; Makala, H.; Lotha, R.; Bhanuvalli, S.R.; Ulaganathan, V.; Tiru, V.; Sivasubramanian, A.; Nagarajan, S. Ferulic acid derivative inhibits NorA efflux and in combination with ciprofloxacin curtails growth of MRSA in vitro and *in vivo*. *Microb. Pathog.* **2018**, *124*, 54–62, doi:10.1016/j.micpath.2018.08.022.
29. Lambert, R.J.W.; Skandamis, P.N.; Coote, P.J.; Nychas, G.-J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *91*, 453–462, doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x.
30. Ben Arfa, A.; Combes, S.; Preziosi-Belloy, L.; Gontard, N.; Chalier, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett. Appl. Microbiol.* **2006**, *43*, 149–154, doi:10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x.
31. Schmitz, D.; Shubert, V.A.; Giuliano, B.M.; Schnell, M. The broadband microwave spectra of the monoterpenoids thymol and carvacrol: Conformational landscape and internal dynamics. *J. Chem. Phys.* **2014**, *141*, 034304, doi:10.1063/1.4887337.
32. Lambert, R.J.W.; Pearson, J. Susceptibility testing: Accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *88*, 784–790, doi:10.1046/j.1365-2672.2000.01017.x.
33. Lekshmi, M.; Ammini, P.; Adjei, J.; M. Sanford, L.; Shrestha, U.; Kumar, S.; F. Varela, M. Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator superfamily in *Staphylococcus aureus*. *AIMS Microbiol.* **2018**, *4*, 1–18, doi:10.3934/microbiol.2018.1.1.
34. Quistgaard, E.M.; Löw, C.; Guettou, F.; Nordlund, P. Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): Structures pave the way. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, *17*, 123–132, doi:10.1038/nrm.2015.25.
35. Liu, M.; Amini, A.; Ahmad, Z. Safranin and its analogs inhibit *Escherichia coli* ATP synthase and cell growth. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *95*, 145–152, doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.11.038.
36. Blanco, P.; Hernando-Amado, S.; Reales-Calderon, J.; Corona, F.; Lira, F.; Alcalde-Rico, M.; Bernardini, A.; Sanchez, M.; Martinez, J. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms* **2016**, *4*, 14, doi:10.3390/microorganisms4010014.

37. Schindler, B.D.; Kaatz, G.W. Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. *Drug Resist. Updat.* **2016**, *27*, 1–13, doi:10.1016/j.drup.2016.04.003.
38. Coutinho, H.D.M.; Brito, S.M.O.; Leite, N.F.; Vandesmet, V.C.S.; Oliveira, M.T.A.; Martins, G.M.A.B.; Silva, A.R.P.; Do Socorro Costa, M. Comparative evaluation of the modulation of antibiotic-activity against strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Rev. Ciencias la Salud* **2015**, *13*, 345–354, doi:10.12804/revsalud13.03.2015.02.
39. Coutinho, H.D.M.; Costa, J.G.M.; Lima, E.O.; Falcão-Silva, V.S.; Siqueira, J.P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy* **2008**, *54*, 328–330, doi:10.1159/000151267.
40. Antibiotics Currently in Global Clinical Development | The Pew Charitable Trusts Available online: <https://www.pewtrusts.org/en/research-and-analysis/data-visualizations/2014/antibiotics-currently-in-clinical-development> (accessed on Sep 14, 2020).
41. Cirino, I.C.S.; Menezes-Silva, S.M.P.; Silva, H.T.D.; de Souza, E.L.; Siqueira-Júnior, J.P. The Essential Oil from *Origanum vulgare* L. and Its Individual Constituents Carvacrol and Thymol Enhance the Effect of Tetracycline against *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy* **2015**, *60*, 290–293, doi:10.1159/000381175.
42. Ali Salehzadeh, Mahsa Sadat Hashemi Doulabi, B.S. et A.J. The Effect of Thyme (*Thymus vulgaris*) Extract on the Expression of norA Efflux Pump Gene in Clinical Strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Genet. Resour.* **2018**, *4*, 26–36, doi:10.22080/jgr.2018.13900.1099.
43. Trombetta, D.; Castelli, F.; Sarpietro, M.G.; Venuti, V.; Cristani, M.; Daniele, C.; Saija, A.; Mazzanti, G.; Bisignano, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 2474–2478, doi:10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005.
44. Maia, G.L. de A.; Falcão-Silva, V. dos S.; Aquino, P.G.V.; Araújo-Júnior, J.X. de; Tavares, J.F.; Silva, M.S. da; Rodrigues, L.C.; Siqueira-Júnior, J.P. de; Barbosa-Filho, J.M. Flavonoids from *Praxelis clematidea* R.M. King and Robinson Modulate Bacterial Drug Resistance. *Molecules* **2011**, *16*, 4828–4835, doi:10.3390/molecules16064828.
45. Monte, D.F.M.; Tavares, A.G.; Albuquerque, A.R.; Sampaio, F.C.; Oliveira, T.C.R.M.; Franco, O.L.; Souza, E.L.; Magnani, M. Tolerance response of multidrug-resistant *Salmonella enterica* strains to habituation to *Origanum vulgare* L. essential oil. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 1–6, doi:10.3389/fmicb.2014.00721.
46. Almeida, R.S.; Freitas, P.R.; Araújo, A.C.J.; Alencar Menezes, I.R.; Santos, E.L.; Tintino, S.R.; Moura, T.F.; Filho, J.R.; Ferreira, V.A.; Silva, A.C.A.; et al. GC-MS Profile and Enhancement of Antibiotic Activity by the Essential Oil of *Ocotea odorifera* and Safrole: Inhibition of *Staphylococcus aureus* Efflux Pumps. *Antibiotics* **2020**, *9*, 247, doi:10.3390/antibiotics9050247.
47. Tintino, S.R.; Oliveira-Tintino, C.D.M.; Campina, F.F.; Silva, R.L.P.; Costa, M. do S.; Menezes, I.R.A.; Calixto-Júnior, J.T.; Siqueira-Junior, J.P.; Coutinho, H.D.M.; Leal-Balbino, T.C.; et al. Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *Microb. Pathog.* **2016**, *97*, 9–13, doi:10.1016/j.micpath.2016.04.003.
48. Dos Santos, J.F.S.; Tintino, S.R.; de Freitas, T.S.; Campina, F.F.; Irwin, I.R.; Siqueira-Júnior, J.P.; Coutinho, H.D.M.; Cunha, F.A.B. In vitro e *in silico* evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2018**, *57*, 22–28, doi:10.1016/j.cimid.2018.03.001.
49. Oliveira, M.M.; Santos, H.S.; Coutinho, H.D.M.; Bandeira, P.N.; da Silva, P.T.; Freitas, T.S.; Rocha, J.E.; Xavier, J.C.; Campina, F.F.; Barbosa, C.R.S.; et al. Spectroscopic characterization and efflux pump modulation of a thiophene curcumin derivative. *J. Mol. Struct.* **2020**, 1215, doi:10.1016/j.molstruc.2020.128291.
50. Kaatz, G.W.; Seo, S.M. Effect of substrate exposure and other growth condition manipulations on norA expression. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *54*, 364–369, doi:10.1093/jac/dkh341.
51. Coêlho, M.L.; Ferreira, J.H.L.; de Siqueira Júnior, J.P.; Kaatz, G.W.; Barreto, H.M.; de Carvalho Melo Cavalcante, A.A. Inhibition of the NorA multi-drug transporter by oxygenated monoterpenes. *Microb. Pathog.* **2016**, *99*, 173–177, doi:10.1016/j.micpath.2016.08.026.

52. Banerjee, A.; Majumder, P.; Sanyal, S.; Singh, J.; Jana, K.; Das, C.; Dasgupta, D. The DNA intercalators ethidium bromide and propidium iodide also bind to core histones. *FEBS Open Bio* **2014**, *4*, 251–259, doi:10.1016/j.fob.2014.02.006.
53. Ultee, A.; Bennik, M.H.J.; Moezelaar, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 1561–1568, doi:10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002.
54. Shapira, R.; Mimran, E. Isolation and Characterization of *Escherichia coli* Mutants Exhibiting Altered Response to Thymol. *Microb. Drug Resist.* **2007**, *13*, 157–165, doi:10.1089/mdr.2007.731.
55. Kachur, K.; Suntres, Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, *0*, 1–12, doi:10.1080/10408398.2019.1675585.
56. Guilhelmelli, F.; Vilela, N.; Albuquerque, P.; Derengowski, L. da S.; Silva-Pereira, I.; Kyaw, C.M. Antibiotic development challenges: The various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*, 1–12, doi:10.3389/fmicb.2013.00353.
57. Johnny, A.K.; Hoagland, T.; Venkitanarayanan, K. Effect of Subinhibitory Concentrations of Plant-Derived Molecules in Increasing the Sensitivity of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 to Antibiotics. *Foodborne Pathog. Dis.* **2010**, *7*, 1165–1170, doi:10.1089/fpd.2009.0527.
58. Schweizer, H.P. Understanding efflux in Gram-negative bacteria: Opportunities for drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2012**, *7*, 633–642.
59. Rao, S., P.; KM, D.; S., K.; BB, N.; MF, V. Antimicrobial Compounds of Plant Origin as Efflux Pump Inhibitors: New Avenues for Controlling Multidrug Resistant Pathogens. *J. Antimicrob. Agents* **2018**, *04*, 1–6, doi:10.4172/2472-1212.1000159.
60. Aron, Z.; Opperman, T.J. The hydrophobic trap—the Achilles heel of RND efflux pumps. *Res. Microbiol.* **2018**, *169*, 393–400, doi:10.1016/j.resmic.2017.11.001.
61. Sharom, F.J. ABC multidrug transporters: Structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* **2008**, *9*, 105–127, doi:10.2217/14622416.9.1.105.
62. Schweizer, H.P. Understanding efflux in Gram-negative bacteria: Opportunities for drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2012**, *7*, 633–642, doi:10.1517/17460441.2012.688949.
63. Opperman, T.J.; Nguyen, S.T. Recent advances toward a molecular mechanism of efflux pump inhibition. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1–16, doi:10.3389/fmicb.2015.00421.
64. Patil, R.; Das, S.; Stanley, A.; Yadav, L.; Sudhakar, A.; Varma, A.K. Optimized Hydrophobic Interactions and Hydrogen Bonding at the Target-Ligand Interface Leads the Pathways of Drug-Designing. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12029, doi:10.1371/journal.pone.0012029.
65. Ng, E.Y.W.; Trucksis, M.; Hooper, D.C. Quinolone resistance mediated by *norA*: Physiologic characterization and relationship to *flqB*, a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus aureus* chromosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 1345–1355, doi:10.1128/AAC.38.6.1345.
66. Couto, I.; Costa, S.S.; Viveiros, M.; Martins, M.; Amaral, L. Efflux-mediated response of *Staphylococcus aureus* exposed to ethidium bromide. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *62*, 504–513, doi:10.1093/jac/dkn217.
67. Elshikh, M.; Ahmed, S.; Funston, S.; Dunlop, P.; McGaw, M.; Marchant, R.; Banat, I.M. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol. Lett.* **2016**, *38*, 1015–1019, doi:10.1007/s10529-016-2079-2.
68. Andrews, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *48*, 5–16, doi:10.1093/jac/48.suppl\_1.5.

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 4. CAPÍTULO III: CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 4.1 Conclusões gerais

- ✚ Os terpenos Carvacrol e Timol, apresentam atividade antibacteriana em cepas de *Staphylococcus aureus*, portadoras da Bomba de Efluxo NorA;
- ✚ Carvacrol e Timol, são capazes de reduzir a CIM do antibiótico de uso padrão Norfloxacino e do Brometo de etídio; atuando como potenciais inibidores da bomba de efluxo NorA;
- ✚ A inibição da bomba NorA pelos terpenos Carvacrol e Timol, possivelmente ocorre através de interações competitivas com os substratos de NorA, pelos mesmos sítios de ligação a essa proteína de efluxo.

### 4.2 Perspectivas de investigações futuras

É esperado a realização de ensaios de PCR em Tempo Real, com o objetivo de verificar a capacidade de Carvacrol e Timol de inibirem a proteína de efluxo NorA através da inibição da expressão gênica do gene *norA*. Também é esperado, a realização de ensaios de dinâmica molecular para investigar os mecanismos de ação de Carvacrol e Timol, utilizando a membrana bacteriana como modelo alvo da ação indireta desses terpenos na inibição da bomba de efluxo NorA. Assim como, a realização de análises por microscopia eletrônica, com o objetivo de verificar danos na estrutura bacteriana principalmente na membrana. Pretende-se também, avaliar a performance *in vivo* dos terpenos Carvacrol e Timol em modelos de infecção como o *Danio rerio*, conhecido. Bem como, a realização de ensaios de toxicidade em embriões deste modelo, devido a presença de genes homólogos aos de humanos, compreendendo um excelente modelo experimental para a avaliação *in vivo* de infecções causadas por bactérias e avaliação da toxicidade de possíveis candidatos a inibidores de bombas de efluxo.

## 5. ANEXOS

### 5.1 Produção científica ligada ao mestrado

[IJMS] ID do manuscrito: ijms-1015899 - Editor Assistente Designado

Caixa de entrada x



Coco Yu <coco.yu@mdpi.com>

11 de nov. de 2020 22:35



para Marcello, Coco, mim, Jackelyne, Thiago, Irwin, Raimundo, Joycy, Sarah, Thais, Zildene, Cícera, José, Henrique, Saulo, Francisco, IJMS

inglês > português Traduzir mensagem

Desativar para: inglês x

Caro Prof. Iriti,

Seu manuscrito foi atribuído a Coco Yu para processamento posterior, que atuará como um ponto de contato para quaisquer perguntas relacionadas ao seu artigo.

Jornal: International Journal of Molecular Sciences  
ID do manuscrito: ijms-1015899

Título: Inibição da bomba de efluxo NorA de Staphylococcus aureus por Carvacrol e Timol

Autores: Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa, Jackelyne Roberta Scherf, Thiago Sampaio de Freitas, Irwin Rose Alencar de Menezes, Raimundo Luiz Silva Pereira, Joycy Francamente Sampaio dos Santos, Sarah Silva Patrício de Jesus, Thais Pereira Lopes, Zildene de Sousa Silveira, Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino, José Pinto Siqueira Júnior, Henrique Douglas Melo Coutinho, Saulo Relison Tintino, Marcello Iriti\*, Francisco Assis Bezerra da Cunha

Received: 11 November 2020

E-mails: [cristinase75@gmail.com](mailto:cristinase75@gmail.com), [jackelyne\\_scherf@yahoo.com.br](mailto:jackelyne_scherf@yahoo.com.br), [thiaocrato@hotmail.com](mailto:thiaocrato@hotmail.com), [irwinalencar@yahoo.com.br](mailto:irwinalencar@yahoo.com.br), [raimundoluizbio@gmail.com](mailto:raimundoluizbio@gmail.com), [joycy.sampaio22@gmail.com](mailto:joycy.sampaio22@gmail.com), [sarahpatricio09@gmail.com](mailto:sarahpatricio09@gmail.com), [thaishonorato001@gmail.com](mailto:thaishonorato001@gmail.com), [zildenesousa15@gmail.com](mailto:zildenesousa15@gmail.com), [datianemorais@hotmail.com](mailto:datianemorais@hotmail.com), [saulorelison@gmail.com](mailto:saulorelison@gmail.com), [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com), [siqueira@dbm.ufpb.br](mailto:siqueira@dbm.ufpb.br), [marcello.iriti@unimi.it](mailto:marcello.iriti@unimi.it), [cunha\\_urca@gmail.com](mailto:cunha_urca@gmail.com)

Você encontra aqui:

<https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review/info/e4e9f4efd90d60bd6b61afa3ef271510>

Atenciosamente,

Sra. Coco Yu

E-Mail: [coco.yu@mdpi.com](mailto:coco.yu@mdpi.com)

Envie para IJMS:

<https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/upload?journal=ijms>

-

MDPI Wuhan Escritório No.6 Jingan Road, 5.5 Creative Industry Park, 25th Floor, Hubei Province, China

MDPI IJMS Editorial Office

St. Alban-Anlage 66, 4052 Basel, Suíça

E-Mail: [ijms@mdpi.com](mailto:ijms@mdpi.com)

<http://www.mdpi.com/journal/ijms>

## 5.2 Produção científica externa ao mestrado

Currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/4805782928575895>

### Artigos publicados

DOI: 10.18095/rnc.v18i2.p28

ORIGINAL

ESTUDO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO E MODULADOR DOS EXTRATOS METANÓLICO E HEXÂNICO DAS ENTRECASCAS DE *Luehea paniculata* Mart. & Zucc. (MALVACEAE)

STUDY OF THE ANTIBACTERIAL AND MODULATORY POTENTIAL OF THE METHANOLIC AND HEXANE EXTRACTS OF THE INNER BARKS OF *Luehea paniculata* Mart. & Zucc. (MALVACEAE)

Isis Oliveira Menezes<sup>1</sup>  
Valérie Christine Romualdo Calou<sup>2</sup>  
Raimundo Luiz Silva Pereira<sup>3</sup>  
Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>4</sup>  
Débora Feitosa Muniz<sup>5</sup>  
Saulo Reilson Tintino<sup>6</sup>  
Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>7</sup>  
João Tavares Calixto Júnior<sup>8</sup>  
Arcélio Viana Colares<sup>9</sup>

#### RESUMO

A resistência microbiana é um dos mais relevantes problemas de saúde pública a nível global, que estimula a pesquisa por novas alternativas farmacológicas. *Luehea paniculata* Mart. & Zucc, também conhecida como açoita-cavalão é uma planta amplamente utilizada no combate a diversas enfermidades, dentre elas, acometimentos por cepas fúngicas e/ou bacterianas. O presente estudo visou determinar as atividades antibacteriana e modulatória dos extratos metanólicos e hexânicos da entrecasca de *L. paniculata* frente a bactérias gram positiva e negativa de cepas padrão e multirresistentes pelo método de microdiluição em caldo para determinação de Concentração Inibitória Mínima e modulação de aminoglicosídeos: gentamicina e ampicilina. Observou-se que os extratos das entrecascas de *L. paniculata* isolados não evidenciaram atividade antibacteriana, entretanto, na atividade nos testes de modulação o extrato metanólico, foi capaz de causar danos as cepas multirresistentes de: *S. aureus* quando associado com ampicilina e *E. coli* e *P. aeruginosa* com gentamicina. Quanto ao extrato hexânico, associado com a ampicilina mostrou-se sinérgico com cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, e com a gentamicina mostrou-se efetividade contra *P. aeruginosa*. Diante dos resultados obtidos, concluímos que os extratos isoladamente não demonstraram atividades antibacterianas significativas. O mesmo não ocorreu quando combinados com antibióticos sintéticos e em especial na *S. aureus*, que devido ao efeito sinérgico já citado, promoveu inibição melhor evidenciada. Portanto, estudos futuros são necessários para o aumento de informações sobre a *Luehea paniculata*, além de testes de citotoxicidade celular e seus fracionamentos por mostrar-se promissora como agente potencializador de antimicrobianos.

**Palavras-chave:** Agentes Antibacterianos, *Luehea paniculata*, Modulação

European Journal of Pharmaceutical Sciences 158 (2021) 105695



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ejps](http://www.elsevier.com/locate/ejps)



### Aminophenyl chalcones potentiating antibiotic activity and inhibiting bacterial efflux pump

Marina Micaele Rodrigues Siqueira<sup>a</sup>, Paulo de Tarso Cavalcante Freire<sup>a,c</sup>,  
Beatriz Gonçalves Cruz<sup>a</sup>, Thiago Sampaio de Freitas<sup>a</sup>, Paulo Nogueira Bandeira<sup>b</sup>,  
Hélio Silva dos Santos<sup>a,b</sup>, Carlos Emídio Sampaio Nogueira<sup>a,c</sup>,  
Alexandre Magno Rodrigues Teixeira<sup>a,c</sup>, Raimundo Luiz Silva Pereira<sup>a</sup>,  
Jayze da Cunha Xavier<sup>a</sup>, Fábria Ferreira Campina<sup>a</sup>, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>a</sup>,  
José Bezerra de Araújo Neto<sup>a</sup>, Maria Milene Costa da Silva<sup>a</sup>, José Pinto Siqueira-Júnior<sup>a</sup>,  
Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Department of Biological Chemistry, Regional University of Ceará, Crato, CE, Brazil  
<sup>b</sup> Science and Technology Center - Course of Chemistry, State University Vale do Acaraú, Sobral, CE, Brazil  
<sup>c</sup> Department of Physics, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil  
<sup>d</sup> Department of Physics, Regional University of Ceará, Juazeiro do Norte, CE, Brazil  
<sup>e</sup> Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Antimicrobial activity  
Antibiotic potentiating activity  
Efflux pump  
Docking

#### ABSTRACT

Chalcones and their derivatives are substances of great interest for medicinal chemistry due to their antibacterial activities. As the bacterial resistance to clinically available antibiotics has become a worldwide public health problem, it is essential to search for compounds capable of reverting the bacterial resistance. As a possibility, the chalcone class could be an interesting answer to this problem. The chalcones (2E)-1-(4-aminophenyl)-3-(phenyl)prop-2-en-1-one (APCHAL), and (2E)-1-(4-aminophenyl)-3-(4-chlorophenyl)prop-2-en-1-one (ACLOPHENYL) were synthesized by the Claisen-Schmidt condensation and characterized by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance (NMR), Fourier-transform infrared (FT-IR), and mass spectrometry (MS). In addition, microbiological tests were performed to investigate the antibacterial activity, modulatory potential, and efflux pump inhibition against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) multi-resistant strains. Regarding the *S. aureus* Gram-positive model, the APCHAL presented synergism with gentamicin and antagonism with penicillin. APCHAL reduced the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of gentamicin by almost 70%. When comparing the effects of the antibiotic modifying activity of ACLOPHENYL and APCHAL, a loss of synergism is noted with gentamicin due to the addition of a chlorine to the substance structure. For *Escherichia coli* (*E. coli*) a total lack of effect, synergistic or antagonistic, was observed between ACLOPHENYL and the antibiotics. In the evaluation of inhibitions of the efflux pump, both chalcones presented a synergistic effect with norfloxacin and ciprofloxacin against *S. aureus*, although the effect is much less pronounced with ACLOPHENYL. The effect of APCHAL is particularly notable against the K2088 (MecA overexpressor) strain, with synergistic effects with both ciprofloxacin and etidimium bromide. The docking results also show that both compounds bind to roughly the same region of the binding site of 199B (MecA overexpressor), and that this region overlaps with the preferred binding region of norfloxacin. The APCHAL chalcone may contribute to the prevention or treatment of infectious diseases caused by multidrug-resistant *S. aureus*.





## Chemical synthesis, molecular docking and MepA efflux pump inhibitory effect by 1,8-naphthyridines sulfonamides

Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino<sup>1</sup>, Saulo Relison Tintino<sup>2</sup>, Débora Feitosa Muniz<sup>2</sup>, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>2</sup>, Raimundo Luiz Silva Pereira<sup>2</sup>, Iéda Maria Begnini<sup>3</sup>, Ricardo Andrade Rebelo<sup>3</sup>, Luiz Everson da Silva<sup>4</sup>, Sandro Lucio Mireski<sup>3</sup>, Michele Caroline Nasato<sup>3</sup>, Maria Isabel Lacowicz Krautler<sup>3</sup>, Pedro Silvino Pereira<sup>1</sup>, Tereza Cristina Leal Balbino<sup>5</sup>, José Galberto Martins da Costa<sup>6</sup>, Fabiela Fernandes Galvão Rodrigues<sup>6</sup>, Alexandre Magno Rodrigues Teixeira<sup>7</sup>, Humberto Medeiros Barreto<sup>8</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>9</sup> ... Teresinha Gonçalves da Silva<sup>1</sup>

Show more

+ Add to Mendeley Share Cite

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105753>

Get rights and content

### RESEARCH ARTICLE

## Modulation of Drug Resistance by Limonene: Inhibition of Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus* Strains RN-4220 and IS-58

Ana Carolina Justino de Araújo<sup>1</sup>, Priscilla Ramos Freitas<sup>1</sup>, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>1</sup>, Débora Feitosa Muniz<sup>1</sup>, Jaime Ribeiro-Filho<sup>3</sup>, Saulo Relison Tintino<sup>1</sup>, José Pinto Siqueira Júnior<sup>1</sup>, José Maria Barbosa Filho<sup>3</sup>, Gabriela Ribeiro de Sousa<sup>3</sup> and Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, URCA, Crato, CE, Brazil; <sup>2</sup>Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, IGIM-FIOCRUZ/BA, Salvador, BA, Brazil; <sup>3</sup>Federal University of Paraíba – UFPB, João Pessoa, Paraíba, Brazil

**Abstract:** *Aims:* This study aimed to investigate the potential of limonene as an efflux pump (EP) inhibitor in *Staphylococcus aureus* strains, RN-4220 and IS-58, which carry EPs for erythromycin (MecA) and tetracycline (TetK), respectively.

*Background:* The evolution of bacterial resistance mechanisms over time has impaired the action of most classes of antibiotics. *Staphylococcus aureus* is a notable bacterium, with high pathogenic potential and demonstrated resistance to conventional antibiotics. Considering the importance of discovering novel compounds to combat antibiotic resistance, our group previously demonstrated the antibacterial properties of limonene, a compound present in the essential oils of several plant species.

### ARTICLE HISTORY

Received: April 14, 2020  
Revised: June 09, 2020  
Accepted: September 09, 2020

DOI:  
10.2174/15892021999210104204718

*Objective:* This study aimed to investigate the potential of limonene as an efflux pump (EP) inhibitor in *Staphylococcus aureus* strains RN-4220 and IS-58, which carry EPs for erythromycin (MecA) and tetracycline (TetK), respectively.

*Method:* The minimum inhibitory concentrations (MIC) of limonene and other efflux pump inhibitors were determined through the broth microdilution method. A reduction in the MIC of ethidium bromide was used as a parameter of EP inhibition.



## Characterization and antibacterial activity of the essential oil obtained from the leaves of *Baccharis coridifolia* DC against multiresistant strains

Priscilla Ramos Freitas<sup>a</sup>, Ana Carolina Justino de Araújo<sup>a</sup>, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>b</sup>, Debora Feitosa Muniz<sup>b</sup>, Janaina Esmeraldo Rocha<sup>a</sup>, José Bezerra de Araújo Neto<sup>a</sup>, Maria Milene Costa da Silva<sup>a</sup>, Raimundo Luiz Silva Pereira<sup>a</sup>, Luiz Everson da Silva<sup>a</sup>, Wanderlei do Amaral<sup>a</sup>, Cicero Deschamps<sup>a</sup>, Saulo Relison Tintino<sup>a</sup>, Jaime Ribeiro-Filho<sup>c</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>b,d</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, UNIM, Regional University of Ceará, Brazil

<sup>b</sup>Laboratory of Biotechnology of Genes and Chemicals Methods, LABBIO, Regional University of Ceará, Brazil

<sup>c</sup>Laboratory of Simulations and Molecular Spectroscopy, LABSIM, Regional University of Ceará, Brazil

<sup>d</sup>Federal University of Piauí, Brazil

<sup>e</sup>Geopla Minir Santos, Grande Cruz Foundation (COM-PROCEL/04), Rua Waldemar Fidalgo, 121, Condição 41296-710, Sobradinho, Bahia, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
*Baccharis coridifolia*  
*Baccharis ohi*  
*Pseudomonas aeruginosa*  
*Staphylococcus aureus*  
 Antibacterial agents  
 Essential oils

### ABSTRACT

Essential oils are secondary metabolites with immense pharmacological potential. These substances are abundantly produced by plants of the family Asteraceae, such as *Baccharis coridifolia*. Previous studies have demonstrated that this species has pharmacological properties that make it a promising source of new antibacterial agents. Therefore, the present study aimed to evaluate the antibacterial and antibiotic-modulating activity of *Baccharis coridifolia* essential oil against multidrug-resistant (MDR) strains. The phytochemical analysis was carried out by gas chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC/MS) and realized the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and antibiotic-modulation from the microdilution method in 96-well plates. It was revealed the presence of germacrene D (22.9%), bicyclogermacrene (17.1%), and (E)-caryophyllene (8.4%) as major components. The minimum inhibitory concentration of essential oil against strains of *Pseudomonas aeruginosa* (512 µg/mL) and *Staphylococcus aureus* (128 µg/mL) demonstrated clinically relevant antibacterial activity. In addition, the combination of inhibitory doses of the oil with conventional antibiotics showed synergism, indicating potentiation of the antibacterial effect. In conclusion, the essential oil of *Baccharis coridifolia* (EUC) presented antibacterial and antibiotic-modulating activities that place this species as a source of molecules useful in the fight against bacterial resistance.



## Do 1,8-naphthyridine sulfonamides possess an inhibitory action against Tet (K) and MsrA efflux pumps in multiresistant *Staphylococcus aureus* strains?

Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino<sup>a,\*</sup>, Saulo Relison Tintino<sup>b</sup>, Débora Feitosa Muniz<sup>b</sup>, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>b</sup>, Raimundo Luiz Silva Pereira<sup>b</sup>, Iêda Maria Begnini<sup>c</sup>, Ricardo Andrade Rebelo<sup>c</sup>, Luiz Everson da Silva<sup>d</sup>, Sandro Lucio Mireski<sup>e</sup>, Michele Caroline Nasato<sup>f</sup>, Maria Isabel Lacowicz Krauter<sup>f</sup>, Pedro Silvano Pereira<sup>g</sup>, Alexandre Magno Rodrigues Teixeira<sup>h</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>f</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>b</sup>, Teresinha Gonçalves da Silva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Pharmacological Properties of Bioactive Products, Department of Analytical, Federal University of Pernambuco, UFPE, Recife, PE, Brazil

<sup>b</sup>Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Department of Biological Chemistry, Regional University of Ceará, UERCA, Oca, CE, Brazil

<sup>c</sup>Department of Chemistry, Regional University of Blumenau, FURB, Inupava Sem, 89130-903, Blumenau, SC, Brazil

<sup>d</sup>Postgraduate Program in Sustainable Territorial Development, Ceará State, Federal University of Piauí, UFPI, Teresina, PI, Brazil

<sup>e</sup>Laboratory of Simulations and Molecular Spectroscopy, Department of Biological Chemistry, Regional University of Ceará, UERCA, Oca, CE, Brazil

<sup>f</sup>Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry, Department of Biological Chemistry, Regional University of Ceará, UERCA, Oca, CE, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
 Antibacterial agent  
 Bacterial resistance  
 Efflux pump  
 Ethidium bromide  
 Synergism

### ABSTRACT

Naphthyridines represent a class of heterocyclic compounds formed by two condensed aromatic rings. This study aimed to evaluate the antibacterial activity and *in vitro* inhibition of efflux resistance mechanisms of a series of 1,8-naphthyridine sulfonamides against strains carrying Tet(K) and MsrA efflux pumps. The efflux pump inhibitory capacity was evaluated by analyzing synergistic effects between 1,8-naphthyridine sulfonamides and standard antibiotics, as well as ethidium bromide. The following 1,8-naphthyridines were used: 4-methyl-N-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Naph 1); 2,5-dichloro-N-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Naph 2); 2,3,4-trifluoro-N-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Naph 7); 3-fluoromethyl-N-(5-chloro-1,8-naphthyridin-2-yl)-benzenesulfonamide (Naph 9). The 1,8-naphthyridine sulfonamide derivatives possessed a potential Tet(K) and MsrA efflux pump inhibitory action.



### Effect of estragole over the RN4220 *Staphylococcus aureus* strain and its toxicity in *Drosophila melanogaster*

Antonio Henrique Bezerra<sup>a</sup>, Sulemy Rodrigues Bezerra<sup>a</sup>, Nair Silva Macêdo<sup>a,b</sup>, Zildene de Sousa Silveira<sup>a,b</sup>, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>a</sup>, Thiago Sampaio de Freitas<sup>a</sup>, Debora Peitona Muniz<sup>a</sup>, Dárcio Luis de Sousa Júnior<sup>a</sup>, José Pinto Siqueira Júnior<sup>c</sup>, Irylório Alves Donato<sup>d</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>e</sup>, Francisco Assis Bezerra da Cunha<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Biopreservation of Standard and Alternative Methods of the Regional University of Ceará - LABBIMA, Crato, Ceará, Brazil

<sup>b</sup> Graduate Program in Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Regional University of Ceará - LABM, Department of Biological Chemistry, Crato, Ceará, Brazil

<sup>d</sup> Laboratory of Microorganisms Genetic (LGM), Federal University of Paraíba-UFPB, Av. Pombal 30811-901, Paraíba, Brazil

<sup>e</sup> Centro de Clínica e Toxicologia de UFPA, Crato, Ceará, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Keywords

Bacterial resistance  
 Antibiotics  
 Efflux pump  
 MDR  
 Antibiotic association

#### ABSTRACT

Among the bacterial resistance mechanisms, efflux pumps are responsible for expelling substances, including bacterial cell antibiotics. Given this problem, studies are investigating new alternatives for inhibiting bacterial growth or enhancing the antibiotic activity of drugs already on the market. With this in mind, this study aimed to evaluate the antibacterial activity of Estragole against the RN4220 *Staphylococcus aureus* strain, which carries the MDR efflux pump, as well as Estragole's toxicity in the *Drosophila melanogaster* arthropod model. The broth microdilution method was used to perform the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) tests. Estragole was used as a sub-inhibitory Concentration (MIC/8) in association with erythromycin and rifediam benzole to assess its combined effect. As for Estragole's toxicity evaluation over *D. melanogaster*, the bioassay bioassay and negative protein methods were used. The results were expressed as an average of sextuplicate replicates. A Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test was used. The present study demonstrated that Estragole did not show a direct antibacterial activity over the RN4220 *S. aureus* strain, since it obtained a MIC > 1024 µg/mL. The association of estragole with erythromycin demonstrated a potentiation of the antibiotic effect, reducing the MIC from 512 to 256 µg/mL. On the other hand, when estragole was associated with rifediam benzole (RFB), an antagonism was observed, increasing the MIC of RFB from 32 to 51,7968 µg/mL, demonstrating that estragole did not inhibit directly the MDR efflux pump mechanism. We conclude that estragole has no relevant direct effect over bacterial growth, however, when associated with erythromycin, this reduced its MIC, potentiating the effect of the antibiotic.



## Microbial Pathogenesis

Volume 149, December 2020, 104528



# Effect of terpinolene against the resistant *Staphylococcus aureus* strain, carrier of the efflux pump QacC and $\beta$ -lactamase gene, and its toxicity in the *Drosophila melanogaster* model

Jackelyne Roberta Scherf<sup>a, \*</sup>, Cristina Rodrigues Barbosa dos Santos<sup>a, \*</sup>, Thiago Sampaio de Freitas<sup>b, \*</sup>, Janaina Esmeraldo Rocha<sup>c, \*</sup>, Nair Silva Macêdo<sup>a, d, e</sup>, Jessyca Nayara Mascarenhas Lima<sup>a, e</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>f</sup>, Francisco Assis Bezerra da Cunha<sup>a, g, h</sup>

Show more

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104528>

Get rights and content



Article

## Essential Oil of *Croton ceanothifolius* Baill. Potentiates the Effect of Antibiotics against Multiresistant Bacteria

Ana C. J. de Araújo <sup>1</sup>, Priscilla R. Freitas <sup>1</sup>, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa <sup>1</sup>, Débora F. Muniz <sup>1</sup>, Janaina Esmeraldo Rocha <sup>1</sup>, José B. de Araújo Neto <sup>1</sup>, Maria M. C. da Silva <sup>1</sup>, Talysson F. Moura <sup>1</sup>, Raimundo L. S. Pereira <sup>1</sup>, Jaime Ribeiro-Filho <sup>2</sup>, Luiz E. da Silva <sup>1</sup>, Wanderlei do Amaral <sup>3</sup>, Cicero Deschamps <sup>3</sup>, Saulo R. Tintino <sup>3</sup>, Marcello Iriti <sup>4</sup>, Sara Vitalini <sup>4\*</sup> and Henrique D. Melo Coutinho <sup>5</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato 63105-000, Brazil; caroljustino@outlook.com (A.C.J.d.A.); priscilla.r.freitas@hotmail.com (P.R.F.); cristinase75@gmail.com (C.R.d.S.B.); deehmuniz78@gmail.com (D.F.M.); janainaesmeraldo@gmail.com (J.E.R.); josebezerra456@gmail.com (J.B.d.A.N.); f.milena.silva2000@gmail.com (M.M.C.d.S.); talyssonsilva@yahoo.com.br (T.F.M.); raimundoluzibio@gmail.com (R.L.S.P.); saulorelison@gmail.com (S.R.T.); hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M.C.)

<sup>2</sup> Gonçalo Moniz Institute, Fundação Oswaldo Cruz (IGM-FIOCRUZ/BA), Salvador 40296-710, Brazil; jaimebrifeirofilho@gmail.com

<sup>3</sup> Setor Litoral, Federal University of Paraná, Curitiba 80060-000, Brazil; luiz\_everson@yahoo.de (L.E.d.S.); wdoamaral@hotmail.com (W.d.A.); cicero@ufpr.br (C.D.)

<sup>4</sup> Department of Agricultural and Environmental Sciences, Milan State University, via G. Celoria 2, 20133 Milan, Italy; marcello.iriti@unimi.it

\* Correspondence: sara.vitalini@unimi.it

Received: 6 December 2019; Accepted: 10 January 2020; Published: 14 January 2020



Article

## Evaluation of the Antibacterial Activity and Efflux Pump Reversal of Thymol and Carvacrol against *Staphylococcus aureus* and Their Toxicity in *Drosophila melanogaster*

Zildene de Sousa Silveira <sup>1,2\*</sup>, Nair Silva Macêdo <sup>1,2\*</sup>, Joycy Francely Sampaio dos Santos <sup>4</sup>, Thiago Sampaio de Freitas <sup>3</sup>, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa <sup>3</sup>, Darcio Luiz de Sousa Júnior <sup>3</sup>, Débora Feitosa Muniz <sup>3</sup>, Lígia Claudia Castro de Oliveira <sup>1</sup>, José Pinto Siqueira Júnior <sup>4</sup>, Francisco Assis Bezerra da Cunha <sup>1</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho <sup>5,6</sup>, Valdir Queiroz Balbino <sup>2</sup> and Natalia Martins <sup>5,6,7\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Semi-Arid Bioprospecting (LABSEMA), Regional University of Cariri-URCA, Crato 63105-000, CE, Brazil; zildenesousa15@gmail.com (Z.d.S.S.); nairmacedo@gmail.com (N.S.M.); joycysampaio22@gmail.com (J.F.S.d.S.); darciojsj@gmail.com (D.L.d.S.); ligiacastro@yahoo.com.br (L.C.C.d.O.); cunha.urca@gmail.com (F.A.B.d.C.)

<sup>2</sup> Graduate Program in Biological Sciences-PPCCB, Federal University of Pernambuco-UPE, Recife 50670-901, PE, Brazil; vqbalbino@gmail.com

<sup>3</sup> Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Regional University of Cariri-URCA, Crato 63105-000, CE, Brazil; thiagocrato@hotmail.com (T.S.d.F.); cristinase75@gmail.com (C.R.d.S.B.); deehmuniz78@gmail.com (D.F.M.)

<sup>4</sup> Laboratory of Microorganism Genetics (LGM), Federal University of Paraíba-UFPB, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; siqueira@lgem.ufpb.br

<sup>5</sup> Faculty of Medicine, University of Porto, Alameda Prof. Hernâni Monteiro, 4200-319 Porto, Portugal

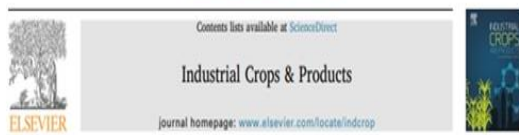
<sup>6</sup> Institute for Research and Innovation in Health (i3S), University of Porto, 4200-135 Porto, Portugal

\* Correspondence: hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M.C.); ncmartins@med.up.pt (N.M.)

Academic Editors: Severina Pacifico and Simona Piccolella

Received: 9 April 2020; Accepted: 27 April 2020; Published: 30 April 2020





Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops &amp; Products

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/indcrop](http://www.elsevier.com/locate/indcrop)

## GC-MS-FID and potentiation of the antibiotic activity of the essential oil of *Baccharis reticulata* (ruiz & pav.) pers. and $\alpha$ -pinene

Priscilla Ramos Freitas<sup>a</sup>, Ana Carolina Justino de Araújo<sup>b</sup>,  
Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>c</sup>, Débora Feitosa Muniz<sup>d</sup>,  
Ana Cristina Albuquerque da Silva<sup>e</sup>, Janaína Esmeraldo Rocha<sup>f</sup>,  
Cícera Dátiane de Moraes Oliveira-Tintino<sup>g</sup>, Jaime Ribeiro-Filho<sup>h</sup>, Luiz Everson da Silva<sup>i</sup>,  
Camila Confortin<sup>j</sup>, Wanderlei do Amaral<sup>k</sup>, Cícero Deschamps<sup>l</sup>, José Maria Barbosa-Filho<sup>m</sup>,  
Nataanael Teles Ramos de Lima<sup>n</sup>, Saulo Reilson Tintino<sup>o</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>o\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biological Chemistry, Regional University of Ceará - URCA, Crato, CE, Brazil

<sup>b</sup> Department of Analytical, Federal University of Pernambuco - UFPE, Recife, Brazil

<sup>c</sup> Ceará Micro Institute, Odebrecht Cruz Foundation - ICM-FIOCRUZ/BA, Salvador, Brazil

<sup>d</sup> Post Graduation Course of Sustainable Territorial Development, Federal University of Paraná - UFPR, Maringá, Brazil

<sup>e</sup> Department of Chemical Technology, Federal University of Paraná - UFPR, Curitiba, Brazil

<sup>f</sup> Post Graduation Course of Agronomy, Federal University of Paraná - UFPR, Curitiba, Brazil

<sup>g</sup> Department of Pharmacy, Federal University of Paraíba - UFPB, João Pessoa, PB, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

*Baccharis reticulata*  
 $\alpha$ -pinene  
*Pseudomonas aeruginosa*  
Antibiotics

## ABSTRACT

The genus *Baccharis* (Asteraceae) demonstrated the presence of compounds with antibacterial, antifungal and antioxidant activities. Because of the increasing rates of antimicrobial resistance, adequate treatment of infections caused by Gram-negative bacteria has become challenging. The objective of the present study was to evaluate the antibacterial and antibiotic modulating activity of the essential oil obtained from *Baccharis reticulata* (Ruiz & Pav.) Pers. and the compound  $\alpha$ -pinene against *Pseudomonas aeruginosa* and other multidrug-resistant bacteria. An analysis by gas chromatography associated with mass spectrometry (GC-MS) revealed the presence of dilapiol (33.8%),  $\alpha$ -pinene (31.7%) and  $\beta$ -pinene (9.4%) as major components of the oil. The determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) revealed that the oil has antibacterial activity against *S. aureus* only. However, the oil potentiated the norfloxacin and gentamicin against all strains evaluated. Also,  $\alpha$ -pinene increased the activity of norfloxacin against *E. coli*, as well as potentiated the activity of norfloxacin and gentamicin against *S. aureus*. Therefore, the authors conclude that the essential oil of *B. reticulata*, as well as the compound  $\alpha$ -pinene, have antibacterial and antibiotic-modulating activities that make them useful in the de-



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox)

## GC-MS-FID characterization and antibacterial activity of the *Mikania cordifolia* essential oil and limonene against MDR strains

Ana Carolina Justino de Araújo<sup>a</sup>, Priscilla Ramos Freitas<sup>b</sup>,  
Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>c</sup>, Débora Feitosa Muniz<sup>d</sup>, Janaína Esmeraldo Rocha<sup>e</sup>,  
Ana Cristina Albuquerque da Silva<sup>f</sup>, Cícera Dátiane de Moraes Oliveira-Tintino<sup>g</sup>,  
Jaime Ribeiro-Filho<sup>h</sup>, Luiz Everson da Silva<sup>i</sup>, Camila Confortin<sup>j</sup>, Wanderlei do Amaral<sup>k</sup>,  
Cícero Deschamps<sup>l</sup>, José Maria Barbosa-Filho<sup>m</sup>, Nataanael Teles Ramos de Lima<sup>n</sup>,  
Saulo Reilson Tintino<sup>o</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>o\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biological Chemistry, Regional University of Ceará - URCA, Crato, CE, Brazil

<sup>b</sup> Department of Analytical, Federal University of Pernambuco - UFPE, Recife, PE, Brazil

<sup>c</sup> Ceará Micro Institute, Odebrecht Cruz Foundation, ICM-FIOCRUZ/BA, Salvador, BA, Brazil

<sup>d</sup> Post Graduation Course of Sustainable Territorial Development, Federal University of Paraná, UFPR, Maringá, PB, Brazil

<sup>e</sup> Department of Chemical Technology, Federal University of Paraná, UFPR, Curitiba, PB, Brazil

<sup>f</sup> Post Graduation Course of Agronomy, Federal University of Paraná, UFPR, Curitiba, PB, Brazil

<sup>g</sup> Department of Pharmacy, Federal University of Paraíba - UFPB, João Pessoa, PB, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

*Mikania cordifolia*  
Limonene  
Bacterial resistance  
Antibiotics  
Modulation

## ABSTRACT

The present study evaluated the effect of the essential oil of *Mikania cordifolia* (EYM) and its major constituent limonene alone or associated with antibacterial drugs against Multidrug Resistant Bacteria (MDR). To evaluate the antibacterial activity, the minimum inhibitory concentrations (MIC) of the oil and limonene against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were determined. The antibiotic-modulating activity was assessed using subinhibitory concentrations (MIC/8) of these substances in combination with conventional antibacterial drugs. Although no relevant antibacterial activity of the natural products was detected, both substances modulated the action of antibiotics against resistant bacteria. The EYM demonstrated the best modulating effect against *P. aeruginosa*, presenting synergistic effects when associated with gentamicin and norfloxacin. In addition, the oil reduced the MIC of norfloxacin against *E. coli* as well as reduced the MIC of gentamicin against *S. aureus*. On the other hand, the best effect of limonene was obtained against *S. aureus*. Thus, it is concluded that the essential oil of *Mikania cordifolia* and the isolated compound limonene do not have clinically significant antibacterial effect, but modulate the action of antibiotics against MDR bacteria.

## Phytochemical analysis, antibacterial activity and antibiotic modifying action of *Jatropha mollissima* (Pohl.) Baill. (Euphorbiaceae)

Noelly Bastos-Cavalcante<sup>1</sup>, Cristina Rodrigues dos Santos-Barbosa<sup>2</sup>, Raimundo Luiz Silva-Pereira<sup>2</sup>, Débora Feltosa-Muniz<sup>2</sup>, Henrique Douglas de Melo-Coutinho<sup>3</sup>, Larissa Araújo-Rolim<sup>4</sup> & Jackson Roberto Guedes da Silva-Almeida<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Center for Studies and Research of Medicinal Plants, Federal University of San Francisco Valley, Petrolina-PE, Brazil.  
<sup>2</sup> Department of Biological Sciences, Regional University of Cariri, Crato-CE, Brazil.

### Resumen

Correspondence:  
 N.B. Cavalcante  
 E-mail: [lys.cavalcante@hotmail.com](mailto:lys.cavalcante@hotmail.com)

Received: 2 January 2020  
 Accepted: 23 May 2020  
 Published on-line: 15 June 2020

**Análisis fitoquímico, actividad antibacteriana y acción moduladora de antibióticos de *Jatropha mollissima* (Pohl.) Baill. (Euphorbiaceae)**

La aparición de cepas bacterianas resistentes y los efectos secundarios de sus fármacos disponibles han hecho investigar nuevos compuestos antibacterianos bioactivos. *Jatropha mollissima* es una planta endémica del bioma Caatinga, Brasil. Existen informes en la literatura de que esta especie tiene acción antioxidante, antibacteriana y antiproliferativa. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial antibacteriano y modulador de *J. mollissima* contra cepas bacterianas multiresistentes. El perfil fitoquímico se obtuvo por cromatografía de gases junto con espectrometría de masas. *J. mollissima* mostró actividad antibacteriana moderada y moduló la actividad del antibiótico Norfloxacin, promoviendo una relación antagonista. Este fue el primer estudio de este tipo realizado con *J. mollissima*.

**Palabras clave:** *Jatropha mollissima*; Euphorbiaceae; Actividad Antibacteriana; Terpenos.

### Abstract

Send Orders for Reprints to [reprints@benjaminscience.net](mailto:reprints@benjaminscience.net)

Current Drug Metabolism, 2020, 21, 600-600

1

### RESEARCH ARTICLE

## Inhibition of Efflux Pumps by Monoterpene ( $\alpha$ -Pinene) and Impact on *Staphylococcus aureus* Resistance to Tetracycline and Erythromycin

Priscilla R. Freitas<sup>1</sup>, Ana Carolina J. de Araújo<sup>1</sup>, Cristina R. Barbosa<sup>1</sup>, Débora F. Muniz<sup>1</sup>, Saulo R. Tintino, Jaime Ribeiro-Filho<sup>2</sup>, José P. Siqueira Júnior<sup>3</sup>, José Maria Barbosa Filho<sup>4</sup>, Gabriela R. de Sousa<sup>4</sup> and Henrique D.M. Coutinho<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Chemistry, UIRCA, Crato, Brazil; <sup>2</sup>Department of Molecular Biology, UFPA, João Pessoa, Brazil; <sup>3</sup>Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Compounds, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; <sup>4</sup>Department of Pharmacy, UFPA, João Pessoa, Brazil

**Abstract:** Infectious diseases have been responsible for an increasing number of deaths worldwide. *Staphylococcus aureus* has been recognized as one of the most notable causative agents of severe infections, while efflux pump (EP) expression is one of the main mechanisms associated with *S. aureus* resistance to antibiotics.

**Objective:** This study aimed to investigate the potential of  $\alpha$ -pinene as an efflux pump inhibitor in species of *S. aureus* carrying the TetK and MsrA proteins.

**Methods:** The minimum inhibitory concentrations (MIC) of  $\alpha$ -pinene and other efflux pump inhibitors were assessed using serial dilutions of each compound at an initial concentration above 1024  $\mu$ g/ml. Solutions containing culture medium and bacterial inoculums were prepared in test tubes and subsequently transferred to 96-well microdilution plates. The modulation of ethidium bromide (EtBr) and antibiotics (tetracycline and erythromycin) was investigated through analysis of the modification in their MICs in the presence of a subinhibitory concentration of  $\alpha$ -pinene (MICs). Wells containing only culture medium and bacterial inoculums were used as negative control. Carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) was used as a positive control.

**Results:** The MIC of ethidium bromide against *S. aureus* strains RN-4220 and IS-58 was reduced by association with  $\alpha$ -pinene. This monoterpene potentiated the effect of tetracycline against the IS-58 strain but failed in modulating the antibacterial effect of erythromycin against RN-4220, suggesting a selective inhibitory effect on the TetK EP by  $\alpha$ -pinene.

**Conclusion:** In conclusion,  $\alpha$ -pinene has promising effects against *S. aureus* strains, which should be useful in the combat of antibacterial resistance associated with EP expression. Nevertheless, further research is required to fully characterize its molecular mechanism of action as an EP inhibitor.

**Keywords:**  $\alpha$ -pinene, monoterpene, *Staphylococcus aureus*, TetK protein, MsrA protein, efflux pump inhibitors.

### 1. INTRODUCTION

Infectious diseases have been responsible for an increasing number of deaths worldwide. The rise in mortality rates for bacterial diseases has been directly correlated with the emergence of multidrug-resistant (MDR) strains, which impair the pharmacologi-

cal mechanisms of resistance to antibiotics in *S. aureus*. Efflux pumps are transmembrane proteins present in several cell types that actively transport drugs, solvents, and toxic substances to the extracellular medium. In the context of antibiotic therapy, EP activation results in reduced intracellular concentrations that consequently impair the therapeutic action of antibiotics [6, 7]. Studies have

Copyright © 2020, Benjamins Science Publishing Co.



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/micpath](http://www.elsevier.com/locate/micpath)

## *Parkia platycephala* lectin enhances the antibiotic activity against multi-resistant bacterial strains and inhibits the development of *Haemonchus contortus*

Romerio R.S. Silva<sup>a</sup>, Carolina R. Silva<sup>b</sup>, Valdenice F. Santos<sup>c</sup>, Cristina R.S. Barbosa<sup>a</sup>, Debra F. Muniz<sup>d</sup>, Ana L.E. Santos<sup>e</sup>, Maria H.C. Santos<sup>f</sup>, Bruno A.M. Rocha<sup>g</sup>, Karla L.R. Batista<sup>a</sup>, Lívio M. Costa-Júnior<sup>h</sup>, Henrique D.M. Coutinho<sup>h</sup>, Claudener S. Teixeira<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Federal do Maranhão, Chapadão, Maranhão, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Psicologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Química Biológica, Universidade Regional de Cariri, Crato, Ceará, Brazil

<sup>d</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brazil

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Anticancer  
Antibiotic  
Genotoxicity  
Lectin  
Agglutination

## ABSTRACT

Lectins have been studied in the past few years as an alternative to inhibit the development of pathogenic bacteria and gastrointestinal nematodes of small ruminants. The development of new antibacterial and anthelmintic compounds is necessary owing to the increase in drug resistance among important pathogens. Therefore, this study aimed to evaluate the capacity of a glucose/mannose-binding lectin from *Parkia platycephala* seeds (PPL) to inhibit the development of *Haemonchus contortus* and to modulate antibiotic activity against multi-resistant bacterial strains, thereby confirming its efficacy when used in combination with gentamicin. PPL at the concentration of 1.2 mg/mL did not show inhibitory activity on *H. contortus* in the egg hatch test or the exsheathment assay. However, it did show significant inhibition of *H. contortus* larval development with an IC<sub>50</sub> of 0.31 mg/mL. The minimum inhibitory concentration (MIC) obtained for PPL against all tested bacterial strains was not clinically relevant (MIC ≥ 1024 µg/mL). However, when PPL was combined with gentamicin, a significant increase in antibiotic activity was observed against *S. aureus* and *E. coli* multi-resistant strains. The inhibition of hemagglutinating activity by gentamicin (MIC = 50 mM) revealed that it may be interacting with the carbohydrate-binding site of PPL. It is this interaction between the antibiotic and lectin carbohydrate-binding site that may be responsible for the enhanced activity of gentamicin against multi-resistant strains. It can be concluded that PPL showed selective anthelmintic effect, inhibiting the development of *H. contortus* larvae and that it increased the effect of the antibiotic gentamicin against multi-resistant bacterial strains, thus constituting a potential therapeutic resource against resistant bacterial strains and *H. contortus*.

## Journal Pre-proof

The 1,8-naphthylidines sulfonamides are NorA efflux pump inhibitors

Cicera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino, Débora Feitosa Muniz, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa, Raimundo Luiz Silva Pereira, Iêda Maria Beghini, Ricardo Andrade Rebelo, Luiz Everson da Silva, Sandro Lucio Mireski, Michele Caroline Nasato, Maria Isabel Lacowicz Krautler, Pedro Silvino Pereira, José Galberto Martins da Costa, Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues, Alexandro Magno Rodrigues Teixeira, Jaime Ribeiro-Filho, Saulo Reilson Tintino, Irwin Rose Alencar de Menezes, Henrique Douglas Melo Coutinho, Teresinha Gonçalves da Silva

PII: S2213-7165(20)30314-3

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.11.027>

Reference: JGAR 1436

To appear in: *Journal of Global Antimicrobial Resistance*

Received Date: 21 April 2020

Revised Date: 24 October 2020

Accepted Date: 30 November 2020

Please cite this article as: de Moraes Oliveira-Tintino CD, Feitosa Muniz D, dos Santos Barbosa CR, Silva Pereira RL, Maria Beghini I, Andrade Rebelo R, da Silva LE, Lucio Mireski S, Caroline Nasato M, Lacowicz Krautler MI, Silvino Pereira P, Galberto Martins da Costa J, Galvão Rodrigues FF, Rodrigues Teixeira AM, Ribeiro-Filho J, Reilson Tintino S, de Menezes IRA, Melo Coutinho HD, da Silva TG, The 1,8-naphthylidines sulfonamides are NorA efflux pump inhibitors, *Journal of Global Antimicrobial Resistance* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.11.027>





## Tocolytic activity of the *Lippia alba* essential oil and its major constituents, citral and limonene, on the isolated uterus of rats

Luis Pereira de-Morais<sup>a,\*</sup>, Andressa de Alencar Silva<sup>a</sup>, Renata Evaristo Rodrigues da Silva<sup>b</sup>, Roger Henrique Sousa da Costa<sup>b</sup>, Álefe Brito Monteiro<sup>b</sup>, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>a</sup>, Thais de Souza Amorim<sup>c</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>b</sup>, Marta Regina Kempton<sup>d</sup>, Roseli Barbosa<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Biological Chemistry Department, Postgraduate Program in Molecular Bioprocessing, Regional University of Ceará, Parnaíba Campus, 63105-001, Crato, CE, Brazil

<sup>b</sup>Biological Chemistry Department, Postgraduate Program in Biological Chemistry, Regional University of Ceará, Parnaíba Campus, 63105-001, Crato, CE, Brazil

<sup>c</sup>Biological Sciences Department, PhysioPharmacology of Essential Cells Laboratory, Regional University of Ceará, Campus of Parnaíba, 63105-001, Crato, CE, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
*Lippia alba*  
 Citral  
 Limonene  
 Uterus  
 Calcium  
 Organ bath

### ABSTRACT

The species *Lippia alba* (MILL.) N. E. Brown belongs to the Verbenaceae family. It is abundant and grows spontaneously throughout the Brazilian territory. Popularly known as "erva-cidreira", it is widely used because of its sedative, carminative and analgesic properties. The objective of this study was to investigate the mechanism of action of the *L. alba* essential oil (EOA) and its major constituents citral and limonene, on isolated rat uterus muscle. To evaluate the EOA, citral and limonene effect, cumulative concentration curves for EOA and citral (1–600 µg/ml) and for limonene (1–1200 µg/ml) were constructed from contractions of rat uterine strips under a 1 g tension. EOA, citral and limonene dose-dependently relaxed myometrial preparations pre-contracted with 60 mM KCl, 10–2 IU/ml oxytocin, serotonin (10 µM), or ACh (10 µM). The results demonstrate that the EOA, citral and limonene cause relaxation of the uterine smooth muscle. These results suggest that the relaxation induced by EOA, citral and limonene is caused by inhibition of L-type V<sub>0</sub>CC, inhibiting the Ca<sup>2+</sup> current through these channels, although other mechanisms of action are likely to contribute to relaxant activity. There was no involvement of K<sup>+</sup> channels (BKCa, Kcs, K<sub>v</sub>) or cytochrome on the relaxation promoted by EOA. Then studies of the tocolytic effects of EOA, citral and limonene may yield new insights into their therapeutic use.

## Accepted Manuscript

Title: Larvicidal activity of some medicinal plant extracts against filariasis fever mosquito, *Culex quinquefasciatus* (Say.) (Diptera: Culicidae)

Authors: M. Johnson, P. Maharaja, S. Murugesan, N. Janakiraman, I.R.A. Menezes, J.G.M. daCosta, C.R.S. Barbosa, H.D.M. Coutinho

PII: S0147-9571(18)30086-9  
 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.10.004>  
 Reference: CIMID 1216

To appear in:

Received date: 7-6-2018  
 Revised date: 21-10-2018  
 Accepted date: 22-10-2018

Please cite this article as: Johnson M, Maharaja P, Murugesan S, Janakiraman N, Menezes IRA, daCosta JGM, Barbosa CRS, Coutinho HDM. Larvicidal activity of some medicinal plant extracts against filariasis fever mosquito, *Culex quinquefasciatus* (Say.) (Diptera: Culicidae). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.10.004>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.





## Accepted Manuscript

Title: Larvicidal activity of some medicinal plant extracts against filariasis fever mosquito, *Culex quinquefasciatus* (Say.) (Diptera: Culicidae)

Authors: M. Johnson, P. Maharaja, S. Murugesan, N. Janakiraman, I.R.A. Menezes, J.G.M. daCosta, C.R.S. Barbosa, H.D.M. Coutinho

PII: S0147-9571(18)30086-9  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.10.004>  
Reference: CIMID 1216

To appear in:

Received date: 7-6-2018  
Revised date: 21-10-2018  
Accepted date: 22-10-2018

Please cite this article as: Johnson M, Maharaja P, Murugesan S, Janakiraman N, Menezes IRA, daCosta JGM, Barbosa CRS, Coutinho HDM. Larvicidal activity of some medicinal plant extracts against filariasis fever mosquito, *Culex quinquefasciatus* (Say.) (Diptera: Culicidae). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.10.004>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



42

Send Orders for Reprints to [reprints@elsevier.com](mailto:reprints@elsevier.com)

Current Drug Metabolism, 2021, 22, 1-8

1

## RESEARCH ARTICLE

Modulation of Drug Resistance by Limonene: Inhibition of Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus* Strains RN-4220 and IS-58

Ana Carolina Justino de Araújo<sup>1</sup>, Priscilla Ramos Freitas<sup>1</sup>, Cristiana Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>1</sup>, Debona Festosa Muzzi<sup>2</sup>, Jaime Ribeiro-Filho<sup>2</sup>, Saulo Relison Timmo<sup>3</sup>, José Panto Siqueira Junior<sup>3</sup>, José Maria Barbosa Filho<sup>3</sup>, Gabriela Ribeiro de Sousa<sup>3</sup> and Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Chemistry, Regional University of Ceará, URCA, Crato, CE, Brazil; <sup>2</sup>Goiásio Mont: Justina, Orivaldo Cruz Foundation, JGM-FIOCRUZ/BA, Salvador, BA, Brazil; <sup>3</sup>Federal University of Paraíba - UFPB, João Pessoa, Paraíba, Brazil

**Abstract:** *Aim:* This study aimed to investigate the potential of limonene as an efflux pump (EP) inhibitor in *Staphylococcus aureus* strains, RN-4220 and IS-58, which carry EPs for erythromycin (ErsA) and tetracycline (TetK), respectively.

**Background:** The evolution of bacterial resistance mechanisms over time has impaired the action of most classes of antibiotics. *Staphylococcus aureus* is a versatile bacterium, with high pathogenic potential and demonstrated resistance to conventional antibiotics. Considering the importance of discovering novel compounds to combat antibiotic resistance, our group previously demonstrated the antibacterial properties of limonene, a compound present in the essential oils of several plant species.

**Objective:** This study aimed to investigate the potential of limonene as an efflux pump (EP) inhibitor in *Staphylococcus aureus* strains RN-4220 and IS-58, which carry EPs for erythromycin (ErsA) and tetracycline (TetK), respectively.

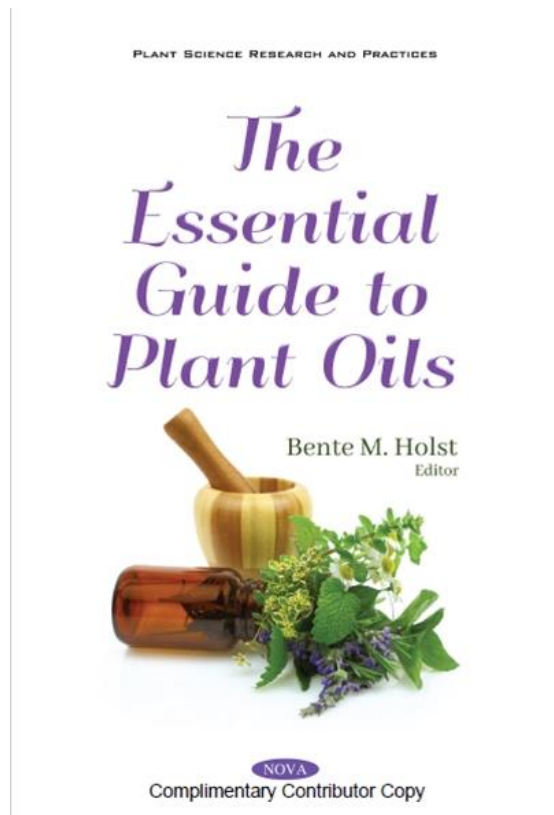
**Method:** The minimum inhibitory concentrations (MIC) of limonene and other efflux pump inhibitors were determined through the broth microdilution method. A reduction in the MIC of ethidium bromide was used as a parameter of EP inhibition.

## ARTICLE HISTORY

Received: April 14, 2020  
Revised: June 08, 2020  
Accepted: September 06, 2020

DOI: [10.1016/j.cimid.2018.10.004](https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.10.004)

## Capítulo de livro publicado



In: The Essential Guide to Plant Oils ISBN: 978-1-53618-008-4  
Editor: Bente M. Holst © 2020 Nova Science Publishers, Inc.

### Chapter 4

#### PHYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE *EUPATORIUM INTERMEDIUM* DC. (ASTERACEAE) ESSENTIAL OIL MODULATORY AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES

*Maysa de O. Barbosa<sup>1</sup>, Samara F. Oliveira<sup>1</sup>,  
Jacqueline C. Andrade<sup>1</sup>, Diógenes de Q. Dias<sup>1</sup>, PhD,  
Cristina R. dos S. Barbosa<sup>2</sup>, Giovana M. de L. Leite<sup>2</sup>,  
Marta R. Kerntopf<sup>2</sup>, PhD, Wanderlei do Amaral<sup>3</sup>, PhD,  
Cicero Deschamps<sup>3</sup>, PhD, Luiz E. da Silva<sup>3</sup>, PhD  
and Henrique D. M. Coutinho<sup>2,\*</sup>, PhD*

<sup>1</sup>Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Brazil

<sup>2</sup>Regional University of Cariri, Crato, Ceará, Brazil

<sup>3</sup>Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil