



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

JACKELYNE ROBERTA SCHERF

EFEITO DO TERPINOLENO CONTRA CEPA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE,
PORTADORA DA BOMBA DE EFLUXO QacC E DO GENE DE β -LACTAMASE E SUA
TOXICIDADE NO MODELO DE *Drosophila melanogaster*

CRATO - CE

2021

JACKELYNE ROBERTA SCHERF

EFEITO DO TERPINOLENO CONTRA CEPA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE,
PORTADORA DA BOMBA DE EFLUXO QacC E DO GENE DE β -LACTAMASE E SUA
TOXICIDADE NO MODELO DE *Drosophila melanogaster*

Relatório de Defesa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Química Biológica.

Orientador: Prof. Dr. FRANCISCO ASSIS BEZERRA DA CUNHA

CRATO - CE
2021

JACKELYNE ROBERTA SCHERF

EFEITO DO TERPINOLENO CONTRA CEPA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE,
PORTADORA DA BOMBA DE EFLUXO QacC E DO GENE DE β -LACTAMASE E SUA
TOXICIDADE NO MODELO DE *Drosophila melanogaster*

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

Relatório de Dissertação defendido em: 22 de fevereiro de 2021

Banca examinadora:

Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha
Orientador
(URCA)

Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior
Membro Interno
(URCA)

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

Profa. Dra. Roseli Barbosa
Suplente Interno
(URCA)

Prof. Dr. Saulo Relison Tintino
Suplente Externo
(URCA)

Dedico mais essa conquista a minha família, por sempre me apoiarem e sonharem junto comigo. Sem eles eu não teria conseguido.
Vocês são minha rocha.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir alcançar tantas conquistas nesta existência. Por seu amor e perdão. Mas principalmente por me presentear com uma família tão bondosa, compreensiva e unida.

A minha mãe, Berta Maria Butzen, por ser tão carinhosa, sensível e forte. Por ter me ensinado a amar. Além de sempre me apoiar e incentivar em todos os momentos da minha vida, sendo minha melhor amiga.

Ao meu pai, Ademir José Scherf, por ser uma pessoa tão bondosa e extremamente batalhadora. Agradeço por sempre almejar o melhor para nossa família e ser parte ativa na minha educação de casa.

Ao meu irmão, Ademir José Scherf Júnior. Sou grata por tê-lo em minha vida, por ser o meu ponto calmaria e tranquilidade e por sempre me fazer querer ser uma pessoa melhor.

Ao Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha, pela orientação e os ensinamentos. Além de ter contribuído para o meu amadurecimento como pessoa e pesquisadora. Posso afirmar que o nosso relacionamento foi baseado em admiração, aprendizado e teimosia. Foi muito gratificante ter conquistado a sua amizade e poder usufruir dos conselhos a mim ofertados.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Química Biológica, por serem exemplo de resiliência na pesquisa diante das adversidades. Principalmente as Prof^a. Dr^a. Marta Regina Kerntopf, Roseli Barbosa e Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga por serem modelo de força e resistência no meio acadêmico.

A todos os integrantes do Laboratório de Microbiologia Molecular, em especial ao Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, por todas as dicas e instruções e por sempre estar presente.

A todos os integrantes do Laboratório de Bioprospecção do Semiárido e Métodos Alternativos. Bem como a Universidade Regional do Cariri. Os quais me acolheram e possibilitaram a realização desta dissertação.

Aos meus amigos acadêmicos que conheci na pós-graduação, Dárcio Luiz, Thiago Sampaio, Raimundo Luiz, Zildene Sousa, Nair Macedo, Thais Honorato, Saulo Relison Tintino.

As minhas amigas Cristina e Joycy por terem me escutado e apoiado em momentos difíceis e de grande adaptação. Além de todos os ensinamentos e companheirismo de ambas as partes.

Agradeço imensamente a “família Oliveira”, Geni, Milton, Isaac, Liz e em especial Isis por todos os aprendizados, desabafos, carinho, amizade e companheirismo durante toda minha trajetória de vida.

Aos meus amigos Nathália, Fernanda, Raianne, Isabely, Jamylys e Pedro. Que por muitas vezes foram o pilar para que eu conseguisse alcançar meus objetivos. E por me ajudarem a perceber o quão importante é ter amigos.

Aos amigos, Gustavo Marques, Bilar, André e Gustavo Alencar. Pelas risadas maravilhosas e descontração.

A minha companheira Brenda Maria de Freitas Leite, que me apoiou e me ajudou de inúmeras formas, para que eu conseguisse atingir meus objetivos.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro.

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

SCHERF, J.R. Efeito do Terpinoleno contra cepa de *Staphylococcus aureus* resistente, portadora da bomba de efluxo QacC e do gene de β -lactamase e sua toxicidade no modelo de *Drosophila melanogaster*. Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Universidade Regional do Cariri. p. 60, 2021.

RESUMO

A utilização contínua de antibióticos levou o homem a temer, mais uma vez, as bactérias, tornando as infecções causadas pelas mesmas problemas de saúde pública. O uso inadequado desses fármacos promoveu um ambiente adequado para a seleção de cepas resistentes a antibióticos, ocorrendo essa resistência bacteriana através de mecanismos moleculares de resistência, dentre os quais estão a enzima β -lactamase e as bombas de efluxo. Devido a isso, a necessidade de encontrar inibidores de mecanismos de resistência vem aumentando gradativamente, sendo direcionada para compostos naturais isolados, como o Terpinoleno. Esse composto é um monoterpeneo que possui várias atividades biológicas, mas há uma falta de informações referente a sua atividade antibacteriana. Este trabalho buscou avaliar a atividade antibacteriana do Terpinoleno contra a cepa de *S. aureus* K4100, portadora de bomba de efluxo QacC e β -lactamase, bem como avaliar a sua toxicidade no artrópode modelo *Drosophila melanogaster*. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada por microdiluição em caldo. A inibição de bomba de efluxo foi avaliada por redução do Brometo de Etídio (BrEt), utilizando uma CIM subinibitória. A inibição de β -lactamase foi analisada por redução de CIM subinibitória da Oxacilina. A toxicidade foi verificada pelos parâmetros de mortalidade e ensaio locomotor em *D. melanogaster*. Os resultados demonstraram que o Terpinoleno não apresentou atividade antibacteriana direta (CIM \geq 1024 $\mu\text{g/mL}$). No entanto, quando associado com a Oxacilina (161,26 para 71,83 $\mu\text{g/mL}$), apresentando uma diminuição de mais de 50% e BrEt (45,25 para 32 $\mu\text{g/mL}$) reduzindo a CIM em aproximadamente 30%, foi observado redução da CIM, possivelmente uma inibição de β -lactamase e bomba de efluxo, evidenciando, o aumento da atividade do antibiótico. O composto apresentou mortalidade de *D. melanogaster*, com uma EC_{50} no valor de 34,6 $\mu\text{L/L}$ em 12 horas de exposição. Além disso, apresentou dano no aparelho locomotor a partir da segunda hora de exposição, tendo o efeito aumentando de forma concentração-dependente. Conclui-se que o Terpinoleno apresenta capacidade de aumentar a atividade do antibiótico e do BrEt, através de uma possível inibição de β -lactamase e bomba de efluxo, respectivamente. Assim como toxicidade relevante, apresentando dano ao aparelho locomotor e mortalidade significativa.

PALAVRAS-CHAVE: Agentes antibacterianos; Farmacorresistência Bacteriana; Produtos Naturais; Metil;

SCHERF, J.R. Efeito do Terpinoleno contra cepa de *Staphylococcus aureus* resistente, portadora da bomba de efluxo QacC e do gene de β -lactamase e sua toxicidade no modelo de *Drosophila melanogaster*. Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Universidade Regional do Cariri. p. 60, 2021.

ABSTRACT

The irrational use of antibiotics has led man to fear, once again, bacteria, making infections caused by the same public health problems. The inappropriate use of these drugs promoted an adequate environment for the selection of antibiotic-resistant strains, occurring this bacterial resistance through molecular resistance mechanisms, among which are the β -lactamase enzyme and efflux pumps. The need to find inhibitors of resistance mechanisms is gradually increasing, being directed to isolated natural compounds, such as Terpinolene. This compound is a monoterpene that has several biological activities, but there is a lack of information regarding its antibacterial activity. This work sought to evaluate the antibacterial activity of Terpinolene against the *S. aureus* K4100 strain, which carries a QacC and β -lactamase efflux pump, as well as to evaluate its toxicity in the model arthropod *Drosophila melanogaster*. The determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was performed by microdilution in broth. The efflux pump inhibition was evaluated by reduction of the subinhibitory MIC of Ethidium Bromide (BrEt). The inhibition of β -lactamase was analyzed by reducing subinhibitory MIC of Oxacillin. Toxicity was verified by the parameters of mortality and locomotor assay in *D. melanogaster*. The results showed that Terpinolene did not show direct antibacterial activity (MIC \geq 1024 $\mu\text{g} / \text{mL}$). However, when associated with Oxacillin (161.26 to 71.83 $\mu\text{g} / \text{mL}$) showing a decrease of more than 50% and BrEt (45.25 to 32 $\mu\text{g} / \text{mL}$) reducing MIC by approximately 30%, a reduction in MIC was observed, possibly an inhibition of β -lactamase and an efflux pump, evidencing the increased activity of the antibiotic. The compound showed mortality from *D. melanogaster*, with an EC50 of 34.6 $\mu\text{L} / \text{L}$ in 12 hours of exposure. In addition, it presented damage to the locomotor system after the second hour of exposure, with the effect increasing in a concentration-dependent manner. It is concluded that Terpinolene has the capacity to increase the activity of antibiotic and BrEt, through a possible inhibition of β -lactamase and efflux pump, respectively. As well as

relevant toxicity, presenting damage to the locomotor system and significant mortality.

KEYWORDS: Antibacterial agents; Bacterial drug resistance; Natural products; Methyl;

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

CAPÍTULO 1: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

- Figura 1:** Mecanismos de resistência presentes na bactéria SA K4100 – QacC.....22
- Figura 2:** Estrutura química do Terpinoleno.....23

CAPÍTULO 2: ARTIGO

- Tabela 1:** Concentração Inibitória Mínima (CIM, µg/mL) do Terpinoleno e da Oxacilina contra cepa de *S. aureus* K4100.....40
- Figura 1:** Verificação da presença da β-lactamase.....41
- Figura 2:** Capacidade de inibição da β-lactamase QacC pelo Terpinolene associado à oxacilina, contra a cepa multirresistente SA K4100.....42
- Figura 3:** Capacidade de inibição de bomba de efluxo QacC pelo Terpinolene associado ao Brometo de Etídio, contra a cepa multirresistente SA K4100.....43
- Figura 4:** Efeito tóxico de diferentes concentrações de Terpinoleno em *Drosophila melanogaster*.....44
- Figura 5:** Efeito tóxico de concentrações variáveis de Terpinoleno sobre a capacidade locomotora de *Drosophila melanogaster*.....45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABC – Superfamília de Cassete de Ligação de Adenosina Trifosfato
- ATP – Adenosina Trifosfato
- BHI – Brain heart agar
- BrEt – Brometo de Etídeo
- CCCP – 2-[(3-chlorophenyl) hydrazinylidene] propanedinitrile
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- CL50 – Concentração Letal de 50 %
- CLSI – Clinical & Laboratory Standards Institute
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DMT – Superfamília do Metabólito Transportador de Drogas
- HIA – Heart infusion agar
- MATE – Superfamília multi-antimicrobiana de proteínas de extrusão
- MFS – Grande Superfamília Facilitadora
- PACE – Superfamília de Efluxo de Compostos Antimicrobianos Proteobacterianos
- QAC – Composto de amônia quaternária
- RND – Superfamília de Divisão de Nodulação de Resistência
- SMR – Família de Resistência a Multidrogas

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 Objetivos e Questionamentos	13
1.2 Estratégias de Pesquisa	15
1.3 Estrutura da Dissertação	15
2. CAPÍTULO I: Fundamentação Teórica	18
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.2 Resistência Bacteriana	19
2.3 β -Lactamase	20
2.4 Bomba de Efluxo	21
2.4.1 Proteínas de Efluxo QacC	22
2.5 Terpenos.....	22
2.6 Terpinoleno	23
2.7 Métodos Alternativos e <i>Drosophila melanogaster</i>	23
3. CAPÍTULO II: Manuscrito publicado	32
4. CAPÍTULO III: Considerações Finais	52
4.1 Conclusões Gerais.....	52
4.2 Perspectivas de Investigações Futuras	52
5. ANEXOS	53
5.1 Produção Científica Ligada ao Mestrado.....	53
6 APÊNDICES	54
6.1 Versão do Manuscrito Publicado em Inglês	54

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Objetivos e Questionamentos

A resistência bacteriana a antibióticos torna-se um problema que preocupa a todos no mundo, podendo atingir todas as classes socioeconômicas, sendo identificado como um problema de saúde pública (BOUGNOM et al., 2020). As infecções por bactérias multirresistentes estão aumentando e a uma grande preocupação relacionada ao retorno da humanidade à era pré-antibiótica, já que se estima que em 2050 os casos de mortes relacionadas a infecções cheguem a 10 milhões ultrapassando, assim, mortes por câncer (KRAKER et al., 2016). A globalização interfere diretamente no aumento da propagação dessas doenças, no Brasil há uma preocupação ainda maior, por ser um país emergente e pelos índices já ocuparem a quarta posição de mortalidade (TEIXEIRA et al., 2019).

Há inúmeras causas relacionadas ao surgimento da resistência bacteriana, as principais são uso inadequado de antibióticos, como a utilização em excesso e o não cumprimento da terapia antibacteriana de forma completa, que se dá pela falta de conhecimento e pelo descuido no controle de infecções que levam a ineficiência do tratamento, já que esses medicamentos são utilizados tanto em tratamentos quanto em profilaxia de doenças e procedimentos cirúrgicos (BELLO; DINGLE, 2018).

Estima-se que países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos, tendem a sofrer mais que países desenvolvidos com o caminho que a resistência bacteriana está tomando, já que esses mecanismos de resistência aumentam o custo do tratamento para o paciente, levando ao abandono da terapia (ASTOLFI et al., 2017; HENDRIKSEN et al., 2019). A procura por novas formas de tratamento é impulsionada pelo aumento dos casos de infecções com microorganismos que fazem parte da microbiota normal humana, como *Staphylococcus aureus* (AKANBI et al., 2017).

Dentre os mecanismos de resistência está a β -lactamase, que consiste na produção de enzimas capazes de inativar fármacos que possuam anel β -lactâmico (BELLO; DINGLE, 2018). E a bomba de efluxo que é uma das formas de resistência mais desenvolvidas, seu funcionamento ocorre através de proteínas localizadas na membrana plasmática que possuem a capacidade de extrudar substâncias tóxicas para o meio extracelular (CRUZ et al., 2020).

Esses mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias obrigam a utilização de estratégias alternativas, como a poli antibióticoterapia que consiste no uso de vários antibacterianos associados para combater essas “superbactérias”. Outra estratégia são os inibidores de bomba de efluxo – EPI’s (*efflux pumps inhibitor*), compostos capazes de

reestabelecer a sensibilidade da bactéria para com o antibiótico, potencializando seu efeito, considerando que o EPI mantém o antibiótico dentro da bactéria (KAPP et al., 2017). Portanto, há certa urgência em encontrar substâncias capazes de inativar bombas de efluxo.

Estudos apontam os terpenos como uma classe química de inibidores de efluxo ativo promissora (GONZÁLEZ-RAMÍRES, 2016). Esses compostos são uma classe de metabólitos secundários de determinadas plantas já utilizadas de forma empírica como antibacterianos. Eles são divididos em subgrupos, dentre esses estão os monoterpenos que possuem várias atividades biológicas como antifúngica, anticancerígena e antibacteriana (KUMAR et al., 2020; NORDIN et al., 2020).

Dentre os monoterpenos está o Terpinoleno, que apresenta notável atividade contra fungos e bactérias multirresistentes. Além de apresentar toxicidade contra algas (PINTO et al., 2020; MAHIZAN et al., 2019). Portanto apresenta-se como um importante composto, que pode trazer grande contribuição para linhas de pesquisas voltadas para microrganismos patogênicos. Podendo ser encontrado em óleos essenciais de várias plantas, como *Pseudotsuga menziesii*, *Ribes rubrum*, *Crocus sativus*, entre outros (TISSERAND; YOUNG, 2014).

A pesquisa relacionada à resistência bacteriana possui um caráter socioeconômico e clínico no ponto de vista da área da saúde. Além de contribuir com informações e estudos importantes sobre uma das bactérias que é origem de maior receio entre os pesquisadores, por ter diversos mecanismos de resistência e uma alta virulência. Portanto, é de suma importância à descoberta e o estudo de novas substâncias e de compostos já pré-estudados sobre suas atividades antibacterianas.

Considerando o que foi supracitado sobre *Staphylococcus aureus*, além da atividade antibacteriana é importante verificar a atividade do composto testado combinado ao antibiótico específico para a cepa K4100. Como neste estudo nos propusemos a estudar o composto Terpinoleno, relacionado à cepa SA K4100, a qual possui plasmídeo com dois mecanismos de resistência: expressão da bomba de efluxo QacC e produção de β -lactamase, através da microdiluição em caldo. Portanto, entendemos que seria de grande interesse fazer testes confirmando ambos os mecanismos.

Além dos ensaios realizados também verificamos a toxicidade dessa substância através da utilização de *Drosophila melanogaster*, considerando que um composto com alta toxicidade não pode ser utilizado clinicamente em seres vivos, no entanto pode se fazer uso como desinfetantes, antissépticos e outros.

Portanto, verificamos que o terpinoleno possui um grande potencial, podendo trazer

grandes contribuições para o combate da resistência bacteriana, no entanto foi pouco estudado e a ausência de informações relacionadas a atividade antibacteriana deste composto, como também, a necessidade de estudar sua capacidade de aumentar o efeito bactericida ou bacteriostático quando associado a oxacilina. Além de analisar a atividade tóxica desse composto a partir do ensaio com *Drosophila melanogaster*.

1.2 Estratégias de Pesquisa

Considerando a necessidade de encontrar novas drogas os pesquisadores direcionam os estudos para compostos isolados derivados de plantas, devido os resultados promissores de pesquisas etnofarmacológicas e etnobotânicas. Além do potencial de atividades biológicas que os metabólitos secundários apresentam.

A metodologia de microdiluição em caldo, para análise quantitativa da atividade antibacteriana do composto foi baseada na CLSI (2015) com adaptações. Esse ensaio é um dos mais utilizados em laboratórios de microbiologia, considerando que entre as vantagens da utilização deste, estão a economia de reagentes e a reprodutibilidade.

O teste de associação do antibiótico com o composto foi realizado baseado na metodologia da CLSI (2015) e CLSI (2019), com algumas modificações. Esse ensaio verifica a capacidade do composto de aumentar a atividade bacteriostática ou bactericida do antibiótico e do Brometo de Etídio a partir da interação do composto com um mecanismo de resistência encontrado na cepa testada. Além de ser uma metodologia amplamente utilizada, relativamente simples e se comparado com outras metodologias apresenta um custo-benefício satisfatório.

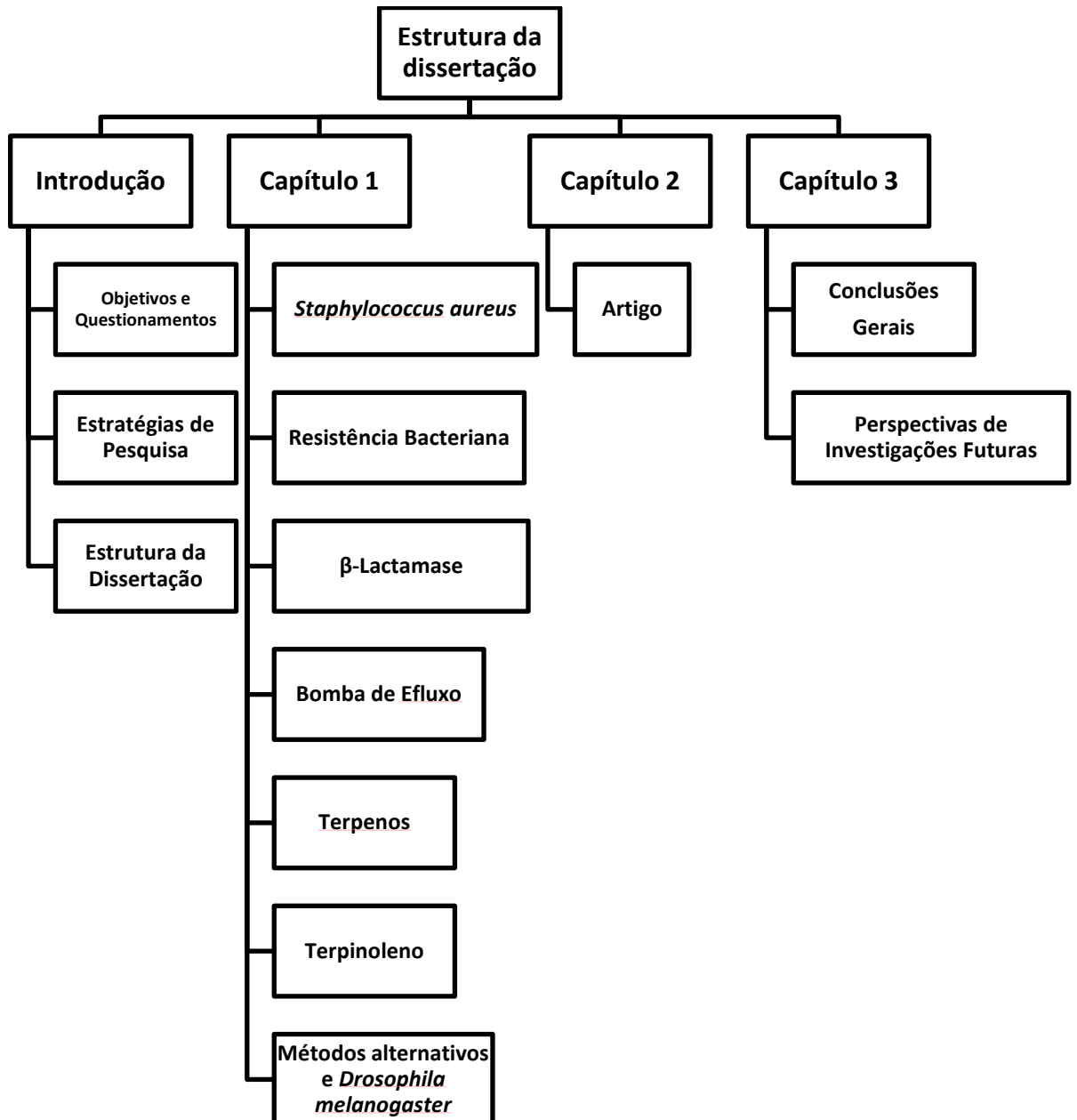
A avaliação da toxicidade do composto é realizada através do modelo-artrópode *D. melanogaster*, com o qual é possível executar dois testes de toxicidade, Geotaxia negativa e Mortalidade por tempo de exposição ao produto. A metodologia utilizada no ensaio de Geotaxia negativa consiste na avaliação do dano ao aparelho locomotor gerado pela exposição do produto (COULOM; BIRMAN, 2004). Já no teste de mortalidade é analisado a quantidade de moscas mortas em um determinado espaço de tempo, o ensaio leva em média 48 horas com leituras em horários pré-definidos (DA CUNHA et al., 2015).

1.3 Estrutura da Dissertação

A dissertação em questão está organizada em quatro capítulos.

- Introdução: Foi dividida em três subtópicos
 - Objetivos e questionamentos: Este tópico trata-se da questão principal

- (GAP) do trabalho com um, resumido, embasamento teórico.
- Estratégias de pesquisa: Neste item foi realizada a explanação da metodologia utilizada e sua justificativa.
 - Estrutura da dissertação: Informa como foi realizada a organização e a estruturação da escrita da dissertação. Considerando quantos capítulos e o que foi referido em cada um deles.
 - Capítulo 1: Referencial teórico, o qual foi dividido em cinco subtópicos
 - *Staphylococcus aureus*: Onde informa as principais características e atualizações referentes a esta bactéria, que foi utilizada neste trabalho.
 - Resistência Bacteriana: Discursa sobre principais os mecanismos de resistência e como eles podem ser propagados.
 - β -Lactamase: Resume a forma de funcionamento da resistência bacteriana por meio de enzima.
 - Bomba de Efluxo: Explica quais são as principais famílias de bombas de efluxo descobertas até o momento e como atua esse mecanismo de resistência. Além de afunilar de forma a atingir a proteína da bactéria utilizada nos testes realizados nesse estudo.
 - Terpenos: Explana sobre os compostos sintéticos terpenos, trazendo suas subclasses.
 - Terpinoleno: Expõem as características químicas do composto utilizado neste trabalho. Considerando a pouca informação encontrada sobre essa substância.
 - *Drosophila melanogaster*: Informa a necessidade da utilização de métodos alternativos, além de apontar as vantagens e a versatilidade de ensaios utilizando o método de *D. melanogaster*.
 - Capítulo 2: Manuscrito.
 - Capítulo 3: Conclusões Gerais, que está dividido em três subtópicos
 - Discussão Geral: Conecta as evidências encontradas neste estudo, conduzindo um raciocínio lógico entre os resultados do estudo e o que foi encontrado na literatura.
 - Perspectivas de Investigações Futuras.
 - Fluxograma:



2. CAPÍTULO I: Fundamentação Teórica

2.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma bactéria caracterizada como cocos Gram-positivas, não esporuladas, não conseguem se mover, são anaeróbias facultativas e apresentam coagulase e catalase positiva, a primeira sendo a forma mais utilizada para diferenciar a bactéria em questão. Normalmente sua incubação leva de 18 a 24 horas, possuindo grande capacidade de crescimento em meios de cultura seletivos ou não. As Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *S. aureus* se apresentam de forma lisa, brilhante, com pigmentação amarelo-dourado e consistência cremosa. Sua parede celular possui ácidos teicoicos interligados, além de outros componentes da superfície (CERVANTES-GARCÍA et al., 2014).

A parede celular de *S. aureus* é composta majoritariamente por peptidoglicanos, tendo como principal função proteger a célula de choques mecânicos ou osmóticos, mas dispendo de flexibilidade suficiente para permitir o crescimento, adaptação e trocas entre o meio interno e externo. Por conseguinte, a mesma está em constante mudança e degradação (VERMASSEN et al., 2019). Na parede celular existem também outros componentes superficiais que estão diretamente ligados à virulência de *S. aureus*.

A capacidade de virulência eleva essa bactéria a um patamar onde se pode afirmar que a mesma possui um acervo de fatores de virulência. Além de sua habilidade de adquirir resistência a inúmeros antibióticos através de constantes mutações e da versatilidade adaptativa, tornando *S. aureus* uma “superbactéria”. Esses fatos preocupam profissionais da área da saúde como também pesquisadores no mundo inteiro (SCHINDLER et al., 2019).

Além de apresentar mecanismos que a fazem resistir aos antibióticos de diversas classes utilizados no tratamento de infecções em geral. Os principais mecanismos de resistência encontrados em *S. aureus* são: Existem quatro principais mecanismos de resistência, tais como enzimáticos, modificações de alvo, permeabilidade da membrana bacteriana e bombas de efluxo (YELLIN; KSHONI, 2018).

Por ser um dos microrganismos mais difundidos na natureza, representa uma ameaça à saúde pública. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2017), essa bactéria foi classificada como patógeno de prioridade II na relação de pesquisa e desenvolvimento no contexto de emergência de saúde pública.

O principal patógeno causador de infecções nosocomiais e comunitárias é *S. aureus*, essas são conhecidas por bacteremia (MAGILL et al., 2018). Na era pré-antibiótica a taxa de

mortalidade por estas chegavam a ~ 80%, após a descoberta dos antibióticos diminuiu e passou a ser cerca de 20 – 30%, indicando que mesmo com tratamentos modernos não foi possível erradicar as mortes por infecções (BENFIELD et al., 2007; GOTO et al., 2017). A ocorrência de infecções por *S. aureus* sucede de forma distinta em relação à classe social de países não industrializados e industrializados, onde o primeiro possui a maior incidência. Outro ponto importante a ser levado em consideração na bacteremia são os grupos de risco que consistem em crianças e idosos, pessoas imunodeprimidas, pacientes dependentes de hemodiálise e a etnia estão diretamente ligadas à incidência (TONG et al., 2015).

Um dos fatores que contribuem muito para o desenvolvimento dessas infecções, é que além dessa bactéria estar disseminada na natureza e a sua patogenicidade ela também está presente no organismo humano, principalmente no trato respiratório superior e em mucosas (ZHEN et al., 2020). Além de ser encontrada também em cerca de 60 % da pele. Portanto, também pode ser considerado um patógeno oportunista, visto que à medida que a defesa do hospedeiro diminui a doença se desenvolve de forma gradativa (DAVID; DAUM, 2017).

2.2 Resistência bacteriana

A partir da descoberta do primeiro antibiótico, a penicilina, pensou-se que os seres humanos estavam a salvo de infecções bacterianas. Apesar desse avanço, diversos fatores implicaram na evolução equivalente desses microrganismos como forma de sobrevivência, desenvolvendo mecanismos de resistência para garantir a perpetuação da espécie (HARKINS et al., 2017). O principal fator que induz essa resistência é o uso irracional de antimicrobianos em humanos e animais (LIU et al., 2021).

Nos últimos anos a resistência bacteriana vem sendo considerada uma das principais crises de saúde pública global (LIU et al., 2021). Esta ocorre a partir de um acontecimento natural onde às bactérias, que antes sensíveis, passam a desenvolver formas de combater os antimicrobianos (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017). Trazendo assim uma forma de seleção natural por meio das substâncias empregadas para deter seu crescimento ou eliminar realmente o patógeno. Onde esses compostos eliminam as bactérias mais fracas e as cepas resistentes são disseminadas (MUNITA et al., 2016).

Atualmente, com a pandemia da COVID-19 o uso de antibióticos no tratamento para evitar coinfeções de bactérias e fungos, muitas vezes sem nenhum programa de “*stewardship*” de antimicrobianos, pode levar a um 'apagão' contra bactérias resistentes (Stevens et al., 2020). Assim, o uso desenfreado de antibióticos tem gerado, como o jornal

americano The Financial Times recentemente definiu, a “pandemia silenciosa da resistência bacteriana” (MENDELSEN, 2021), sendo recomendado que fortes programas de controle do uso de antimicrobianos, especialmente de antibióticos, sejam estabelecidos em protocolos de tratamento pelos serviços de saúde ao redor do mundo buscando mitigar essa ampliação do cenário da resistência bacteriana e reduzir sua repercussão global (GETAHUN et al., 2020).

Existem quatro principais mecanismos que conferem resistência às bactérias: Produção de enzimas inativantes, como as β -lactamases, possuem a capacidade de inativar medicamentos β -lactâmicos através da hidrólise. Existem quatro categorias dessa enzima, que são caracterizadas pelo sistema de classificação molecular chamado de *Ambler*, podendo ser classe A, B, C e D, a caracterização de cada grupo é efetuada através dos aminoácidos que as compõem (BELLO; DINGLE, 2018; DRAWZ; PAPP-WALLACE; BONOMO, 2014). A modificação do alvo do antibiótico atua através da mutação do alvo e não reconhecimento pelo antibiótico ou da ligação a um fator de proteção ou a diminuição do nível de expressão do alvo, diminuindo a afinidade com a substância. Os alvos dependem da substância em ação e da bactéria, podendo haver modificações químicas em proteínas de ligação, DNA, RNA, lipossacarídeos e outros (EICHENBERGER; THADEN, 2019).

A diminuição da permeabilidade da membrana celular ocorre como forma de impedir a entrada do fármaco, considerando que muitos fármacos possuem seus alvos no interior celular impedindo assim o efeito farmacológico (YELIN; KISHONY, 2018). As porinas são canais de difusão cheios de água, muito utilizados por moléculas hidrofílicas para adentrar as células bacterianas, quando a permeabilidade da membrana é reduzida pode ocorrer à diminuição da expressão, o comprometimento da função desses canais ou modificação do tipo de porina. Sendo os compostos hidrofílicos mais afetados quando ocorre a modificação da permeabilidade da membrana externa (BELLO; DINGLE, 2018).

As bombas de efluxo são consideradas o mecanismo de resistência mais rápido e mais efetivo quando a bactéria é exposta a substâncias consideradas tóxicas. Quando ocorre essa exposição são ativadas inúmeras reações complexas que podem levar a super expressão de vários genes de proteínas transportadoras (NICHOLS et al., 2012).

Os mecanismos de resistência possuem origem genética e podem ter sido desenvolvidos por mutação cromossomal ou adquiridos por transferência de genes de resistência de outros patógenos daquele meio (LERMINIAUX; CAMERON, 2019). A transferência desses mecanismos pode ocorrer de diferentes formas, como os plasmídeos e transposons que são os principais mecanismos da transferência horizontal dos genes, adquiridos entre cepas (TURNER et al., 2019). Há também os integrons, que possuem a capacidade de adicionar

novos genes nos cromossomos das bactérias. Portanto uma cepa bacteriana pode expressar mais de um tipo de mecanismo de resistência (MUNITA et al., 2016).

2.3 β -lactamase

As β -lactamases são enzimas muito versáteis por possuírem estruturas moleculares que podem ser encontradas em diversas fontes bacterianas, tanto bactérias Gram-positivas, quanto Gram-negativas. São capazes de hidrolisar a amida β -lactâmica (BELLO; DINGLE, 2018). As β -lactamases podem ser divididas em quatro classes moleculares (A, B, C e D), de acordo com seu tamanho molecular e homologia dos aminoácidos do sítio ativo. As bactérias conseguem realizar a hidrólise do anel β -lactâmico dos antibióticos de duas formas: através da adição de um grupo acila com uma serina de sítio ativo ou por meio de uma reação hidrolítica facilitada por dois íons essenciais de zinco nos sítios ativos das metalo- β -lactamases (BUSH, 2018).

Os β -lactâmicos acilam serina D-Ala-D-Ala carboxipeptidase no sítio ativo de proteínas essenciais ligadas à penicilina – *Penicillin-Binding Proteins* (PBPs). Responsáveis pelos peptídeos para formação de peptidoglicanos para constituição da parede celular (TIPPER; STROMINGER, 1965). Em *S. aureus* a proteína responsável pela resistência é a PC1, codificada pelo gene *blaZ*. No entanto é notória rapidez e o aumento da quantidade de bactérias que expressam múltiplas β -lactamases, com plasmídeos de multirresistência únicos, trazendo uma complicação adicional (TOOK et al., 2019).

2.4 Bomba de efluxo

A síntese de proteínas de bomba de efluxo tem como principal função impedir o acúmulo de substâncias tóxicas através de mecanismos dependentes de energia, podendo ser específicas para um único composto ou não. Dentre esses compostos extrusados estão os antibióticos, configurando assim bactérias que possuem efluxo ativo como um microrganismo multidroga-resistente – MDR (*multidrug resistance*) (EL-BAKY et al., 2019). Essas proteínas estão localizadas na membrana plasmática bacteriana, onde uma parcela é responsável por impedir a entrada de substâncias tóxicas e outra parcela é responsável pelo efluxo e formam um canal para o meio extracelular (DU et al., 2018).

Existem diversas bombas de efluxo entre seis famílias diferentes em *S. aureus*, elas são: a Superfamília Facilitadora – MFS (*major facilitator superfamily*), que utiliza o potencial

eletroquímico de íons ou do soluto; Família de Resistência a Multidrogas – SMR (*family, the small multidrug resistance*), expulsa compostos de amônia e cátions lipofílicos; Família de Extrusão de Compostos Tóxicos e Multidrogas – MATE (*multidrug and toxin extrusion*), utiliza os gradientes de Na^+ e H^+ para o transporte de substâncias. Superfamília de Cassete de Ligação de Adenosina Trifosfato – ABC (*ATP- binding cassette*), utiliza a energia da hidrólise do ATP; Superfamília de Divisão de Nodulação de Resistência – RND (*resistance-nodulation-cell division*), levando o influxo da droga até o meio externo, não deixando-a no periplasma; Superfamília de Efluxo de Compostos Antimicrobianos Proteobacterianos – PACE (*superfamily and the proteobacterial antimicrobial compound efflux*), utiliza o gradiente de H^+ (HASSAN et al., 2015; HASSANZADEH et al., 2020).

2.4.1 Proteínas de Efluxo QacC

As proteínas de efluxo Qac presente em *S. aureus* pertencem a duas famílias de bombas de efluxo, MFS e SMR. Essas famílias contém uma grande quantidade de transportadores de membrana, os quais estão diretamente ligados ao simporte, antiporte e uniporte dos substratos (WASSENAAR et al., 2015).

Qac são proteínas de efluxo que estão localizadas na membrana plasmática. Se subdividem de A a Z, sendo diferenciadas pela classe de plasmídeos que distinguem os substratos extraídos da célula bacteriana. A QacC é responsável por extrusar Amônia Quaternária, corantes e Brometo de Etídio. Seu gene codificador consiste no pSK89. Essa proteína de efluxo contém quatro domínios transmembranas e forma dímeros na membrana plasmática (WASSENAAR et al., 2015).

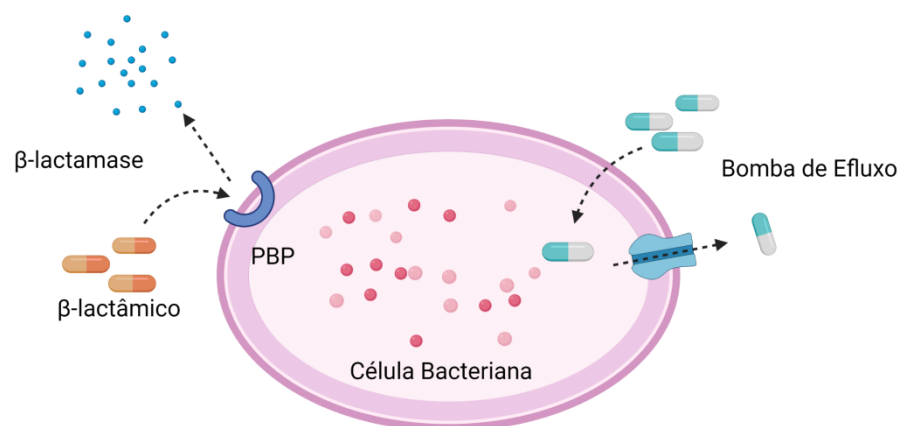


Figura 1. Mecanismos de resistência presentes na bactéria SA K4100 - QacC

2.5 Terpenos

Os terpenos são compostos biossintéticos constituídos por uma porção de isopreno, cerca de 90% de sua estrutura é relacionado ao isopropeno, e classificados de acordo com o número de unidades. Alguns terpenos também sofrem modificações nos seus produtos e derivados, podendo ser caracterizados como terpenóides ou fenilpropanoides (PICHESKY; RAGUSO, 2018). A formação do primeiro composto ocorre pela via do ácido chiquímico podendo ter como precursores o ácido cinâmico ou o p-cumárico, já do segundo acontece através da via do acetato, sendo o precursor dos terpenóides o ácido mevalônico ou pela via não-mevalônica a partir do 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato (URLACHER; GIRHARD, 2019; YAZAKI; ARIMURA; OHNISHI, 2017). Esses compostos possuem várias atividades biológicas como anti-inflamatórias, anticarcinogênicas e neuroprotetoras (KIYAMA, 2017).

Os terpenos se dividem em três principais subclasses, sesquiterpenos, diterpenos e monoterpenos, esse último sendo caracterizados por possuírem 10 carbonos, podendo ser acíclicos, monocíclicos e bicíclicos, apresentando alta volatilidade (PICHESKY; RAGUSO, 2018). Os monoterpenos apresentam várias atividades biológicas como atividade anticancerígena, antifúngica, antibacteriana, dentre outras (KUMAR et al., 2020; NORDIN et al., 2020).

2.6 Terpinoleno

O Terpinoleno (1-metil-4-propano-2-ilidenociclohexeno) é um dos monoterpenos mais abundantes na natureza, sua estrutura química é composta por um propano e um metil, como mostra a figura 1. Possui características lipofílicas, que auxilia na passagem pela membrana plasmática (ZHAO et al., 2020). Esse composto é comumente utilizado como suplemento alimentar por indústrias alimentícias, aromatizantes em fábricas de cosméticos, assim como aditivos pelas farmacêuticas (AGUS; SARP; CEMILOGLU, 2018; SEYYEDNEJAD, 2010).

O Terpinoleno pode ser encontrado em óleos essenciais principalmente de plantas como *Pseudotsuga menziesii*, da família Lamiaceae. No entanto também pode ser encontrada em plantas como *Ribes rubrum*, *Crocus sativus* e outras. Assim como, no tratamento com ácido sulfúrico alcoólico ou na destilação de resinas de coníferas (TISSERAND; YOUNG, 2014). Há estudos que comprovam que esse composto apresenta atividades biológicas como anticancerígena, antioxidante e antifúngica (AYDIN; TÜRKEZ; TAŞDEMİR, 2013; ZHAO et al., 2020).

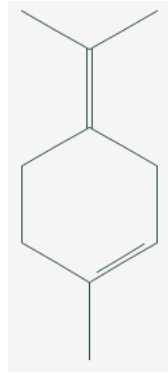


Figura 2. Estrutura química do Terpinoleno

2.7 Drosophila melanogaster

A pesquisa sempre vem se atualizando, em todas as áreas, e com isso há mudanças de metodologias, equipamentos e substâncias utilizadas em testes. Assim como vem se expandindo a utilização de modelos animais, as diretrizes que regem esses ensaios também foram atualizadas introduzindo os princípios de reduzir, substituir e refinar. Sendo necessário um planejamento correto, sempre tendo em mente a utilização somente da quantidade necessária de cobaias (KNOP; MARIA, 2016). Portanto, torna-se de grande importância o uso de novas metodologias alternativas, *in vitro*, para que o pesquisador possa se orientar em relação aos critérios de seu estudo, possuindo assim o apoio desses testes para colocar em prática o princípio supracitado e seguir as normas do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) (FERNANDES; PEDROSO, 2017).

Drosophila melanogaster é um díptero utilizado como método alternativo há mais de 100 anos. Conhecida popularmente como mosca da fruta é sensível a mudanças ambientais. Pertence à família Drosophilidae e faz parte do filo Arthropoda, que é caracterizado pela presença de patas articuladas e exoesqueleto segmentado. Além de possuir características fisiológicas parecidas com as dos vertebrados, podendo assim substituí-los nos estudos (OBOH et al., 2018).

Vem sendo utilizado como organismo modelo em testes genéticos, de biologia molecular e em toxicológicos, nesse último é reconhecido como forma de entender mecanismos de ação de substâncias tóxicas por ser sensível em diferentes níveis a esses compostos, através das hipóteses do estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ROS) (RAND et al., 2014). Apresentam múltiplas vantagens como baixo custo, fácil manuseio, manutenção em laboratório e por se desenvolverem de forma rápida os testes são feitos com precisão em um curto prazo. Além dessa espécie já possuir seu sequenciamento genético

conhecido (HU et al., 2019).

A via de administração mais comum utilizada em teste com esse modelo é a fumigação, que é utilizada com produtos voláteis, já que essa técnica precisa que as substâncias sejam vaporizadas. Mas a administração também pode ser realizada adicionando as drogas na alimentação de *D. melanogaster* (ZHANG et al., 2016).

Referências:

AGUS, H. H.; SARP, C.; CEMILOGLU, M. Oxidative stress and mitochondrial impairment mediated apoptotic cell death induced by terpinolene in: *Schizosaccharomyces pombe*. **Toxicology Research**, [S. l.], v. 7, n. 5, p. 848–858, 2018. DOI: 10.1039/c8tx00100f.

AKANBI, O. E., NJOM, H. A., FRI, J., OTIGBU, A. C., AND 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**, [S.l.], v. 14, n. 1001, 2017. DOI: 10.3390/ijerph14091001

AYDIN, E.; TÜRKEZ, H.; TAŞDEMİR, Ş. Anticancer and antioxidant properties of terpinolene in rat brain cells. **Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju**, [S. l.], v. 64, n. 3, p. 415–424, 2013. DOI: 10.2478/10004-1254-64-2013-2365.

ASTOLFI, A., FELICETTI, T., IRACI, N., MANFRONI, G., MASSARI, S., PIETRELLA, D., Pharmacophore-based repositioning of approved drugs as novel *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 60, p. 1598–1604, 2017. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01439.

BOUGNOM, B.P., THIELE-BRUHN, S., RICCI, V., ZONGO, C., PIDDOCK, L. J. V. Raw wastewater irrigation for urban agriculture in three African cities increases the abundance of transferable antibiotic resistance genes in soil, including those encoding extended spectrum β -lactamases (ESBLs). **Science of Total Environment**, [S.l.], v. 698, 2019. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134201.

BENFIELD, T.; ESPERSEN, F.; FRIMODT-MØLLER, N.; JENSEN, A. G.; LARSEN, A.

R.; PALLESEN, L. V.; SKOV, R.; WESTH, H.; SKINHØJ, P. Increasing incidence but decreasing in-hospital mortality of adult *Staphylococcus aureus* bacteraemia between 1981 and 2000. **Clinical Microbiology and Infection**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 257–263, 2007. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2006.01589.x..

BELLO, A.; DINGLE, T. C. Clinical Microbiology. **Clinical Microbiology Newsletter**, [S. l.], v. 40, n. 20, p. 165–174, 2018. DOI: 10.1016/j.clinmicnews.2018.10.001.

BUSH, K. Past and present perspectives on β -lactamases. American Society for Microbiology, [S. l.], v. 62, n. 10, 2018. DOI: 10.1128/AAC.01076-18.

CERVANTES-GARCÍA, E.; GARCÍA-GONZALES, R.; SALAZAR-SCHETTINO P. M. Características generales del *Staphylococcus aureus*. **Revista Mexicana De Patología Clínica e Medicina Laboratorial**, [S. l.], v. 61, n. 1, p. 28-40, 2014.

CLSI, Clinical and Laboratory Standarts Institute Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing, **Clin. Lab. Stand. Int.** 2015.

CLSI, Clinical and Laboratory Standarts Institute Standarts Development Plicies and Process, **Clin. Lab. Stand. Int.** 2019.

COULOM, H., BIRMAN, S. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*, [S.l.], **Journal Neuroscience**, v. 24, p. 10993–10998, 2004. DOI:10.1523/JNEUROSCI.2993-04.2004.

CRUZ, R. M. D., ZELLI, R., BENSHAIN, S., CRUZ, R. M. D., SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P., DÉCOUT, J. L., MINGEOT-LECLERCQ, M. P., MENDONÇA-JÚNIOR, F. J. B. Synthesis and Evaluation of 2-Aminothiophene Derivatives as *Staphylococcus aureus* Efflux Pump Inhibitors. **Chem Med Chem**, [S.l.], v. 15, p. 716-725, 2020. DOI:doi.org/10.1002/cmdc.201900688.

CUNHA, F. A. B., WALLAU, G. L., PINHO, A. I., NUNES, M.E.M., LEITE, N. F., TINTINO, S. R., DA COSTA, G. M., ATHAYDE, M. L., BOLIGON, A. A., COUTINHO, H. D. M., PEREIRA, A. B., POSSER, T., FRANCO, J. L. Eugenia uniflora leaves essential

oil induces toxicity in *Drosophila melanogaster*: Involvement of oxidative stress mechanisms. **Toxicology Research**, [S.l.], v. 4, p. 634–644, 2015. DOI:10.1039/c4tx00162a.

DAVID, M. Z.; DAUM, R. S. Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 409, p. 325-383, 2017. DOI: 10.1007/82_2017_42.

DRAWZ, S. M.; PAPP-WALLACE, K. M.; BONOMO, R. A. New β -lactamase inhibitors: A therapeutic renaissance in an MDR world. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v. 58, n. 4, p. 1835–1846, 2014. DOI: 10.1128/AAC.00826-13.

DU, D.; WANG-KAN, X.; NEUBERGER, A.; VAN VEEN, H. W.; POS, K. M.; PIDDOCK, L. J. V.; LUISI, Ben F. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. [s.l: s.n.]. v. 16 DOI: 10.1038/s41579-018-0048-6.

EICHENBERGER, E. M.; THADEN, J. T. Epidemiology and mechanisms of resistance of extensively drug resistant gram-negative bacteria. **Antibiotics**, [S. l.], v. 8, n. 2, 2019. DOI: 10.3390/antibiotics8020037.

EL-BAKY, R. M. A.; SANDLE, T.; JOHN, J.; ABUO-RAHMA, G. El Din A.; HETTA, Helal F. A novel mechanism of action of ketoconazole: Inhibition of the nora efflux pump system and biofilm formation in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infection and Drug Resistance**, [S. l.], v. 12, n. July, p. 1703–1718, 2019. DOI: 10.2147/IDR.S201124.

FERNANDES, M. R.; PEDROSO, A. R.. Animal experimentation: A look into ethics, welfare and alternative methods. **Rev Assoc Med Bras**, [S. l.], v. 63, n. 11, p. 923–928, 2017. DOI: 10.1590/1806-9282.63.11.923.

GETAHUN et al. Tackling antimicrobial resistance in the COVID-19 pandemic. **Bull WHO**. v. 98, p. 442-442, 2020. DOI: 10.2471/BLT.20.268573

GONZÁLEZ-RAMÍREZ, A. E., GONZÁLEZ-TRUJANOB, M. E., OROZCO-SUÁREZC, S. A., ALVARADO-VÁSQUEZD, N., LÓPEZ-MUÑOZANEROL, F.J. Nerol Alleviates Pathologic Markers In The Oxazolone-Induced Colitis Model. **European Journal of**

Pharmacology, [S.l.], v. 776, n. 5, p. 81-89, 2016. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.02.036.

GOTO, M. et al. Association of evidence-based care processes with mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia at Veterans Health Administration hospitals, 2003-2014.

JAMA Internal Medicine, [S. l.], v. 177, n. 10, p. 1489–1497, 2017. DOI: 10.1001/jamainternmed.2017.3958.

HARKINS, C. P. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. **Genome Biology**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 1–11, 2017. DOI: 10.1186/s13059-017-1252-9.

HASSAN, K. A.; LIU, Q.; HENDERSON, P. J. F.; PAULSEN, I. T. Homologs of the *Acinetobacter baumannii* aceI transporter represent a new family of bacterial multidrug efflux systems. **mBio**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1–5, 2015. DOI: 10.1128/mBio.01982-14.

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**, [S. l.], v. 139, n. November 2019, p. 103850, 2020. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103850.

HENDRIKSEN, R. S., MUNK, P., NJAGE, P., BUNNIK, B. V., MCNALLY, L., LUKJANCENKO, O., RODER, T., NIEUWENHUIJSE, D., PEDERSEN, S. K., KJELDGAARD, J., KAAS, R. S., CLAUSEN, P. T. L. C., VOGT, J. K., LEEKITCHAROENPHON, P., SCHANS, M. G. M. V., ZUIDEMA, T., HUSMAN, A. M. R., RASMUSSEN, S., PETERSEN, B. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. **Nature Communications**, [S.l.], v. 10, n. 1124, 2019. DOI: 10.1038/s41467-019-08853-3.

HU, X.; FU, W.; YANG, X.; MU, Y.; GU, W.; ZHANG, M. Effects of cadmium on fecundity and defence ability of *Drosophila melanogaster*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 171, n. August 2018, p. 871–877, 2019. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.01.029.

KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A., Action and resistance mechanisms of antibiotics: a guide for clinicians. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v,

33, p. 300-305, 2017. DOI: 10.4103/joacp.JOACP_349_15

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 in Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 18, n. 1, p. 72–86, 2017. DOI:10.2174/1389557517666170510105506.

KIYAMA, R. Estrogenic terpenes and terpenoids: Pathways, functions and applications. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 815, p. 405–415, 2017. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.09.049.

KNOP, L. B.; MARIA, D. A. Métodos substitutivos e a experimentação animal: um enfoque inovador. **RESBCAL**, v. 4, n. 2, p. 101-14, 2016.

KRAKER, M. E. A., STEWARDSON, A. J., HARBARTH, S. Will 10 Million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? **PLoS Med**, [S.l.], v. 13, 2016. DOI:10.1371/journal.pmed.1002184.

KUMAR, A.; KAMAL, A.; SINGH, S.; PADALIA, R. C.; TANDON, S.; CHAUHAN, A.; SAIKIA, D.; VERMA, R. S. Chemical composition, antimicrobial activity, kinetics and mechanism of action of Himalayan-thyme (*Thymus linearis* Benth.). **Journal of Essential Oil Research**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 64–73, 2020. DOI: 10.1080/10412905.2019.1662337.

LERMINIAUX, N. A.; CAMERON, A. D. S. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. **Canadian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 65, n. 1, p. 34–44, 2019. DOI: 10.1139/cjm-2018-0275.

LIU, N.; XU, L.; HAN, L.; HUANG, G.; CIRIC, L. Microbiological safety and antibiotic resistance risks at a sustainable farm under large-scale open-air composting and composting toilet systems. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 401, n. June 2020, p. 123391, 2021. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.123391.

MAGILL, S. S. et al. Changes in prevalence of health care-associated infections in U.S. Hospitals. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 379, n. 18, p. 1732–1744, 2018.

DOI: 10.1056/NEJMoa1801550.

MAHIZAN, N. A. et al., Terpene derivatives as a potential agent against antimicrobial resistance (AMR) pathogens. **Molecules**, [S.l.], v. 24, n. 14, p. 2631, 2019. DOI: 10.3390/molecules24142631.

MENDELSON, M. The silent pandemic of antibiotic resistance. **The Financial Times**. Acessível em: <https://www.ft.com/content/520b0300-1717-4f66-b792-f2f7da7112a3>

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A.; UNIT, Antimicrobial Resistance; SANTIAGO, Alemana De. HHS Public Access Mechanisms of Antibiotic Resistance. **HHS Public Access**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 1–37, 2016. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.Mechanisms.

NICHOLS, R. J. et al. Phenotypic landscape of the cell NIH Public Access. **Cell**, [S. l.], v. 144, n. 1, p. 143–156, 2012. DOI: 10.1016/j.cell.2010.11.052.Phenotypic.

NORDIN, N.; OTHMAN, S. H.; RASHID, S. A.; BASHA, R. K. Effects of glycerol and thymol on physical, mechanical, and thermal properties of corn starch films. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 106, n. December 2019, p. 105884, 2020. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2020.105884.

OBOH, G.; OGUNSUYI, O. B.; OJELADE, M. T.; AKOMOLAFE, S. F. Effect of dietary inclusions of bitter kola seed on geotactic behavior and oxidative stress markers in *Drosophila melanogaster*. **Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 6, n. 8, p. 2177–2187, 2018. DOI: 10.1002/fsn3.782.

Organização Mundial de Saúde. **Lista de Agentes Patogênicos Prioritários**. Organização Mundial da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde, 2017.

PICHERSKY, E.; RAGUSO, R. A. Why do plants produce so many terpenoid compounds? **New Phytologist**, [S. l.], v. 220, n. 3, p. 692–702, 2018. DOI: 10.1111/nph.14178.

PINTO, Â. V.; OLIVEIRA, J. C.; MEDEIROS, C. A. C.; SILVA, S. L.; PEREIRA, F. O. Potentiation of antifungal activity of terbinafine by dihydrojasnone and terpinolene against

dermatophytes. **Lett Appl Microbiol**, [S.l.], 2020. DOI: 10.1111/lam.13371.

RAND, M. D.; MONTGOMERY, S. L.; PRINCE, L.; VOROJEIKINA, D. Developmental toxicity assays using the *Drosophila* model. **Current Protocols in Toxicology**, [S. l.], v. 1, n. SUPPL.59, p. 1–27, 2014. DOI: 10.1002/0471140856.tx0112s59.

SCHINDLER, B. D. et al. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 177, n. 2, p. 103850, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00333.

SEYYEDNEJAD, S.M.; KOOCHAK, H.; NAJAFABADE, F.P.; KOLAHI, M. Allelopathic effect of aquatic hull extract of rice (*Oryza sativa* L.) on growth of *Silybum marianum* and *Echinochloa crus-galli*. **African Journal of Agricultural Research**, [S. l.], v. 5, n. 16, p. 2222-2226, 2010. DOI: 10.5897/AJAR.

STEVENS, M. P.; PATEL, P. K.; NORI, P. Involving antimicrobial stewardship programs in COVID-19 response efforts: All hands on deck. **Infect Control Hosp Epidemiol**. [S.l.], v. 41, n. 6, p. 744-745, 2020. DOI: 10.1017/ice.2020.69. PMID: 32167442; PMCID: PMC7137534.

TEIXEIRA, N. B., CUNHA, M. L. R. S. Prevalence and risk factors for nasal and orofaringeal carriage of *Staphylococcus aureus* in insulin-dependent diabetics in the city of Botucatu, SP. 2019

TIPPER, D. J., STROMINGER, J. L. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. **Proc Natl Academic Science**, [S. l.], v. 54, p. 1133–1141, 1965.

TISSERAND, R.; YOUNG, R. Essential Oil Safety: Constituent Profiles. **Churchill Livingstone**, [S. l.], v. 2, p 1-784, 2014. DOI: 10.1016/C2009-0-52351-3.

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**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015. DOI:

10.1128/CMR.00134-14.

TOOK, C. L., HINCHLIFFE, P., BRAGGINTON, E. C., COLENZO, C. K., HIRVONEN, V. H. A., TAKEBAYASHI, Y., SPENCER, J. β -Lactamases and β -lactamase inhibitors in the 21st century. **Jounar of Molecular Biology**, [*S. l.*], v. 431, n. 18, p. 3472-3500, 2019. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.04.002.

TURNER, N. A.; SHARMA-KUINKEL, B. K.; MASKARINEC, S. A.; EICHENBERGER, E. M.; SHAH, P. P.; CARUGATI, M.; HOLLAND, T. L.; FOWLER, V. G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, [*S. l.*], v. 17, n. 4, p. 203–218, 2019. DOI: 10.1038/s41579-018-0147-4.

URLACHER, V. B.; GIRHARD, M. Cytochrome P450 Monooxygenases in Biotechnology and Synthetic Biology. **Trends in Biotechnology**, [*S. l.*], v. 37, n. 8, p. 882–897, 2019. DOI: 10.1016/j.tibtech.2019.01.001.

VERMASSEN, A.; LEROY, S.; TALON, R.; PROVOT, C.; POPOWSKA, M.; DESVAUX, M. Cell Wall Hydrolases in Bacteria: Insight on the Diversity of Cell Wall Amidases, Glycosidases and Peptidases Toward Peptidoglycan. **Frontiers in Microbiology**, [*S. l.*], v. 10, n. 331, p. 1-27, 2019. DOI: 10339/fmicb.2019.00331.

WASSENAAR, T.; USSERY, D.; NIELSEN, L.; INGMER, H. Review and phylogenetic analysis of *qac* genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* species . **European Journal of Microbiology and Immunology**, [*S. l.*], v. 5, n. 1, p. 44–61, 2015. DOI: 10.1556/eujmi-d-14-00038.

YAZAKI, K.; ARIMURA, G. I.; OHNISHI, T. “Hidden” terpenoids in plants: Their biosynthesis, localization and ecological roles. **Plant and Cell Physiology**, [*S. l.*], v. 58, n. 10, p. 1615–1621, 2017. DOI: 10.1093/pcp/pcx123.

YELIN, I.; KISHONY, R. Antibiotic Resistance. **Cell**, [*S. l.*], v. 172, n. 5, p. 1136- 1136.e1, 2018. DOI: 10.1016/j.cell.2018.02.018.

ZHANG, Z.; YANG, T.; ZHANG, Y.; WANG, L.; XIE, Y. Fumigant toxicity of

monoterpenes against fruitfly, *Drosophila melanogaster*. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 81, p. 147–151, 2016. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.11.076.

ZHAO, P.; WANG, Y.; HUANG, W.; HE, L.; LIN, Z.; ZHOU, J.; HE, Q. Toxic effects of terpinolene on *Microcystis aeruginosa*: Physiological, metabolism, gene transcription, and growth effects. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 719, p. 137376, 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.137376.

ZHEN, X. et al. Clinical and economic impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a multicentre study in China. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–8, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-60825-6.

3. CAPÍTULO II: MANUSCRITO

Manuscrito submetido em 11/08/2020, aceito em 17/09/2020 na Microbial Pathogenesis, Qualis B2 em CBII e Fator de impacto 2.91 (JCR 2019).

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33002597/>

EFEITO DO TERPINOLENO CONTRA CEPA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE, PORTADORA DA BOMBA DE EFLUXO QacC E DO GENE DE β -LACTAMASE E SUA TOXICIDADE NO MODELO DE *Drosophila melanogaster*

Autores: Jackelyne Roberta Scherf ^{1,5}, Cristina Rodrigues Barbosa dos Santos ^{1,5}, Thiago Sampaio de Freitas ^{2,5}; Janaína Esmeraldo Rocha ^{3,5}, Nair Silva Macêdo ^{1,4}, Jessyca Nayara Mascarenhas Lima ¹, Henrique Douglas Melo Coutinho³, Francisco Assis Bezerra da Cunha ^{1,*}.

1 Laboratório de Bioprospecção do Semiárido e Métodos Alternativos (LABSEMA), Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato 63105-000, CE, Brasil; jackelyne_scherf@yahoo.com.br (J.R.S.); cristinase75@gmail.com (C.R.d.S.B.); naiirmacedo@gmail.com (N.S.M.); jessyca.lima@urca.br (J.N.M.L.) cunha.urca@gmail.com (F.A.B.d.C.)

2 Laboratório de Simulações e Espectroscopia Molecular, Universidade Regional do Cariri -

URCA, Crato 63105-000, CE, Brasil; thiagocrato@hotmail.com (T.S.d.F.)

3 Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM), Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato 63105-000, CE, Brasil; janinaesmeraldo@gmail.com (J.E.R)

4 Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas- PPGCB, Universidade Federal do Pernambuco - UFPE, Recife 50670-901, PE, Brasil

5 Programa de Pós-Graduação em Química Biológica

* Correspondente: cunha.urca@gmail.com (F.A.B.d.C.);

Resumo:

Bomba de efluxo e β -lactamases são mecanismos de resistência bacteriana, existentes em *Staphylococcus aureus*. Na cepa SA K4100 são expressos estes dois mecanismos simultaneamente, sendo a bomba de efluxo caracterizada como QacC. A busca por inibidores desses mecanismos tem crescido gradativamente, sendo comum pesquisas com compostos isolados, dentre estes estão os terpenos, que possuem inúmeras atividades biológicas. Este trabalho buscou avaliar a atividade antibacteriana do Terpinoleno contra a cepa de *S. aureus* K4100, portadora de bomba de efluxo QacC e β -lactamase, bem como avaliar a sua toxicidade no artrópode-modelo *Drosophila melanogaster*. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada por microdiluição em caldo. A inibição de bomba de efluxo foi avaliada por redução de CIM da Oxacilina e do Brometo de Etídio (BrEt). A inibição de β -lactamase foi analisada por redução de CIM da Ampicilina com Sulbactam. A toxicidade foi verificada pelos parâmetros de mortalidade e ensaio locomotor em *D. melanogaster*. Os resultados demonstraram que o Terpinoleno não apresentou atividade antibacteriana direta (CIM \geq 1024 $\mu\text{g/mL}$). No entanto, quando associado com a Oxacilina (161,26 – 71,83 $\mu\text{g/mL}$) e BrEt (45,25 - 32 $\mu\text{g/mL}$), foi observado redução da CIM, possivelmente uma inibição de β -lactamase e bomba de efluxo, evidenciando, assim atividade moduladora. O composto apresentou mortalidade de *D. melanogaster*, com uma EC₅₀ no valor de 34,6 $\mu\text{L/L}$ em 12 horas de exposição. Além disso, apresentou dano no aparelho locomotor a partir da segunda hora de exposição, tendo o efeito aumentando de forma concentração-dependente. Conclui-se que novos ensaios devem ser realizados visando a investigar o mecanismo de ação do Terpinoleno na atividade moduladora antibacteriana e tóxica.

Palavras – chave: Agentes antibacterianos; Farmacorresistência Bacteriana; Produtos Naturais; Metil;

Abstract:

Efflux pumps and β -lactamases are mechanisms of bacterial resistance that exist in *Staphylococcus aureus*, where both mechanisms are expressed simultaneously in the SA K4100 strain, with its efflux pump being characterized as QacC (Quaternary Ammonium Compounds C). The search for inhibitors of these mechanisms has grown gradually, with research on isolated compounds, including terpenes, which have innumerable biological activities, being common. This study sought to evaluate the antibacterial activity of Terpinolene against the *S. aureus* K4100 strain, carrying a QacC efflux pump and β -lactamase, as well as to evaluate its toxicity in the *Drosophila melanogaster* arthropod model. Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was performed by broth microdilution. Efflux pump inhibition was evaluated by the MIC reduction of Oxacillin and Ethidium Bromide (EtBr). β -Lactamase inhibition was analyzed by the MIC reduction of Ampicillin with Sulbactam. Toxicity was verified by mortality parameters and locomotor assays in *D. melanogaster*. The results demonstrated that Terpinolene did not present a direct antibacterial activity (MIC \geq 1024 $\mu\text{g/mL}$). However, a reduction in MIC was observed when Terpinolene was associated with Oxacillin (161.26–71.83 $\mu\text{g/mL}$) and EtBr (45.25–32 $\mu\text{g/mL}$), possibly by a β -lactamase and efflux pump inhibition, thus evidencing a modulatory activity. Terpinolene presented *D. melanogaster* mortality with an EC₅₀ of 34.6 $\mu\text{L/L}$ within 12 h of exposure. Additionally, Terpinolene presented damage to the locomotor system after the second hour of exposure, with the effect increasing in a concentration-dependent manner. In conclusion, new tests should be carried out to investigate the Terpinolene reinforcement of antibiotic activity and toxic activity mechanisms of action.

Keywords: Bacterial resistance; β -lactams; Methyl; Terpenoids; Quaternary ammonia;

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva, oportunista e facilmente encontrada no organismo humano, na pele e nas mucosas, está diretamente associada a infecções, tanto comunitárias quanto nosocomiais. A alta virulência e plasticidade genética podem levar ao desenvolvimento de mecanismos de resistência cujo objetivo é garantir a sobrevivência da sua espécie, desencadeando um processo de resistência aos antibióticos e dificultando o tratamento de enfermidades (Munita et al., 2016; Turner et al., 2019).

Um dos mecanismos de resistência são as enzimas β -lactamases que possuem a capacidade de inativar antibióticos β -lactâmicos (Andrade & Darini, 2017). Esta resistência ocorre através da degradação do fármaco pela catálise hidrolítica do anel β -lactâmico, inativando a capacidade bactericida do medicamento. Estas enzimas conseguem hidrolisar quase todos os β -lactâmicos que possuam ligação amina ou éster como as penicilinas (Kapoor; Saigal; Elongavan, 2017).

Outro mecanismo de resistência são as bombas de efluxo, as quais podem estar presentes em *S. aureus*. São compostas por proteínas transmembranas que formam um canal que leva ao meio extracelular (Kapoor; Saigal; Elongavan, 2017). Sua função é proteger a célula através da extrusão de substratos que a bactéria não necessita mais ou que sejam de alguma forma nociva à mesma. Esses substratos podem ser íons, corantes, derivados de fosfônio, Brometo de Etídio ou compostos amônia quaternária (Qac) (Bello, Dingle, 2018).

As proteínas de efluxo Qac existente em *S. aureus* podem se dividir em denominações como QacA, QacB, QacC, até Z, onde cada um representa uma proteína de uma família de plasmídeo relacionado a resistência de substratos diferentes. Enquanto A e B possuem uma semelhança genética, no termo QacC a codificação gênica é diferente, o mesmo é utilizado para proteínas que possuem resistência à amônia quaternária e Brometo de Etídio (Wassenaar et al., 2015).

Compostos de amônia quaternária (Qac) são largamente utilizados na assepsia de hospitais e clínicas que realizam procedimentos invasivos, para evitar e minimizar a taxa de infecções. Além de medicamentos β -lactâmicos que são amplamente utilizados no tratamento de infecções bacterianas. Tendo em vista o avanço da resistência bacteriana, há urgência para encontrar substâncias capazes de inibir bombas de efluxo como também β -lactamases (Mo et al., 2020; Suisse, 2017).

Os terpenos são uma classe de metabólitos secundários, que desperta grande interesse em pesquisadores, por possuírem propriedades farmacológicas em diversas áreas de pesquisa, tais como o Eugenol que apresenta atividade antifúngica, Eucalyptol anticancerígena e o Thymol

antibacteriana, entre outros (Kiyama, 2017; Nordin et al., 2020; Sampath et al., 2018; Shaban et al., 2020).

Dentre os terpenos, o Terpinoleno (1-methyl-4-propan-2-ylidenecyclohexene) pertence à classe dos monoterpenos, é um composto lipofílico, portanto bem absorvido a nível celular, sendo quase insolúvel em água. Este monoterpeno está presente em óleos essenciais de diversas espécies vegetais com amplo uso medicinal, tais como *Alpinia zerumbet* (“Colônia”) e espécies de *Piper* (*P. arboreum*, *P. crassinervium*, *P. dilatatum* e *P. tuberculatum*) (CYSNE et al., 2005; JEZLER et al., 2013). Está presente em óleos essenciais de diversas espécies vegetais. Possui uma grande quantidade de atividades biológicas, tais como anticancerígena, antifúngica e antioxidante (Aydin et al., 2013; Zhao et al., 2020). Apesar de apresentar estas atividades, existem lacunas referentes à atividade antibacteriana em geral. Até o momento do presente estudo não foram encontrados artigos associando o Terpinoleno com esta atividade.

Alguns terpenos possuem atividades biológicas capazes de inibir bombas de efluxo ou apresentam potencial relacionado à atividade antibacteriana, porém por sua alta toxicidade o composto passa a ser utilizado como antisséptico, desinfetante ou inseticida (Limaverde et al., 2017). Dessa forma, faz-se necessário estudos sobre a toxicidade desses compostos. Tendo em vista que o modelo alternativo *Drosophila melanogaster* é extremamente sensível a substâncias tóxicas e a diferentes concentrações torna-se adequado para este tipo de estudo (Rand et al., 2014).

Em relação à atividade antibacteriana e ao aumento da atividade do antibiótico pelo Terpinoleno há uma escassez de informações. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e o aumento da atividade do antibiótico do Terpinoleno na cepa de *Staphylococcus aureus* K4100, portadora de bomba de efluxo QacC e β -lactamase e avaliar seu perfil tóxico.

2. METODOLOGIA

2.1 Cepa bacteriana

A cepa de *Staphylococcus aureus* utilizada foi K4100, esta possui resistência a β -lactâmicos pelo mecanismo de β -lactamase e a Brometo de Etídio e Qac através de bomba de efluxo QacC. A linhagem bacteriana utilizada neste estudo foi cedida pelo professor S. Gibbons da Universidade de Londres. Essa cepa foi mantida em meio de cultura a base de ágar-sangue (Laboratórios Difco Ltda., Brasil). Antes do estudo as células foram cultivadas em Heart Infusion Agar (HIA, Difco) para seu crescimento, durante 24 horas a 36 °C.

2.2 Drogas

Os antibióticos (Oxacilina, Ampicilina e Ampicilina com Sulbactam), o Brometo de Etídio (BrEt), o Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) e o Terpinoleno foram obtidos da empresa Sigma Aldrich Co. Ltd., e a Clorpromazina (CPMZ) obtida da Aché, foram dissolvidos em Dimetilsulfóxido (DMSO), após este processo foram diluídos em água destilada estéril a concentração de 1024 µg/mL. A solução de Brometo de Etídio foi dissolvida em água destilada estéril e armazenada a -20 °C, sem contato com a luz em uma concentração de 1024 µg/mL (CLSI, 2013).

2.3 Teste da atividade antibacteriana através da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM do Terpinoleno foi determinada em ensaio realizado em sextuplicata, utilizando 100 µL do inóculo bacteriano suspenso em água salina, comparado com a escala de 0,5 McFarland que corresponde a 10⁶ Unidades Formadoras de Colônia e adicionados 900 µL do meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) nos eppendorf's®. Após esse processo foram transferidos 100 µL para cada poço da placa de microdiluição e a diluição seriada (100 µL) em cada um foi feita com uma concentração variando entre 512 a 0,5 µg/mL, exceto no controle de crescimento e esterilidade. As placas foram incubadas na estufa a 36 °C durante 24 horas, e o crescimento foi visualizado a partir da adição de 20 µL Resazurina em cada poço. A CIM foi definida como a menor concentração que não foi observado crescimento bacteriano (CLSI, 2013; Javadpour et al., 1996).

2.4 Verificação da presença de β-lactamase.

A verificação da presença de β-lactamase foi realizada através da CIM da Ampicilina sozinha e CIM da formulação da Ampicilina associada ao inibidor de β-lactamase (Subactam) na concentração de 50%. Para confirmar a inibição de β-lactamase foi usado o pressuposto que uma diminuição 3 diluições na presença do inibidor é indicativa da produção de β-lactamase pela cepa (CLSI, 2019).

2.5 Avaliação da inibição de β-lactamase por redução da CIM

A inibição da β -lactamase foi avaliada utilizando a concentração subinibitória CIM/8 (128 $\mu\text{g/mL}$) de Terpinoleno, com o objetivo de avaliar a capacidade de diminuir a CIM do antibiótico na cepa K4100. Foram adicionados nos eppendorfs® 170 μL de inóculo bacteriano suspenso em solução salina estéril, juntamente com a concentração subinibitória (128 $\mu\text{g/mL}$) do composto e completado com BHI até chegar ao volume de 1700 μL , foi transferido para a placa, feito a microdiluição com o antibiótico, oxacilina, e após 24 h foi feita a leitura do teste. No controle de crescimento não houve microdiluição. O controle de esterilidade foi realizado em placa separadamente (CLSI, 2015).

2.6 Avaliação da inibição de bomba de efluxo por redução da CIM

A inibição de bomba de efluxo QacC foi avaliada utilizando a concentração subinibitória MIC/8 (128 $\mu\text{g/mL}$) de Terpinoleno, com o objetivo de avaliar a capacidade de diminuir a CIM do BrEt na cepa K4100. E foi utilizado o CCCP e a Clorpromazina como inibidores de bomba de efluxo padrão na concentração subinibitória MIC/8 (1,41 e 128 $\mu\text{g/mL}$). Foram adicionados nos eppendorfs® 170 μL de inóculo bacteriano suspenso em solução salina estéril, juntamente com a concentração subinibitória (128 $\mu\text{g/mL}$) do Terpinoleno e completando com BHI até chegar ao volume de 1700 μL . Essa solução foi transferida para a placa, feita a microdiluição com o BrEt passando de uma concentração de 512 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$. O teste foi lido após 24 h. No controle de crescimento não houve microdiluição. O controle de esterilidade foi feito a parte (CLSI, 2015).

2.7 Análise estatística dos resultados bacterianos

Os resultados dos testes foram realizados em sextuplicata e expressos em gráficos. As análises estatísticas foram aplicadas de duas formas ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni's *post hoc* usando o software GraphPad Prism 5.0.

2.8 Teste de toxicidade

2.8.1 - Criação e estoque de *Drosophila melanogaster*

D. melanogaster (estirpe de Harwich) foi obtida do National Species Stock Center, Bowling Green, OH. As moscas foram criadas em recipientes de vidro de 340 mL e cultivadas

com o meio contendo: (83 % de massa de milho, 4 % de açúcar, 4 % de leite liofilizado, 4 % de farelo de soja, 4 % de farelo de trigo e 1 % de sal). Por ocasião do cozimento da mistura foi acrescentado 1 g de Nipagin (Metilparabeno). Após resfriamento nos recipientes de crescimento foi adicionado 1 mL de solução contendo *Saccharomyces cerevisiae*. As moscas foram mantidas a temperatura de 26 °C e Umidade Relativa do ar de 60 %. Todos os testes foram realizados com a mesma estirpe (Da Cunha et al., 2015).

2.8.2 Teste de mortalidade

Os testes foram realizados de acordo com o método proposto por Da Cunha et al., 2015 com algumas modificações. 20 moscas adultas (machos e fêmeas) foram colocadas em recipientes de vidro de 130 mL (6 cm de altura e 6.5 cm de diâmetro), contendo no fundo papel vegetal previamente preparado com 1 mL de solução de sacarose a 20 %, a parte interna da tampa do recipiente recebeu papel filtro onde foi impregnado com Terpinoleno nas concentrações de 1 µL, 5 µL e 10 µL. No grupo controle foi adicionado apenas sacarose no papel vegetal. Durante todo o procedimento, foi mantido o ciclo claro/escuro de 12:12 horas e temperatura controlada a 26 °C e Umidade Relativa do ar de 60 %. O teste foi realizado em triplicata onde cada “n” foi composto por dois recipientes. As leituras para a verificação de mortalidade foram realizadas a cada 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 36 e 48 h (Da Cunha et al., 2015).

2.8.3 Teste de geotaxia negativa

O dano ao aparelho locomotor foi verificado através do ensaio de geotaxia negativa descrita por Coulom & Birman. Cada grupo de moscas vivas expostas ao Terpinoleno nos horários de leitura de 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 36 e 48 horas, foram conduzidas para o fundo dos recipientes e após 5 segundos, o número de moscas que atingiram 5 cm de altura do recipiente foram contadas. Os ensaios foram repetidos duas vezes a intervalos de um minuto. Os resultados foram apresentados como média de tempo (\pm) EP obtidos em duas experiências independentes (Coulom & Birman, 2004).

2.9 Análise estatística dos resultados de toxicidade

A análise dos dados de toxicidade foi feito um teste ANOVA de duas vias, seguido por um teste de múltipla comparação de *Tukey*. Não havendo diferença estatística com uma

mesma concentração em função do tempo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Testes microbiológicos

Foi observado que o Terpinoleno não apresentou atividade antibacteriana direta em relação ao ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM), com resultado $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 1). Se comparado com a oxacilina, é possível verificar que a diferença do resultado entre o antibiótico e o composto não é grande tendo em vista que a diminuição da CIM foi menor que uma vez ($\geq 1024 - 522 \mu\text{g/mL}$).

Existem monoterpenos com atividade antibacteriana contra *S. aureus* e outros microorganismos patogênicos, tais como Carvacrol, Thymol e γ -Terpinene nas seguintes concentrações $0,17 \mu\text{g/mL}$, $8,72 \text{ mg/L}$ e $30 \mu\text{L}$ (Kumar et al., 2020; Mohammadzamani et al., 2020; Nordin et al., 2020). Os compostos citados se assemelham ao Terpinoleno não só por serem monoterpenos, mas também por possuírem em sua estrutura química a cadeia principal com seis carbonos e ramificações como o metil e o propano. Podendo assim demonstrar atividades biológicas similares.

Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM $\mu\text{g/mL}$) de Terpinoleno e oxacilina contra cepa de *S. aureus* K4100

Cepa	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
<i>S. aureus</i> K4100	Terpinoleno	Oxacilina
	≥ 1024	522

3.2 Verificação da presença de β -lactamase

O Sulbactam é considerado um inibidor de β -lactamase, no teste foi verificado o aumento do efeito antibacteriano, por diminuição de CIM (Figura 1). Quando utilizado esse inibidor juntamente com a Ampicilina se comparado com controle do antibiótico, β -lactâmico, houve uma diminuição de aproximadamente cinco vezes ($456,14 - 90,51 \mu\text{g/mL}$) da CIM. Indicando que a bactéria SA K4100 possui o mecanismo de resistência enzimático β -lactamase (CLSI, 2019).

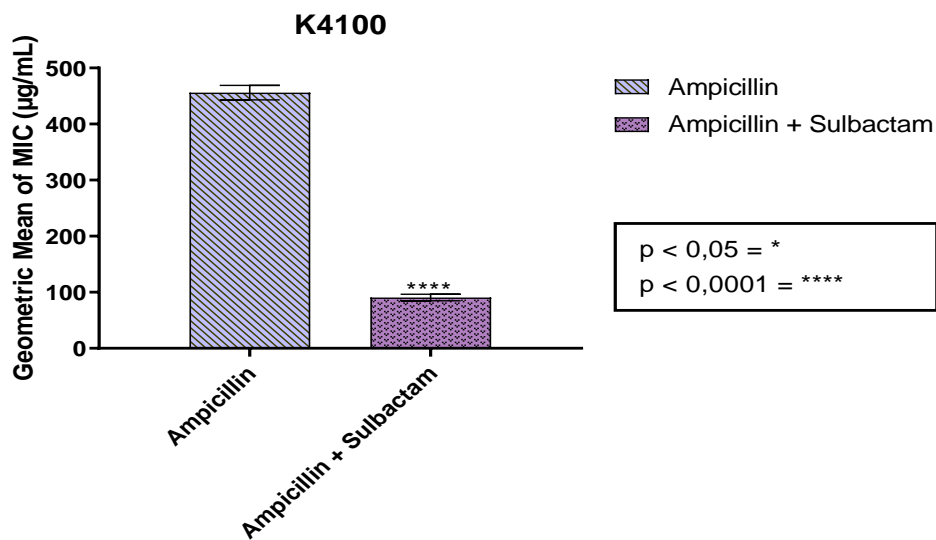


Figura 1. Verificação da presença de β -lactamase. Os valores representam a média geométrica \pm S.E.M. (erro padrão da média). ANOVA de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. $p < 0,0001$ vs controle.

Tendo em vista a redução da CIM da ampicilina (512 - 456 $\mu\text{g/mL}$) sugere-se que esta cepa possui resistência contra β -lactâmicos e com a associação do antibiótico com o Sulbactam (90,51 $\mu\text{g/mL}$) houve a inibição da enzima, indicando a possível presença do mecanismo enzimático.

A resistência de *S. aureus* por β -lactamase é encontrada mais frequentemente, mas alguns plasmídeos possuem a capacidade de compartilhar mais de um mecanismo de resistência, levando assim, a transmissão também do gene responsável pela bomba de efluxo (Sidhu et al., 2001). Devido à ligação de genes de resistência a compostos quaternários com genes de β -lactamase, podendo disseminar resistência enzimática e por bomba de efluxo (Hadadi et al., 2019; Kim et al., 2012).

3.3 Inibição de β -lactamase por redução da CIM de Oxacilina

A Oxacilina é um antibiótico utilizado contra cepas multirresistentes. O Terpinoleno apresentou a capacidade de reduzir a concentração inibitória mínima quando associado à Oxacilina contra a cepa SA K4100, de acordo com a Figura 2. Quando o controle é comparado com a modulação do Terpinoleno houve uma redução de mais da metade da CIM, diminuindo de 161,26 $\mu\text{g/mL}$ para 71,83 $\mu\text{g/mL}$.

A resistência bacteriana a Oxacilina ocorre normalmente através do mecanismo de β -lactamase possivelmente relacionada aos genes homólogos dos reguladores do gene *blaZ* de *Staphylococcus aureus* (Lowy et al., 2003). Entretanto, há resistência por bomba de efluxo

através de Qac, proteínas de resistência antisséptica, sendo estas associadas a compostos lipofílicos e cátions mono e divalentes (Uddin & Ahn, 2017). Existem substâncias capazes de inibir bombas de efluxo que apresentam cadeia cíclica e metil em sua estrutura química, tais como a Hematoporphyrin monomethyl ether e Meso-tetra (Dharmaratne et al., 2020), assim como o Terpinoleno.

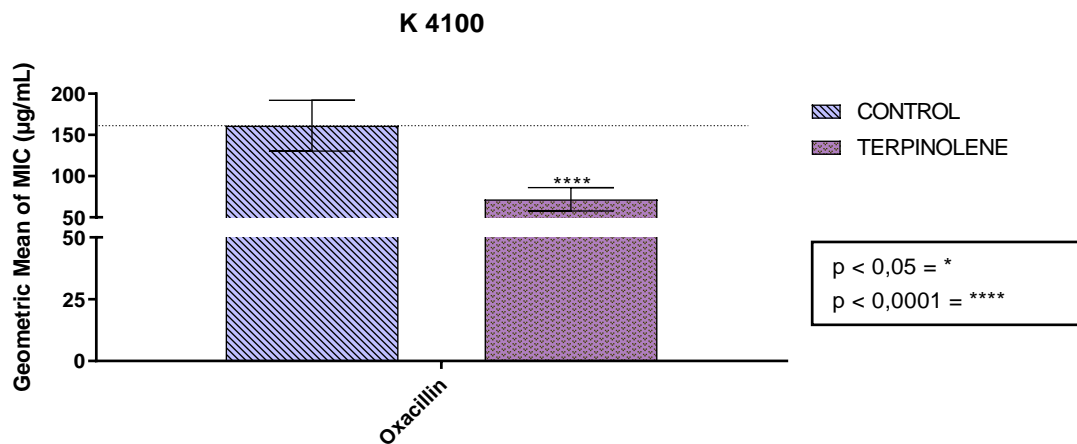


Figura 2. Capacidade de inibição da β -lactamase pelo Terpinolene associado à oxacilina, contra a cepa multiresistente SA K4100. Os valores representam a média geométrica \pm S.E.M. (erro padrão da média). ANOVA de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. $p < 0,0001$ vs controle.

3.4 Inibição de bomba de efluxo por redução de CIM do Brometo de Etídio

O Brometo de Etídio vem sendo, vastamente, utilizado na verificação de bomba de efluxo, seu mecanismo de ação está diretamente relacionado à ligação com DNA bacteriano levando a morte celular (Banerjee et al., 2014). A bomba de efluxo QacC é caracterizada pela retirada de compostos amônia quaternária e BrEt, sendo assim, apresenta-se mais resistente a esta substância. As bactérias que possuem bomba de efluxo são capazes de extrair este composto da célula, portanto substâncias capazes de manter o BrEt, e outras substâncias tóxicas, no meio intracelular da bactéria são inibidores de bomba de efluxo (Li & Nikaido, 2004; Wassenaar et al., 2015)

De acordo com a Figura 3 a cepa de SA K4100 expressa proteína de efluxo ativo, confirmado pela redução da CIM do CCCP (45,25 – 2,5 $\mu\text{g/mL}$) e Clorpromazina (45,25 – 12,69 $\mu\text{g/mL}$). Os testes realizados com esta bactéria apresentam diminuição da CIM quando o Terpinoleno é associado ao BrEt e comparado com o controle. Apresentando uma redução de 45,25 para 32 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando uma possível inibição da bomba de efluxo QacC.

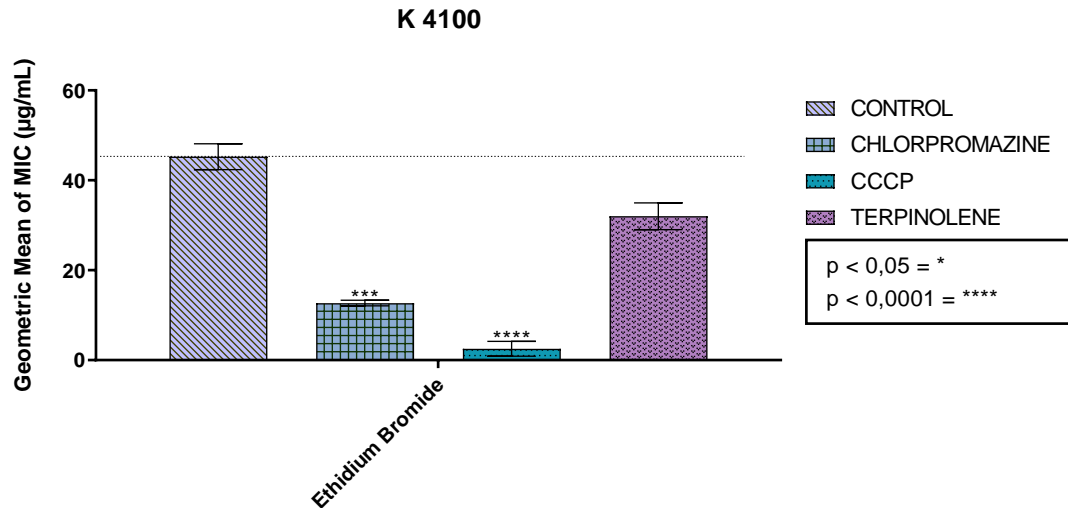


Figura 3. Capacidade de inibição da bomba de efluxo QacC pelo Terpinolene associado ao brometo de etídio, contra a cepa multirresistente SA K4100. Os valores representam a média geométrica \pm S.E.M. (erro padrão da média). ANOVA de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. A: Associado ao brometo de etídio; CCCP: carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona. $p < 0,0001$ vs controle.

3.5 Teste de mortalidade com *Drosophila melanogaster*

Os resultados do teste de toxicidade do Terpinoleno demonstram que o composto apresenta EC_{50} no valor de 34,6 μ L/L em 12 horas de exposição. De acordo com a figura 4 os resultados de mortalidade por toxicidade, realizado com o artrópode-modelo *Drosophila melanogaster*, evidenciaram que o composto apresentou toxicidade alta em todas as concentrações, a partir da segunda hora de exposição e a taxa de mortalidade foi aumentando gradativamente com o tempo e também de forma concentração-dependente.

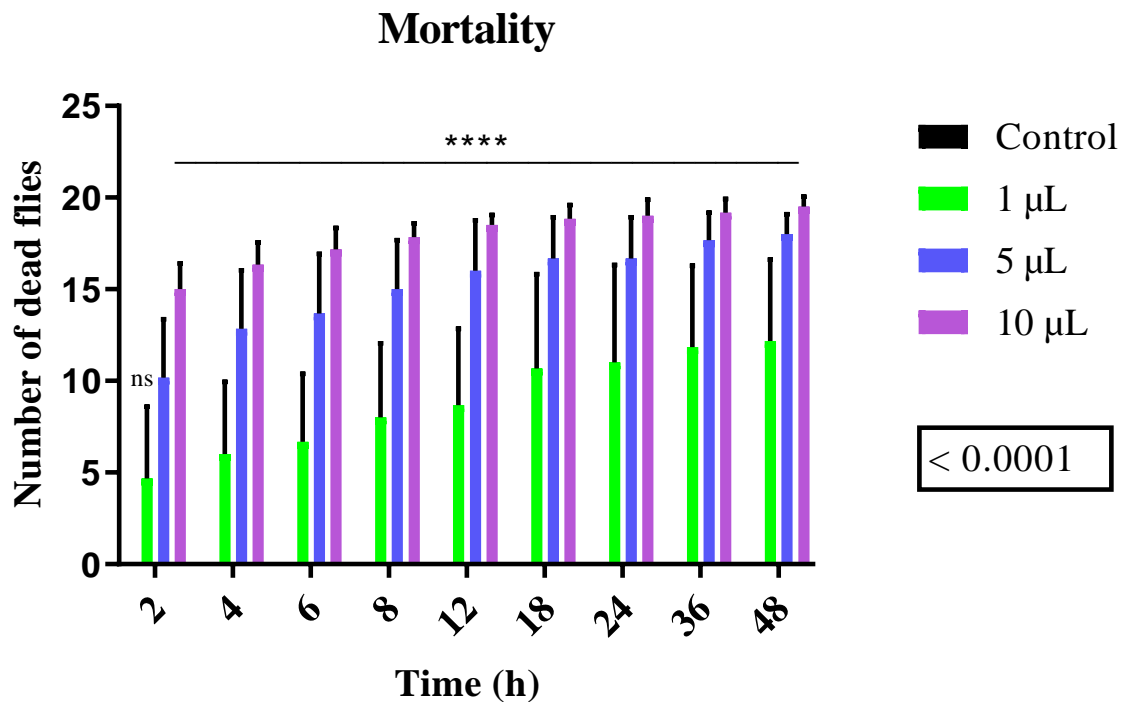


Figura 4. Efeito tóxico de diferentes concentrações em *D. melanogaster*

O Terpinoleno é amplamente utilizado na agricultura por fazer parte da classe de bioherbicida terpenóides aleloquímicos, além de ser utilizado na produção de perfumes e na indústria farmacêutica (Seyyednejad et al., 2010). Segundo estudo realizado por Zhang et al., 2016, dentre os 40 monoterpenos testados através de fumigação o Terpinoleno demonstrou maior toxicidade contra *D. melanogaster*. Sugere-se que a posição da hidroxila na estrutura química possui grande participação na atividade inseticida e que o grupo carbonil possivelmente aumenta a atividade tóxica dos compostos (Zhang et al., 2016). Em teste realizado contra *Musca domestica* L. o Terpinoleno apresentou LC_{50} de 1.84 $\mu\text{L/L}$, sendo definido como um dos únicos monoterpenos hidrocarbonos com atividade inseticida contra a mosca doméstica (Zhang et al., 2017).

Por possuir um baixo peso molecular os terpenos, tornam-se voláteis, além de ser altamente lipofílico, favorecendo sua passagem para o meio intracelular (Moreira et al., 2019). De acordo com Hua et al., 2018 o Terpinoleno pode levar ao aumento de estresse oxidativo e de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que pode levar a morte celular (Hua et al., 2018). Assim como produção elevada de acetilcolinesterase, quando não metabolizada, pode gerar paralisia e levar a morte (Hu et al., 2019).

3.6 Teste de dano locomotor com *Drosophila melanogaster*

A verificação da atividade locomotora de *D. melanogaster* consiste na verificação da capacidade deste artrópode de se mover de forma vertical, mostrando assim os danos causados por compostos sem ocasionar a morte. Sugere-se que quando a espécie *D. melanogaster* é exposta a substâncias tóxicas a mesma consegue hidrolizar parte da acetilcolinesterase que foi produzida em excesso. Esta enzima pode causar paralisia podendo levar a morte de acordo com o tempo de exposição e a concentração (Hu et al., 2019). Porém, na literatura não foram encontrados estudos de geotaxia negativa contra o modelo de *Drosophila melanogaster* relacionado ao Terpinoleno.

Nos ensaios de geotaxia negativa onde é verificado um possível dano ao aparelho locomotor, foi observado um déficit locomotor a partir da segunda hora de exposição em todas as concentrações testadas (Fig. 5). Esse efeito foi aumentando ao longo do tempo de exposição gradativamente e de forma concentração-dependente.

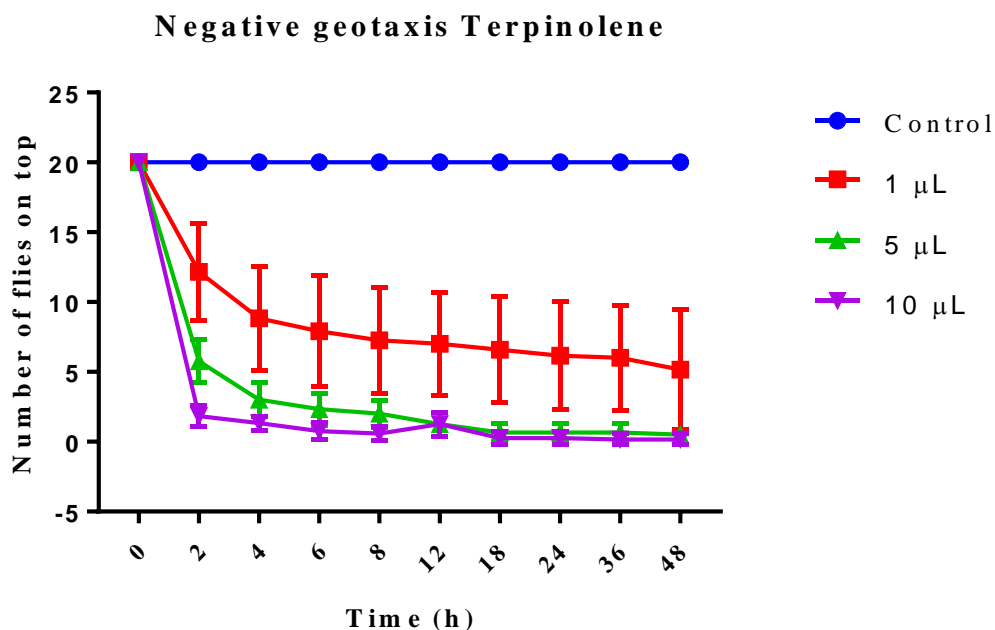


Figura 5. Efeito tóxico de concentrações variáveis de Terpinoleno sobre a capacidade locomotora de *D. melanogaster*

4 CONCLUSÃO

Conforme foi observado neste estudo, quando a cepa SA K4100 foi testada com Ampicilina e Sulbactam apresentou uma diminuição de cinco vezes da CIM (456,14 – 90,51 µg/mL), indicando que a bactéria possui resistência a β-lactamase. Embora o Terpinoleno não possua atividade antibacteriana direta (≥ 1024 µg/mL). Quando o composto é associado à

Oxacilina demonstra uma redução de mais de duas vezes nos valores da CIM (161,26 - 71 µg/mL). No teste com BrEt, o composto também apresenta redução nos valores de CIM (45,25 - 32 µg/mL). O composto em questão expressou mortalidade e dano ao aparelho locomotor, com uma EC₅₀ 34,6 µL/L em 12 horas de exposição, apresentando atividade tóxica contra *Drosophila melanogaster*. Contudo, novos estudos precisam ser realizados visando a identificar os mecanismos de ação, bem como ensaios *in vivo* para avaliar atividade antibacteriana, moduladora e tóxica.

5 AGRADECIMENTOS

Projeto Geoparque Araripe. FUNCAP, Bolsa.

Contribuição dos Autores:

Conceituação: J.R.S

Metodologia: C.R.B.S; N.S.M

Análise: T.S.F; J.E.R;

Validação: J.N.M.L

Coordenação do projeto: H.D.M.C

Supervisão: F.A.B.C

Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento: Este estudo foi financiado por Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico — FUNCAP (BP3-0139-00077.01.00/18).

Conflito de Interesse: Os autores declaram que não há conflito de interesse.

6 Referências

J.M. Munita, C.A. Arias, A.R. Unit, A. De Santiago, HHS Public Access Mechanisms of Antibiotic Resistance, HHS Public Access. 4 (2016) 1–37.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.Mechanisms>.

N.A. Turner, B.K. Sharma-Kuinkel, S.A. Maskarinec, E.M. Eichenberger, P.P. Shah, M.

- Carugati, T.L. Holland, V.G. Fowler, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research, *Nat. Rev. Microbiol.* 17 (2019) 203–218. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>.
- L. Andrade, A. Darini, Bacilos gram-negativos productores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse?, *J. Infect. Control.* 6 (2017) 16–25.
- G. Kapoor, S. Saigal, A. Elongavan, Action and resistance mechanisms of antibiotics: a guide for clinicians, *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* 33 (2017) 300-305. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15
- A.B.P. D, T.C.D.P. D, Clinical Microbiology, *Clin. Microbiol. Newsl.* 40 (2018) 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2018.10.001>.
- T. Wassenaar, D. Ussery, L. Nielsen, H. Ingmer, Review and phylogenetic analysis of qac genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* species, *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 5 (2015) 44–61. <https://doi.org/10.1556/eujmi-d-14-00038>.
- D. Suisse, Bactéries multirésistantes et voyage, (2017) 944–947.
- L.Y. Mo, Y.A. Liu, J. Zhu, L.T. Qin, Y.P. Liang, H.H. Zeng, Benefits from hazards, benefits from nothing, and benefits from benefits: the combined effects of five quaternary ammonium compounds to *Vibrio qinghaiensis* Q67, *Environ. Sci. Eur.* 32 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00310-z>.
- N. Nordin, S.H. Othman, S.A. Rashid, R.K. Basha, Effects of glycerol and thymol on physical, mechanical, and thermal properties of corn starch films, *Food Hydrocoll.* 106 (2020) 105884. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105884>.
- S. Sampath, S. Subramani, S. Janardhanam, P. Subramani, A. Yuvaraj, R. Chellan, Bioactive compound 1,8-Cineole selectively induces G2/M arrest in A431 cells through the upregulation of the p53 signaling pathway and molecular docking studies, *Phytomedicine.* 46 (2018) 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.007>.

- S. Shaban, M. Patel, A. Ahmad, Improved efficacy of antifungal drugs in combination with monoterpene phenols against *Candida auris*, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–8.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-58203-3>.
- J. B. Cysne, et al. Leaf essential oils of four *Piper* species from the State of Ceará - Northeast of Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 16 (2005) 1378-1381. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532005000800012>.
- C. N. JEZLER, et al. Histochemistry, content and chemical composition of essential oil in different organs of *Alpinia zerumbet*. *Cienc. Rural* [online]. 43 (2013) 1811-1816.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782013001000013>.
- R. Kiyama, Estrogenic terpenes and terpenoids: Pathways, functions and applications, *Eur. J. Pharmacol.* 815 (2017) 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.09.049>.
- P. Zhao, Y. Wang, W. Huang, L. He, Z. Lin, J. Zhou, Q. He, Toxic effects of terpinolene on *Microcystis aeruginosa*: Physiological, metabolism, gene transcription, and growth effects, *Sci. Total Environ.* 719 (2020) 137376.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137376>.
- E. Aydin, H. Türkez, Ş. Taşdemir, Anticancer and antioxidant properties of terpinolene in rat brain cells, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 64 (2013) 415–424.
<https://doi.org/10.2478/10004-1254-64-2013-2365>.
- P.W. Limaverde, F.F. Campina, F.A.B. da Cunha, F.D. Crispim, F.G. Figueredo, L.F. Lima, C. Datiane de M. Oliveira-Tintino, Y.M.L.S. de Matos, M.F.B. Morais-Braga, I.R.A. Menezes, V.Q. Balbino, H.D.M. Coutinho, J.P. Siqueira-Júnior, J.R.G.S. Almeida, S.R. Tintino, Inhibition of the TetK efflux-pump by the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. and α -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58, *Food Chem. Toxicol.* 109 (2017) 957–961. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.031>.
- M.D. Rand, S.L. Montgomery, L. Prince, D. Vorobjekina, Developmental toxicity assays using the *Drosophila* model, *Curr. Protoc. Toxicol.* 1 (2014) 1–27.

<https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0112s59>.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute Standards Development Policies and Process, *Clin. Lab. Stand. Int.* (2013).

<https://clsi.org/media/1711/clsistandardsdevelopmentpoliciesandprocessesfinal.pdf>.

M.M. Javadpour, M.M. Juban, W.C.J. Lo, S.M. Bishop, J.B. Albery, S.M. Cowell, C.L. Becker, M.L. McLaughlin, De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity, *J. Med. Chem.* 39 (1996) 3107–3113. <https://doi.org/10.1021/jm9509410>.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute Standards Development Policies and Process, *Clin. Lab. Stand. Int.* (2019).

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, *Clin. Lab. Stand. Int.* (2015).

F.A.B. Da Cunha, G.L. Wallau, A.I. Pinho, M.E.M. Nunes, N.F. Leite, S.R. Tintino, G.M. Da Costa, M.L. Athayde, A.A. Boligon, H.D.M. Coutinho, A.B. Pereira, T. Posser, J.L. Franco, Eugenia uniflora leaves essential oil induces toxicity in *Drosophila melanogaster*: Involvement of oxidative stress mechanisms, *Toxicol. Res. (Camb)*. 4 (2015) 634–644. <https://doi.org/10.1039/c4tx00162a>.

H. Coulom, S. Birman, Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*, *J. Neurosci.* 24 (2004) 10993–10998. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2993-04.2004>.

A. Kumar, A. Kamal, S. Singh, R.C. Padalia, S. Tandon, A. Chauhan, D. Saikia, R.S. Verma, Chemical composition, antimicrobial activity, kinetics and mechanism of action of Himalayan-thyme (*Thymus linearis* Benth.), *J. Essent. Oil Res.* 32 (2020) 64–73. <https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1662337>.

Z. Mohammadzamani, A. Khorshidi, A. Khaledi, A. Shakerimoghaddam, G.A. Moosavi, A. Piroozmand, Inhibitory effects of Cinnamaldehyde, Carvacrol, and honey on the expression of *exoS* and *ampC* genes in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

- isolated from burn wound infections, *Microb. Pathog.* 140 (2020) 103946.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103946>.
- M.S. Sidhu, E. Heir, H. Sørum, A. Holck, Genetic linkage between resistance to quaternary ammonium compounds and β -lactam antibiotics in food-related *Staphylococcus* spp, *Microb. Drug Resist.* 7 (2001) 363–371. <https://doi.org/10.1089/10766290152773374>.
- F. Hadadi, E.G. Rad, A. Almasi-Hashiani, H. Abtahi, Detection of QACE Δ 1, QACG, QACE, QACF resistance genes in *Escherichia coli* producing broad-spectrum beta-lactamases to benzalkonium chloride, *J. Babol Univ. Med. Sci.* 21 (2019) 286–292.
- C. Kim, C. Milheiriço, S. Gardete, M.A. Holmes, M.T.G. Holden, H. De Lencastre, A. Tomasz, Properties of a novel PBP2A protein homolog from *Staphylococcus aureus* strain LGA251 and its contribution to the β -lactam-resistant phenotype, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 36854–36863. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.395962>.
- F.D. Lowy, Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*, *J. Clin. Invest.* 111 (2003) 1265–1273. <https://doi.org/10.1172/jci200318535>.
- M.J. Uddin, J. Ahn, Associations between resistance phenotype and gene expression in response to serial exposure to oxacillin and ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*, *Lett. Appl. Microbiol.* 65 (2017) 462–468. <https://doi.org/10.1111/lam.12808>.
- P. Dharmaratne, D.N. Sapugahawatte, B. Wang, C.L. Chan, K.M. Lau, C. Lau, K.P. Fung, D.K. Ng, M. IP, Contemporary approaches and future perspectives of antibacterial photodynamic therapy (aPDT) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A systematic review, *Eur. J. Med. Chem.* 200 (2020) 112341.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112341>.
- A. Banerjee, P. Majumder, S. Sanyal, J. Singh, K. Jana, C. Das, D. Dasgupta, The DNA intercalators ethidium bromide and propidium iodide also bind to core histones, *FEBS Open Bio.* 4 (2014) 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.02.006>.
- X.-Z. Li, H. Nikaido, Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. [Review], *Drugs* 2004.

64 (2004) 159–204.

- A. Lamut, L.P. Mašič, D. Kikelj, T. Tomašič, Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria, *Med. Res. Reviews.* 39 (2019) 2460-2504. <https://doi.org/10.1002/med.21591>
- M.M Kristiansen, C. Leandro, D. Ordway, M. Martins, M. Viveiros, T. Pacheco, J.E. Kristiansen, L. Amaral, Phenothiazines alter resistance of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA) to oxacillin in vitro, *Inter. J. Antimicrob. Ag.* 22 (2003) 250-253. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00200-0](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00200-0)
- A. Martins, I. Couto, L. Aagaard, M. Martins, M. Viveiros, J.E. Kristiansen, L. Amaral, Prolonged exposure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) COL strain to increasing concentrations of oxacillin results in a multidrug-resistant phenotype, *Inter. J. Antimicrob. Ag.* 29 (2007) 302-305. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.10.012>
- S.M. Seyyednejad, H. Koochak, F.P. Najafabade, M. Kolahi, Allelopathic effect of aquatic hull extract of rice (*Oryza sativa* L.) on growth of *Silybum marianum* and *Echinochloa crus-galli*, *Afr. J. Agric. Res.* 5 (2010) 2222-2226.
- Z. Zhang, T. Yang, Y. Zhang, L. Wang, Y. Xie, Fumigant toxicity of monoterpenes against fruitfly, *Drosophila melanogaster*, *Ind. Crops Prod.* 81 (2016) 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.076>.
- Z. Zhang, Y. Xie, Y. Wang, Z. Lin, L. Wang, G. Li, Toxicities of monoterpenes against housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae), *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 24708–24713. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0219-4>.
- X. Moreira, L. Abdala-Roberts, C.S. Nell, C. Vázquez-González, J.D. Pratt, K. Keefover-Ring, K.A. Mooney, Sexual and genotypic variation in terpene quantitative and qualitative profiles in the dioecious shrub *Baccharis salicifolia*, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51291-w>.

Q. Hua, Y. guo Liu, Z. li Yan, G. ming Zeng, S. bo Liu, W. jin Wang, X. fei Tan, J. qin Deng, X. Tang, Q. peng Wang, Allelopathic effect of the rice straw aqueous extract on the growth of *Microcystis aeruginosa*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 148 (2018) 953–959. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.049>.

X. Hu, W. Fu, X. Yang, Y. Mu, W. Gu, M. Zhang, Effects of cadmium on fecundity and defence ability of *Drosophila melanogaster*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 171 (2019) 871–877. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.029>.

4. CAPÍTULO III: Considerações Finais

4.1 Conclusões Gerais

Conclui-se que a cepa SA K4100 foi testada com Ampicilina e Sulbactam apresentou uma diminuição de cinco vezes da CIM (456,14 – 90,51 µg/mL), indicando que a bactéria produz β-lactamase, apresentando resistência aos β-lactamicos. Embora o Terpinoleno não possua atividade antibacteriana direta (≥ 1024 µg/mL). Quando o composto é associado à Oxacilina demonstra uma redução de mais de duas vezes nos valores da CIM (161,26 - 71 µg/mL). No teste com BrEt, o composto também apresenta redução nos valores de CIM (45,25 - 32 µg/mL). O composto em questão expressou mortalidade e dano ao aparelho locomotor, com uma EC_{50} 34,6 µL/L em 12 horas de exposição, apresentando atividade tóxica contra *Drosophila melanogaster*. Contudo, novos estudos precisam ser realizados visando a identificar os mecanismos de ação, bem como ensaios *in vivo* para avaliar atividade antibacteriana, moduladora e tóxica.

4.2 Perspectivas de Investigações Futuras

Espera-se que sejam realizados estudos mais aprofundados, tanto *in vitro* como *in vivo*, para identificação dos mecanismos de ação que levam a essas atividades biológicas apresentadas pelo Terpinoleno. Como a modelagem molecular e computacional, para a confirmação da possível interação com as proteínas de bombas de efluxo e com a β-lactamase. Bem como, ensaios de toxicidade utilizando células eucariontes através da fragilidade osmótica. Após o resultado expandir para organismos mais complexos, tanto no contexto toxicológico como nos estudos microbiológicos.

5. ANEXOS

5.1 Produção científica ligada ao mestrado



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

Jackelyne Roberta Scherf ^{a,c}, Cristina Rodrigues Barbosa dos Santos ^{a,c},
 Thiago Sampaio de Freitas ^{b,c}, Janaína Esmeraldo Rocha ^{b,c}, Nair Silva Macêdo ^{a,d},
 Jessyca Nayara Mascarenhas Lima ^a, Henrique Douglas Melo Coutinho ^c,
 Francisco Assis Bezerra da Cunha ^{a,*}

^a Laboratory of Bioprospecting in the Semi-Arid and Alternative Methods (LABSEMA), Regional University of Cariri - URCA, Crato, 63105-000, CE, Brazil

^b Laboratory of Simulations and Molecular Spectroscopy, Regional University of Cariri - URCA, Crato, 63105-000, CE, Brazil

^c Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Regional University of Cariri - URCA, Crato, 63105-000, CE, Brazil

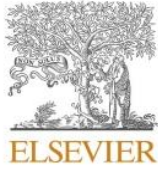
^d Biological Sciences Post Graduate Program - PPGE, Federal University of Pernambuco - UFPE, Recife, 50670-901, PE, Brazil

* Biological Chemistry Post Graduate Program, Brazil

6. APÊNDICES

6.1 Versão do Manuscrito Publicado em Inglês

Microbial Pathogenesis 149 (2020) 104528



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micpath

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

Jackelyne Roberta Scherf^{a,e}, Cristina Rodrigues Barbosa dos Santos^{a,e},
Thiago Sampaio de Freitas^{b,e}, Janaína Esmeraldo Rocha^{c,e}, Nair Silva Macêdo^{a,d},
Jessyca Nayara Mascarenhas Lima^a, Henrique Douglas Melo Coutinho^c,
Francisco Assis Bezerra da Cunha^{a,*}

^a Laboratory of Bioprospecting in the Semi-Arid and Alternative Methods (LABSEMA), Regional University of Cariri - URCA, Crato, 63105-000, CE, Brazil

^b Laboratory of Simulations and Molecular Spectroscopy, Regional University of Cariri - URCA, Crato, 63105-000, CE, Brazil

^c Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Regional University of Cariri - URCA, Crato, 63105-000, CE, Brazil

^d Biological Sciences Pos Graduate Program - PPGCB, Federal University of Pernambuco - UFPE, Recife, 50670-901, PE, Brazil

^e Biological Chemistry Pos Graduate Program, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Bacterial resistance
 β -lactams
Methyl
Terpenoids
Quaternary ammonia

ABSTRACT

Efflux pumps and β -lactamases are mechanisms of bacterial resistance that exist in *Staphylococcus aureus*, where both mechanisms are expressed simultaneously in the SA K4100 strain, with its efflux pump being characterized as QacC (Quaternary Ammonium Compounds C). The search for inhibitors of these mechanisms has grown gradually, with research on isolated compounds, including terpenes, which have innumerable biological activities, being common. This study sought to evaluate the antibacterial activity of Terpinolene against the *S. aureus* K4100 strain, carrying a QacC efflux pump and β -lactamase, as well as to evaluate its toxicity in the *Drosophila melanogaster* arthropod model. Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was performed by broth microdilution. Efflux pump inhibition was evaluated by the MIC reduction of Oxacillin and Ethidium Bromide (EtBr). β -Lactamase inhibition was analyzed by the MIC reduction of Ampicillin with Sulbactam. Toxicity was verified by mortality parameters and locomotor assays in *D. melanogaster*. The results demonstrated that Terpinolene did not present a direct antibacterial activity (MIC \geq 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$). However, a reduction in MIC was observed when Terpinolene was associated with Oxacillin (161.26–71.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and EtBr (45.25–32 $\mu\text{g}/\text{mL}$), possibly by a β -lactamase and efflux pump inhibition, thus evidencing a modulatory activity. Terpinolene presented *D. melanogaster* mortality with an EC₅₀ of 34.6 $\mu\text{L}/\text{L}$ within 12 h of exposure. Additionally, Terpinolene presented damage to the locomotor system after the second hour of exposure, with the effect increasing in a concentration-dependent manner. In conclusion, new tests should be carried out to investigate the Terpinolene reinforcement of antibiotic activity and toxic activity mechanisms of action.

1. Introduction

Staphylococcus aureus is a gram-positive, opportunistic bacterium that is easily found in the human organism, on the skin and mucous membranes, and is directly associated with both community and nosocomial infections. A high virulence and genetic plasticity can lead to the

development of resistance mechanisms whose objective is to guarantee the survival of a species, triggering an antibiotic resistance process and hindering the treatment of diseases [1,2].

One of the resistance mechanisms involves β -lactamase enzymes that have the ability to inactivate β -lactam antibiotics [3]. This resistance occurs through the degradation of the drug by hydrolytic catalysis of the

* Corresponding author.

E-mail addresses: jackelyne_scherf@yahoo.com.br (J.R. Scherf), cristinase75@gmail.com (C.R. Barbosa dos Santos), thiagocrato@hotmail.com (T. Sampaio de Freitas), janainaesmeraldo@gmail.com (J.E. Rocha), nairmacedo@gmail.com (N.S. Macêdo), jessyca.lima@urca.br (J.N. Mascarenhas Lima), cunha.urca@gmail.com, hdmcoutinho@urca.br (F.A. Bezerra da Cunha).

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

Received 11 August 2020; Received in revised form 17 September 2020; Accepted 17 September 2020

Available online 28 September 2020

0882-4010/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

β -lactam ring, which inactivates the bactericidal capacity of the drug. These enzymes are able to hydrolyze almost all β -lactams that have an amine or ester bond such as penicillins [4].

Efflux pumps are another resistance mechanism, which may be present in *S. aureus*. Efflux pumps are composed of transmembrane proteins that form a channel leading to the extracellular environment [4]. Its function is to protect the cell by extruding substrates the bacteria no longer needs or those which are in some way noxious to it. These substrates can be ions, dyes, phosphonium derivatives, Ethidium Bromide or quaternary ammonium compounds (qac) [5].

Qac efflux proteins found in *S. aureus* can be divided into denominations such as QacA, QacB and QacC, up to Z, where each denomination represents a protein from a plasmid family associated with resistance to different substrates. While A and B are genetically similar, the gene coding for QacC is different, with its protein product providing resistance to quaternary ammonium and Ethidium Bromide [6].

In addition to β -lactam drugs that are widely used for the treatment of bacterial infections, quaternary ammonium compounds (qac) are widely used for the asepsis of hospitals and clinics that perform invasive procedures, to prevent and minimize the rate of infections. In view of the advancement of bacterial resistance, there is an urgent need to find substances capable of inhibiting efflux pumps as well as β -lactamases [7, 8].

Terpenes are a class of secondary metabolites, which arouse great interest in researchers, as terpenes have pharmacological properties across several research areas, such as Eugenol, which presents an antifungal activity, Eucalyptol with its anticancer activity and Thymol with an antibacterial activity, including others [9–12].

Within terpene compounds, Terpinolene (1-methyl-4-propan-2-ylidenecyclohexene) belongs to the monoterpene class. Terpinolene is a lipophilic compound and is therefore well absorbed at the cellular level and almost insoluble in water. Terpinolene is present in essential oils from several plant species and has a large amount of biological activities, such as anticancer, antifungal and antioxidant [13,14]. However, despite presenting these activities, gaps regarding its general antibacterial activity exist. At the time of the present study, no articles were found associating Terpinolene with an antibacterial activity.

Some substances possess biological activities capable of inhibiting efflux pumps or have potentials associated with antibacterial activity, however, due to their high toxicity the compound is used as an anti-septic, disinfectant or insecticide [15]. Thus, studies on the toxicity of these compounds are necessary. Bearing in mind that the alternative *Drosophila melanogaster* model is extremely sensitive to toxic substances and to different concentrations, this model becomes suitable for this type of study [16].

Information is lacking in terms of the antibacterial and increase antibiotic activity of Terpinolene. Therefore, this study aimed to evaluate the antibacterial and the reinforcement of antibiotic activity of Terpinolene in the *Staphylococcus aureus* K4100 strain, carrying a QacC efflux pump and β -lactamase, as well as to evaluate its toxic profile.

2. Methodology

2.1. Bacterial strains

The *Staphylococcus aureus* K4100 strain, which has resistance to β -lactam via the β -lactamase mechanism, as well as to Ethidium Bromide and qac through a QacC efflux pump, was used. The bacterial strain used in this study was provided by Professor S. Gibbons from the University of London and was maintained in a blood agar base culture medium (Laboratórios Difco Ltda., Brazil). Before the study, the cells were cultivated on Heart Infusion Agar (HIA, Difco) for growth, for 24 h at 36 °C.

2.2. Drugs

Antibiotics (Oxacillin, Ampicillin and Ampicillin with Sulbactam), Ethidium bromide (EtBr), Carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) and Terpinolene were obtained from Sigma Aldrich Co. Ltd., while Chlorpromazine (CPMZ) was obtained from Aché, and were dissolved in Dimethyl sulfoxide (DMSO). Following this process, the substances were diluted in sterile distilled water to a concentration of 1024 μ g/mL. The Ethidium bromide solution was dissolved in sterile distilled water and stored at –20 °C, being kept away from light at a concentration of 1024 μ g/mL [17].

2.3. Antibacterial activity test via minimum inhibitory concentration (MIC)

The MIC of Terpinolene was determined in a sextuplicate assay, using 100 μ L of the bacterial inoculum suspended in saline water, compared with the 0.5 McFarland scale corresponding to 10⁶ Colony Forming Units and 900 μ L of Brain Heart Infusion (BHI) culture medium in eppendorf s®. Following this, 100 μ L were transferred to each well of a microdilution plate and a serial dilution (100 μ L) of each well was performed, with concentrations ranging from 512 to 0.5 μ g/mL, with the exception of the growth and sterility controls. The plates were incubated in an incubator at 36 °C for 24 h, and growth was visualized by adding 20 μ L of Resazurin to each well. The MIC was defined as the lowest concentration where bacterial growth was not observed [17,18].

2.4. Verification of the presence of β -lactamase

The verification of the presence of β -lactamase was performed using the MIC of Ampicillin alone and the MIC of Ampicillin in association with the β -lactamase inhibitor (Sulbactam) at a concentration of 50%. To confirm the inhibition of β -lactamase it was assumed that a 3-fold dilution decrease in the presence of the inhibitor is indicative of the production of β -lactamase by the strain [19].

2.5. Evaluation of β -lactamase inhibition by MIC reduction

β -Lactamase inhibition was evaluated using a subinhibitory concentration MIC/8 (128 μ g/mL) of Terpinolene to evaluate its ability to decrease the MIC of the antibiotic in the K4100 strain. 170 μ L of the bacterial inoculum suspended in sterile saline solution were added to an eppendorf s®, together with the subinhibitory concentration 128 μ g/mL of Terpinolene and supplemented with BHI until reaching the volume of 1700 μ L. This solution was then transferred to the plate, a microdilution with the antibiotic, Oxacillin, was performed and the test was read after 24 h. No microdilutions were performed in the growth controls. Sterility controls were performed on a separate plate [20].

2.6. Evaluation of efflux pump inhibition by MIC reduction

Inhibition of the QacC efflux pump was tested using the subinhibitory concentration MIC/8 (128 μ g/mL) of Terpinolene with the objective of evaluating its ability to decrease the MIC of EtBr in the K4100 strain. And was used CCCP and Chlorpromazina as standards efflux pump inhibitors in the subinhibitory concentration MIC/8 (1,41 and 128 μ g/mL). 170 μ L of the bacterial inoculum suspended in sterile saline solution were added to an eppendorf s®, together with the subinhibitory concentration (128 μ g/mL) of Terpinolene and supplemented with BHI until reaching the volume of 1700 μ L. This solution was then transferred to the plate, a microdilution with the EtBr was performed with concentrations ranging from 512 to 0.5 μ g/mL. The test was read after 24 h. No microdilutions were performed in the growth controls. Sterility controls were performed separately [20].

2.7. Statistical analysis of bacterial results

The results from the tests were performed in sextuplicate and expressed in graphs. Statistical analyzes were applied using a Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test using the GraphPad Prism 5.0 software.

2.8. Toxicity test

2.8.1. - *Drosophila melanogaster* cultivation and stocks

Drosophila melanogaster (Harwich strain) was obtained from the National Species Stock Center, Bowling Green, OH. The flies were raised in 340 mL glass containers and grown with a medium containing: 83% corn mass, 4% sugar, 4% lyophilized milk, 4% soy bran, 4% wheat bran and 1% salt. When cooking the mixture, 1 g of Nipagin (Methylparaben) was added. After the mixture cooled in the growth containers, 1 mL of a solution containing *Saccharomyces cerevisiae* was added. The flies were kept at a temperature of 26 °C and a relative air humidity of 60%. All tests were performed with the same strain [21].

2.8.2. Mortality test

The tests were performed according to the methodology proposed by Da Cunha et al., 2015 with some modifications. 20 adult flies (males and females) were placed in 130 mL glass containers (6 cm high and 6.5 cm in diameter), with parchment paper at the bottom of the container that had been previously prepared with 1 mL of 20% sucrose solution, while the inside of the container lid had a filter paper that had been impregnated with Terpinolene at concentrations of 1 µL, 5 µL and 10 µL. For the control group, only sucrose was added to the parchment paper. During the entire procedure, a 12:12 h light/dark cycle was maintained, the temperature was controlled to 26 °C and relative air humidity was kept at 60%. The test was performed in triplicates where each "n" was composed of two containers. The mortality readings were taken every 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 36 and 48 h [21].

2.8.3. Negative geotaxis test

Damage to the locomotor system was verified using the negative geotaxis test described by Coulom & Birman. Each group of live flies exposed to Terpinolene were conducted to the bottom of the containers at reading times 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 36 and 48 h, and after 5 s, the number of flies that reached 5 cm in height of the container were counted. The tests were repeated twice at 1-min intervals and was made with the same flies from the beginning. The results were presented as the mean time (±) S.E. obtained from two independent experiments [22].

2.9. Statistical analysis of toxicity results

The toxicity data was analyzed by a two-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparisons test. There were no statistical differences with the same concentration as a function of time.

3. Results and discussion

3.1. Microbiological tests

Terpinolene did not show a direct antibacterial activity in terms of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) assay, obtaining a result ≥ 1024 µg/mL (Table 1). When compared with oxacillin, the difference in the result between the antibiotic and the compound is not large, given

Table 1
Minimum inhibitory concentrations (MIC, µg/mL) of Terpinolene and oxacillin against the *S. aureus* K4100 strain.

Strain	MIC (µg/mL)
<i>S. aureus</i> K4100	Terpinolene ≥ 1024 Oxacillin 161.26

the MIC decrease was less than one ($\geq 1024-522$).

Monoterpenes with antibacterial activity against *S. aureus* and other pathogenic microorganisms exist, such as Carvacrol, Thymol and γ -Terpinene in the 0.17 µg/mL, 8.72 mg/L, and 30 µL concentrations [9, 23,24]. The aforementioned compounds are similar to Terpinolene not only because they are monoterpenes, but also because they have in their chemical structure the main six carbon chain with branches such as methyl and propane, thus being able to demonstrate similar biological activities.

3.2. Verification of the presence of β -lactamase

Sulbactam is considered a β -lactamase inhibitor, where an increase in the antibacterial effect of Ampicillin was verified, due to a decrease in MIC in the test (Fig. 1). When this inhibitor was used together with Ampicillin, in comparison with the antibiotic control, β -lactam, a MIC decrease of approximately five times (456.14–90.51 µg/mL) was observed, indicating the SA K4100 bacterium has the β -lactamase enzymatic resistance mechanism [19].

Given the reduction in ampicillin MIC (512 - 456 µg/mL), this strain has been suggested to have resistance against β -lactams, and with the association of the antibiotic with Sulbactam (90.51 µg/mL), where an inhibition of the enzyme was observed, this indicates the possible presence of this enzymatic mechanism.

S. aureus resistance to β -lactamase is found more frequently, however, some plasmids have the ability to share more than one resistance mechanism, thus leading to the transmission of the gene responsible for the efflux pump [25]. Moreover, an association between quaternary compounds resistance genes and β -lactamase genes exist, which can disseminate enzymatic and efflux pump resistance [26,27].

3.3. β -lactamase inhibition by reduction of the oxacillin MIC

Oxacillin is an antibiotic used against multidrug-resistant strains. Terpinolene reduced the minimum inhibitory concentration against the SA K4100 strain when associated with Oxacillin, according to Fig. 2. When the control is compared with the reinforcement of antibiotic activity of Terpinolene, a reduction of more than half the MIC, decreasing from 161.26 µg/mL to 71.83 µg/mL, was observed.

Bacterial resistance to oxacillin normally occurs through the β -lactamase mechanism, possibly related to the homologous genes from the *Staphylococcus aureus* *blaZ* gene regulators [28]. However, resistance through QacC efflux pumps exist, these being antiseptic resistance proteins, which are associated with lipophilic compounds and mono and divalent cations [29]. There are substances capable of inhibiting efflux pumps that have a cyclic and methyl chain in their chemical structure, such as Hematoporphyrin monomethyl ether and Meso-tetra [30], as

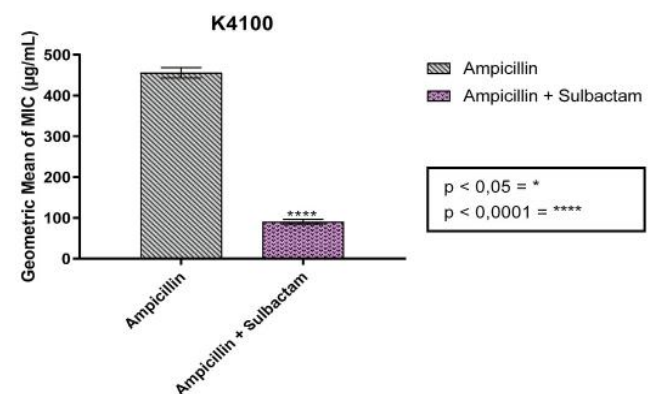


Fig. 1. Verification of the presence of β -lactamase. The values represent the geometric mean \pm S.E.M. (standard error of mean). Two-way ANOVA, followed by the Bonferroni test. $P < 0.0001$ vs control.

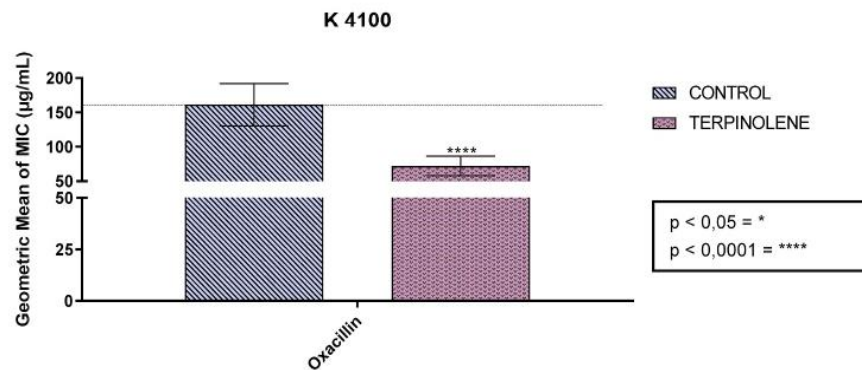


Fig. 2. Ability of inhibition of the QacC efflux pump by the Terpinolene associated with oxacillin, against the SA K4100 multiresistant strain. The values represent the geometric mean \pm S.E.M. (standard error of mean). Two-way ANOVA, followed by the Bonferroni test. $P < 0.0001$ vs control.

well as Terpinolene.

3.4. Efflux pump inhibition by MIC reduction of ethidium bromide

Ethidium Bromide has been widely used for the verification of the presence of an efflux pump, where its mechanism of action is directly associated with binding to bacterial DNA leading to cell death [31]. The QacC efflux pump is characterized by the removal of quaternary ammonia and EtBr compounds, thus being more resistant to this substance. Bacteria that have an efflux pump can extrude this compound from the cell, and therefore substances capable of maintaining EtBr, and other toxic substances, in the bacterium's intracellular environment are efflux pump inhibitors [6,32].

According to Fig. 3, the SA K4100 strain expresses active efflux proteins, confirmed by the MIC reduction of CCCP (45.25–2.5 µg/mL) and chlorpromazine (45.25–12.69 µg/mL). The tests carried out with the SA K4100 bacterium show a decrease in MIC when Terpinolene is associated with EtBr and compared with the control, with a reduction from 45.25 to 32 µg/mL, demonstrating a possible inhibition of the QacC efflux pump.

In addition, this compound having low molecular weight, an important characteristic for a future Efflux Pump Inhibitor [33]. The chlorpromazine, as a phenothiazine substance, can inhibit energy dependent and non-dependent efflux pumps. In addition being able to eliminate plasmids from bacteria [34]. However, the bacteria has the ability to adapt and resist to increasing levels of antibiotics and toxic substances, as heavy metals [35].

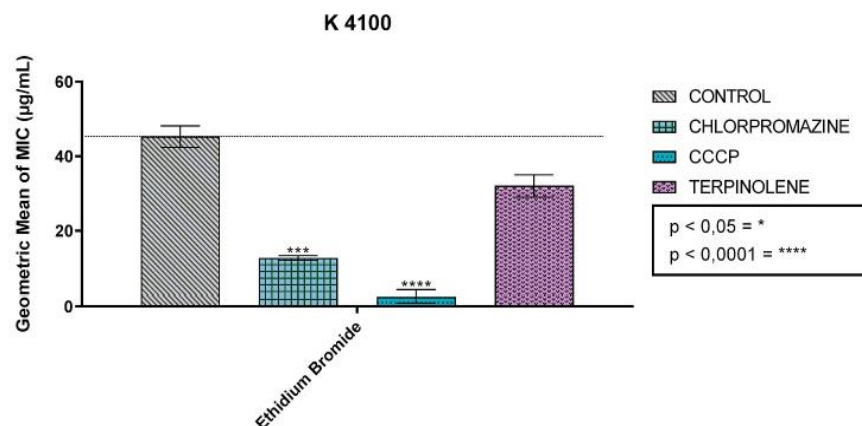


Fig. 3. Ability of inhibition of the QacC efflux pump by the Terpinolene associated with ethidium bromide, against the SA K4100 multiresistant strain. The values represent the geometric mean \pm S.E.M. (standard error of mean). Two-way ANOVA, followed by the Bonferroni test. A: Associated with Ethidium Bromide; CCCP: carbonilcianeto *m*-clorofenil-hidrazona. $P < 0.0001$ vs control.

3.5. *Drosophila melanogaster* mortality test

The results from the Terpinolene toxicity test demonstrate that the compound has an EC_{50} value of 32.46 µL/L during 12 h of exposure. According to Fig. 4, results from the toxicity mortality test, performed with the *Drosophila melanogaster* arthropod model, showed the compound presented high toxicity at 5 µL and 10 µL concentrations, from the second hour of exposure and the lowest concentration (1 µL) from the fourth hour, where the mortality rate gradually increased with time, as well as in a concentration-dependent manner.

Terpinolene is widely used in agriculture for being a part of the allelochemical terpenoid bioherbicide class, in addition to being used in the production of perfumes and in the pharmaceutical industry [36]. According to a study by Zhang et al., 2016, from the 40 monoterpenes tested by fumigation, Terpinolene demonstrated the greatest toxicity against *D. melanogaster*. The position of the hydroxyl in the chemical structure has been suggested to play a large part in the insecticidal activity, while the carbonyl group possibly increases the toxic activity of the compounds [37]. In a test performed against *Musca domestica* L., Terpinolene showed an LC_{50} of 1.84 µL/L, being defined as one of the only hydrocarbon monoterpenes with insecticidal activity against the house fly [38].

Because terpenes have a low molecular weight, they become volatile, in addition to being highly lipophilic, favoring their passage into the intracellular environment [39]. According to Hua et al., 2018 Terpinolene can lead to increased oxidative stress and reactive oxygen species (ROS), which can lead to cell death [40], in addition to an elevated production of acetylcholinesterase, which when not metabolized, can

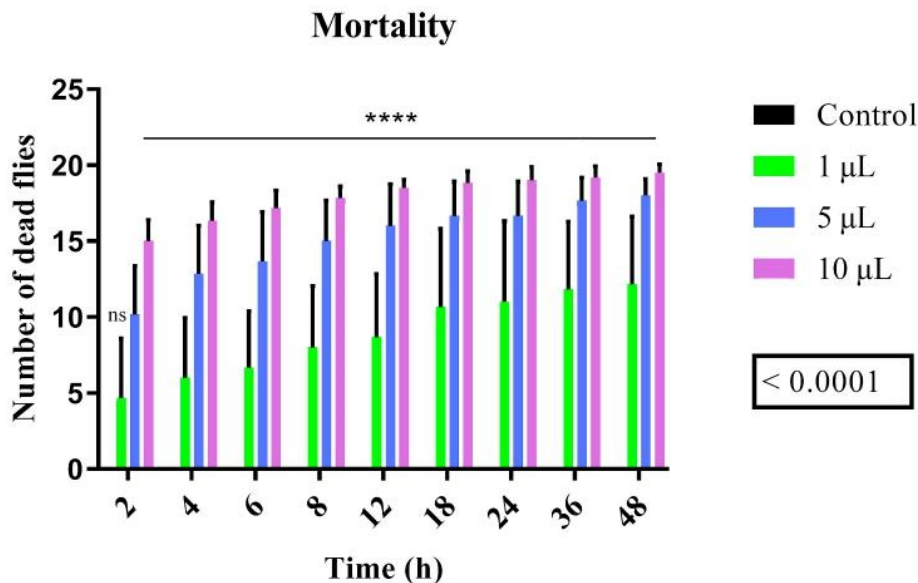


Fig. 4. Toxic effect of different Terpinolene concentrations on *D. melanogaster*.

cause paralysis and lead to death [41].

3.6. *Drosophila melanogaster* locomotor damage test

The verification of *D. melanogaster* locomotor activity consists of verifying the ability of this arthropod to move vertically, thus showing any damage caused by compounds which did not cause death. It has been suggested that when the *D. melanogaster* species is exposed to toxic substances it can hydrolyze part of the acetylcholinesterase that was produced in excess. This enzyme can cause paralysis and lead to death according to the time of exposure and concentration [41]. However, no negative geotaxis studies using the *Drosophila melanogaster* model against Terpinolene were found in the literature.

In the negative geotaxis tests where possible damages to the locomotor system are verified, a locomotor deficit was observed from the second hour of exposure with all tested concentrations (Fig. 5). This effect gradually increased over the time of exposure and in a concentration-dependent manner.

4. Conclusion

As observed in this study, when the SA K4100 strain was tested with Ampicillin and Sulbactam, a five-fold decrease in MIC (456.14–90.51 µg/mL) was noted, indicating the bacterium has resistance to β-lactamase. However, Terpinolene has no direct antibacterial activity (≥ 1024). When Terpinolene is combined with Oxacillin, a reduction of more than twice the MIC value (161.26–71 µg/mL) is observed. Showing a possible inhibition of β-lactamase. Terpinolene also presented a reduction in MIC values (45.25–32 µg/mL) in the EtBr test. Indicating a supposed synergism, reinforcing of antibiotic activity by inhibiting the efflux pump. Terpinolene displayed mortality and damage to the locomotor system, with an EC_{50} of 32.46 µL/L during 12 h of exposure, presenting toxic activity against *Drosophila melanogaster*. However, further studies are needed to identify the mechanisms of action, as well as *in vivo* tests to assess the antibacterial, increase of the antibiotic and toxic activity of Terpinolene.

Funding

This study was funded by the Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico — FUNCAP (BP3-0139-

Negative geotaxis

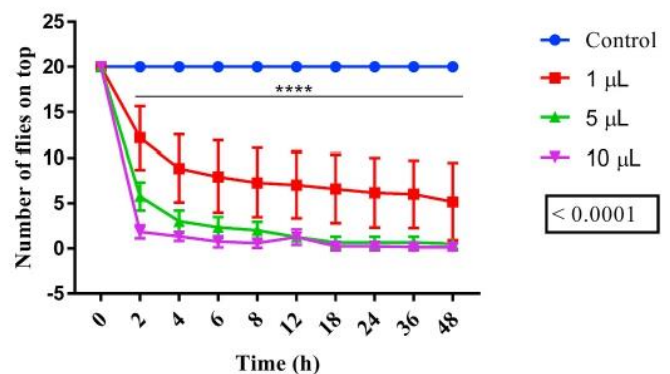


Fig. 5. Toxic effect of varying Terpinolene concentrations on the locomotor ability of *D. melanogaster*.

00077.01.00/18).

CRedit authorship contribution statement

Jackelyne Roberta Scherf: Conceptualization. **Cristina Rodrigues Barbosa dos Santos:** Methodology. **Thiago Sampaio de Freitas:** Formal analysis. **Janaina Esmeraldo Rocha:** Formal analysis. **Nair Silva Macedo:** Methodology. **Jessyca Nayara Mascarenhas Lima:** Validation. **Henrique Douglas Melo Coutinho:** Coordination of the project. **Francisco Assis Bezerra da Cunha:** Supervision.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgment

Project Geoparque Araripe. FUNCAP.

References

- [1] J.M. Munita, C.A. Arias, A.R. Unit, A. De Santiago, HHS public access mechanisms of antibiotic resistance, HHS Public Access 4 (2016) 1–37, <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.Mechanisms>.
- [2] N.A. Turner, B.K. Sharma-Kuinkel, S.A. Maskarinec, E.M. Eichenberger, P.P. Shah, M. Carugati, T.L. Holland, V.G. Fowler, Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research, Nat. Rev. Microbiol. 17 (2019) 203–218, <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>.
- [3] L. Andrade, A. Darini, Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse? J. Infect. Control 6 (2017) 16–25.
- [4] G. Kapoor, S. Saigal, A. Elongavan, Action and resistance mechanisms of antibiotics: a guide for clinicians, J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol. 33 (2017) 300–305, https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15.
- [5] A.B.P. D. T.C.D.P. D. Clinical microbiology, Clin. Microbiol. Newsl. 40 (2018) 165–174, <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2018.10.001>.
- [6] T. Wassenaar, D. Ussery, L. Nielsen, H. Ingmer, Review and phylogenetic analysis of qac genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in Staphylococcus species, Eur. J. Microbiol. Immunol 5 (2015) 44–61, <https://doi.org/10.1556/eujmi-d-14-00038>.
- [7] D. Suisse, Bactéries multirésistantes et voyage, 2017, pp. 944–947.
- [8] L.Y. Mo, Y.A. Liu, J. Zhu, L.T. Qin, Y.P. Liang, H.H. Zeng, Benefits from hazards, benefits from nothing, and benefits from benefits: the combined effects of five quaternary ammonium compounds to Vibrio qinghaiensis Q67, Environ. Sci. Eur. 32 (2020), <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00310-z>.
- [9] N. Nordin, S.H. Othman, S.A. Rashid, R.K. Basha, Effects of glycerol and thymol on physical, mechanical, and thermal properties of corn starch films, Food Hydrocolloids 106 (2020), 105884, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105884>.
- [10] S. Sampath, S. Subramani, S. Janardhanam, P. Subramani, A. Yuvaraj, R. Chellan, Bioactive compound 1,8-Cineole selectively induces G2/M arrest in A431 cells through the upregulation of the p53 signaling pathway and molecular docking studies, Phytomedicine 46 (2018) 57–68, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.007>.
- [11] S. Shaban, M. Patel, A. Ahmad, Improved efficacy of antifungal drugs in combination with monoterpene phenols against Candida auris, Sci. Rep. 10 (2020) 1–8, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58203-3>.
- [12] R. Kiyama, Estrogenic terpenes and terpenoids: pathways, functions and applications, Eur. J. Pharmacol. 815 (2017) 405–415, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.09.049>.
- [13] P. Zhao, Y. Wang, W. Huang, L. He, Z. Lin, J. Zhou, Q. He, Toxic effects of terpinolene on Microcystis aeruginosa: physiological, metabolism, gene transcription, and growth effects, Sci. Total Environ. 719 (2020), 137376, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137376>.
- [14] E. Aydin, H. Türkez, Ş. Taşdemir, Anticancer and antioxidant properties of terpinolene in rat brain cells, Arh. Hig. Rada. Toksikol. 64 (2013) 415–424, <https://doi.org/10.2478/10004-1254-64-2013-2365>.
- [15] P.W. Limaverde, F.F. Campina, F.A.B. da Cunha, F.D. Crispim, F.G. Figueredo, L. F. Lima, C. Datiane de M Oliveira-Tintino, Y.M.L.S. de Matos, M.F.B. Morais-Braga, I.R.A. Menezes, V.Q. Balbino, H.D.M. Coutinho, J.P. Siqueira-Júnior, J.R.G. S. Almeida, S.R. Tintino, Inhibition of the TetK efflux-pump by the essential oil of Chenopodium ambrosioides L. and α -terpinene against Staphylococcus aureus IS-58, Food Chem. Toxicol. 109 (2017) 957–961, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.031>.
- [16] M.D. Rand, S.L. Montgomery, L. Prince, D. Vorobjeikina, Developmental toxicity assays using the Drosophila model, Curr. Protoc. Toxicol 1 (2014) 1–27, <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0112s59>.
- [17] CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute Standards Development Policies and Process, Clin. Lab. Stand. Int. 2013, in: https://clsi.org/media/1711/clsi_standards_development_policies_and_processes_final.pdf.
- [18] M.M. Javadpour, M.M. Juban, W.C.J. Lo, S.M. Bishop, J.B. Alberty, S.M. Cowell, C. L. Becker, M.L. McLaughlin, De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity, J. Med. Chem. 39 (1996) 3107–3113, <https://doi.org/10.1021/jm9509410>.
- [19] CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute Standards Development Policies and Process, Clin. Lab. Stand. Int. 2019.
- [20] CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Clin. Lab. Stand. Int. 2015.
- [21] F.A.B. Da Cunha, G.L. Wallau, A.I. Pinho, M.E.M. Nunes, N.F. Leite, S.R. Tintino, G. M. Da Costa, M.L. Athayde, A.A. Boligon, H.D.M. Coutinho, A.B. Pereira, T. Posser, J.L. Franco, Eugenia uniflora leaves essential oil induces toxicity in Drosophila melanogaster: involvement of oxidative stress mechanisms, Toxicol. Res. (Camb) 4 (2015) 634–644, <https://doi.org/10.1039/c4tx00162a>.
- [22] H. Coulom, S. Birman, Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in Drosophila melanogaster, J. Neurosci. 24 (2004) 10993–10998, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2993-04.2004>.
- [23] A. Kumar, A. Kamal, S. Singh, R.C. Padalia, S. Tandon, A. Chauhan, D. Saikia, R. S. Verma, Chemical composition, antimicrobial activity, kinetics and mechanism of action of Himalayan-thyme (Thymus linearis Benth.), J. Essent. Oil Res. 32 (2020) 64–73, <https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1662337>.
- [24] Z. Mohammadzamani, A. Khorshidi, A. Khaledi, A. Shakerimoghaddam, G. A. Moosavi, A. Piroozmand, Inhibitory effects of Cinnamaldehyde, Carvacrol, and honey on the expression of *exoS* and *ampC* genes in multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from burn wound infections, Microb. Pathog. 140 (2020), 103946, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103946>.
- [25] M.S. Sidhu, E. Heir, H. Sørum, A. Holck, Genetic linkage between resistance to quaternary ammonium compounds and β -lactam antibiotics in food-related Staphylococcus spp, Microb. Drug Res. 7 (2001) 363–371, <https://doi.org/10.1089/10766290152773374>.
- [26] F. Hadadi, E.G. Rad, A. Almasi-Hashiani, H. Abtahi, Detection of QACE1, QACG, QACE, QACF resistance genes in escherichia coli producing broad-spectrum beta-lactamases to benzalkonium chloride, J. Babol Univ. Med. Sci 21 (2019) 286–292.
- [27] C. Kim, C. Milheirico, S. Gardete, M.A. Holmes, M.T.G. Holden, H. De Lencastre, A. Tomasz, Properties of a novel PBP2A protein homolog from staphylococcus aureus strain LGA251 and its contribution to the β -lactam-resistant phenotype, J. Biol. Chem. 287 (2012) 36854–36863, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.395962>.
- [28] F.D. Lowy, Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus, J. Clin. Invest. 111 (2003) 1265–1273, <https://doi.org/10.1172/jci200318535>.
- [29] M.J. Uddin, J. Ahn, Associations between resistance phenotype and gene expression in response to serial exposure to oxacillin and ciprofloxacin in Staphylococcus aureus, Lett. Appl. Microbiol. 65 (2017) 462–468, <https://doi.org/10.1111/lam.12808>.
- [30] P. Dharmaratne, D.N. Sapugahawatte, B. Wang, C.L. Chan, K.M. Lau, C. Lau, K. P. Fung, D.K. Ng, M. Ip, Contemporary approaches and future perspectives of antibacterial photodynamic therapy (aPDT) against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): a systematic review, Eur. J. Med. Chem. 200 (2020), 112341, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112341>.
- [31] A. Banerjee, P. Majumder, S. Sanyal, J. Singh, K. Jana, C. Das, D. Dasgupta, The DNA intercalators ethidium bromide and propidium iodide also bind to core histones, FEBS Open Bio 4 (2014) 251–259, <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.02.006>.
- [32] X.-Z. Li, H. Nikaido, Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an update, Drugs. 69 (2009) 1555–1623 [Review].
- [33] A. Lamut, L.P. Mašić, D. Kikelj, T. Tomasić, Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria, Med. Res. Rev. 39 (2019) 2460–2504, <https://doi.org/10.1002/med.21591>.
- [34] M. M. Kristiansen, C. Leandro, D. Ordway, M. Martins, M. Viveiros, T. Pacheco, J. E. Kristiansen, L. Amaral, Phenothiazines alter resistance of methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus (MRSA) to oxacillin in vitro, Int. J. Antimicrob. Agents 22 (2003) 250–253, [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(03\)00200-0](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(03)00200-0).
- [35] A. Martins, I. Couto, L. Aagaard, M. Martins, M. Viveiros, J.E. Kristiansen, L. Amaral, Prolonged exposure of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) COL strain to increasing concentrations of oxacillin results in a multidrug-resistant phenotype, Int. J. Antimicrob. Agents 29 (2007) 302–305, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.10.012>.
- [36] S.M. Seyyednejad, H. Koochak, F.P. Najafabade, M. Kolahi, Allelopathic effect of aquatic hull extract of rice (Oryza sativa L.) on growth of Silybum marianum and Echinochloa crus-galli, Afr. J. Agric. Res. 5 (2010) 2222–2226.
- [37] Z. Zhang, T. Yang, Y. Zhang, L. Wang, Y. Xie, Fumigant toxicity of monoterpenes against fruitfly, Drosophila melanogaster, Ind. Crop. Prod. 81 (2016) 147–151, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.076>.
- [38] Z. Zhang, Y. Xie, Y. Wang, Z. Lin, L. Wang, G. Li, Toxicities of monoterpenes against housefly, Musca domestica L. (Diptera: muscidae), Environ. Sci. Pollut. Res. 24 (2017) 24708–24713, <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0219-4>.
- [39] X. Moreira, L. Abdala-Roberts, C.S. Nell, C. Vázquez-González, J.D. Pratt, K. Keefover-Ring, K.A. Mooney, Sexual and genotypic variation in terpene quantitative and qualitative profiles in the dioecious shrub Baccharis salicifolia, Sci. Rep. 9 (2019) 1–10, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51291-w>.
- [40] Q. Hua, Y. guo Liu, Z. li Yan, G. ming Zeng, S. bo Liu, W. jin Wang, X. fei Tan, J. qin Deng, X. Tang, Q. peng Wang, Allelopathic effect of the rice straw aqueous extract on the growth of Microcystis aeruginosa, Ecotoxicol. Environ. Saf. 148 (2018) 953–959, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.049>.
- [41] X. Hu, W. Fu, X. Yang, Y. Mu, W. Gu, M. Zhang, Effects of cadmium on fecundity and defence ability of Drosophila melanogaster, Ecotoxicol. Environ. Saf. 171 (2019) 871–877, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.029>.