



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

Luiz Jardelino de Lacerda Neto

**Estudo do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* e seu constituinte α -terpineno
a luz do efeito vasorelaxante, antimicrobiano e potencial tóxico em modelo de
*Drosophila melanogaster***

Crato
2021

Luiz Jardelino de Lacerda Neto

Estudo do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* e seu constituinte α -terpineno a luz do efeito vasorelaxante, antimicrobiano e potencial tóxico em modelo de *Drosophila melanogaster*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri - URCA, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Química Biológica.

Orientador: Francisco Assis Bezerra da Cunha

Co-orientador: Irwin Rose Alencar de Menezes

Crato

2021

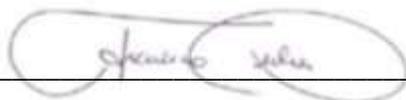
Luiz Jardelino de Lacerda Neto

**Estudo do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* e seu constituinte e α -terpineno
a luz do efeito vasorelaxante, antimicrobiano e potencial tóxico em modelo de
*Drosophila melanogaster***

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Química Biológica, da
Universidade Regional do Cariri -
URCA, como requisito para obtenção do
Título de Doutor em Química Biológica.

Defendido e aprovado em: 28 de junho de 2021.

Banca examinadora:



Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha
Orientador- URCA

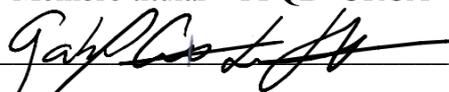
Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes
Co-orientador- URCA



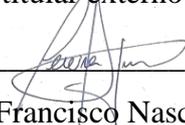
Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior
Membro titular – PPQB -URCA - UFS



Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
Membro titular – PPQB -URCA



Prof. Dr. Gabriel Costa Alverni da Hora
Membro titular externo - University of Utah



Prof. Dr. Francisco Nascimento Pereira Junior
Membro titular externo - UFCA

Prof. Dr. Raimundo Nonato Pereira Texeira
Membro suplente interno - URCA

Prof. Dr. Hebert di Tarso Fernandes Facundo
Membro suplente externo - UFCA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Regional do Cariri
Biblioteca Universitária

L138b Lacerda Neto, Luiz Jardelino de.
Estudo do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* e seu constituinte e α -terpineno a luz do efeito vasorelaxante, antimicrobiano e potencial tóxico em modelo de *Drosophila melanogaster*/ Luiz Jardelino de Lacerda Neto. – 2021.
126 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Regional do Cariri, Centro De Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Crato, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha.

Coorientação: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes.

1. Atividade biológica. 2. Produtos naturais. 3. Toxicidade. 4. Vasorelaxamento. I. Título.

CDD 572

Dedico este trabalho a Deus e a todas as famílias que sofreram com a pandemia de COVID-19.

.

Agradecimentos

A Deus, o Grande Arquiteto do Universo, inteligência suprema e causa primária de todas as coisas, obrigado Senhor por me dar forças quando precisei, por guiar e iluminar meus caminhos!

Aos meus pais, João Pereira Leite e Maria do Socorro Lacerda, que sempre nos incentivaram, meus irmãos e eu, nos estudos, realizando algumas vezes esforços gigantescos para nos proporcionar as melhores condições de vida e estudo. Muito obrigado.

A minha família adotiva cratense, meu primo José Rosieldo Figueiredo Silva, sua esposa Verônica Maria Figueiredo Lima e filhos.

A toda minha família, tios e primos, em especial ao meu tio José Gorete Pedroza de Lacerda, pela contribuição intelectual. Obrigado por se orgulharem dos meus estudos, essa vitória também é de vocês!

Aos meus segundos pais, Francisco Rolim Sobrinho e Barbara Fernandes Rolim, pelo apoio incondicional durante minha graduação na capital paraibana, passo fundamental e indispensável para essa conquista.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha, agradeço pela pessoa que és e tenho eterna gratidão pelos valiosos conhecimentos, dedicação, por saber elogiar e criticar do jeito e na hora certa. Obrigado por tudo!!!

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes, por ter se disponibilizado gentilmente a co-orientar este trabalho, contribuindo sempre com seus conhecimentos e grande incentivo. Obrigado!

Aos professores: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho e Prof^a. Dr^a. Roseli Barbosa, pessoas muito importantes nesse trabalho, sou-lhes grato pela disponibilidade de sempre ajudar, pelo imenso auxílio e conhecimento transferido, pelo encorajamento e pela amizade! Muito agradecido!

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Química Biológica da Universidade Regional do Cariri (URCA), Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Química Biológica, em especial: Prof. Dr. Diniz Maciel de Sena Junior, Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa, Prof. Dr. Leandro Costa Lima Verde, Prof^a. Dr^a Marta Regina Kerntopf, Prof. Dr. Raimundo Nonato Pereira Teixeira e Prof^a. Dr^a. Roseli Barbosa.

À Andreza Guedes Barbosa Ramos, sem a qual este trabalho teria sido bem mais árduo. Obrigado pelo apoio, carinho e atenção. Serei eternamente grato.

Aos infalíveis companheiros de bancada, Dárcio Luiz, Zildene, Nair, Cristina, Tiago e Janaína, por sempre estarem disponíveis na realização dos ensaios.

Aos amigos do Doutorado, Lindaiane, Renata e Andreza, por tornarem os momentos mais divertidos e pela amizade, pela ajuda. Obrigado.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular, pelo companheirismo, experiências compartilhadas e palavras de conforto nos momentos difíceis que compartilhamos juntos;

À Universidade Federal de Campina Grande pelo apoio para a qualificação.

À URCA e aos funcionários desta IES, no nome de Francisco de Assis Belarmino Rodrigues (*in memoriam*), que mantiveram o ambiente seguro e agradável.

À secretária Manuela Fernandes (Manu), pela solicitude!

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior – CAPES, pelo suporte financeiro;

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

“Um barco ancorado é seguro, mas não é para isso que os barcos foram feitos”.

John A. Shedo

RESUMO

Os produtos naturais são fontes importantes na descoberta de substâncias ou compostos com atividades biológicas e tem contribuído substancialmente para inclusão de novos produtos nos mercados farmacêutico, cosmético, de aditivos entre outros. Os óleos essenciais e seus constituintes podem apresentar-se como uma inestimável fonte de compostos bioativos que contribuem para desenvolvimento de novos produtos destes mercados. A presente tese objetivou verificar a atividade tóxica do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides*, e seu constituinte isolado, o α -terpineno, contra *Drosophila melanogaster*, registrar o efeito sobre contração de coronária de suínos, além de determinar possíveis mecanismos desse efeito tóxico e ação α -terpineno sobre bombas de efluxo presentes em cepas de *Staphylococcus aureus*. Os testes de relacionado à toxicidade foram os testes de sobrevivência e geotaxia negativa com exposição a substância por fumigação, os testes de micro diluição, com cepas contendo bomba de efluxo, com brometo de etídio foram realizados para verificar interferência nas bombas pelo α -terpineno. Tanto o óleo de *Chenopodium ambrosioides*, quanto o α -terpineno apresentaram toxicidade contra a *D. melanogaster*, sendo este primeiro mais eficiente. O relaxamento da contração foi registrado tanto para o óleo essencial de *C. ambrosioides*. O α -terpineno não apresentou atividade antibacteriana quando isolado, a diminuição da concentração inibitória mínima dos antibióticos nas cepas 1199B, K2068 e K4100. Assim, podemos observamos que óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* e seu constituinte (α -terpineno) apresentaram efeito toxico sobre a mosca da fruta, efeito miorrelaxante sobre artéria coronária de porco e o α -terpineno, especificamente efeito modulador de alguns antibióticos e por isso devem ser estudados mais profundamente, pois são uma fonte promissora de produtos que possuem bioatividades de grande relevância.

Palavras-Chave: Atividade biológica; Produtos naturais; toxicidade, vasorelaxamento, antibacteriano.

ABSTRACT

Natural products are important sources in the discovery of substances or compounds with biological activities and have substantially contributed to the inclusion of new products in the pharmaceutical, cosmetic, additives and other markets. Essential oils and their constituents can be an invaluable source of bioactive compounds that contribute to the development of new products in these markets. The present thesis aimed to verify the toxic activity of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides*, and its isolated constituent, α -terpinene, against *Drosophila melanogaster*, to register the effect on swine coronary contraction, in addition to determining possible mechanisms of this toxic effect and α action -terpinene on efflux pumps present in *Staphylococcus aureus* strains. Toxicity-related tests were survival tests and negative geotaxis with exposure to the substance by fumigation, micro-dilution tests with strains containing efflux pump, with ethidium bromide were performed to verify interference in the pumps by α -terpinene. Both *Chenopodium ambrosioides* oil and α -terpinene showed toxicity against *D. melanogaster*, the latter being more efficient. The relaxation of contraction was recorded for both the essential oil of *C. ambrosioides*. α -terpinene did not show antibacterial activity when isolated, decreasing the minimum inhibitory concentration of antibiotics in strains 1199B, K2068 and K4100. Thus, we can observe that *Chenopodium ambrosioides* essential oil and its constituent (α -terpinene) had a toxic effect on the fruit fly, myorelaxant effect on the porcine coronary artery and α -terpinene, specifically a modulating effect of some antibiotics and therefore should be studied more deeply, as they are a promising source of products that have highly relevant bioactivities.

Keywords: Biological activity; Natural products; Toxicity; Vasorelaxation, Antibacterial

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

Figura 1 - Perfil do histograma da composição do óleo essencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	39
Figura 2 - Efeito relaxante do óleo essencial de <i>Dysphania ambrosioides</i> (EODa) nas contrações mantidas pelo potássio em artérias coronárias isoladas de suínos.	40
Figura 3 - . Efeito relaxante do EODa nas contrações mantidas pela serotonina em artérias coronárias isoladas de suínos.	40
Figura 4 - Efeito do óleo essencial da folha de <i>D. ambrosioides</i> na sobrevivência de <i>D. melanogaster</i>	41
Figura 5 - Efeito do α -terpineno sobre a sobrevivência de <i>D. melanogaster</i>	42
Figura 6 - Efeito do óleo essencial da folha de <i>D. ambrosioides</i> na habilidade locomotora de <i>D. melanogaster</i>	42
Figura 7 - Efeito do α -terpineno na capacidade locomotora de <i>D. melanogaster</i>	43
Figura 8 - Relação entre moscas vivas e alterações na mobilidade	44

Capítulo III

Figura 1 - Efeito da associação entre α -terpineno e antibióticos nas cepas 1199B, K2068 e K4100.	61
Figura 2 - Ensaio de mortalidade com o modelo <i>Drosophila melanogaster</i> frente ao composto α -Terpineno	64
Figura 3 - Ensaio de geotaxia negativa com o modelo <i>Drosophila melanogaster</i> frente ao α -terpineno.	65
Figura 4 - Relação entre moscas vivas e alterações na mobilidade.	69

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 1 - Toxicidade fumigante do óleo essencial de <i>Dysphania ambrosioides</i> e α -terpineno contra moscas adultas de <i>D. melanogaster</i>	41
--	----

Capítulo III

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos Antibióticos e do α -terpineno	61
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca⁺² - Ion cálcio

CO₂ - dióxido de carbono

DAG - Diacyl glycerol (Diacilglicderol)

DMAPP - dimetilalil pirofosfato

FPP - difosfato de farnesil

GGPP - difosfato de geranilgeranil

GPP - difosfato de geranil

G_q/11 - *Heterotrimeric G protein alfa subunits* (Proteína G heterotrimerica subunidade alfa)

IP₃ - *Inositol trisphosphate* (Inositol trifosfato)

IP₃R - *Inositol trisphosphate receptor* (Receptor de Inositol trifosfato)

IPP - isopentenil pirofosfato

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

K⁺ - Ion Potássio

MEP - metileritritol fosfato

Na⁺ - Ion sódio

PIP₂ - *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate* (Fosfatidilinositol 4,5- bifosfato)

PKA – *Protein kinase A* (Proteína quinase A)

PKC – *Protein kinase C* (Proteína quinase C)

PLC - *Phospholipase C* (Fosfolipase C)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1	Introdução Geral	16
1.2	Estratégias de pesquisa.....	17
1.3	Estrutura da tese.....	19
2.	CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1	Produto Natural.....	21
2.2	Óleos Essenciais.....	22
2.2.1	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	23
2.3	Componentes dos óleos essenciais.....	24
2.3.1	Terpenos.....	24
2.4	Bioatividades.....	25
2.4.1	Toxicidade.....	26
2.4.2	Atividade antibacteriana	27
2.4.3	Contração e relaxamento do musculo liso vascular	28
2.5	Referências.....	29
3.	CAPÍTULO II – EFEITO MIORRELAXANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Dysphania ambrosioides</i> NA ARTÉRIA CORONÁRIA DE <i>SUS SCROFA DOMESTICUS</i> E SUA TOXICIDADE NO MODELO DE <i>Drosophila melanogaster</i>	36
4.	CAPÍTULO III - ALFA-TERPINENO COMO AGENTE ANTIBACTERIANO, POTENCIALIZADOR DE EFICÁCIA DE ANTIBIÓTICOS E LETALIDADE SOBRE DÍPTEROS.	56
	APÊNDICES.....	79

1. INTRODUÇÃO

1.1 Introdução Geral

A busca por produtos com atividade biológica e/ou farmacológica tem se voltado cada vez mais para substâncias de origem natural, que podem ser utilizadas *in natura* de forma direta como fitoterápico, seja pela população ou em formulações preparada pela indústria. Além disso, seus constituintes podem ser isolados e passar por alterações estruturais como o objetivo de torná-las mais eficazes, biodisponíveis e/ou seguras. Em resumo, melhorando a relação farmacocinética e farmacodinâmica. Dentre as grandes famílias de metabólitos secundários oriundos de produtos naturais destaca-se os terpenóides que tem apresentado propriedades biológicas promissoras, sendo amplamente utilizados na indústria farmacêutica, de cosméticos e de saneantes. Assim, a pesquisa de novas atividades biológicas promovidas por terpenóides é de interesse científico e comercial.

Os terpenóides são resultados do metabolismo vegetal, e são subdivididos em diversos subtipos chegando a mais de 36.000 moléculas já relatadas, esta classe não é apenas numerosa, mas também apresentam grande variabilidade estrutural como presença dos mais diversos grupos funcionais. Essa condição fornece a esta classe uma grande diversidade de ações dentre as quais posso citar: anti-edematogênica, anti-inflamatório e anti-hipertensiva (ASHOUR; WINK; GERSHENZON, 2018; RAMOS *et al.*, 2020). Tais atividades precisam ser testadas através de ensaios em animais que exigem autorização para execução, como as regulamentadas pela lei Arouca (Lei Federal nº 11.794/08). Com a possibilidade da utilização de métodos alternativos essas autorizações não são exigidas e muitas informações importantes são geradas sobre atividades tóxica, biológica e/ou farmacológica dos produtos em análise, sejam substâncias isoladas ou seus compostos originais, no caso de óleos essenciais ou extratos. Esse tipo de estudo, com métodos alternativos, produz informações diversas e importantes que podem otimizar os testes que utilizam cordados.

Existem diversos métodos alternativos que não precisam da utilização direta de animais, e estes podem ser classificados em testes *ex vivo*, *in vitro* e *in silico*, promovendo a substituição de animais cordados por outras espécies que estão isentas de regulação e que geralmente apresentam melhor manejo e menor custo de manutenção. Assim, almejo obter respostas sobre os efeitos de terpenos em *Drosophila melanogaster*, como método de substituição, e compreender como representantes desta classe de metabólitos secundários interagem com este modelo experimental e quais alterações podem promover e que efeitos podem ser observados. Testes *in vitro* com micro-organismo (bactérias) foram realizados

para obter informações sobre concentrações bactericidas e interações entre o terpeno testado e antibióticos e sua interferência em mecanismo de resistência (bomba de efluxo).

Os testes *ex vivo*, serviram de subsídio para importantes informações sobre a ação em músculo liso, mais especificamente na capacidade de promover relaxamento após contração induzida por potássio e serotonina, em artéria coronária de porco. Todos os métodos citados até aqui são métodos alternativos e que são isentos de autorizações previstas em lei para sua execução, mas não tem a capacidade de substituir os testes com animais cordados, e sim de complementar informações e promover o princípio dos 3R's (1; redução (*Reduction*), 2; refinamento (*Refinement*) e 3; substituição (*Replacement*).

Portanto, o objetivo foi verificar a toxicidade do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (*Chenopodiaceae*) e α -terpineno contra *Drosophila melanogaster*, além de produzir o maior número de informações relevantes sobre os métodos alternativos utilizados no desenvolvimento deste trabalho, sendo estas aptas a formar um arcabouço que irá fundamentar a utilização de testes alternativos com objetivo de baratear, agilizar e ser mais eficiente e seguro na busca por substâncias com atividades biológicas.

1.2 Estratégias de pesquisa

As bioatividades de compostos complexos ou isolados, sejam eles naturais, semissintéticos ou totalmente sintéticos, são verificadas buscando o uso clínico por ensaios de modelagem computacional, *in vitro*, *in vivo* usando animais, ensaios pré-clínicos, e posteriormente realizados testes clínicos em seres humanos. (TEAGUE; VALKO, 2017). Esta sequência está relacionada com a determinação de doses seguras, vias de administração, posologia e efeitos esperados, portanto, um estudo amplo de farmacocinética e farmacodinâmica a fim de tornar a utilização da substância segura e eficaz (DICKSON; GAGNON, 2004). Entretanto, a utilização de animais cordados nestes ensaios pré-clínicos deve ser cada vez mais regulamentada para que ocasione o mínimo possível de sofrimento para os animais e para esse propósito a teoria dos 3R's (do inglês *Reduction, Replacement and Refinement* – Redução, Substituição e Refinamento) (GRUBER; HARTUNG, 2004) tem sido utilizada como base.

Os testes *ex vivo*, *in vitro* e *in silico* de substituição de cordados por não-cordados tem se apresentado como ferramentas importantes na produção de informações que contribuem para a melhor utilização dos cordados, promovendo assim testes pré-clínicos mais precisos e refinados, que utilizam um número menor de animais (DOKE *et al.*, 2015). A *Drosophila melanogaster* é um modelo que apresenta-se com baixo custo de manutenção, exigência de pouco espaço e fácil manipulação, podendo fornecer dados importantes sobre a toxicidade de substâncias, além de servir de modelos para diversas

doenças neurodegenerativas (BOLUS *et al.*, 2020; LAMBRECHTS; FABER; SIBON, 2017).

Os efeitos tóxicos podem ser inicialmente avaliados pelos testes de sobrevivência das moscas à exposição à substância, sendo possível determinar a sua concentração letal média, além de ser possível verificar a capacidade da substância de promover alterações na capacidade locomotora dos insetos. O efeito tóxico está relacionado diretamente ao estresse oxidativo que pode ser mensurado por testes de lipoperoxidação, espécies reativas de oxigênio, tióis não proteicos, e tióis proteicos e testes enzimáticos de glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) de acordo com métodos descritos anteriormente (DA CUNHA *et al.*, 2015; FRANCO *et al.*, 2009).

Alterações na fisiologia do músculo liso são fatos relevantes pois o controle do tônus dessa musculatura regula o funcionamento de vários sistemas fundamentais à vida. A contração ou relaxamento do músculo liso depende de muitos mecanismos e podem ser regulados por controle central, químico e físico. No exemplo do sistema circulatório, os vasos apresentam um tônus que é responsável por grande parte do controle pressórico. Ações sobre estes músculos implicam em respostas biológicas significantes, então testes que usam tecidos com capacidade de contração e relaxamento auxiliam na determinação da potencial toxicidade da substância, uma vez que, substâncias capazes de promover tanto a contração como relaxamento dos músculos lisos de forma irreversível, possuem a possibilidade causar os mesmos efeitos *in vivo* gerando alterações consideráveis na homeostasia do animal testado, podendo levar até a morte (PEREIRA-GONÇALVES *et al.*, 2018).

Os testes de atividade antibacteriana podem indicar se a substância em teste apresenta efeito antibacteriano de forma isolada ou associada a antibióticos, além de evidenciar se existe alguma influência sobre bombas de efluxo, que é um dos mecanismos de resistência aos antibióticos presente em diversas estirpes de bactérias. Os testes de micro diluição fornecem a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da substância testada e como ela se comporta quando em associação com antibióticos ou com outros antimicrobianos (LIMAVERDE *et al.*, 2017).

Por fim, os resultados dos testes microbiológicos esclarecem se a substância possui atividade antibacteriana e como a mesma comporta-se na presença de antibióticos, possibilitando a investigação de como a substância pode interagir com mecanismos de resistência bacterianos, como bombas de efluxo. Com os testes de mortalidade, geotaxia negativa e determinação da concentração letal média é possível verificar o potencial tóxico da substância em estudo. Os ensaios de determinação bioquímica fornecem dados capazes de elucidar os mecanismos desencadeados por efeitos tóxicos e que também podem ser

evidenciados nos testes *ex vivo*, quando é observado o feito de contração ou relaxamento irreversível.

1.3 Estrutura da tese

A tese foi desenvolvida no decorrer do tempo do doutoramento, 2017 – 2021, no Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade Regional do Cariri, e versará sobre atividades tóxica e biológicas de terpenos isolados ou constituintes de óleo essencial mensuradas através de métodos alternativos que irão fornecer informações para seleção e realização de testes com animais de forma mais eficiente e com mais fundamentação para solicitação de autorização para realização de testes em outros modelos.

A tese possui 4 capítulos, onde cada um relata dados e informações sobre a utilização de produtos naturais complexos ou terpenos isolados com atividade biológica e como essas atividades podem ser registradas por alguns métodos alternativos, evidenciando o efeito tóxico sobre determinados organismos, a ação sobre tecidos *ex vivo* e como essas informações podem contribuir para tornar etapas futuras mais eficientes, rápidas e baratas.

A primeira parte da tese traz informações sobre os questionamentos que estimularam o desenvolvimento da mesma. Mostrando a necessidade da discussão sobre a utilização de testes alternativos ao uso de animais e como eles podem contribuir para avanço de pesquisas que buscam comprovar atividades biológicas e/ou farmacológicas das mais diversas substâncias, sejam naturais ou sintéticas, simples ou complexas.

O Capítulo I é constituído pela fundamentação teórica para embasar a discussão sobre os questionamentos levantados e auxiliar na elaboração dos capítulos seguintes. Essa fundamentação teórica relata informações pertinentes sobre produtos naturais e terpenóides, mostrando a disponibilidade e alguns usos, explanação sobre métodos alternativos ao uso de animais tendo como base o princípio dos 3R's, sobre modelos como a *Drosophila melanogaster* e testes que podem ser realizados, testes *ex vivo*, e demais tópicos relevantes que contribuem para o desenvolvimento do trabalho.

O Capítulo II apresenta-se como um artigo, que foi publicado na revista *Molecules*, que trata dos testes de capacidade de reversão de contração do músculo liso, promovida por potássio e serotonina, do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides*, que apresenta o α -terpineno como constituinte majoritário, e a atividade tóxica destes sobre o modelo de *Drosophila melanogaster*. (*Molecules – Current Impact Factor 2020*: 4.411, Qualis Ciências Biológicas II – B1, CiteScore 2020 – 4.7)

O Capítulo III trata-se de um manuscrito, em que testes microbiológicos com bactérias, verificam a existência da atividade bactericida do α -terpineno e como ele interage em associação com determinados antibióticos frente a bactérias, com e sem mecanismo de resistência, além de observar o efeito tóxico da substância contra *Drosophila melanogaster*.

Submetido à *Microbial Pathogenesis*. (Current Impact Factor 2020: 2.914, Qualis Ciências Biológicas II – B2, CiteScore 2020 – 5.6)

As considerações finais, Capítulo IV, relatam a associações das evidências produzidas durante o desenvolvimento da tese e as conclusões que poderão ser feitas como base nelas, além da possibilidade de investigações futuras envolvendo o objeto em estudo.

2. CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A busca por conforto, comodidade e segurança fez o homem incorporar novos hábitos como procurar cavernas, que forneciam abrigo e segurança fazendo assim uma mudança na forma de vida. Essas mudanças também são observadas em outras áreas como no cuidado com a saúde e bem-estar através da utilização de vegetais como alternativa para reestabelecer a saúde ou como estimulantes, um exemplo dessa estimulação, é o hábito de mascar folhas de coca pelos povos pré-colombianos há mais de 8 mil anos (MORTIMER, 1974). Esse hábito de consumo de vegetais, e outros produtos encontrados na natureza, como o objetivo de melhorar o bem-estar ou reestabelecer a saúde provavelmente foi adquirido pela observação de animais que tinham esse costume, esse conhecimento foi denominado de Zoofarmacognosia (ÁLVARO, M. M. *et al.*, 2019; MUKHERJEE, J. R.; CHELLADURAI; RONALD, 2011).

Com a evolução dos conhecimentos para separação e isolamento de constituintes e da química orgânica, mais especificamente da síntese e semi-síntese orgânica, os medicamentos passaram a ser constituídos, geralmente, por remédios que possuem uma única droga, que é definida como substância quimicamente esclarecida, concentração padronizada e efeito terapêutico estabelecido e validado (BLAKEMORE *et al.*, 2018), porém atualmente grande parte das drogas comercializadas ou são isoladas de produtos naturais, ou são modificações químicas em constituintes do produto natural (semi-síntese), ou são moléculas resultado de síntese total, mas que foram inicialmente conhecidas por estar na composição de um produto natural e que por questões econômicas torna-se mais viável sua síntese total. Como exemplo, cerca de 50% das drogas lançadas no mercado entre 1981 e 2019 eram derivados direto ou indiretamente de produtos naturais (BRAHMACHARI, 2011; NEWMAN; CRAGG, 2020; VUORELA, P. *et al.*, 2004). Assim, podemos constatar a importância dos produtos naturais para farmacologia.

2.1 Produto Natural

Como observado à utilização de produtos de origem natural pelos seres humanos ocorre desde os primórdios e serviu de fonte de descoberta para inúmeros fármacos modernos (BRAHMACHARI, 2019; RODRIGUES, T. *et al.*, 2016). Um óleo essencial, um extrato ou óleo fixo de uma determinada espécie é considerado um produto natural complexo, entretanto esse material possui diversos constituintes, que podemos definir como produto natural isolado em proporções definidas e essa constituição pode variar tanto quantitativamente quanto qualitativamente e essa variação pode ser resultado da idade do vegetal, tipo de solo, clima da região, até mesmo do horário de coleta do material. Assim, um produto natural pode ser resultado de quimiotipos diferentes (HILAN; SFEIR;

AITOUR, 2011; POLATOGLU, 2013) e apresentar farmacóforos distintos, que na química farmacêutica são definidos como regiões de interação intermolecular que serão importantes para definir a sua atividade farmacológica (BARREIRO; FRAGA, 2015). Portanto, produtos naturais oriundos de quimiotipos distintos podem apresentar proporções diferentes dos constituintes e até mesmo diferença na constituição, que pode resultar em alteração na potência do efeito estudado ou até mesmo registro de efeitos distintos. Em suma, um produto natural complexo é uma mistura de vários constituintes em proporções definidas, no entanto a lista de constituintes ou as quantidades de cada um deles variam de acordo como material de origem seja ele qual for o vegetal, animal ou mineral.

Os modelos animais são ferramentas indispensáveis para comprovação de atividades biológicas pois geram informações sobre sua eficácia e segurança tornando assim possível a sequência dos testes clínicos. E a utilização do princípio dos 3R's tem ficado em evidência, e o seu emprego tem justificado as pesquisas além de proporcionar um ganho de qualidade considerável (SNEDDON; HALSEY; BURY, 2017). Tornando-se assim um argumento forte e importante para o desenvolvimento de pesquisas que envolvam animais cordados (MACARTHUR CLARK, 2018).

A toxicidade, atividade antimicrobiana e modulação da contração de músculo liso são algumas das atividades biológicas que podem ser verificadas utilizando este princípio.

A ação do produto natural depende dos constituintes e das suas proporções, pois a interação como o organismo modelo é muito complexa, devido a relações farmacocinéticas dos vários constituintes com organismo (LACERDA-NETO *et al.*, 2019). Entretanto, os testes de bioatividades e/ou farmacológicos como um dos constituintes que compõem o produto natural, geralmente os constituintes majoritários, podem evidenciar de forma mais simples qual ou quais processos biológicos estão sendo regulados ou afetados pela disponibilidade daquela substância, porém, estudos mostram que os resultados mensurados em testes de substâncias isoladas apresentam potência diferente de quando utilizado o produto natural (JUNG *et al.*, 2014).

2.2 Óleos Essenciais

Óleos essenciais (OE) são produtos naturais derivados de vegetais podendo ser extraídos por enfloração, hidrodestilação (arraste de vapor d'água), extração por solventes orgânicos, extração por CO₂ supercrítico ou ação mecânica sobre pericarpos de frutos (prensagem), estes apresentam algumas características como, solubilidade em solventes orgânicos, conseqüentemente limitada solubilidade em água, densidade menor que 1 mg/mL, com algumas exceções, são incolores e líquidos de aparência oleosa a temperatura ambiente, porém sendo voláteis, não possuem muita estabilidade principalmente sob ação

de luz, calor, ar, umidade e metais, também, a maioria, apresentam atividade óptica que auxiliam na sua identificação e mais um parâmetro de controle de qualidade (DHIFI *et al.*, 2016).

Podem ser extraídos das mais diversas partes dos vegetais tais como: flores, sementes, frutos, raízes, rizomas, madeira, cascas e folhas, sendo esta última à parte mais frequentemente utilizada. Nos vegetais os óleos essenciais são responsáveis por mecanismos de defesa e estratégias de sobrevivência, que vão desde atrativo para polinizadores, repelente ou proteção contra pragas e predadores, entre outras (PANDEY *et al.*, 2017).

Os constituintes dos óleos essenciais são produto, principalmente, do metabolismo secundário dos vegetais e possuem uma constituição bastante variada com diferentes tipos de estruturas, podendo conter mais de 300 tipos diferentes de compostos, entre álcoois, éteres ou óxidos, aldeídos, cetonas, ésteres, aminas, amidas, fenóis e heterociclos. Porém a grande maioria é constituída de derivados fenilpropanóides ou terpenóides, com predominâncias desse último. Os fenilpropanóides são produzidos pela rota do ácido chiquímico, já os terpenóides, a classe mais comum, tem sua biossíntese da via do ácido mevalônico ou mevalonato independente (DEWICK, 2002; LICHTENTHALER, 1999).

Existem diversos estudos que relatam várias atividades para os óleos essenciais como: atividade antimicrobiana (TARIQ *et al.*, 2019) antifúngico (DONATO *et al.*, 2020), antiulcerogênico (ARUNACHALAM *et al.*, 2017), anti-helmíntico (FERREIRA *et al.*, 2018), antioxidante (YUAN; CHEN; LI, 2016), anti-inflamatória (RAMOS *et al.*, 2020), inseticida (ABDELGALEIL; EL-SABROUT, 2018),

2.2.1 *Chenopodium ambrosioides*

Chenopodium ambrosioides (L.) Mosyakin & Clemants (*Chenopodiaceae*), que também é conhecida como *Dysphania ambrosioides* e popularmente chamada de mastruz ou erva-de-santa-maria, apresenta ocorrência frequente em regiões de clima subtropical e sub-temperado com característica cosmopolita, e popularmente utilizada para o tratamento de verminoses (SOARES *et al.*, 2017), diurético e alterações respiratórias e inflamatórias. Sendo uma das plantas mais utilizadas no mundo como medicamento, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (LORENZI; MATOS, 2002), essa grande utilização deve-se a sua ampla distribuição e ao conhecimento etnomédico. A extração do óleo essencial das folhas de *Chenopodium ambrosioides* é uma fonte para ensaios de atividade biológica deste tipo de produto natural, já existindo relatado na literatura com atividade inseticida contra abelhas, mosca doméstica, antiviral, anti-helmíntica, antifúngica

antileishmania e antioxidante (PAVELA *et al.*, 2018). O óleo essencial proveniente dessa espécie apresenta componentes com conhecido valor medicinal como: ascaridol, isoascaridol, p-cymene, limoneno e α -terpineno. Alguns produtos bioativos isolados deste vegetal são utilizados no tratamento de tuberculose, reumatismo, hemorragias uterinas e doenças respiratórias.(ZOHRA *et al.*, 2019).

2.3 Componentes dos óleos essenciais

Uma grande diversidade de compostos estão presente na constituição dos óleos essenciais, como álcoois, éteres ou óxidos, aldeídos, cetonas, ésteres, aminas, amidas, fenóis, sendo possível verificar que entre eles sobressaem-se os terpenos, e dentre estes os monoterpenos são os mais comuns.

2.3.1 Terpenos

Os terpenos são uma das classes com maior número de representantes conhecidos, sendo estes produtos do metabolismo secundário dos vegetais, e essa grande diversidade de moléculas confere a esta classe uma grande variabilidade de ações biológicas visto que a diversidade não é apenas quantitativa, mas também nos grupos funcionais presentes e a própria estrutura molecular. Quimicamente os terpenos são derivados de unidades de isopreno e compostos hidrocarbonetos, ou seja, constituídos de carbonos e hidrogênios, e apresentam dupla ligação carbono-carbono podendo assim serem definidos como alcenos naturais. A *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) distingue terpenóides como sendo compostos oxigenados formados por isopreno, porém apesar dessa diferenciação a literatura utiliza os dois termos como sinônimos. Os terpenos podem ser classificados de acordo como o número de carbonos presentes, subdividindo essa classe em hemiterpenos (5C), monoterpenos (10C), sesquiterpenos (15C), diterpenos (20C), sesterterpenos (25C), triterpenos (30C), tetraterpenos ou carotenoides (40C) e politerpenos (C_{5n}) (IUPAC, 2009).

Os mono e sesquiterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais, essa composição explica a volatilidade dos óleos, já que são mais voláteis que di, tri, sester, tetra e poli terpenos que por sua vez compõem balsamos, resinas, graxas e ceras (FELIPE; BICAS, 2017).

Uma característica importante dos terpenos é sua isomeria, pois diferenças espaciais sutis, como isomeria óptica, podem resultar em ações biológicas distintas. E este fato ganha mais importância, visto que, muitas vezes a síntese de produtos puros, em relação à isomeria, é difícil e onerosa, muitas vezes se recorrendo à utilização de “indústrias

biológicas” para alcançar o resultado desejado (DICKSCHAT, 2011; NAGEGOWDA; GUPTA, 2020; STRUB *et al.*, 2014).

A biossíntese dos terpenos tem como base a união de duas unidades isoprenicas, do isopentenil pirofosfato (IPP) ou de seu isômero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). A biossíntese destes compostos é promovida por duas rotas já descritas, a via do ácido mevalônico e a via do metileritritol fosfato (MEP), ambas de intermediários da glicólise acetil-coA e ácido pirúvico, respectivamente. IPP e DMAPP serão isomerizados pela enzima isopentil difosfato isomerase. Após essa etapa uma condensação de unidades isoprenicas ocorre por ação da prenil transferase, assim a condensação de uma molécula de IPP e outra de DMAPP gerando difosfato de geranyl (GPP) precursor de monoterpenos que tem como exemplo o α -terpineno, sendo condensado mais uma molécula de IPP ao GPP será produzido difosfato de farnesil (FPP) precursor de sesquiterpenos e com mais uma condensação de IPP ao FPP será originado o difosfato de geranylgeranyl (GGPP) precursor de diterpenos, por fim na etapa de condensação IPP sendo condensado ao GGPP irá produzir escaleno precursor de triterpenos, lipídios e esteroides. Também podem ocorrer condensação entre FPP e GGPP formando os precursores terpenoídes como 30 e 40 carbonos. Após essa etapa de condensação terpenoídes com 10 ou 20 carbonos podem ser rearranjados ou convertidos a moléculas cíclicas. Por fim vários processos como de oxidações, isomerizações de reduções, conjugações e outras transformações são submetidas às moléculas base dos terpenos produzindo assim uma gama enorme de metabolitos distintos (ASHOUR; WINK; GERSHENZON, 2018; LÜCKER *et al.*, 2001; NOVAES, 2019).

O α -terpineno é um monoterpeno ($C_{10}H_{16}$) presente em óleos essenciais de várias espécies vegetais como *Abies lasiocarpa*, *Chenopodium ambrosioides* e *Pinus contorta*, é um dos terpenos de ocorrência mais comum nos Estados Unidos sendo responsável por 10% da emissão de monoterpenos na região das Montanhas Rochosas, e é normalmente utilizado na indústria de perfumes e farmacêutica. Apresenta uma estrutura semelhante a outros terpenos como o limoneno, possui atividade antioxidante, miorelaxante, antibacteriana. Esse monoterpeno pode sofrer auto oxidação pelo ar e causar respostas alérgicas na pele, um tipo de efeito tóxico (COMELLI; PONZI, E. N.; PONZI, M. I., 2005; GERON *et al.*, 2000; PASSOS MENEZES, *et al.*, 2016; PEREIRA-DE-MORAIS *et al.*, 2020; RUDBÄCK *et al.*, 2012).

2.4 Bioatividades

Essas atividades devem ser comprovadas através de testes em modelos animais a fim de gerar informações sobre sua eficácia e segurança tornando assim possível a sequência dos testes clínicos. E a utilização do princípio dos 3R's tem ficado em evidência,

e o seu emprego tem justificado as pesquisas além de proporcionar um ganho de qualidade considerável (SNEDDON; HALSEY; BURY, 2017). Tornando-se assim um argumento forte e importante para o desenvolvimento de pesquisas que envolvam animais cordados (MACARTHUR CLARK, 2018).

A toxicidade, atividade antimicrobiana e modulação da contração de músculo liso são algumas das atividades biológicas que podem ser verificadas utilizando este princípio.

2.4.1 Toxicidade

A toxicidade de uma substância ou composto está relacionada como sua capacidade de alterar processos fisiológicos e ou patológicos gerando resultados danosos ao funcionamento correto ou ao reestabelecimento dele, seja esse dano irreversível ou não. Fica evidente também que os efeitos tóxicos das substâncias estão associados à dose ou concentrações de exposição, via de exposição (administração), e do próprio organismo exposto.

Estes efeitos tóxicos são registrados por vários tipos de ensaios e tem como objetivo produzir o maior número de informações sobre a segurança na utilização de substâncias ou compostos que pretendem serem usados como medicamentos, aditivos, pesticidas, em resumo tudo que pode entrar em contato com o ser humano. Obviamente que os produtos naturais não são isentos desse fato, eles também possuem seu perfil toxicológico, ou seja, quantidade a que podemos ser expostos, que via de exposição revela-se mais segura, por quanto tempo pode perdurar a exposição, todos esses pontos são importantes para estabelecer uma relação segura entre a utilização de substâncias e compostos e o bem estar de seres humanos, animais e ambiental (VENKATESAN; RAMANATHAN, 2017).

A ação tóxica pode ser utilizada em benefício de uma espécie em detrimento de outra como, por exemplo, as ações, antibacteriana, anti-helmíntica, antifúngica, antiprotozoaria, inseticida, larvicida, todas essas demonstram o efeito tóxico de uma substância ou composto contra uma determinada espécie ou grupo de espécies que podem e que podem ser utilizados pelo homem no combate, controle ou eliminação destas (ZOLFAGHARI EMAMEH *et al.*, 2015).

A seleção de animais para ensaios pré-clínicos de toxicidade é uma etapa crucial para determinar o potencial tóxico das substâncias ou complexo, e a possibilidade de uso em humanos ou não. Esta escolha é baseada principalmente na similaridade entre os órgãos e a fisiologia das espécies (VENKATESAN; RAMANATHAN, 2017). Assim, a *Drosophila melanogaster*, um díptero, conhecido comumente como mosca da fruta, tem

sido bem estudada no último século por apresentar cerca de 75% dos genes relacionados a doenças humanas. Como também está sendo utilizada como modelo para estudos de diversas patologias. A mosca ainda possui um ciclo de vida bem mais rápido, manutenção mais barata e sem limitações éticas para uso em relação aos roedores, o que faz com que aumente o interesse por esse díptero. O modelo pode ser uma ferramenta em estudos de alterações genéticas, farmacológicas, infecciosas, nutricionais, além de poder ser usado como modelos na triagem de inseticidas, larvicidas e no risco de contaminação ambiental por produtos químicos (ZOLFAGHARI EMAMEH *et al.*, 2015).

Os ensaios relacionados à toxicidade de substâncias e ou complexos contra *Drosophila melanogaster* podem tanto evidenciar atividade tóxica como proteção contra a ação tóxica de substâncias reconhecidas como tóxicas. O citronelal e pulegona revelaram-se potenciais inseticidas de origem vegetal, em testes de fumigação (ZHANG, *et al.*, 2016). Testes de toxicidade oral podem ser realizados, inclusive com nanopartículas, a fim de determinar o efeitos tóxicos que essas moléculas podem desenvolver por essa via de administração e na viabilidade dos ovos, ou seja, na taxa de reprodução (ALARABY *et al.*, 2019). Os testes de toxicidade com a mosca também podem ter uma configuração diferente como o objetivo de verificar se alguma substância possui a capacidade de evitar danos ao díptero, protegendo-o da ação tóxica de um inseticida ou metal tóxico, como no estudo que demonstrou que o α -cetoglutamato diminuiu os múltiplos efeitos metabólicos da ação do alumínio (BAYLIAK *et al.*, 2019). Essa toxicidade está diretamente relacionada ao estresse oxidativo com aumento do malonaldeído, peróxido de hidrogênio, da glutathione redutase e dos tióis, além de promover maior atividade das enzimas antioxidantes e alterações na cadeia respiratória como disfunção mitocondrial causada pelo Paraquat (HOSAMANI, 2013).

2.4.2 Atividade antibacteriana

A ação antibacteriana de óleos essenciais e seus componentes é outra atividade que possui vários relatos (SWAMY; AKHTAR; SINNIAH, 2016). E a busca por produtos com essa atividade antibacteriana tem se tornado cada vez mais importante e intensa, pois as bactérias possuem processo adaptativos e de transferência de informações genéticas bastante eficientes fazendo com que as mesmas revelem-se resistentes aos antibióticos disponíveis (GILLINGS; PAULSEN; TETU, 2017).

A resistência pode dar-se por diversos mecanismos, que podem ocorrer individualmente ou associados. Podemos listar seis principais mecanismos de resistência: a) degradação do antibiótico, (b) modificação do alvo do antibiótico, (c) alteração da

permeabilidade, (d) proteção ribossomal, (e) produção de biofilme e (f) por ação de bombas de efluxo (FLOYD *et al.*, 2013).

A associação de substância que resultem em atividade antibacteriana vem sendo uma alternativa para o combate da resistência. Um exemplo já consolidado é a associação de amoxicilina (antibiótico) com ácido clavulânico no combate de bactérias que apresentam resistência à amoxicilina (TODD; BENFIELD, 1990). As bombas de efluxo expulsam o antibiótico do interior da bactéria, não permitindo assim que atinjam a contração intracelular necessária para promover seu efeito. Existem vários tipos de bombas de efluxo, algumas que agem sobre um grupo de antibióticos específicos, e outras podem agir sobre uma grande quantidade de grupos de antibióticos. Assim, ensaios envolvendo compostos que possam interferir no funcionamento das bombas de efluxo, e conseqüentemente permitam que os antibióticos atinjam seus alvos e em quantidade suficiente estão na vanguarda das pesquisas no combate a resistência bacteriana, porém esses compostos também devem ter uma toxicidade segura para uso em humano.

A verificação da interferência em bombas de efluxo, por alguma substância, pode ser promovida utilizando o brometo de etídio que é bactericida e expulso da célula bacteriana por bombas de efluxo, assim se um composto interferir no funcionamento normal da bomba uma quantidade menor de brometo será necessário para causar o efeito bactericida (MORAIS OLIVEIRA-TINTINO, *et al.*, 2018).

Muitas bactérias utilizaram de diversos processos adaptativos e evolutivos que resultaram na resistência aos antibióticos utilizados no seu combate (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020). Um exemplo é *S. aureus* que apresenta várias cepas com diversas bombas de efluxo expressas. As quais podemos citar: cepa 1199 cepa selvagem; 1199B portadora do gene *norA* Small D que codifica a proteína de efluxo NorA, resistente a fluoroquinolonas hidrofílicas; IS-58, dotada do plasmídeo PT181 portadora do gene que expressa a proteína de efluxo de Tetraciclina TetK; cepa K2068 que possui a bomba MepA, decodificada no gene *mepA* que confere resistência a Ciprofloxacino; cepa K4100 que possui a bomba QacC, decodificada pelo gene *qacC* conferindo resistência à Oxacilina; a cepa K4414 que expressa a bomba QacA/B, decodificada pelo gene *qacA/B*, que promove resistência contra Penicilina e RN4220 portadora do plasmídeo pUL5054, que transporta o gene que codifica a proteína MsrA de efluxo de macrolídeos.

2.4.3 Contração e relaxamento do musculo liso vascular

O tônus vascular é fundamental para homeostasia, e está relacionado diretamente com o controle da pressão sanguínea e a partir desse controle envolvido com outros processos, como filtração glomerular e todos os outros processos relacionados

principalmente a pequenos vasos. Alterações no controle de contração e relaxamento dos músculos vasculares é uma característica marcante de várias doenças, tais como: doença cardiovascular, diabetes e hiperlipidemia (CONWAY; THOMPSON; COHEN, 2017; PETRIE; GUZIK; TOUYZ, 2018; SOWERS; EPSTEIN; FROHLICH, 2001). Testes *ex vivo* utilizando artérias coronárias de *Sus scrofa domesticus* são comumente utilizados para verificar a influência de compostos sobre o tônus muscular desses vasos (BELL; GOCHENAUR, 2006; ELLE *et al.*, 2018; GOODWILL *et al.*, 2016; LAWANDY *et al.*, 2019; TABART *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2018).

A contração do músculo liso está associada diretamente a sinalização promovida pelo de Ca^{+2} , conhecido como segundo mensageiro de vários processos. O aumento de Ca^{+2} para o citosol, que pode ocorrer influxo extracelular ou liberação pelo retículo sarcoplasmático, e a promoção do processo de contração difusa do músculo liso pelo movimento de proteínas pode ser desencadeado basicamente por dois mecanismos: o eletromecânico que é disparado pelo aumento da concentração externa de potássio (K^{+}) e o farmacomecânico que é resultado da abertura de canais de cálcio voltagem dependente que são abertos após a ligação de agonista a receptores, como por exemplo, serotonina. No mecanismo farmacomecânico o acoplamento da serotonina no receptor de proteína Gq/11, ativando a PLC que hidrolisa o PIP_2 em IP_3 e DAG. O IP_3 se difunde no citoplasma e liga em receptores IP_3R , que são canais de cálcio presentes na membrana do RS, e que quando ativados liberam Ca^{+2} , já o DAG em conjunto com o Ca^{+2} ativam a PKC que atua em diversos processos incluindo a regulação do transporte transmembranar do Ca^{+2} (MORGADO *et al.*, 2012). O relaxamento observado pode ser resultado, em parte, por um bloqueio dos IP_3R ativados por IP_3 , como foi observado já relatado (PELAIA *et al.*, 2008). Porém, outros mecanismos podem estar envolvidos, como por exemplo: aumento da atividade da Ca^{+2} -ATPase, diminuição da formação de IP_3 , ação PKA e estimulação do trocador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$.

Assim, como o conhecimento de atividades biológicas promovidas por óleos essenciais e seus constituintes, principalmente os terpenos, a hipótese é que estes compostos podem promover efeito miorelaxante em músculo liso, tóxico contra a mosca da fruta e modular antibióticos contra bactérias com perfil de resistência.

2.5 Referências

- ABDELGALEIL, S. A. M.; EL-SABROUT, A. M. Anti-nutritional, antifeedant, growth-disrupting and insecticidal effects of four plant essential oils on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Crop Protection**, 2018. v. 7, n. 2, p. 135–150.
- ALARABY, M. *et al.* Toxic and Genotoxic Effects of Silver Nanoparticles in *Drosophila*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 1 abr. 2019. v. 60, n. 3, p. 277–285. DOI: 10.1002/em.22262.

ÁLVARO, M. M. *et al.* The origins of zoopharmacognosy: how humans learned about self-medication from animals. **International Journal of Applied Research**, 2019. v. 5, n. 5, p. 73–79. DOI: <http://dx.doi.org/10.22271/allresearch>.

ARUNACHALAM, K. *et al.* Chemical characterization, toxicology and mechanism of gastric antiulcer action of essential oil from *Gallesia integrifolia* (Spreng.) Harms in the in vitro and in vivo experimental models. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 1 out. 2017. v. 94, p. 292–306. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.07.064.

ASHOUR, M.; WINK, M.; GERSHENZON, J. Biochemistry of Terpenoids: Monoterpenes, Sesquiterpenes and Diterpenes. **Annual Plant Reviews online**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2018, p. 258–303.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Planejamento racional baseado no mecanismo de ação: Fármacos inteligentes. *In*: BARREIRO, ELIEZER J. ; FRAGA, C. A. M. (Org.). **Química medicinal. As bases moleculares da ação dos fármacos**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015, p. 171–223.

BAYLIAK, M. M. *et al.* Protective effects of alpha-ketoglutarate against aluminum toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 1 mar. 2019. v. 217, p. 41–53. DOI: 10.1016/j.cbpc.2018.11.020.

BELL, D. R.; GOCHENAUR, K. Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. **Journal of Applied Physiology**, abr. 2006. v. 100, n. 4, p. 1164–1170. DOI: 10.1152/jappphysiol.00626.2005.

BLAKEMORE, D. C. *et al.* Organic synthesis provides opportunities to transform drug discovery. **Nature Chemistry**, 22 abr. 2018. v. 10, n. 4, p. 383–394. DOI: 10.1038/s41557-018-0021-z.

BOLUS, H. *et al.* Modeling Neurodegenerative Disorders in *Drosophila melanogaster*. **International Journal of Molecular Sciences**, 26 abr. 2020. v. 21, n. 9, p. 3055. DOI: 10.3390/ijms21093055.

BRAHMACHARI, Goutam. Natural products in drug discovery: Impacts and opportunities – an assessment. *In*: BRAHMACHARI, Goutam (Org.). **Bioactive Natural Products: Opportunities and Challenges in Medicinal Chemistry**. Singapore: World Scientific Publishing Co., 2011, p. 1–199.

BRAHMACHARI, Goutam; Aloe vera: a promising hope against Buruli ulcer. *In*: BRAHMACHARI, Goutam (Org.). **Discovery and Development of Therapeutics from Natural Products Against Neglected Tropical Diseases**. 1. ed. [S.l.]: Elsevier, 2019, p. 373–383.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution**, 2020. v. 88, n. 1, p. 26–40. DOI: 10.1007/s00239-019-09914-3.

COMELLI, N. A.; PONZI, E. N.; PONZI, M. I. Isomerization of α -pinene, limonene, α -terpinene, and terpinolene on sulfated zirconia. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, jul. 2005. v. 82, n. 7, p. 531–535. DOI: 10.1007/s11746-005-1105-2.

CONWAY, D. S.; THOMPSON, N. R.; COHEN, J. A. Influence of hypertension, diabetes, hyperlipidemia, and obstructive lung disease on multiple sclerosis disease course. **Multiple Sclerosis**, 2017. v. 23, n. 2, p. 277–285. DOI: 10.1177/1352458516650512.

CUNHA, Francisco Assis Bezerra DA *et al.* Eugenia uniflora leaves essential oil induces toxicity in *Drosophila melanogaster*: involvement of oxidative stress mechanisms. **Toxicology Research**, 2015. v. 4, n. 3, p. 634–644. DOI: 10.1039/C4TX00162A.

- DEWICK, P. M. The biosynthesis of C5–C25 terpenoid compounds. **Natural Product Reports**, 15 mar. 2002. v. 19, n. 2, p. 181–222. DOI: 10.1039/b002685i.
- DHIFI, W. *et al.* Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medicines**, 22 set. 2016. v. 3, n. 4, p. 25. DOI: 10.3390/medicines3040025.
- DICKSCHAT, J. S. Isoprenoids in three-dimensional space: the stereochemistry of terpene biosynthesis. **Natural Product Reports**, 15 dez. 2011. v. 28, n. 12, p. 1917. DOI: 10.1039/c1np00063b.
- DICKSON, M.; GAGNON, J. P. Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. **Nature Reviews Drug Discovery**, maio. 2004. v. 3, n. 5, p. 417–429. DOI: 10.1038/nrd1382.
- DOKE, S. K. *et al.* Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 1 jul. 2015. v. 23, n. 3, p. 223–229. DOI: 10.1016/j.jsps.2013.11.002.
- DONATO, R. *et al.* Antifungal activity of different essential oils against *Malassezia* pathogenic species. **Journal of Ethnopharmacology**, 1 mar. 2020. v. 249, p. 1123–76. DOI: 10.1016/j.jep.2019.112376.
- ELLE, R. E. *et al.* Ex-vivo vasorelaxation induced by polyphenol-rich extracts from plant, fruits and berries on porcine coronary artery rings. **Free Radical Biology and Medicine**, 20 maio. 2018. v. 120, p. S80. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.266.
- FELIPE, L. O. ; BICAS, J. L. . Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, 2017. v. 39, n. 2. DOI: 10.21577/0104-8899.20160068.
- FERREIRA, L. E. *et al.* Essential oils of *Citrus aurantifolia*, *Anthemis nobile* and *Lavandula officinalis*: in vitro anthelmintic activities against *Haemonchus contortus*. **Parasites & Vectors**, 25 dez. 2018. v. 11, n. 1, p. 269. DOI: 10.1186/s13071-018-2849-x.
- FLOYD, J. T. *et al.* A review of the molecular mechanisms of drug efflux in pathogenic bacteria: A structure-function perspective. **Recent Research Developments in Membrane Biology**. Trivandrum, India: Research Signpost, 2013, V. 37661, p. 15–66.
- FRANCO, Jeferson L. *et al.* Zinc reverses malathion-induced impairment in antioxidant defenses. **Toxicology Letters**, 22 jun. 2009. v. 187, n. 3, p. 137–143. DOI: 10.1016/j.toxlet.2009.02.015.
- GERON, C. *et al.* A review and synthesis of monoterpene speciation from forests in the United States. **Atmospheric Environment**, 1 jan. 2000. v. 34, n. 11, p. 1761–1781. DOI: 10.1016/S1352-2310(99)00364-7.
- GILLINGS, M. R.; PAULSEN, I. T.; TETU, S. G. Genomics and the evolution of antibiotic resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1 jan. 2017. v. 1388, n. Antimicrobial Therapeutics Reviews, p. 92–107. DOI: 10.1111/nyas.13268.
- GOODWILL, A. G. *et al.* Critical contribution of KV1 channels to the regulation of coronary blood flow. **Basic Research in Cardiology**, 5 set. 2016. v. 111, n. 5, p. 56. DOI: 10.1007/s00395-016-0575-0.
- GRUBER, F. P.; HARTUNG, T. Alternatives to animal experimentation in basic research. **ALTEX**, 2004. v. 21 Suppl 1, p. 3–31.
- HILAN, C.; SFEIR, R.; AITOUR, S. Chimiotypes de plantes communes au Liban du genre *Origanum* et du genre *Micromeria* (Lamiceae). **Lebanese Science Journal**, 2011. v. 12, n. 1, p. 79–91.
- HOSAMANI, R. Acute exposure of *Drosophila melanogaster* to paraquat causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**,

maio. 2013. v. 83, n. 1, p. 25–40. DOI: 10.1002/arch.21094.

IUPAC. **IUPAC Compendium of Chemical Terminology**. 2nd ed. ed. Research Triangle Park, NC: IUPAC, 2009.

JUNG, J. W. *et al.* Pharmacokinetics of chlorogenic acid and corydaline in DA-9701, a new botanical gastroprokinetic agent, in rats. **Xenobiotica**, 13 jul. 2014. v. 44, n. 7, p. 635–643. DOI: 10.3109/00498254.2013.874610.

LACERDA-NETO, L. J. *et al.* The complex pharmacology of natural products. **Future Medicinal Chemistry**, 1 abr. 2019. v. 11, n. 8, p. 797–799. DOI: 10.4155/fmc-2018-0327.

LAMBRECHTS, R.; FABER, A.; SIBON, O. Modelling in miniature: Using *Drosophila melanogaster* to study human neurodegeneration. **Drug Discovery Today: Disease Models**, 2017. v. 25–26, p. 3–10. DOI: 10.1016/j.ddmod.2018.09.004.

LAWANDY, I. *et al.* Increased coronary arteriolar contraction to serotonin in juvenile pigs with metabolic syndrome. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 27 nov. 2019. v. 461, n. 1–2, p. 57–64. DOI: 10.1007/s11010-019-03589-6.

LICHTENTHALER, H. K. The 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, jun. 1999. v. 50, n. 1, p. 47–65. DOI: 10.1146/annurev.arplant.50.1.47.

LIMAVERDE, P. W. *et al.* Inhibition of the TetK efflux-pump by the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. and α -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58. **Food and Chemical Toxicology**, 1 nov. 2017. v. 109, p. 957–961. DOI: 10.1016/j.fct.2017.02.031.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. De A. **Plantas medicinais no Brasil : nativas e exóticas**. 2nd ed ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

LÜCKER, J. *et al.* Expression of Clarkia S-linalool synthase in transgenic petunia plants results in the accumulation of S-linalyl- β -d-glucopyranoside. **The Plant Journal**, 23 dez. 2001. v. 27, n. 4, p. 315–324. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2001.01097.x.

MACARTHUR CLARK, J. The 3Rs in research: A contemporary approach to replacement, reduction and refinement. **British Journal of Nutrition**, 1 ago. 2018. v. 120, n. s1, p. S1–S7. DOI: 10.1017/S0007114517002227.

MORAIS OLIVEIRA-TINTINO, C. D. DE *et al.* Inhibition of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L. and α -terpinene on the NorA efflux-pump of *Staphylococcus aureus*. **Food Chemistry**, 1 out. 2018. v. 262, p. 72–77. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.04.040.

MORGADO, M. *et al.* Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 27 jan. 2012. v. 69, n. 2, p. 247–266. DOI: 10.1007/s00018-011-0815-2.

MORTIMER, W. G. **History of Coca" The divine Plant" of the Incas**. New York: [s.n.], 1974.

MUKHERJEE, J. R.; CHELLADURAI, V.; RONALD, J. Do animals eat what we do? Observations on medicinal plants used by humans and animals of Mudanthurai Range, Tamil Nadu. **Medicinal plants and sustainable development**. New York: Nova Science, 2011, p. 179–195.

NAGEGOWDA, D. A.; GUPTA, P. Advances in biosynthesis, regulation, and metabolic engineering of plant specialized terpenoids. **Plant Science**, 1 maio. 2020. v. 294, p. 110457. DOI: 10.1016/j.plantsci.2020.110457.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the

Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, 27 mar. 2020. v. 83, n. 3, p. 770–803. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

NOVAES, L. F. T. **Síntese total de terpenos e meroterpenos: actinoranona, pleocarpanona e sesquiterpenos “Illicium”**. [S.l.]: UNICAMP, 2019.

PANDEY, A. K. *et al.* Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. **Frontiers in Microbiology**, 16 jan. 2017. v. 7, n. JAN, p. 2161. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02161.

PASSOS MENEZES, P. DOS *et al.* Docking and physico-chemical properties of α - and β -cyclodextrin complex containing isopulegol: a comparative study. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, 16 ago. 2016. v. 85, n. 3–4, p. 341–354. DOI: 10.1007/s10847-016-0633-0.

PAVELA, R. *et al.* Clausena anisata and Dysphania ambrosioides essential oils: from ethno-medicine to modern uses as effective insecticides. **Environmental Science and Pollution Research**, 1 abr. 2018. v. 25, n. 11, p. 10493–10503. DOI: 10.1007/s11356-017-0267-9.

PELAIA, G. *et al.* Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: Implications for asthma. **Respiratory Medicine**, 1 ago. 2008. v. 102, n. 8, p. 1173–1181. DOI: 10.1016/j.rmed.2008.02.020.

PEREIRA-DE-MORAIS, L. *et al.* Myorelaxant action of the Dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clemants essential oil and its major constituent α -terpinene in isolated rat trachea. **Food Chemistry**, 30 set. 2020. v. 325, p. 126923. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126923.

PEREIRA-GONÇALVES, Á. *et al.* 1,8-Cineole blocks voltage-gated L-type calcium channels in tracheal smooth muscle. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, 11 dez. 2018. v. 470, n. 12, p. 1803–1813. DOI: 10.1007/s00424-018-2201-5.

PETRIE, J. R.; GUZIK, T. J.; TOUYZ, R. M. Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms. **Canadian Journal of Cardiology**, 2018. v. 34, n. 5, p. 575–584. DOI: 10.1016/j.cjca.2017.12.005.

POLATOGLU, K. “Chemotypes”– A Fact that should not be Ignored in Natural Product Studies. **The Natural Products Journal**, 26 mar. 2013. v. 3, n. 1, p. 10–14. DOI: 10.2174/2210315511303010004.

RAMOS, A. G. B. *et al.* Antiedematogenic and Anti-Inflammatory Activity of the Monoterpene Isopulegol and Its β -Cyclodextrin (β -CD) Inclusion Complex in Animal Inflammation Models. **Foods** 9, 630 (2020). Antiedematogenic and Anti-Inflammatory Activity of t. **Foods**, 14 maio. 2020. v. 9, n. 5, p. 630. DOI: 10.3390/foods9050630.

RODRIGUES, T. *et al.* Counting on natural products for drug design. **Nature Chemistry**, 25 jun. 2016. v. 8, n. 6, p. 531–541. DOI: 10.1038/nchem.2479.

RUDBÄCK, J. *et al.* α -Terpinene, an Antioxidant in Tea Tree Oil, Autoxidizes Rapidly to Skin Allergens on Air Exposure. **Chemical Research in Toxicology**, 19 mar. 2012. v. 25, n. 3, p. 713–721. DOI: 10.1021/tx200486f.

SNEDDON, L. U.; HALSEY, L. G.; BURY, N. R. Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. **Journal of Experimental Biology**, 1 set. 2017. v. 220, n. 17, p. 3007–3016. DOI: 10.1242/jeb.147058.

SOARES, M. H. *et al.* Chemical Composition, Antibacterial, Schistosomicidal, and Cytotoxic Activities of the Essential Oil of Dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clemants (Chenopodiaceae). **Chemistry and Biodiversity**, 1 ago. 2017. v. 14, n. 8, p. e1700149. DOI: 10.1002/cbdv.201700149.

- SOWERS, J. R.; EPSTEIN, M.; FROHLICH, E. D. Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease. **Hypertension**, abr. 2001. v. 37, n. 4, p. 1053–1059. DOI: 10.1161/01.HYP.37.4.1053.
- STRUB, D. J. *et al.* Stereochemistry of terpene derivatives. Part 8: synthesis of novel terpenoids from (1S,4R)- and (1R,4S)-fenchone and their comparative odour characteristics. **Tetrahedron: Asymmetry**, 31 jul. 2014. v. 25, n. 13–14, p. 1038–1045. DOI: 10.1016/j.tetasy.2014.06.012.
- SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIHAH, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2016. v. 2016. DOI: 10.1155/2016/3012462.
- TABART, J. *et al.* The potency of commercial blackcurrant juices to induce relaxation in porcine coronary artery rings is not correlated to their antioxidant capacity but to their anthocyanin content. **Nutrition**, 1 jul. 2018. v. 51–52, p. 53–59. DOI: 10.1016/j.nut.2018.01.009.
- TARIQ, S. *et al.* A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. **Microbial Pathogenesis**, 1 set. 2019. v. 134, p. 103580. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103580.
- TEAGUE, S.; VALKO, K. How to identify and eliminate compounds with a risk of high clinical dose during the early phase of lead optimisation in drug discovery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 15 dez. 2017. v. 110, p. 37–50. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.02.017.
- TODD, P. ; BENFIELD, P. Amoxicillin/clavulanic acid. **Drugs**, 1990. v. 39, n. 2, p. 264–307. DOI: 10.2165/00003495-199039020-00008.
- VENKATESAN, N.; RAMANATHAN, M. Preclinical Toxicity Studies-Tool of Drug Discovery. **Pharmacovigilance and Pharmacoepidemiology**, 2017. v. 1, p. 104. DOI: 10.33805/2638-8235.104.
- VUORELA, P. *et al.* Natural Products in the Process of Finding New Drug Candidates. **Current Medicinal Chemistry**, 2004. v. 11, n. 11, p. 1375–1389. DOI: 10.2174/0929867043365116.
- WU, H. *et al.* Relaxant and vasoprotective effects of ginger extracts on porcine coronary arteries. **International Journal of Molecular Medicine**, 11 jan. 2018. v. 41, n. 4, p. 2420–2428. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3380.
- YUAN, G.; CHEN, X.; LI, D. Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. **Food Research International**, 2016. v. 89, p. 117–128. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.10.004.
- ZHANG, Zhilin *et al.* Fumigant toxicity of monoterpenes against fruitfly, *Drosophila melanogaster*. **Industrial Crops and Products**, 1 mar. 2016. v. 81, p. 147–151. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.11.076.
- ZOHRA, T. *et al.* Extraction optimization, total phenolic, flavonoid contents, HPLC-DAD analysis and diverse pharmacological evaluations of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. **Natural Product Research**, 2 jan. 2019. v. 33, n. 1, p. 136–142. DOI: 10.1080/14786419.2018.1437428.
- ZOLFAGHARI EMAMEH, R. *et al.* *Drosophila melanogaster* : a model organism for controlling Dipteran vectors and pests. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 4 maio. 2015. v. 30, n. 3, p. 505–513. DOI: 10.3109/14756366.2014.944178.

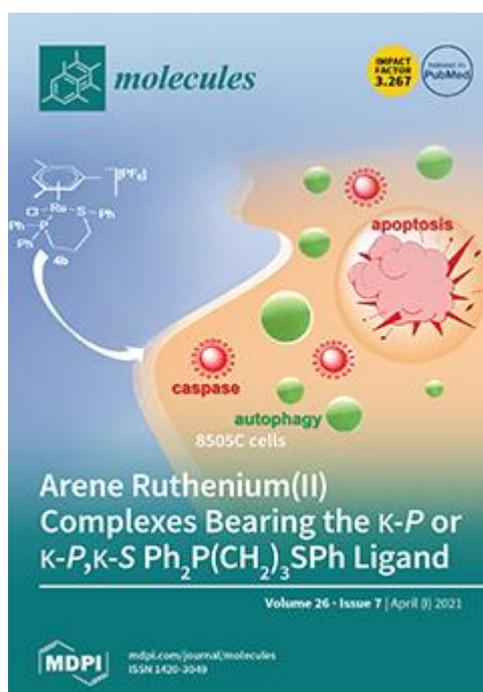
3. CAPÍTULO II – EFEITO MIORRELAXANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Dysphania ambrosioides* NA ARTÉRIA CORONÁRIA DE *SUS SCROFA DOMESTICUS* E SUA TOXICIDADE NO MODELO DE *Drosophila melanogaster*

Neste Capítulo consta um Artigo publicado na *Molecules*, e trata sobre o efeito miorelaxante do óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* em coronárias suínas e do efeito tóxico contra *Drosophila melanogaster*.

Métricas (*Molecules* – Current Impact Factor 2020: 4.411, Qualis Ciências Biológicas II – B1, CiteScore 2020 – 4.7)

Myorelaxant effect of the *Dysphania ambrosioides* essential oil on *Sus scrofa domesticus* coronary artery and its toxicity in the *Drosophila melanogaster* model

<https://doi.org/10.3390/molecules26072041>



Efeito miorrelaxante do óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* na artéria coronária de *Sus scrofa domesticus* e sua toxicidade no modelo de *Drosophila melanogaster*

Luiz Jardelino de Lacerda Neto¹, Andreza Guedes Barbosa Ramos¹, Renata Evaristo Rodrigues da Silva¹, Luís Pereira-de-Morais¹, Fernanda Maria Silva¹, Roger Henrique Sousa da Costa¹, Lindaiane Bezerra Rodrigues Dantas¹, José Galberto Martins da Costa¹, Henrique Douglas Melo Coutinho^{1,*}, Grażyna Kowalska², Joanna Hawlena², Radosław Kowalski^{3,*}, Roseli Barbosa¹ e Francisco Assis Bezerra da Cunha¹

¹ Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato 63105-000, Brasil

² Departamento de Turismo e Recreação, Universidade de Ciências da Vida em Lublin, 15 Akademicka Street, 20-950 Lublin, Polônia

³ Departamento de Análise e Avaliação da Qualidade Alimentar, University of Life Sciences em Lublin, 8 Skromna Street, 20-704 Lublin, Polônia

*

Molecules **2021**, *26* (7), 2041; <https://doi.org/10.3390/molecules26072041>

Recebido: 13 de março de 2021 / Revisado: 25 de março de 2021 / Aceito: 26 de março de 2021 / Publicado: 2 de abril de 2021

Resumo

Métodos alternativos para o uso de animais em pesquisas têm ganhado importância cada vez maior, devido às avaliações que avaliam a real necessidade de seu uso e ao desenvolvimento de legislação que regulamenta o assunto. O princípio dos 3R's (substituição, redução e refinamento) tem sido uma referência importante, de modo que os métodos *in vitro*, *ex vivo* e substituição de cordão têm conquistado lugar de destaque na pesquisa. Métodos: Portanto, devido ao sucesso dos estudos desenvolvidos com esses métodos, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito miorrelaxante do óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* (EODa) utilizando um modelo de artéria coronária de *Sus scrofa domesticus*, e a toxicidade de ambos do óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* e seu principal constituinte, α -terpineno, contra *Drosophila melanogaster* em ensaios de toxicidade e geotaxia negativa. Resultados: O EODa relaxou o músculo liso das artérias coronárias de suínos contraídas com K^+ e 5-HT em ensaios usando artérias coronárias de *Sus scrofa domesticus*. Os resultados de toxicidade apresentaram valores de CL_{50} de 1,546 mg/mL e 2,282 mg/mL para o EODa e α -terpineno, respectivamente, mostrando que o EODa e α -terpineno apresentaram toxicidade para esses dípteros, sendo o EODa mais tóxico. Conclusões: Além disso, os resultados revelam a possibilidade do uso do EODa em estudos de doenças vasculares, uma vez que promoveu o relaxamento do músculo liso coronário de *Sus scrofa domesticus*.

Palavras-chave: óleo essencial; produto natural; atividade miorrelaxativa; toxicidade

1. Introdução

A utilização de animais em pesquisas essenciais tem sido constantemente questionada em termos dos princípios dos 3R's (substituição, redução e refinamento), gerando a necessidade de reflexão no número de animais utilizados em pesquisas (redução), possibilidade de substituição de vertebrados. Animais como invertebrados, embriões, microrganismos, órgãos ou tecidos isolados, além de garantir a qualidade dos experimentos

(refinamento), onde este princípio reforça o treinamento para o uso correto de técnicas de manejo animal, técnicas assépticas em procedimentos cirúrgicos, administrações de doses corretas e outras recomendações para a realização de experimentos de alta qualidade [1].

A substituição de animais por metodologias *in vitro* e *ex vivo* promove de forma eficiente um dos R's, evitando o uso de animais em ensaios, com a capacidade de esclarecer o potencial tóxico ou a eficácia de uma substância ou produto em análise [2]. Na década de 1990, as metodologias *in vitro* praticamente não eram utilizadas para verificar a toxicidade e eficácia, entretanto, no início dos anos 2000, observou-se um grande crescimento no uso dessa metodologia para avaliação da genotoxicidade, segurança farmacêutica e ensaios farmacocinéticos [3]. Outro método alternativo que merece destaque é a substituição de animais vertebrados por invertebrados em ensaios, que permitem estudar a doença de Parkinson, memória, endócrina, diabetes e ensaios toxicológicos. *Drosophila melanogaster* é um invertebrado frequentemente utilizado como modelo, onde esta substituição é benéfica por uma série de razões como redução de custos, ciclo de vida curto, tamanho pequeno e anatomia simples da mosca, além de poder observar um maior número de animais por experimento [2]. *Drosophila melanogaster* é um modelo de grande importância, pois gera informações para o combate a pragas e vetores de doenças. A busca por novos agentes que sejam eficazes no controle de vetores, explora opções que sejam economicamente viáveis, com menor poluição ambiental e menor toxicidade para organismos não-alvo, inclusive humanos [4].

Nesse contexto, a busca por produtos com atividade biológica e / ou farmacológica reacendeu o interesse pelos produtos naturais, principalmente os de origem vegetal, entre os quais os óleos essenciais (OE) ocupam lugar de destaque. Os OE são líquidos à temperatura ambiente e geralmente são compostos complexos formados por várias substâncias, como álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, éteres, ésteres e terpenos em diferentes proporções, sendo os últimos predominantemente mono e sesquiterpenos. Os OE possuem atividades antioxidantes, quelantes de metais, eliminadores de radicais livres, moduladores da dor, anticonvulsivantes, neuroprotetores e antiinflamatórios [5,6].

Dysphania ambrosioides (L.), Mosyakin e Clemants (Chenopodiaceae), também conhecido como *Chenopodium ambrosioides*, ocorre frequentemente em regiões subtropicais e subtropicadas com característica cosmopolita, sendo popularmente utilizado para o tratamento de vermes [7], como diurético e em alterações respiratórias e inflamatórias. Segundo a organização mundial de saúde [8], *D. ambrosioides* é uma das plantas medicinais mais utilizadas no mundo, devido à sua ampla distribuição e conhecimento etnomédico. O EO de *D. ambrosioides* foi relatado anteriormente na literatura com atividade inseticida contra abelhas e moscas [9], como antiviral, anti-helmíntico, antifúngico, antileishmania e antioxidante. O OE possui componentes de conhecido valor medicinal como: ascaridol, isoascaridol, p-cimeno, limoneno e α -terpineno. Produtos bioativos isolados de plantas são usados para o tratamento de tuberculose, reumatismo, hemorragia uterina e doenças respiratórias [10]. Estudos demonstraram que o α -terpineno é seguro em testes de embriofetotoxicidade em ratos [11], entretanto, outros estudos revelaram alguns efeitos tóxicos no uso oral desta substância [12, 13]. Portanto, entre as preocupações para o desenvolvimento de novos produtos com atividade biológica e / ou farmacológica está a determinação de doses tóxicas e margens de segurança. Vários estudos demonstram semelhanças anatômicas e fisiológicas entre o sistema cardiovascular de humanos e suínos (*Sus scrofa domestica*), em particular o controle do músculo liso, sendo relatados efeitos envolvendo mecanismos eletromecânicos e farmacomecânicos [14-17]. O efeito miorrelaxante que drogas e medicamentos exercem sobre a musculatura lisa vascular é uma ferramenta fundamental no controle das condições em que a vasoconstrição ou a obstrução vascular são responsáveis por danos a tecidos,

órgãos, sistemas ou mesmo a sobrevivência do organismo. Portanto, testes com artérias coronárias de suínos fornecem informações relevantes sobre o assunto, pois alguns estudos já demonstraram a ação miorelaxante de extratos, óleos essenciais e seus componentes [18-24]. Assim, os efeitos na musculatura lisa, principalmente nas artérias coronárias, fornecem informações importantes, que podem gerar enormes possibilidades para outros estudos envolvendo a ação e os mecanismos de contração da musculatura lisa. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade miorelaxante do óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* (EODa) em modelo coronariano *ex vivo* de *Sus scrofa domesticus*, bem como verificar as concentrações tóxicas do EODa e de seu constituinte majoritário, α -terpineno, frente ao modelo alternativo de *Drosophila melanogaster*.

2. Resultados

2.1. Análise Fitoquímica

A porcentagem dos compostos identificados pode ser observada no histograma resultante da análise dos dados cromatográficos e espectrais (figura 1).

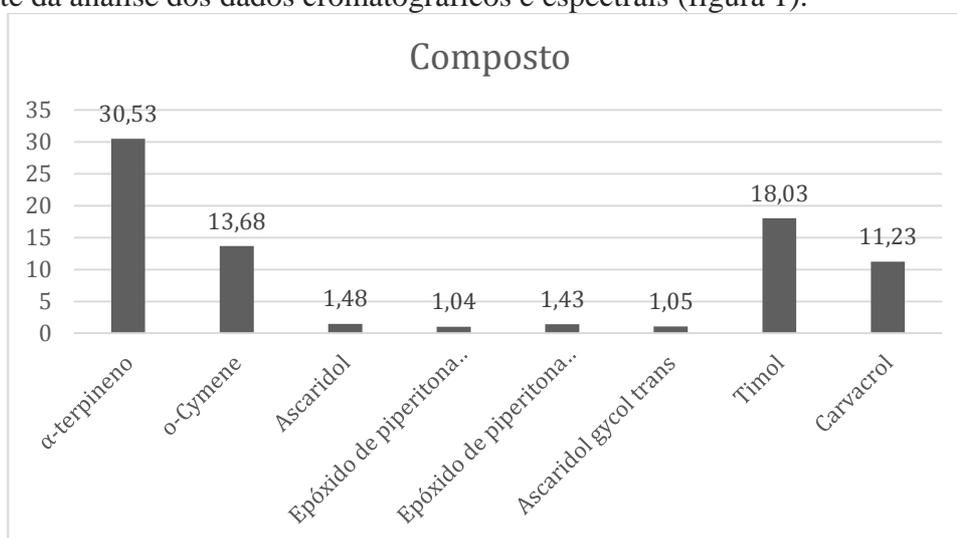


Figura 1. Perfil do histograma da composição do óleo essencial de *Disphania ambrosioides*

2.2. Ensaio de contratilidade de músculo liso *Ex Vivo*

2.2.1. Efeito do óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* nas contrações induzidas por K^+ usando um modelo de artéria coronária de *Sus scrofa domesticus*

Concentrações crescentes e cumulativas do EODa (1, 3, 10, 30, 100, 300, 600 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) foram administradas para avaliar seu efeito miorelaxante nas contrações promovidas e sustentadas pelo K^+ no músculo liso da artéria coronária de suínos (eletromecânico acoplamento). Concentrações crescentes do EODa promoveram um relaxamento dependente da concentração, onde seus efeitos significativos foram observados a partir da concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$, ANOVA unilateral seguida de Holm-Sidak) (figura 2)

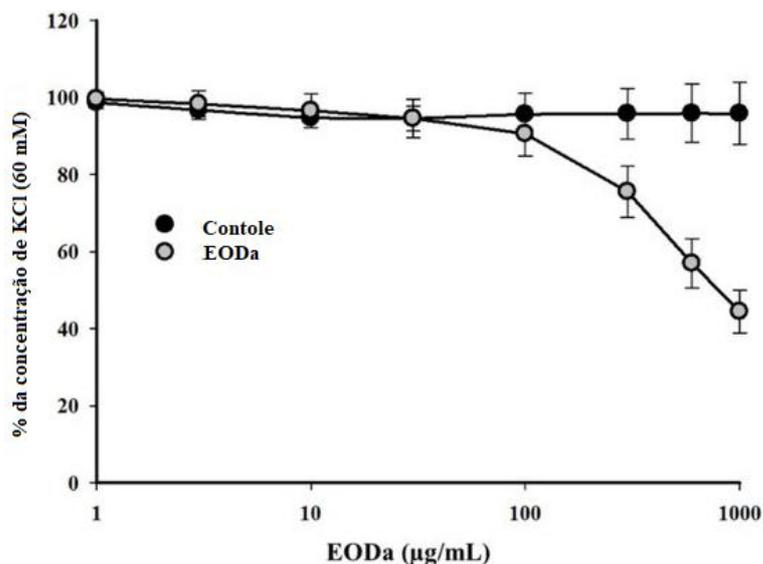


Figura 2. Efeito relaxante do óleo essencial de *Disphania ambrosioides* (EODa) nas contrações mantidas pelo potássio em artérias coronárias isoladas de suínos.

Legenda: Gráfico representativo do efeito relaxante do EODa nas contrações mantidas pelo KCl (60 mM) em artérias coronárias isoladas de suínos. Os valores são expressos como a média \pm SEM; n representa o número de experiências ($p < 0,001$, ANOVA unilateral seguida por Holm-Sidak).

2.2.2. Efeito do óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* nas contrações induzidas pela serotonina (5-HT) usando um modelo de artéria coronária de *Sus scrofa domesticus*

Concentrações crescentes e cumulativas de EODa (1, 3, 10, 30, 100, 300, 600 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) foram administradas para avaliar seu efeito miorelaxante nas contrações induzidas por 5-HT em artérias coronárias de músculo liso de suínos (acoplamento farmacomecânico). Concentrações crescentes de EODa promoveram um relaxamento dependente da concentração que foi estatisticamente significativo a partir da concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,005$, ANOVA de uma via seguida por Holm-Sidak) (figura 3).

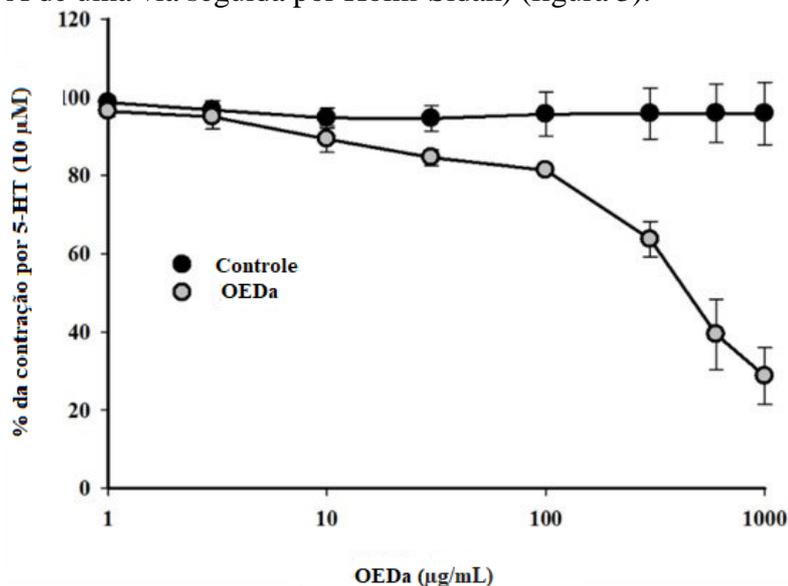


Figura 3. Efeito relaxante do EODa nas contrações mantidas pela serotonina em artérias coronárias isoladas de suínos.

Legenda: Gráfico representativo do efeito relaxante do EODa nas contrações mantidas pelo 5-HT em artérias coronárias isoladas de suínos. Os valores são expressos como a média \pm SEM; n representa o número de experiências ($p < 0,005$, ANOVA unilateral seguida por Holm-Sidak).

O EODa apresentou atividade miorreaxante tanto na via eletromecânica quanto na farmacomecânica, porém com maior eficiência na via farmacomecânica onde as contrações foram evocadas pelo 5-HT.

2.3. *D. melanogaster*-modelo alternativo

2.3.1. Ensaio de Toxicidade

Os testes de toxicidade do óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* e α -terpineno contra *D. melanogaster* foram realizados em três concentrações (1, 2 e 4 mg/mL) pelo método de fumigação. Este teste utiliza moscas como modelo alternativo ao uso de mamíferos, gerando informações para a determinação do perfil de toxicidade do óleo essencial e do composto. O cálculo da concentração letal média (CL₅₀) do EODa foi determinado em 1,806 mg/mL, por regressão sigmoidal, enquanto para α -terpineno foi obtido um EC₅₀ de 2,282. Os resultados citados foram semelhantes aos observados por [25], onde o EODa obteve um LC₅₀ de 1,96 mg/mL, sendo este inferior ao constituinte isolado (tabela 1). A mesma metodologia foi utilizada para determinar a CE₅₀ para mobilidade, para a qual foi obtido o valor de 1,646 mg/mL.

Tabela 1. Toxicidade fumigante do óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* e α -terpineno contra moscas adultas de *D. melanogaster*.

Composto	LC ₅₀ (mg. L ⁻¹ de ar)	Limites 95%
OEDa	1,806	1,588–2,296
α -terpineno	2,282	1,933–2,671

O EODa apresentou diferença significativa com a concentração de 4 mg/mL, quando comparado ao controle e a concentração de 1 mg/mL, em todos os tempos de leitura (entre 1 e 8 h). A partir da terceira hora, foi registrada uma diferença entre a concentração de 2 mg/mL e o controle, fato que só foi identificado a partir da sexta hora de leitura com a concentração de 1 mg/mL, conforme mostrado na figura 4.

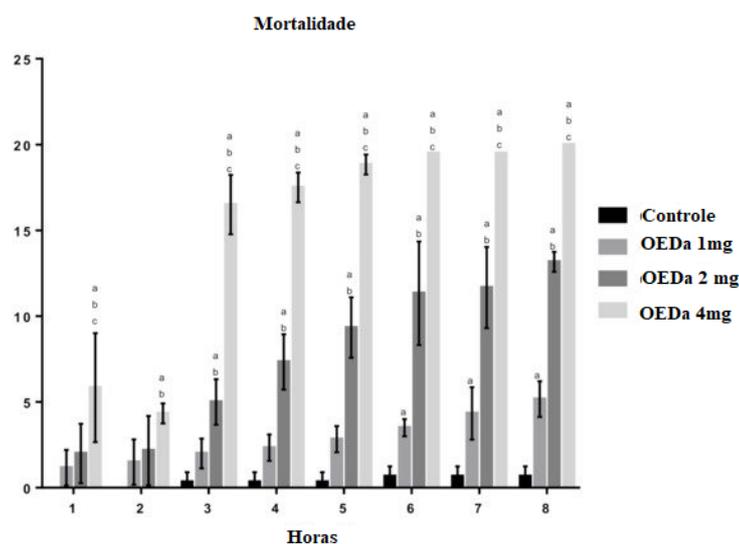


Figura 4. Efeito do óleo essencial da folha de *D. ambrosioides* na sobrevivência de *D. melanogaster*.

Legendas: A sobrevivência foi analisada nos momentos indicados. Os resultados são expressos como a média \pm DP do número de moscas mortas após cada tempo de exposição. a = $p < 0,05$ comparado ao controle, b = $p < 0,05$ comparado a 1 mg/mL e c = $p < 0,05$ comparado a 2 mg/mL.

Os ensaios de toxicidade do α -terpineno foram realizados nas seguintes concentrações: 1, 2 e 4 mg/mL. As leituras foram realizadas a cada hora durante 8 h, sendo que a concentração de 4 mg/mL apresentou diferenças significativas em relação a todos os outros grupos (controle, 1 e 2 mg/mL), sendo esta característica não evidente em nenhuma das outras comparações, conforme demonstrado na figura 5.

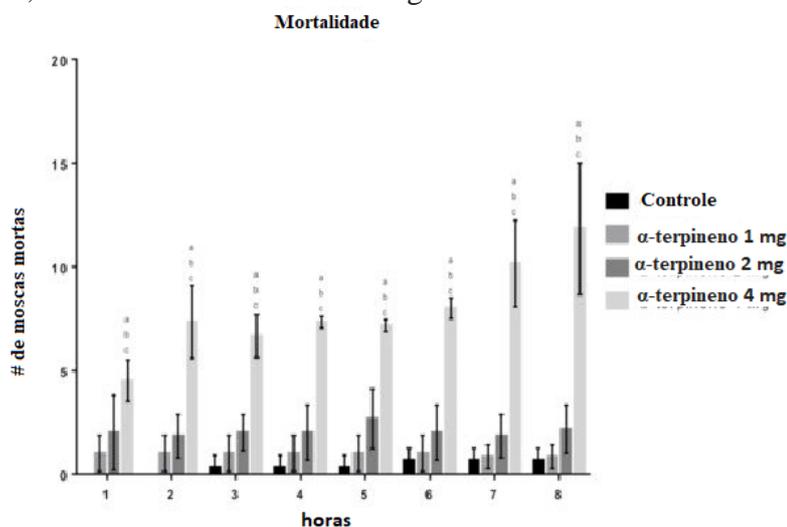


Figura 5. Efeito do α -terpineno na sobrevivência de *D. melanogaster*.

Legendas: A sobrevivência foi analisada nos momentos indicados. Os resultados são expressos como a média \pm DP do número de moscas mortas após cada tempo de exposição. a = $p < 0,05$ comparado ao controle, b = $p < 0,05$ comparado a 1 mg/mL e c = $p < 0,05$ comparado a 2 mg/mL.

O composto α -terpineno presente no óleo essencial de *D. ambrosioides* apresentou efeito tóxico contra *D. melanogaster*.

2.3.2. Geotaxia negativa

O dano à capacidade locomotora das moscas foi registrado com todas as concentrações nas oito horas de registro, com exceção da concentração de 1 mg/mL na primeira hora, que não diferiu estatisticamente do controle. Além disso, a concentração de 2 mg/mL não diferiu significativamente da concentração de 4 mg/mL na última hora (figura 6).

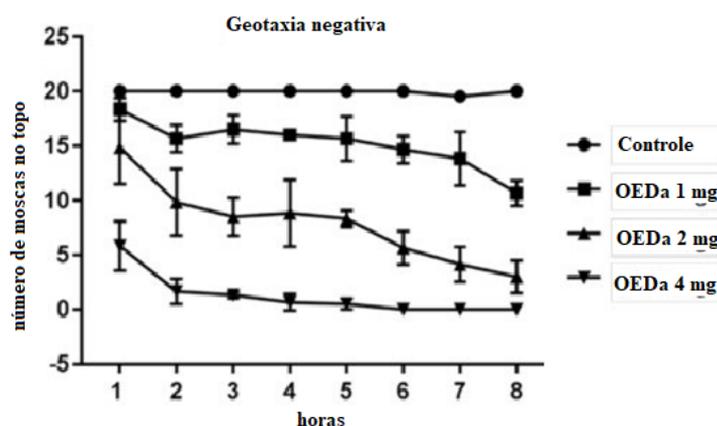


Figura 6. Efeito do óleo essencial da folha de *D. ambrosioides* na habilidade locomotora de *D. melanogaster*.

Legenda: A atividade locomotora foi determinada pelo comportamento negativo da geotaxia. Os resultados são expressos como a média \pm DP do número de moscas capazes de escalar uma coluna de vidro marcada, conforme descrito anteriormente, durante cada tempo de exposição.

Em termos de locomoção do inseto o α -terpineno apenas na concentração de 4 mg/mL alterou a locomoção em todos os momentos de registro, enquanto a concentração de 2 mg/mL também se mostrou eficaz em prejudicar a capacidade locomotora até a sexta hora, após esse momento não houve diferenças quando comparados ao controle, indicando uma reversibilidade na ação (figura 7).

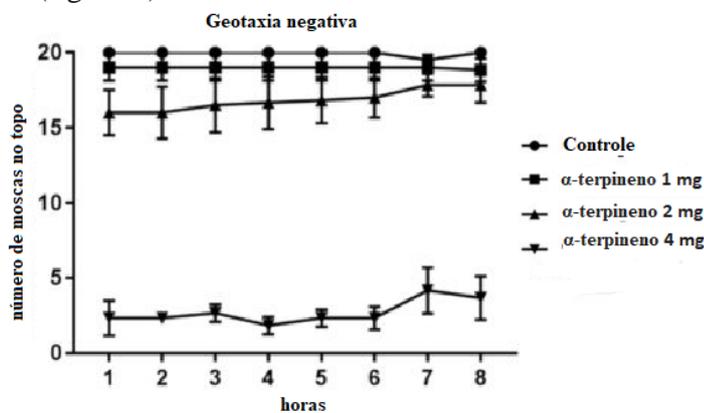


Figura 7. Efeito do α -terpineno na capacidade locomotora de *D. melanogaster*.

Legenda: A atividade locomotora foi determinada pelo comportamento negativo da geotaxia. Os resultados são expressos como a média \pm DP do número de moscas capazes de escalar uma coluna de vidro marcada, conforme descrito anteriormente, em cada tempo de exposição.

Ao sobrepor os resultados dos ensaios de mortalidade e geotaxia negativa, todas as concentrações de EODa testadas (1, 2 e 4 mg/mL) reduziram a mobilidade das moscas que permaneceram vivas, fato que pode ser bem observado nas primeiras horas de exposição para as concentrações de 2 e 4 mg/mL, comportamento que também se manteve nas demais horas de avaliação (figura 8).

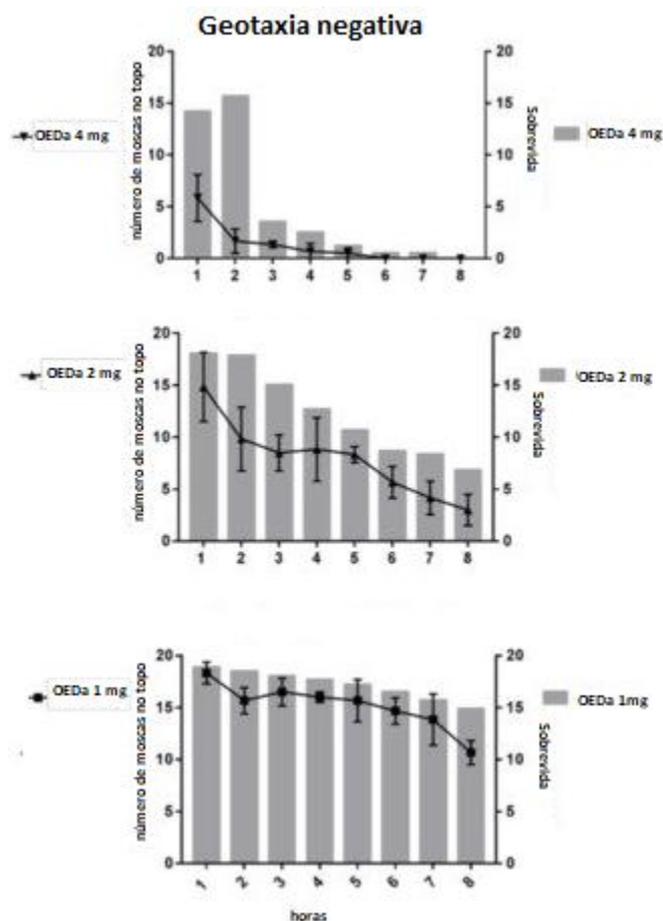


Figura 8. Relação entre moscas vivas e alterações na mobilidade.

3. Discussão

O perfil fitoquímico do óleo estudado foi estabelecido por cromatografia e teve o α -terpineno como constituinte majoritário, com um percentual de 30,53%. Os constituintes secundários com maior percentual foram: timol e o-cimeno, com 18,11% e 13,68%, respectivamente. A porcentagem dos compostos identificados pode ser observada no histograma resultante da análise dos dados cromatográficos e espectrais (figura 1), e que corroboram com os resultados apresentados por [23].

Vários estudos listam os constituintes do EODa, onde sua composição pode ser variável, como no estudo de [24], onde principalmente terpenos e sesquiterpenos oxigenados (α -terpineno 61,04%, 4-careno 13,55% e p-cimeno 12,94%) foram identificados, enquanto o estudo por (9) registrou cis e trans ascaridol (35,4% e 26,0%, respectivamente), e p-cimeno (29,2%), como constituintes majoritários.

As variações constituintes nas análises mencionadas podem ser explicadas pelas inúmeras variáveis presentes ao comparar estudos usando as mesmas espécies de plantas que foram cultivadas e coletadas em diferentes locais. Essas variáveis incluem o tipo de solo, índices de pluviosidade, intensidade do vento, época de coleta e época de coleta, entre outros fatores que são importantes influenciadores na constituição dos óleos essenciais, onde tais diferenças foram relatadas anteriormente [25]. Outro fator que deve ser levado em consideração é a maturação ou idade da planta, que pode alterar a composição do óleo essencial [26]. Mudanças na composição também podem ser observadas por reações químicas que podem ocorrer espontaneamente após a extração do EO, como a auto-

oxidação do α -terpineno, aumentando a concentração de vários outros constituintes, como o ascaridol e, assim, reduzindo sua própria concentração quando em contato com o ar [27].

A alta concentração de potássio gerada pela adição de KCl promove uma despolarização da membrana por meio de uma mudança na carga elétrica, que consequentemente resulta na ativação de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (ou canais sensíveis à dihidropiridina) permitindo a entrada de Ca^{2+} íons do ambiente externo para o citosol. O aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular é o protagonista do acoplamento excitação-contração, onde este aumento na concentração de cálcio citosólico medeia a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, aumentando ainda mais os níveis de íons de cálcio que estão disponíveis para fosforilação da cadeia leve da miosina, um dos os estágios finais da contração do músculo liso [28, 29]. É importante ressaltar que a despolarização da membrana causada pelo potássio também promove uma contração dependente de Ca^{2+} , mediada pela proteína G RhoA associada à Rho quinase [30].

Pereira-de-Morais et al. [23] demonstraram que o EODa relaxou a musculatura lisa de traqueias isoladas de ratos, com os dados indicando que esse efeito é supostamente devido ao bloqueio dos canais de cálcio do tipo L. Da mesma forma, Menezes et al. [31] relataram um efeito relaxante do óleo essencial de *Origanoides lippi* contra as contrações promovidas pelo KCl, ao mesmo tempo em que indicaram o envolvimento dos canais de potássio dependente de Ca^{+2} e dependente de voltagem no relaxamento da musculatura lisa, fato que pode explicar o relaxamento promovido pelo EODa uma vez que ambos têm os mesmos compostos majoritários.

Quaisquer efeitos sobre o K^+ precisam ser entendidos para entender o mecanismo de ação do OE, uma vez que esse íon contribui para o potencial de membrana em células excitáveis, principalmente neurônios, fibra muscular esquelética e fibra muscular lisa, por meio de sua ação em seus canais. Por outro lado, os efeitos do EODa nas contrações induzidas pela serotonina podem ocorrer por meio de um mecanismo agonista externo, onde o EODa pode se ligar a receptores de membrana e modificar a atividade de canais iônicos como Na^+ e K^+ [32, 33]. Esse mecanismo começa com o acoplamento da serotonina ao receptor da proteína Gq/11, ativando a fosfolipase C (PLC), que hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) em inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 difunde-se para o citoplasma e liga-se ao receptor de trifosfato de inositol (receptores IP_3R), canais de cálcio presentes na membrana SR, que quando ativados liberam Ca^{2+} . Enquanto isso, o DAG junto com o Ca^{2+} ativam o PKC que atua em vários processos, incluindo a regulação do transporte transmembrana de Ca^{2+} [34]. O relaxamento observado pode ser devido, em parte, a um bloqueio da ativação do IP_3R pelo IP_3 , conforme observado em Pelaia et al. [35], e por outros mecanismos, como: aumento de Ca^{2+} -ATPase atividade, diminuição da formação de IP_3 , atividade da proteína quinase A (PKA) e estimulação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Estudos com óleos essenciais de plantas medicinais aromáticas como *Melissa officinalis* e *Lippia alba* mostraram inibição das contrações promovidas por K^+ e 5-HT (vias eletromecânicas e farmacomecânicas) em vários órgãos de ratos como: íleo, traqueia, aorta e útero [6, 23, 36, 37]. Jarvis [38] relatou que o óleo essencial de *Lippia alba* inibe as contrações do músculo liso causadas por 5-HT na traqueia e íleo. Assaidi et al. [39] relatam que a administração intravenosa dos extratos aquoso, metanólico e acetato de etila das folhas de *Chenopodium ambrosioides* induzem hipotensão arterial em ratos normotensos anestesiados. Assim, os resultados do presente estudo indicam um efeito relaxante para plantas aromáticas, sugerindo o potencial que *Disphania ambrosioides* tem como relaxante de músculo liso.

A exposição à mosca-das-frutas por fumigação ao óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* causou um aumento significativo na mortalidade. Este efeito depende do

tempo de exposição e da concentração de óleo. No estudo de Pinho et al. [40], o óleo essencial de *Psidium guajava* apresentou ação significativa em termos de mortalidade de *D. melanogaster*, onde adicionalmente, as concentrações testadas causaram uma perda total da capacidade motora nas moscas, dependendo da dose e do tempo de exposição. Esses achados corroboram com o presente estudo e sugerem que óleos essenciais de plantas aromáticas podem ser tóxicos para artrópodes.

A ação tóxica do óleo essencial de *D. ambrosioides* também foi investigada em outros modelos importantes, com estudos relatando que esta espécie possui atividade pesticida, larvicida e inseticida. O EODa apresentou notável ação esquistossomicida *in vitro*, matando 100% dos vermes adultos em 24 e 72 h e reduzindo significativamente a viabilidade celular *in vitro*, obtendo, entretanto, um índice de seletividade 31,8 vezes mais tóxico para vermes adultos do *Schistosoma mansoni* do que as células testadas [41], o que sugere uma atividade tóxica com potenciais aplicações no controle de pragas.

O EODa também mostrou ser tóxico para moscas domésticas adultas [9] e tóxico para *Alphitobius diaperinu* [42]. Portanto, o EODa pode ser considerado em novas estratégias olhando para novas possibilidades no manejo integrado de pragas.

O efeito tóxico do EODa pode estar associado a uma alteração na atividade da acetilcolinesterase, que por sua vez está associada a um aumento nas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no sistema neuronal, o que inicialmente levaria a um aumento na atividade e concentração de enzimas antioxidantes tais como catalase e glutatona S-transferase [43, 44].

O composto α -terpineno presente no óleo essencial de *D. ambrosioides* apresentou efeito tóxico contra *D. melanogaster*. Estudos demonstraram que a toxicidade do α -terpineno contra adultos de *Sitophilus zeamais* tem valores de CL_{50} de $5,46 \text{ mg L}^{-1}$ [25], sendo este um importante componente adjuvante na composição de outros óleos usados para esse fim [45]. Paes et al. [46] mostraram que α -terpineno foi um dos principais compostos identificados no óleo essencial de *C. ambrosioides*, que apresentou atividade acaricida. Porém, o uso do óleo essencial na sua totalidade tem apresentado maior atividade tóxica do que seus constituintes majoritários isolados, corroborando assim com estudos que demonstram que a toxicidade dos constituintes selecionados das misturas apresenta efeito sinérgico entre os compostos supostamente ativos e inativos, e que os a presença de todos os constituintes é necessária para a toxicidade completa e / ou ação dos óleos essenciais [45].

O efeito letal dos terpenos e / ou óleos essenciais é o resultado da ação tóxica desses compostos em diversos alvos receptores, principalmente em vias de sinalização ou regulatórias que estão diretamente associadas ao sistema nervoso, tais como: interferência da acetilcolinesterase, ligação à ocitocina, receptores nicotínicos, GABAérgicos e tiramina [47]. Além dos inúmeros efeitos-alvo, onde essas substâncias não atuam em um único alvo, a complexa composição dos óleos essenciais contribui para a letalidade nos insetos, não só pelo seu efeito farmacodinâmico, mas também pela possibilidade de ativação em diversos alvos, e efeitos farmacocinéticos [48], onde o próprio complexo pode contribuir para uma melhor absorção, conseqüentemente maior biodisponibilidade dos compostos ativos, resultando na competição das vias metabólicas pelos constituintes do OE, entre muitas outras variações, que podem ocorrer neste processo [49].

Tem sido sugerido que a mobilidade reduzida de *D. melanogaster*, observada pelo menor número de moscas atingindo o topo da coluna, é resultado da inibição efetiva da acetilcolinesterase (AChE) [50, 51]. Assim, podemos inferir que a capacidade do OE em induzir relaxamento no músculo liso pode ser explicada por um aumento da concentração de acetilcolina no endotélio vascular. A acetilcolina no endotélio atua através de receptores muscarínicos acoplados às proteínas G, que ao contrário de estimular o influxo de cálcio

para uma efetiva contração, induz a ativação do óxido nítrico sintase promovendo a produção de óxido nítrico e relaxamento [52-55]. No entanto, é digno de nota que outras vias que causam alterações na mobilidade das moscas podem estar envolvidas, incluindo a via dopaminérgica, uma vez que diminuições na dopamina alteram significativamente a mobilidade do inseto [56].

O α -terpineno foi um dos principais compostos identificados no óleo essencial de *D. ambrosioides*, também conhecido como *Chenopodium ambrosioides*, que apresentou atividade acaricida [46]. Além disso, o α -terpineno apresentou atividade inibitória da acetilcolinesterase [57], corroborando com os achados deste estudo, visto que o α -terpineno é o principal monoterpene presente no EODa.

O maior dano à capacidade locomotora foi registrado ao comparar o EODa ao seu constituinte principal isolado, fato que consolida a observação de que os efeitos tóxicos são mais potentes quando uma mistura complexa é testada em vez de um único constituinte.

Vários estudos relatam que a diminuição da atividade da acetilcolinesterase está fortemente associada à diminuição da mobilidade [58-60] ou deficiência locomotora permanente [61]. A comparação entre moscas vivas e moscas móveis mostra uma correlação negativa direta, tanto em termos da concentração de EODa quanto do tempo de exposição, o que sugere que a deficiência locomotora precede os efeitos tóxicos gerais, que podem levar à morte do inseto, onde este resultado pode ser explicado pela ação dos constituintes do óleo essencial em diferentes enzimas e genes alvo [50, 62].

4. Materiais e Métodos

4.1. Coleta e Identificação de Plantas

O material botânico *Dysphania ambrosioides* (L.), Mosyakin e Clemants foi coletado no Jardim Botânico do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (Horto Botânico do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais - LPPN), da Universidade Regional do Cariri. Cariri — URCA, Crato, Brasil) (coordenadas: latitude 07 14' 19,2 " S. e 39 e longitude 24'52,8 " W.). A espécie foi identificada pela Profa. Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva como pertencente à *Dysphania ambrosioides* (L.), Mosyakin e Clemants, espécies, da família Chenopodiaceae. Uma exsicata foi depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima (Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima, Crato, Brasil), da Universidade Regional do Cariri (Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato, Brasil), sob o voucher nº 12.208.

4.2. Extração de óleo essencial

As folhas das plantas foram coletadas e cortadas em pedaços de aproximadamente 1 cm². Posteriormente, o material vegetal foi imerso em água destilada e submetido à extração por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger para obtenção do óleo essencial. As extrações foram realizadas em triplicata e tratadas com sulfato de sódio anidro. O óleo foi então filtrado através de algodão e transferido com uma pipeta Pasteur para um vidro âmbar e armazenado a -20 °C. Os procedimentos de extração e análise foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) da Universidade Regional do Cariri (Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato, Brasil).

4.3. Análise Fitoquímica

O óleo essencial foi submetido à cromatografia gasosa com coluna HP-5 apolar (Agilent J&W, Santa Clara, CA, EUA, 60 m × 0,25 mm de diâmetro interno; espessura do filme 0,25 µm) e acoplado a um espectrômetro de massa com um Agilent Analisador quadrupolo série 5975C (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA). As condições de

análise foram as seguintes: gás carreador hélio com fluxo constante de 1 mL por min e para injeção da amostra temperatura inicial de 40 °C (mantida por 2 min), rampa de aquecimento de 4 °C / min e temperatura final de 230 °C, que foi mantido durante 5 min. Os compostos eluídos da coluna cromatográfica foram ionizados por impacto eletrônico a 70 eV. A fonte de ionização foi mantida a 230 °C e o quadrupolo a 150 °C. Os compostos foram identificados por meio da análise dos espectros de massa de cada pico cromatográfico, comparar com padrões autênticos e calcular índices de retenção. Os valores calculados foram comparados com as taxas de retenção publicadas na literatura [23].

A mesma solução foi quantificada por injeção em triplicado de 1 µL no modo splitless desta solução em cromatógrafo gasoso (Thermo trace GC ultra) equipado com coluna apolar VB-5 (60 m × 0,25 mm de diâmetro interno; espessura do filme 0,25 µm). As amostras foram analisadas nas seguintes condições: temperatura inicial de 40 °C (mantida por 2 min), rampa de aquecimento de 4 °C / min e temperatura final de 230 °C, que foi mantida por 5 min. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio, a um fluxo constante de 1 mL por minuto e a temperatura do injetor foi mantida em 250 °C. Os compostos eluídos da coluna cromatográfica foram detectados usando queimadores de chama (FID) a 250 °C.

4.4. Ensaio *ex Vivo* e Testes Farmacológicos

De acordo com a Resolução Normativa Conceca nº 30, de 2 de fevereiro de 2016, cadáveres e suas partes, oriundos das atividades de abatedouro, açougue ou produtor rural para consumo, estão dispensados de passar pela Comissão de Uso e Experimentação Animal (Comissão de uso e Experimentação Animal - CEUA).

As artérias coronárias de suínos adultos (*Sus scrofa domesticus*) foram obtidas em abatedouro local (Frigorífico Industrial do Carir - Leandro Bezerra localizado na Av. Paulo Maia nº 2000, distrito de São José, Juazeiro do Norte - Ceará, Brasil).

Durante o transporte para o laboratório, as coronárias foram colocadas em uma solução nutritiva Tyrode (TM ou Tyrode) modificada a 4 °C com a seguinte composição em mM: (136,0 NaCl; 5,0 KCl; 0,98 MgCl₂; 0,36 NaH₂PO₄; 11,9 NaHCO₃; 2,0 CaCl₂ e 5,5 glicoses). O pH foi ajustado para 7,4 com HCl 1 M e / ou NaOH 1 M. As coronárias foram dissecadas e seccionadas em anéis medindo entre 4 e 5 mm de comprimento. Os anéis coronários foram mantidos em banho de órgãos isolado com capacidade de 10 mL para a solução nutritiva Tyrode, mantidos sob aeração contínua por borbulhamento de ar e temperatura de 37 °C. As medidas da atividade contrátil dos tecidos foram registradas por meio de uma haste conectada a um transdutor de força (TRI, modelo 210, Panlab, Espanha), acoplado a um amplificador diferencial (DATAQ, modelo PM-1000, Akron, OH, EUA), com entrada para uma placa conversora digital analógica (DATAQ DI-200) instalada em um computador, cujos dados coletados foram convertidos em traços e armazenados em arquivos por meio do software WINDAQ (DATAQ Instruments, Inc. Akron, OH, USA). Os anéis coronários isolados foram submetidos a uma tensão de 1 gf (força grama) e aclimatados por um período de 1 h. Todos os protocolos foram iniciados com duas contrações subsequentes reproduzidas pela adição de KCl 60 mM (K60) aos anéis coronários estudados, de forma hipertônica, onde após atingir valores estáveis, um platô, a resposta máxima obtida foi considerada a contração máxima do anel. Apenas experimentos com contrações reproduzíveis foram considerados viáveis para a série experimental.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, acompanhados de seu controle, o qual foi submetido às mesmas condições e aos mesmos protocolos experimentais. As preparações do controle receberam apenas o veículo, Tween, diluído em solução de Tyrode, nas mesmas proporções utilizadas nas preparações experimentais.

4.5. Teste de toxicidade com o modelo alternativo de *Drosophila melanogaster*

4.5.1. Estoque e cultura de drosófila

As moscas *D. melanogaster* (estirpe Harwich) foram obtidas no National Species Stock Centre, Bowling Green, OH. As moscas foram criadas em garrafas de vidro de 330 mL (15 cm de altura e 6,5 cm de diâmetro), cultivadas com um meio contendo: (83% de massa de milho, 4% de açúcar, 4% de leite liofilizado, 4% de farelo de soja, 4% de trigo farelo e 1% de sal), 1 g de Nipagin (Metilparabeno) e 1 mL de uma solução contendo *Saccharomyces cerevisiae*. As moscas foram mantidas em temperatura de 25 °C com umidade relativa de 60% [23]. Todos os experimentos foram realizados com a mesma cepa.

4.5.2. Ensaio de *D. melanogaster* e exposição a óleo essencial

A exposição das moscas ao óleo essencial foi realizada por meio do protocolo de fumigação descrito: 20 moscas adultas (machos e fêmeas) foram colocadas em frascos de 130 cm³, contendo um papel filtro embebido em sacarose 20% em água destilada no fundo. Um papel de filtro (1 cm²) foi fixada na parte interna da tampa do frasco para aplicação de diferentes doses do óleo essencial. Ao fazer isso, as moscas se alimentam da solução de sacarose no fundo dos frascos, enquanto o óleo essencial é volatilizado no topo e atinge o sistema respiratório da mosca. Os frascos receberam os seguintes tratamentos: sacarose 1% (controle) e 1, 2 ou 4 µg/mL do óleo essencial ou constituinte testado. As leituras de sobrevivência das moscas foram feitas a cada hora até a oitava hora. Os resultados são apresentados como o número de moscas vivas (média ± DP) obtido a partir de seis experiências independentes.

4.5.3. Ensaio Locomotor

A capacidade locomotora foi avaliada seguindo o comportamento negativo da geotaxia, conforme descrito por Boutkhil et al. [24], com algumas modificações. Vinte moscas adultas (1-4 dias de idade, machos e fêmeas) foram expostas ao óleo essencial conforme descrito na seção anterior. Resumidamente, após a contagem horária da mortalidade das moscas, um teste de geotaxia negativo foi realizado simultaneamente com as moscas sobreviventes, onde este consistiu na contagem do número de moscas que ultrapassaram 5 cm na coluna de vidro do próprio experimento, durante um intervalo de 5 segundos. Os testes foram repetidos cinco vezes com intervalos de 1 minuto. Os resultados são apresentados como o número de moscas que atingiu o máximo ± DP obtido em três experimentos independentes.

4.6. Análise Estatística

Os dados são expressos como a média ± SEM Para análise estatística e produção de gráfico, o software Sigma Plot 11.0 foi usado para os ensaios *ex vivo* usando uma ANOVA de uma via seguida por Holm-Sidak e o software GraphPad Prism 7.0 para os outros testes. Os resultados considerados estatisticamente significativos obtiveram uma probabilidade de hipótese nula inferior a 5% ($p < 0,05$). Testes e análise de variância (ANOVA de duas vias), seguido por de Tukey foram usadas. Para o cálculo dos valores de EC₅₀, foram realizadas interpolação logarítmica e regressão sigmoidal, sendo a concentração capaz de produzir 50% do efeito máximo considerado como o EC₅₀, com os cálculos sendo realizados para cada experimento.

5. Conclusões

A metodologia de contratilidade muscular *ex vivo* da artéria coronária de *Sus scrofa domestica* demonstrou a atividade relaxante do EODa e de seu principal composto nas

contrações do músculo liso induzidas por potássio e serotonina. A composição do EODa revelou a presença de terpenos oxigenados, capazes de promover efeitos tóxicos em insetos a partir de baixa concentração, além de induzir a um comprometimento precoce da mobilidade das moscas, o que dificulta a dispersão desses insetos. O exposto torna o EODa um produto potencial para a realização de estudos necessários sobre a segurança desses compostos para o homem, tanto por sua ação miorelaxante no sistema vascular, quanto por sua toxicidade para o cultivo de lavouras, com possibilidade de desenvolver formulações com maior eficácia e segurança e benefícios de custo atraentes.

Contribuições do autor

Conceptualização, LJdLN e FABdC; metodologia, LJdLN, JGMdC e FABdC; validação, JH e GK; análise formal, JH e GK; investigação, LJdLN, AGBR, RERdS, FMS, LBRD, LP-d.-M., RHSdC; recursos, LJdLN, AGBR, RERdS, FMS, LBRD, LP-d.-M. e RHSdC; curadoria de dados, LJdLN; redação - preparação do rascunho original, LJdLN; redação - revisão e edição, RB, HDMC, RK e FABdC; supervisão, RB, HDMC, RK e FABdC; administração de projetos, FABdC; aquisição de financiamento, FABdC Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento

Este estudo foi financiado pela Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP (BP3-0139-00077.01.00 / 18). Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES e Geopark Araripe.

Declaração do Conselho de Revisão Institucional

Não aplicável.

Declaração de consentimento informado

Não aplicável.

Declaração de disponibilidade de dados

Não aplicável.

Agradecimentos

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP (BP3-0139-00077.01.00 / 18). Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES e Geopark Araripe.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Disponibilidade de amostra

Não disponível.

Referências

1. Gruber, F.P.; Hartung, T. Alternatives to animal experimentation in basic research. *ALTEX* **2004**, 21 Suppl 1, 3–31.
2. Doke, S.K.; Dhawale, S.C. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharm. J.* **2015**, 23, 223–229.
3. Hamm, J.; Sullivan, K.; Clippinger, A.J.; Strickland, J.; Bell, S.; Bhatarai, B.; Blaauboer, B.; Casey, W.; Dorman, D.; Forsby, A.; et al. Alternative approaches for identifying acute systemic toxicity: Moving from research to regulatory testing. *Toxicol. Vitr.* **2017**, 41, 245–259, doi:10.1016/J.TIV.2017.01.004.
4. Mwanauta, R.W.; Mtei, K.A.; Ndakidemi, P.A. Prospective Bioactive Compounds from *Vernonia amygdalina*, *Lippia javanica*, *Dysphania ambrosioides* and *Tithonia diversifolia* in Controlling Legume Insect Pests. *Agric. Sci.* **2014**, 05, 1129–1139, doi:10.4236/as.2014.512123.
5. Aumeeruddy-Elalfi, Z.; Mahomoodally, F. Essential oils and nanoemulsions alternative tool to biofilm eradication. In *Essential Oils and Nanotechnology for Treatment of Microbial Diseases*; Rai, M., Zacchino, S., Derita, M.G., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL : CRC Press/Taylor & Francis Group, 2017., **2017**; pp. 159–174 ISBN 9781351806077.
6. de Lavor, É.M.; Fernandes, A.W.C.; de Andrade Teles, R.B.; Leal, A.E.B.P.; de Oliveira Júnior, R.G.; Gama e Silva, M.; de Oliveira, A.P.; Silva, J.C.; de Moura Fontes Araújo, M.T.; Coutinho, H.D.M.; et al. Essential Oils and Their Major Compounds in the Treatment of Chronic Inflammation: A Review of Antioxidant Potential in Preclinical Studies and Molecular Mechanisms. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, 2018, 1–23, doi:10.1155/2018/6468593.
7. Simões, R.R.; dos Santos Coelho, I.; Junqueira, S.C.; Pigatto, G.R.; Salvador, M.J.; Santos, A.R.S.; de Faria, F.M. Oral treatment with essential oil of *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae) reduces acute pain and inflammation in mice: Potential interactions with transient receptor potential (TRP) ion channels. *J. Ethnopharmacol.* **2017**, 200, 8–15, doi:10.1016/j.jep.2017.02.025.
8. Lorenzi, H.; Matos, F.J. de A. *Plantas medicinais no Brasil : nativas e exóticas*; 2nd ed.; Instituto Plantarum: Nova Odessa, SP, **2002**;
9. Pavela, R.; Maggi, F.; Lupidi, G.; Mbuntcha, H.; Woguem, V.; Womeni, H.M.; Barboni, L.; Tapondjou, L.A.; Benelli, G. *Clausena anisata* and *Dysphania ambrosioides* essential oils: from ethno-medicine to modern uses as effective insecticides. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, 1–11, doi:10.1007/s11356-017-0267-9.
10. Zohra, T.; Ovais, M.; Khalil, A.T.; Qasim, M.; Ayaz, M.; Shinwari, Z.K. Extraction optimization, total phenolic, flavonoid contents, HPLC-DAD analysis and diverse pharmacological evaluations of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. *Nat. Prod. Res.* **2019**, 33, 136–142, doi:10.1080/14786419.2018.1437428.
11. Araujo, I.B.; Souza, C.A.M.; De-Carvalho, R.R.; Kuriyama, S.N.; Rodrigues, R.P.; Vollmer, R.S.; Alves, E.N.; Paumgarten, F.J.R. Study of the embryofetotoxicity of α -terpinene in the rat. *Food Chem. Toxicol.* **1996**, 34, 477–482, doi:10.1016/0278-6915(96)87358-3.
12. Baldissera, M.D.; Souza, C.F.; Dolci, G.S.; Grando, T.H.; Sagrillo, M.R.; Vaucher, R.A.; da Luz, S.C.A.; Silveira, S.O.; Duarte, M.M.M.F.; Duarte, T.; et al.

- Monoterpene alpha-terpinene induced hepatic oxidative, cytotoxic and genotoxic damage is associated to caspase activation in rats. *J. Appl. Biomed.* **2017**, *15*, 187–195, doi:10.1016/j.jab.2017.01.002.
13. Baldissera, M.D.; Souza, C.F.; Grando, T.H.; Sagrillo, M.R.; De Brum, G.F.; Nascimento, K.; Peres, D.S.; Maciel, M.F.; Silveira, S.O.; Da Luz, S.C.A.; et al. Memory deficit, toxic effects and activity of Na⁺, K⁺-ATPase and NTPDase in brain of Wistar rats submitted to orally treatment with alpha-terpinene. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2016**, *46*, 1–8, doi:10.1016/j.etap.2016.06.024.
 14. Rodrigues, M.; Silva, A.; Águas, A.; Anat, N.G.-E.J.; 2005, U. The coronary circulation of the pig heart: comparison with the human heart. *Eur. J. Anat.* **2005**, *9*, 67–87.
 15. Goodwill, A.G.; Noblet, J.N.; Sassoon, D.; Fu, L.; Kassab, G.S.; Schepers, L.; Herring, B.P.; Rottgen, T.S.; Tune, J.D.; Dick, G.M. Critical contribution of KV1 channels to the regulation of coronary blood flow. *Basic Res. Cardiol.* **2016**, *111*, 1–13, doi:10.1007/s00395-016-0575-0.
 16. Grover, A.K. Sodium–Calcium Exchanger in Pig Coronary Artery. In *Advances in Pharmacology*; Academic Press Inc., **2017**; Vol. 78, pp. 145–170.
 17. Lawandy, I.; Liu, Y.; Shi, G.; Zhang, Z.; Scrimgeour, L.A.; Pavlov, V.; Jaworski, R.; Sellke, F.W.; Feng, J. Increased coronary arteriolar contraction to serotonin in juvenile pigs with metabolic syndrome. *Mol. Cell. Biochem.* **2019**, *461*, 57–64, doi:10.1007/s11010-019-03589-6.
 18. Bell, D.R.; Gochenaur, K. Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *J. Appl. Physiol.* **2006**, *100*, 1164–1170, doi:10.1152/jappphysiol.00626.2005.
 19. Auger, C.; Pollet, B.; Arnold, C.; Marx, C.; Schini-Kerth, V.B. Great heterogeneity of commercial fruit juices to induce endothelium-dependent relaxations in Isolated porcine coronary Arteries: Role of the phenolic content and composition. *J. Med. Food* **2015**, *18*, 128–136, doi:10.1089/jmf.2013.0183.
 20. Elle, R.E.; Defraigne, J.-O.; Schini-kerth, V.; Pollet, B.; Augier, C.; Kevers, C.; Tabart, J.; Pincemail, J. Ex-vivo vasorelaxation induced by polyphenol-rich extracts from plant, fruits and berries on porcine coronary artery rings. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *120*, S80, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.266.
 21. Tabart, J.; Auger, C.; Kevers, C.; Dommes, J.; Pollet, B.; Defraigne, J.O.; Schini-Kerth, V.B.; Pincemail, J. The potency of commercial blackcurrant juices to induce relaxation in porcine coronary artery rings is not correlated to their antioxidant capacity but to their anthocyanin content. *Nutrition* **2018**, *51–52*, 53–59, doi:10.1016/j.nut.2018.01.009.
 22. Wu, H.C.; Horng, C.T.; Tsai, S.C.; Lee, Y.L.; Hsu, S.C.; Tsai, Y.J.; Tsai, F.J.; Chiang, J.H.; Kuo, D.H.; Yang, J.S. Relaxant and vasoprotective effects of ginger extracts on porcine coronary arteries. *Int. J. Mol. Med.* **2018**, *41*, 2420–2428, doi:10.3892/ijmm.2018.3380.
 23. Pereira-de-Morais, L.; Silva, A. de A.; da Silva, R.E.R.; Ferraz Navarro, D.M. do A.; Melo Coutinho, H.D.; Menezes, I.R.A. de; Kerntopf, M.R.; Cunha, F.A.B. da; Leal-Cardoso, J.H.; Barbosa, R. Myorelaxant action of the *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants essential oil and its major constituent α -terpinene in isolated rat trachea. *Food Chem.* **2020**, *325*, 126923, doi:10.1016/j.foodchem.2020.126923.
 24. Boutkhil, S.; El Idrissi, M.; Amechrouq, A.; Chbicheb, A.; Chakir, S.; El Badaoui, K. Chemical composition and antimicrobial activity of crude, aqueous, ethanol

- extracts and essential oils of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. *Acta Bot. Gall.* **2009**, 156, 201–209, doi:10.1080/12538078.2009.10516151.
25. Chu, S.S.; Feng Hu, J.; Liu, Z.L. Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Pest Manag. Sci.* **2011**, 67, 714–718, doi:10.1002/ps.2112.
 26. Johnson, M.A.; Croteau, R. Biosynthesis of ascaridole: iodide peroxidase-catalyzed synthesis of a monoterpene endoperoxide in soluble extracts of *Chenopodium ambrosioides* fruit. *Arch. Biochem. Biophys.* **1984**, 235, 254–266, doi:10.1016/0003-9861(84)90274-1.
 27. Rudbäck, J.; Bergström, M.A.; Börje, A.; Nilsson, U.; Karlberg, A.-T. α -Terpinene, an antioxidant in tea tree oil, autoxidizes rapidly to skin allergens on air exposure. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, 25, 713–721, doi:10.1021/tx200486f.
 28. Bolton, T.B.; Prestwich, S.A.; Zholos, A. V; Gordienko, D. V Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. *Annu. Rev. Physiol.* **1999**, 61, 85–115, doi:10.1146/annurev.physiol.61.1.85.
 29. Catterall, W.A. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, a003947, doi:10.1101/cshperspect.a003947.
 30. Clelland, L.J.; Browne, B.M.; Alvarez, S.M.; Miner, A.S.; Ratz, P.H. Rho-kinase inhibition attenuates calcium-induced contraction in β -escin but not Triton X-100 permeabilized rabbit femoral artery. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **2011**, 32, 77–88, doi:10.1007/s10974-011-9253-x.
 31. Menezes, P.M.N.; Brito, M.C.; de Paiva, G.O.; dos Santos, C.O.; de Oliveira, L.M.; de Araújo Ribeiro, L.A.; de Lima, J.T.; Lucchese, A.M.; Silva, F.S. Relaxant effect of *Lippia organoides* essential oil in guinea-pig trachea smooth muscle involves potassium channels and soluble guanylyl cyclase. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, 220, 16–25, doi:10.1016/j.jep.2018.03.040.
 32. Hille, B. *Ion channels of excitable membranes*; 3rd ed.; Sinauer: Sunderland, MA, **2001**; Vol. 507;.
 33. Jackson, W.F.; Boerman, E.M. Voltage-gated Ca^{2+} channel activity modulates smooth muscle cell calcium waves in hamster cremaster arterioles. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2018**, 315, H871–H878, doi:10.1152/ajpheart.00292.2018.
 34. Morgado, M.; Cairrão, E.; Santos-Silva, A.J.; Verde, I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, 69, 247–266, doi:10.1007/s00018-011-0815-2.
 35. Pelaia, G.; Renda, T.; Gallelli, L.; Vatrella, A.; Busceti, M.T.; Agati, S.; Caputi, M.; Cazzola, M.; Maselli, R.; Marsico, S.A. Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: Implications for asthma. *Respir. Med.* **2008**, 102, 1173–1181, doi:10.1016/j.rmed.2008.02.020.
 36. Sadraei, H.; Ghannadi, A.; Malekshahi, K. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. *Fitoterapia* **2003**, 74, 445–452, doi:10.1016/S0367-326X(03)00109-6.
 37. Ribeiro, T.F.; Da Silva, R.E.R.; de Moraes, L.P.; Carvalho, P.M.M.; Macêdo, C.A.F.; Silva, A.A.; Menezes, I.R.A.; Barbosa, R.; Kerntopf, M.R. Effect of the *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its main constituents, citral and limonene, on the tracheal smooth muscle of rats. *Biotechnol. Reports* **2017**, 17, 31–34, doi:10.1016/j.btre.2017.12.002.
 38. Jarvis, G.E.; Barbosa, R.; Thompson, A.J. Noncompetitive inhibition of 5-HT₃ receptors by citral, linalool, and eucalyptol revealed by nonlinear mixed-effects modeling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2016**, 356, 549–562, doi:10.1124/jpet.115.230011.

39. Assaidi, A.; Legssyer, A.; Berrichi, A.; Aziz, M.; Mekhfi, H.; Bnouham, M.; Ziyat, A. Hypotensive property of *Chenopodium ambrosioides* in anesthetized normotensive rats. *J. Complement. Integr. Med.* **2014**, *11*, 1–7, doi:10.1515/jcim-2013-0045.
40. Pinho, A.I.; Wallau, G.L.; Nunes, M.E.M.; Leite, N.F.; Tintino, S.R.; da Cruz, L.C.; da Cunha, F.A.B.; da Costa, J.G.M.; Douglas Melo Coutinho, H.; Posser, T. Fumigant activity of the *Psidium guajava* var. *pomifera* (Myrtaceae) essential oil in *Drosophila melanogaster* by means of oxidative stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, 2014, doi:10.1155/2014/696785.
41. Soares, M.H.; Dias, H.J.; Vieira, T.M.; de Souza, M.G.M.; Cruz, A.F.F.; Badoco, F.R.; Nicoletta, H.D.; Cunha, W.R.; Groppo, M.; Martins, C.H.G.; et al. Chemical Composition, Antibacterial, Schistosomicidal, and Cytotoxic Activities of the Essential Oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (Chenopodiaceae). *Chem. Biodivers.* **2017**, *14*, e1700149, doi:10.1002/cbdv.201700149.
42. Arena, J.S.; Omarini, A.B.; Zunino, M.P.; Peschiutta, M.L.; Defagó, M.T.; Zygadlo, J.A. Essential oils from *Dysphania ambrosioides* and *Tagetes minuta* enhance the toxicity of a conventional insecticide against *Alphitobius diaperinus*. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *122*, 190–194, doi:10.1016/j.indcrop.2018.05.077.
43. Da 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.; et al. *Eugenia uniflora* leaves essential oil induces toxicity in *Drosophila melanogaster*: Involvement of oxidative stress mechanisms. *Toxicol. Res. (Camb.)* **2015**, *4*, 634–644, doi:10.1039/c4tx00162a.
44. Adedara, I.A.; Abolaji, A.O.; Rocha, J.B.T.; Farombi, E.O. Diphenyl Diselenide Protects Against Mortality, Locomotor Deficits and Oxidative Stress in *Drosophila melanogaster* Model of Manganese-Induced Neurotoxicity. *Neurochem. Res.* **2016**, *41*, 1430–1438, doi:10.1007/s11064-016-1852-x.
45. Jiang, Z.; Akhtar, Y.; Bradbury, R.; Zhang, X.; Isman, M.B. Comparative toxicity of essential oils of *Litsea pungens* and *Litsea cubeba* and blends of their major constituents against the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4833–4837, doi:10.1021/jf900274r.
46. Paes, J.P.P.; Rondelli, V.M.; Costa, A.V.; Vianna, U.R.; De Queiroz, V.T. Chemical characterization and effect of the essential oil from santa-maria herb on the strawberry mite. *Rev. Bras. Frutic.* **2015**, *37*, 346–354, doi:10.1590/0100-2945-057/14.
47. Zhang, Z.; Yang, T.; Zhang, Y.; Wang, L.; Xie, Y. Fumigant toxicity of monoterpenes against fruitfly, *Drosophila melanogaster*. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *81*, 147–151, doi:https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.076.
48. Omolo, M.O.; Okinyo, D.; Ndiege, I.O.; Lwande, W.; Hassanali, A. Fumigant toxicity of the essential oils of some African plants against *Anopheles gambiae* sensu stricto. *Phytomedicine* **2005**, *12*, 241–246, doi:10.1016/j.phymed.2003.10.004.
49. Lacerda-Neto, L.J.; Barbosa, A.G.; Quintans-Junior, L.J.; Coutinho, H.D.; da Cunha, F.A. The complex pharmacology of natural products. *Future Med. Chem.* **2019**, *11*, 797–799, doi:10.4155/fmc-2018-0327.
50. Abolaji, A.O.; Kamdem, J.P.; Lugokenski, T.H.; Farombi, E.O.; Souza, D.O.; da Silva Loreto, É.L.; Rocha, J.B.T. Ovotoxicants 4-vinylcyclohexene 1, 2-monoepoxide and 4-vinylcyclohexene diepoxide disrupt redox status and modify

- different electrophile sensitive target enzymes and genes in *Drosophila melanogaster*. *Redox Biol.* **2015**, 5, 328–339, doi:10.1016/j.redox.2015.06.001.
51. Medeiros, E.; Prigol, M.; Alves, D.; do Sacramento, M.; Musachio, E.A.S.; de Freitas Couto, S. Assessment of toxicity of compound 4-phenylselenyl-7-chlorochinoline and its changes in the fruit fly model *Drosophila melanogaster*. *An. do Salão Int. Ensino, Pesqui. e Extensão* **2018**, 9.
 52. Brunner, F.; Kühberger, E.; Groschner, K.; Poch, G.; Kukovetz, W.R. Characterization of muscarinic receptors mediating endothelium-dependent relaxation of bovine coronary artery. *Eur. J. Pharmacol.* **1991**, 200, 25–33, doi:10.1016/0014-2999(91)90661-9.
 53. Obi, T.; Kabeyama, A.; Nishio, A. Characterization of muscarinic receptor subtype mediating contraction and relaxation in equine coronary artery in vitro. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **1994**, 17, 226–231, doi:10.1111/j.1365-2885.1994.tb00237.x.
 54. Bruder-Nascimento, T.; Campos, D.H.S.; Cicogna, A.C. Chronic stress improves NO-and Ca²⁺ flux-dependent vascular function: a pharmacological study. *Arq. Bras. Cardiol.* **2015**, 104, 226–233, doi:10.5935/abc.20140207.
 55. Storch, A.S.; Mattos, J.D. de; Alves, R.; Galdino, I. dos S.; Rocha, H.N.M. Methods of Investigating Endothelial Function: Description and its Applications. *Int. j. Cardiovasc. sci.(Impr.)* **2017**, 30, h: 262-l: 273, doi:10.5935/2359-4802.20170034.
 56. Hanna, M.E.; Bednářová, A.; Rakshit, K.; Chaudhuri, A.; O'Donnell, J.M.; Krishnan, N. Perturbations in dopamine synthesis lead to discrete physiological effects and impact oxidative stress response in *Drosophila*. *J. Insect Physiol.* **2015**, 73, 11–19, doi:10.1016/j.jinsphys.2015.01.001.
 57. De-Oliveira, A.C.A.X.; Ribeiro-Pinto, L.F.; Paumgarten, F.J.R. In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by β -myrcene and other monoterpenoid compounds. *Toxicol. Lett.* **1997**, 92, 39–46, doi:10.1016/S0378-4274(97)00034-9.
 58. Sanchez-Hernandez, J.C.; Sanchez, B.M. Lizard cholinesterases as biomarkers of pesticide exposure: Enzymological characterization. *Environ. Toxicol. Chem.* **2002**, 21, 2319–2325, doi:doi:10.1002/etc.5620211109.
 59. Kavitha, P.; Rao, J.V. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2007**, 87, 182–188, doi:10.1016/j.pestbp.2006.07.008.
 60. Sharma, A.; Mishra, M.; Shukla, A.K.; Kumar, R.; Abdin, M.Z.; Chowdhuri, D.K. Organochlorine pesticide, endosulfan induced cellular and organismal response in *Drosophila melanogaster*. *J. Hazard. Mater.* **2012**, 221, 275–287, doi:10.1016/j.jhazmat.2012.04.045.
 61. Ramin, M.; Azizi, P.; Motamedi, F.; Khodaghali, F.; Haghparast, A.; Fatahi, Z.; Alamdary, S.Z. Inhibition of JNK phosphorylation reverses memory deficit induced by β -amyloid (1–42) associated with decrease of apoptotic factors. *Behav. Brain Res.* **2014**, 266, 222, doi:10.1016/j.bbr.2010.11.017.
 62. Wei, H.; Liu, J.; Li, B.; Zhan, Z.; Chen, Y.; Tian, H.; Lin, S.; Gu, X. The toxicity and physiological effect of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* against the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Prot.* **2015**, 76, 68–74, doi:10.1016/j.cropro.2015.06.013.

4. CAPÍTULO III- ALFA-TERPINENO COMO AGENTE ANTIBACTERIANO, POTENCIALIZADOR DE EFICÁCIA DE ANTIBIÓTICOS E LETALIDADE SOBRE DÍPTEROS.

Neste capítulo temos um manuscrito que descreve a ação do α -terpineno sobre bombas de efluxo expressas por *Staphylococcus aureus* e a toxicidade contra *Drosophila melanogaster*. Está submetido à ***Microbial Pathogenesis***.

Métricas (Current Impact Factor 2020: 2.914, Qualis Ciências Biológicas II – B2, CiteScore 2020 – 5.6)

Alfa-terpineno como agente antibacteriano, potencializador de eficácia de antibióticos e letalidade sobre dípteros.

Luiz Jardelino de Lacerda Neto^{1,3}, Andreza Guedes Barbosa Ramos³, Thiago Sampaio de Freitas^{2,3}, Janaína Esmeraldo Rocha^{2,3}, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa^{2,3}, Dárcio Luiz de Sousa Júnior^{1,3}, Nair Silva Macedo¹, Zildene de Sousa Silveira¹, Lucindo José Quintans Júnior³, Irwin Rose Alencar de Menezes³, Henrique Douglas Melo Coutinho^{2,3*}; Francisco Assis Bezerra da Cunha^{1,3};

¹ Laboratory of Semi-Arid Bioprospecting (LABSEMA), Regional University of Cariri - URCA, Crato, CE, Brazil.; luizjardelino@gmail.com (L.J.L.N); andrezaurca@gmail.com (A.G.B.R.); darciolsjr@gmail.com (D.L.S.J.); nairmacedo@gmail.com (N.S.M), zildenesousa15@gmail.com (Z.S.S.), cunha.urca@gmail.com (D.A.B.C.);

² Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Regional University of Cariri - URCA, Crato, CE, Brazil. thiagocrato@hotmail.com (T.S.F.); cristinase75@gmail.com (C.R.S.B.); janainaesmeraldo@gmail.com (J.E.R.)

³ Graduate Program in Biological Chemistry - Regional University of Cariri; lucindojr@gmail.com (L.J.Q.J.) irwinalencar@yahoo.com.br (I.R.A.M.)

Resumo

O α -Terpineno é um monoterpene derivado do metabolismo secundário de vegetais, sendo conhecido por suas propriedades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias, antioxidantes e anticâncer. O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antibacteriana do α -Terpineno contra cepas de *Staphylococcus aureus*, bem como, a capacidade de modificar a Concentração inibitória mínima (MIC) de antibióticos e do Brometo de Etídio (EtBr) e na inibição de bombas de efluxo, além da toxicidade contra *Drosophila melanogaster*. Com a realização de testes de microdiluição foi determinado o CIM ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$ para o α -Terpineno e observada a incapacidade de inibir as bombas de efluxo envolvidas nos ensaios. Entretanto, o α -Terpineno foi capaz de reduzir a CIM dos antibióticos norfloxacino, ciprofloxacino e oxacilina frente às cepas 1199B, K2068 e K4100, respectivamente. Os ensaios de fumigação foram eficazes para demonstrar a letalidade com concentração letal média (CL₅₀) de 22,8 $\mu\text{g/L}$ de ar e o dano causado ao aparelho locomotor. Assim o α -Terpineno, um produto natural, inspira maiores aprofundamentos para utilização dele em associação com norfloxacina, ciprofloxacino e oxacilina e efeito tóxico contra *Drosophila melanogaster*.

1 Introdução

Os metabólitos secundários dos vegetais têm sido cada vez mais estudados na tentativa de descobrir substâncias com atividades biológicas relevantes e com menor poder tóxico ou de contaminação ambiental. Assim os produtos naturais estão novamente na vanguarda da busca por compostos que possuam aplicabilidade no bem-estar do homem, seja no campo medicinal ou agrícola, ou permitindo um uso mais seguro tanto toxicamente como ambientalmente. Estes compostos podem estar presentes em extratos e/ou óleos essenciais das mais diversas partes dos vegetais, desde raízes até os frutos. Além disso, eles podem ser isolados a partir dessas drogas vegetais, podendo ser utilizados como drogas isoladas e com estrutura química definida, que por definição seria um fármaco [1–4].

Além da segurança toxicológica e ambiental dos compostos naturais utilizados para promoção do bem-estar do homem, outra preocupação que deve nortear as pesquisas para utilização desses constituintes é o desenvolvimento da resistência, a qual advém principalmente do uso prolongado e indiscriminado de substâncias, com objetivo de eliminar ou controlar a proliferação de organismos específicos, seja uma bactéria ou um inseto. Assim, atualmente diversos compostos que outrora eram eficientes no combate a esses organismos, já perderam parcial ou totalmente sua eficácia. Dentre as estratégias para enfrentamento dessa resistência podemos citar: desenvolvimento de novos produtos, incluindo principalmente os de origem natural e a associação com produtos que perderam sua eficácia [5–7].

A resistência bacteriana tem sido um dos maiores desafios para o desenvolvimento de novos antibióticos [8]. Diante disso, a bactéria *Staphylococcus aureus* é de grande importância clínica, visto que apresenta resistência à maioria dos antibióticos disponíveis atualmente. Esta resistência pode ser resultado de vários mecanismos, porém, as bombas de efluxo ocupam um lugar de destaque entre esses mecanismos, uma vez que conseguem extrudar o antibiótico para fora da célula bacteriana [9,10].

O modelo experimental *Drosophila melanogaster*, tem sido bastante utilizado para determinar atividade inseticida de produtos naturais, visto que apresenta fácil manejo e baixo custo, podendo ser facilmente utilizado na determinação da concentração letal e danos no aparelho locomotor da mosca, sendo assim possível indicar um potencial efeito tóxico ou repelente sobre esse díptero [11]. Além disso, essa espécie possui muitos genes ortólogos à genes humanos relacionados a homeostase, sendo assim uma ferramenta importante para estudos de toxicidade e com capacidade de esclarecer algumas questões não respondidas sobre algumas doenças [12].

A busca por compostos com baixa toxicidade em mamíferos, biodegradáveis, multifuncionais e ambientalmente seguros, têm colocado em evidências os produtos naturais, como óleos essenciais e seus principais constituintes, os terpenos. Os terpenos são efetivos no combate a um grande número de insetos, entretanto, os mecanismos de ação ainda não estão bem descritos [11,13,14].

O α -terpineno (1-isopropyl-4-methyl-1,3-cyclohexadiene) é um monoterpene derivado do metabolismo secundário dos vegetais, presente por exemplo, no óleo essencial de *Dysphania ambrosioides*. Este composto torna-se atrativo por apresentar diversas atividades como: antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante e anticâncer, além de ser utilizado como fragrância na indústria cosmética e alimentícia, devido ao seu odor [15–19].

Os terpenos de modo geral têm demonstrado atividades antibacterianas e efeito tóxico contra insetos [20]. Estudos demonstraram potencial tóxico contra *Musca domestica* de terpenos como: linalool, citronellal, (R)- α -pinene, 1,8-cineole, γ -terpinene, limonene, α -terpinene, (S)- β -pinene, thymol and (R)-pulegone [21]. A atividade antibacteriana também foi observada para os terpenos, seja de forma isolada ou em associação com antibióticos [22–24].

Portanto, este trabalho propôs verificar o potencial do α -terpineno como agente antibacteriano, bem como, sua capacidade de modificar a Concentração inibitória mínima (MIC) de antibióticos e do Brometo de Etídio (EtBr) e na inibição do mecanismo de bombas de efluxo em cepas de *S. aureus* e seu potencial de toxicidade contra *Drosophila melanogaster* a partir de testes de fumigação para medir letalidade e danos ao aparelho locomotor.

2 Materiais e Métodos

2.1 Testes microbiológicos

2.1.1 Drogas utilizadas

O α -Terpineno e o CCCP foram adquiridos da SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA, já a clorpromazina (CPMZ) foi adquirida da Aché. Tanto CPMZ quanto o brometo de etídio foram diluídos em água estéril, sendo o CCCP diluído em uma solução água/metanol (3:1 v/v). Todos os antibióticos e o α -Terpineno foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e água estéril. Todas estas soluções tiveram a concentração padronizada para 1024 $\mu\text{g/mL}$ e a proporção de DMSO foi menor que 5%.

2.1.2 Microrganismos

Foram usadas sete cepas de *S. aureus*: 1199 (selvagem), 1199B (bomba NorA), IS-58 (bomba TetK), K2068 (bomba MepA), K4100 (bomba QacC), K4414 (bomba QacA/B) e RN4220 (bomba MsrA). Todas cedidas por Prof. S. Gibbons (*University of London*) e Prof. Glenn Kaatz (*Wayne State University*).

2.1.3 Atividade antibacteriana pela Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para estes testes, o método utilizado foi o descrito por Javadpour *et al* [25] usando apenas o α -terpineno para determinação do CIM.

2.1.4 Teste de inibição de bomba de efluxo por modificação da CIM do antibiótico e do brometo de etídio

Foi utilizada a concentração sub-inibitória do α -terpineno (CIM/8) em associação com diluições seriadas (1:1) do antibiótico ou do brometo de etídio, que gerou concentrações de 512 a 0,25 $\mu\text{g/mL}$, distribuídos nos poços das placas de microdiluição. Após 24 horas de incubação à 37°C o crescimento bacteriano pode ser verificado utilizando resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) em uma concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$. O crescimento bacteriano promove a oxidação da resazurina provocando a mudança de coloração de azul para rosa [26]. Portanto, a CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano [27]. Sendo possível então realizamos a comparação entre os controles e substâncias teste.

2.2 *Drosophila melanogaster*

2.2.1 Cultura e estoque de *Drosophila*

A manutenção das moscas *D. melanogaster* (Harwich cepa) foi feita de acordo como descrito por Lacerda Net *et. al* [16] e são oriundas do *National Species Stock Center*, Bowling Green, OH - USA.

2.2.2 Teste de mortalidade

Os testes foram realizados de acordo como o método descrito por Da Cunha [28], com modificações. Para tanto, 20 moscas adulta (macho e fêmea) foram colocadas em um recipiente de 130 cm³, contendo no seu interior um papel filtro preparado previamente com 1 mL de solução de sacarose a 20% (alimento) e na parte interna de sua tampa um outro papel filtro com 1 cm² que foi impregnado como α -terpineno nas seguintes concentrações: 0,75 μg (5,77 $\mu\text{g/L}$ de ar), 1 μg (7,7 $\mu\text{g/L}$ de ar), 1,5 μg (11,54 $\mu\text{g/L}$ de ar), 2 μg (15,4 $\mu\text{g/L}$ de ar), 3 μg (23,1 $\mu\text{g/L}$ de ar), 3,25 μg (25 $\mu\text{g/L}$ de ar), 3,5 μg (26,9 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ar), 3,75 μg (28,8 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ar), e 4 μg (30,7 $\mu\text{g/L}$ de ar). Porém no grupo controle foi adicionado apenas o papel. Durante o teste foram mantidas a temperatura em 26 °C,

humidade 60% e ciclos de claro e escuro de 12 horas. O teste foi realizado em triplicata e cada n era composto por dois recipientes. As leituras para verificar a mortalidade foram realizadas após a aplicação do α -terpineno nos terpenos: 1, 2, 3, 6, 12, 24 e 48 horas.

2.2.3 Teste de geotaxia negativa

Através do teste de geotaxia negativa, descrito por Coulom e Birman [29], foi possível verificar o dano na mobilidade das moscas. Cada grupo de moscas foi exposto ao α -terpineno e a leitura realizada nos tempos de 1, 2, 3, 6, 12, 24 e 48 horas. Com leve choque físicos as moscas são levadas ao fundo do recipiente e em seguida foram contabilizadas quantas conseguem superar uma marca de 5 cm de deslocamento vertical em até 5 segundos. O teste é repedido duas vezes em um intervalo de 1 minuto. Os resultados foram apresentados média (\pm) desvio padrão das contagens obtidas em dois experimentos independentes [29].

2.3 Análise estatística

2.3.1 Análise estatística dos resultados de microbiologia

Os testes foram feitos em triplicata e expressos em média geométrica. Foi utilizada ANOVA *one-way*, com *post hoc* de Tukey ou Bonferroni.

2.3.2 Análise estatística dos resultados dos testes de toxicidade

A análise da toxicidade foi realizada usando ANOVA *tow-way* com teste de múltipla comparação por Tukey.

3 Resultados

3.1 Testes microbiológicos

3.1.1 Atividade antibacteriana pela Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios para determinação da CIM do α -Terpineno evidenciaram um valor de CIM \geq 1024 $\mu\text{g/mL}$ frente a todas as cepas utilizadas nos ensaios. As CIMs de cada antibiótico frente às cepas específicas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: CIM dos antibióticos e do α -Terpineno

CEPA	BOMBA	CIM DOS ANTIBIOTICOS	CIM DO ALFA- TERPINENO
1199	NorA	Norfloxacino 288 $\mu\text{g/mL}$	\geq 1024 $\mu\text{g/mL}$
1999B	NorA	Norfloxacino 256 $\mu\text{g/mL}$	\geq 1024 $\mu\text{g/mL}$
IS-58	TetK	Tetraciclina 128 $\mu\text{g/mL}$	\geq 1024 $\mu\text{g/mL}$
RN	MepA	Eritromicina \geq 1024	\geq 1024 $\mu\text{g/mL}$

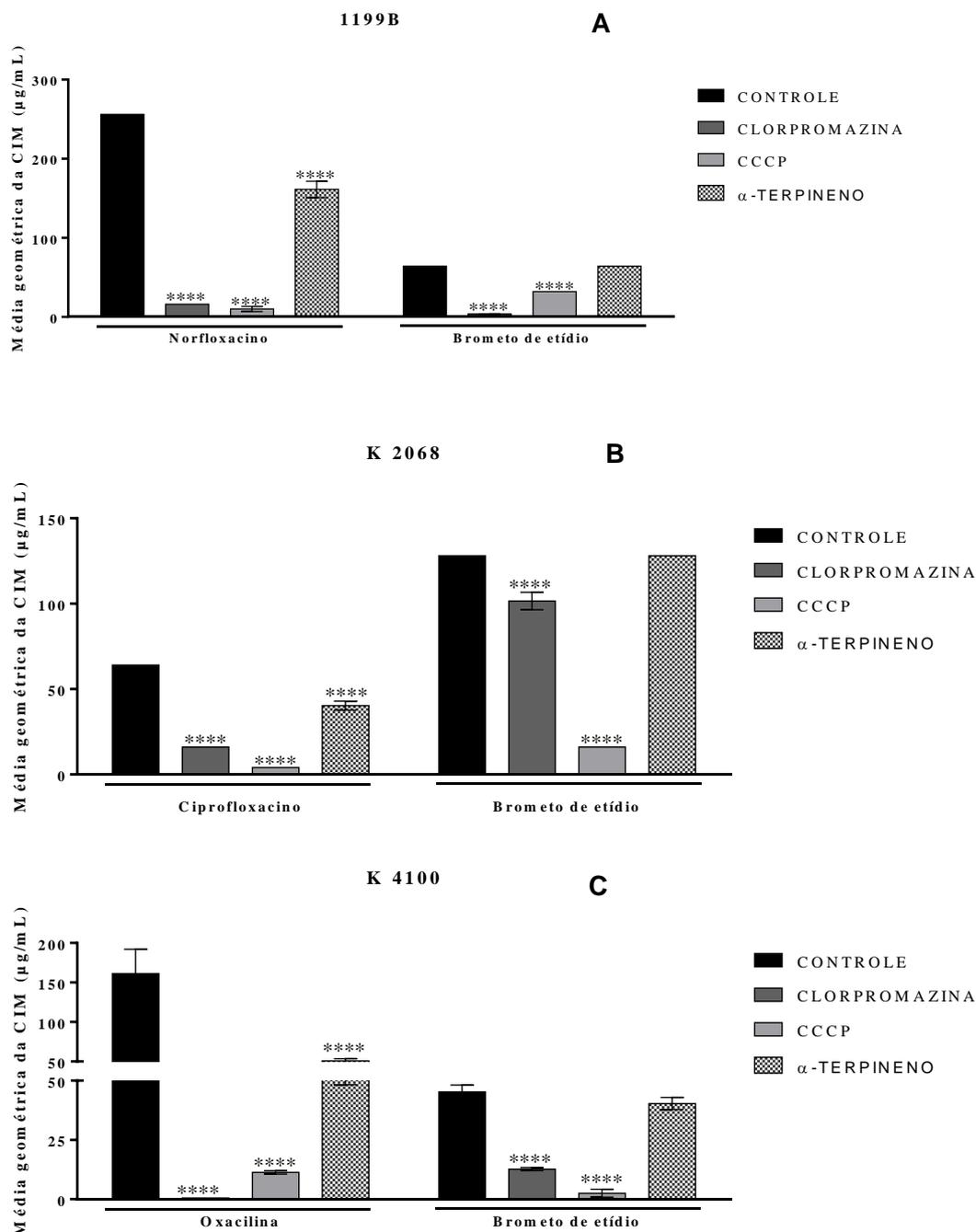
4220	μg/mL		
K 2068	QacC	Ciprofloxacina 64 μg/mL	≥ 1024 μg/mL
K 4414	QacA/B	Penicilina 262 μg/mL	≥ 1024 μg/mL
K 4100	MsrA	Oxacilina 161 μg/mL	≥ 1024 μg/mL

3.1.2 Teste de inibição de bomba de efluxo por modificação da CIM do antibiótico e do brometo de etídio

A comparação entre as médias geométricas da CIM dos antibióticos isolados e a CIM do antibiótico associado ao α -Terpineno, bem como, a comparação entre a CIM do EtBr isolado e a CIM do EtBr em associação com α -Terpineno, são testes capazes de revelar se existem diferenças na concentração efetiva do antibiótico quando associado a MIC/8 do α -Terpineno, indicando assim se essa associação altera a eficácia do antibiótico e se o α -Terpineno atua sobre as bombas de efluxo estudadas.

Nos ensaios com a cepa 1199, a qual é considerada selvagem por apresentar o mecanismo de bomba de efluxo (NorA) de forma basal, foram observadas reduções na concentração da CIM de 287 μg/mL para 228 μg/mL e de 80 μg/mL para 64 μg/mL, para antibiótico e BrEt, respectivamente. Já os ensaios de associação entre α -Terpineno e o Norfloxacino sobre a cepa 1199B foram responsáveis por reduzir o CIM do antibiótico de 80 μg/mL para 64 μg/mL. Esta cepa expressa a bomba NorA que confere resistência às fluoroquinolonas, o que justifica uso do Norfloxacino neste ensaio (Figure 1A). Nossos resultados também demonstraram uma redução de 64 μg/mL para 40 μg/mL na CIM do antibiótico Ciprofloxacino, decorrente de sua associação com o α -Terpineno sobre a cepa K2068, portadora da bomba de efluxo MepA, a qual expressa efeito sobre fluoroquinolonas como o Ciprofloxacino (Figure 1B). Já para a cepa K4100 que expressa a bomba QacC, sendo responsável pela extrusão de Oxacilina, foi observada uma redução da CIM do antibiótico decorrente de sua associação com o α -Terpineno, em contraste com o CIM do antibiótico sozinho, com uma redução de 161 μg/mL para 50,79 μg/mL (Figure 1C).

Figura 1: CIM dos antibióticos e brometo de etídio, isolados ou associados ao alfa-terpineno.



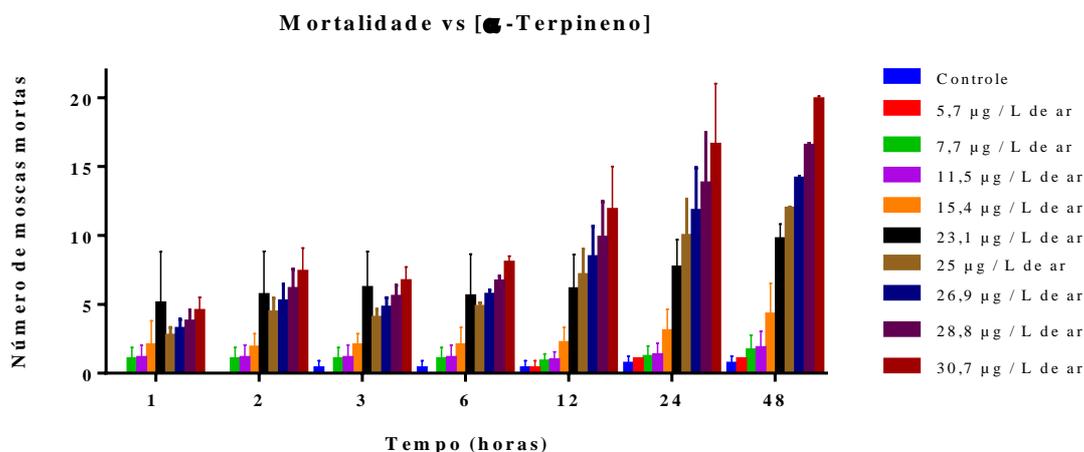
Legenda: A: CIM do antibiótico Norfloxacin isolado e em associação com α -Terpineno e inibidores padrão CCCP e Clorpromazina e CIM do EtBr isolado e em associação com os inibidores padrão CCCP e Clorpromazina e α -Terpineno sobre a cepa 1199B. B: CIM do antibiótico ciprofloxacin isolado e em associação com α -Terpineno e inibidores padrão CCCP e Clorpromazina e CIM do EtBr isolado e em associação com os inibidores padrão CCCP e Clorpromazina e α -Terpineno sobre a cepa K2068. C: CIM do antibiótico Oxacilina isolado e em associação com α -Terpineno e inibidores padrão CCCP e Clorpromazina e CIM do EtBr em associação com os inibidores padrão CCCP e Clorpromazina e α -Terpineno sobre a cepa K4100. CCCP = Cianeto de carbonilo m-clorofenilhidrazona; **** representa significância estatística em comparação com o controle.

Nos demais ensaios com as cepas 1199B, IS-58, RN4220, K2068, K4414 e K4100, não foram observadas reduções na CIM do EtBr em associação com α -Terpineno em comparação a CIM do EtBr sozinho, razão pela qual não inserimos os gráficos referentes a estes dados.

3.1.3 Teste de Mortalidade

Através do ensaio de mortalidade foi demonstrado o efeito do α -Terpineno sobre a mortalidade de *D. melanogaster*, nas concentrações de 5,77 $\mu\text{g/L}$; 7,7 $\mu\text{g/L}$; 11,54 $\mu\text{g/L}$; 15,4 $\mu\text{g/L}$; 23,1 $\mu\text{g/L}$; 25 $\mu\text{g/L}$; 26,9 $\mu\text{g/L}$; 28,8 $\mu\text{g/L}$ e 30,7 $\mu\text{g/L}$ de ar (Figura 2). Os resultados obtidos evidenciaram significância estatística nas concentrações maiores que 23,1 $\mu\text{g/L}$ de ar em relação ao controle a partir de 2 horas de exposição ao composto, tendo esse efeito permanecido até o final do ensaio. Também foi possível verificar que a taxa de mortalidade atingiu os 100% a partir da leitura de 48 horas na concentração de 30,7 $\mu\text{g/L}$ de ar, obtendo um valor de CL_{50} de 22,8 $\mu\text{g/L}$.

Figura 2: Ensaios de mortalidade com o modelo *Drosophila melanogaster* frente ao composto α -Terpineno

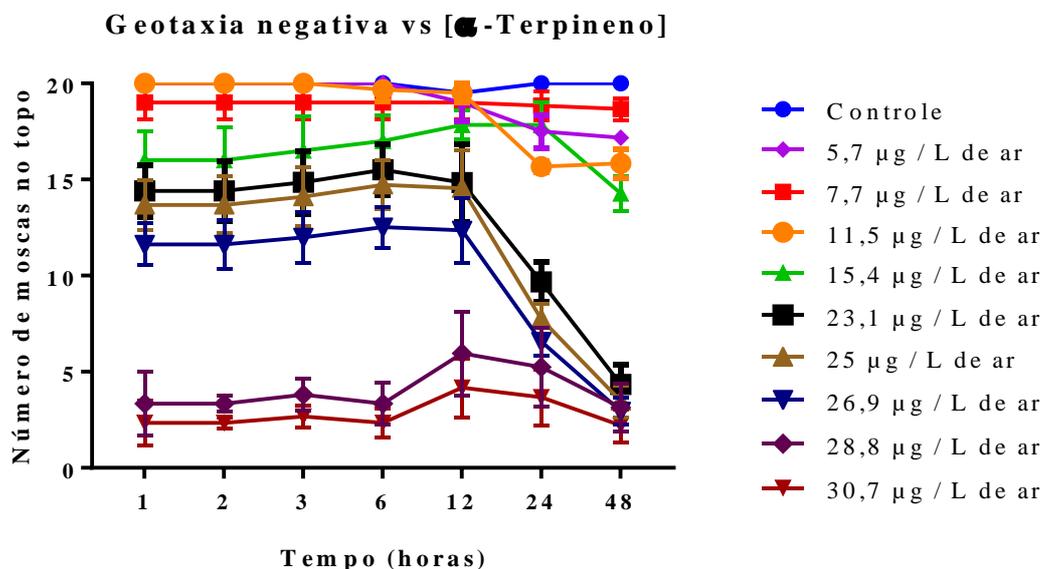


3.1.4 Teste de geotaxia negativa

Nossos resultados indicam que as concentrações 15,4 $\mu\text{g/L}$ de ar foram capazes de causar danos ao aparelho locomotor de *D. melanogaster*, a partir da 1h de exposição ao composto em relação ao controle, resultado que foi mantido até a última leitura. As concentrações de 23,1, 25 e 26,9 $\mu\text{g/L}$ de ar apresentaram acentuada redução do número de moscas capazes de alcançar o topo da coluna do frasco após 12 h de exposição ao α -Terpineno. Já as concentrações de 28,8 e 30,7 $\mu\text{g/L}$ de ar demonstraram padrões similares em relação a geotaxia das moscas, havendo redução no número de moscas no topo do frasco a partir de

12 h de exposição. É interessante notar que entre 6 e 12 horas ocorreu uma recuperação no número de moscas que chegaram ao topo (Figure 3).

Figura 3: Ensaios de geotaxia negativa com o modelo *Drosophila melanogaster* frente ao α -terpineno.



4 Discussão

O α -terpineno é um terpeno monocíclico derivado de isomerização cis-trans do p-mentano, sendo considerado um mentadieno presente em várias espécies vegetais (*Citrus*, *Mentha*, *Juniperus* e *Pinus*) e estando associado ao combate contra cupins. Além disso, comercialmente é bastante utilizado como fragrância pela indústria farmacêutica e de perfumes [17,22,30].

Suas atividades biológicas têm sido descritas tanto como constituinte isolado, como também como parte da constituição de óleos essenciais. Os óleos essenciais que possuem na sua composição o α -terpineno estão presentes em *Chenopodium ambrosioides* [31,32], *Pulicaria salviifolia* [33], *Dysphania multifida* [33], *Magnolia kwangsiensis* [34]. De forma isolada já foram relatadas atividades como: antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, anticâncer e antioxidante [17,35,36].

A resistência bacteriana aos antibióticos é um fato cada vez mais preocupante. Essa resistência resulta de uma intensa interação entre as bactérias como troca de informações genéticas e da pressão exercida pela exposição destas bactérias a substâncias bactericidas. Os principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resistência são: degradação do antibiótico (I), modificação do alvo do antibiótico (II), alteração da permeabilidade (III),

proteção ribossomal (IV), produção de biofilme (V) e ação de bombas de efluxo (VI) [37]. Dentre estes mecanismos a ação das bombas de efluxo, que provocam a redução dos níveis de antibióticos no interior das bactérias, é considerado um dos principais tipos de mecanismo de resistência.

Os ensaios de microdiluição fornecem resultados quantitativos das substâncias contra as bactérias, como por exemplo, a concentração inibitória mínima (MIC), que é definida como a menor concentração que inibe o crescimento bacteriano [38,39]. O α -Terpineno, apesar de ser um terpeno que pode interferir na captura de oxigênio e na fosforilação oxidativa [22], apresentou MIC $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ frente a todas as cepas testadas, corroborando com os resultados obtidos por de Moraes Oliveira-Tintino et. al [32] e Limaverde et. al [31]. A extrapolação para uso clínico mostra que o valor da CIM precisa ser 4-5 vezes maior para garantir a eficácia da substância, e valores de CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ resultam em concentrações altas que praticamente inviabilizam avaliações de critérios como, dose, organismo alvo e sua resistência, mecanismos, indicações clínicas, propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, toxicidade e resultado clínico desejado. Todos esses critérios são necessários para determinar a CIM do ponto de corte clínico (*clinical breakpoint*), que é definido como sendo a maior concentração plasmática segura da substância no paciente e se microrganismo é susceptível ou resistente. Esses valores são publicados e definidos principalmente por: EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) and CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) [40–43].

Os mecanismos utilizados pelas bactérias, citados anteriormente, podem ser revertidos utilizando como estratégia a associação de substâncias diversas com antibióticos que apresentam eficácia reduzida com o objetivo de observar a modulação desses por essas substâncias e que sejam capazes de recuperar essa eficácia, como por exemplo a associação entre amoxicilina e ácido clavulânico [44]. Os resultados indicaram que a concentração sub-inibitória do α -Terpineno em associação com Norfloxacino, Ciprofloxacino e Oxacilina, foram capazes de modular os antibióticos frente às cepas 1199B, K2098 e K4100, respectivamente. Em contraste com os nossos resultados, em um relatório anterior de Moraes Oliveira-Tintino e colaboradores [32], não foi demonstrada modulação do Norfloxacino na cepa 1199B. Essa modulação pode ter alterado a resistência às quinolonas interferindo na ação de bombas de efluxo, alteração do sítio de ação do antibiótico e alteração na permeabilidade [45,46]. Essa mesma justificativa pode ser usada para explicar a modulação do Ciprofloxacino pelo α -Terpineno frente a cepas K2068. Os resultados da

modulação do antibiótico obtidos para a cepa K4100 que apresenta resistência à Oxacilina resultante da produção de β -lactamases e ação da bomba de efluxo QacC, podem estar associados a capacidade de monoterpenos, como o α -Terpineno, de interferir na permeabilidade da membrana plasmática, nas atividades de coagulase, na produção de enterotoxinas e na halotolerância [47,48].

As bombas de efluxo ocupam lugar de destaque entre os vários mecanismos de resistência a antibióticos, sendo responsáveis por reduzir a disponibilidade intracelular de antibióticos, diminuindo assim sua eficácia. *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva com várias cepas com bombas de efluxo de diferentes famílias [49]. Neste estudo foram utilizadas 7 cepas de *S. aureus* portadoras de diferentes mecanismos de efluxo ativo específicos. Os inibidores de bombas de efluxo, como CCCP e clorpromazina, juntamente com BrEt são uma forma interessante de demonstra a presença e a inibição das bombas de efluxo. O inibidores de bomba de efluxo podem interferir no funcionamento da bomba de cinco formas: (1) impedindo o fluxo energético na bomba, um exemplo é o CCCP; (2) diminuindo a expressão das bombas, exemplo clorpromazina, (3) impedindo a montagem de bombas multicomponentes, (4) bloqueando o canal externo da bomba e (5) gerando um inibição competitiva ou não com o antibiótico, e uma outra estratégia que deve ser considerada é a remodelagem química de antibióticos a ponto que não sejam mais substratos das bombas [9,50].

Os resultados do presente estudo mostraram que a associação entre a MIC do EtBr com o α -terpineno não diferiu do controle do EtBr isolado, não havendo modificação na MIC do EtBr para nenhuma das cepas estudadas, portanto o α -terpineno não atua por nem um dos mecanismos citados anteriormente. Resultados de estudos anteriores também demonstraram que não houve modulação do EtBr na bomba de efluxo NorA da cepa 1199B [32] e bombas de efluxo TetK da cepa IS-58 pelo α -Terpineno [31]. Assim, ficando evidente a ausência de influência do α -Terpineno sobre as bombas de efluxo, e reforçando o entendimento que essa modulação apresentada no MIC dos antibióticos é resultado da uma possível interação com a membrana plasmática causando sua desintegração e/ou a coagulação intracelular, ambos mecanismos levam à morte celular [46].

Com relação aos ensaios de toxicidade, foi possível determinar a LC_{50} 22,8 μ g/L de ar, após 48 horas de exposição ao composto. Um dado que informa a concentração necessária para matar metade das moscas expostas ao α -Terpineno no teste de fumigação. O estudo de Lacerda Neto e colaboradores [16] com α -Terpineno informa uma LC_{50} de 2,282 mg/L, porem as leituras foram limitadas a 8 horas. Estudando 40 monoterpenos, pelo método de

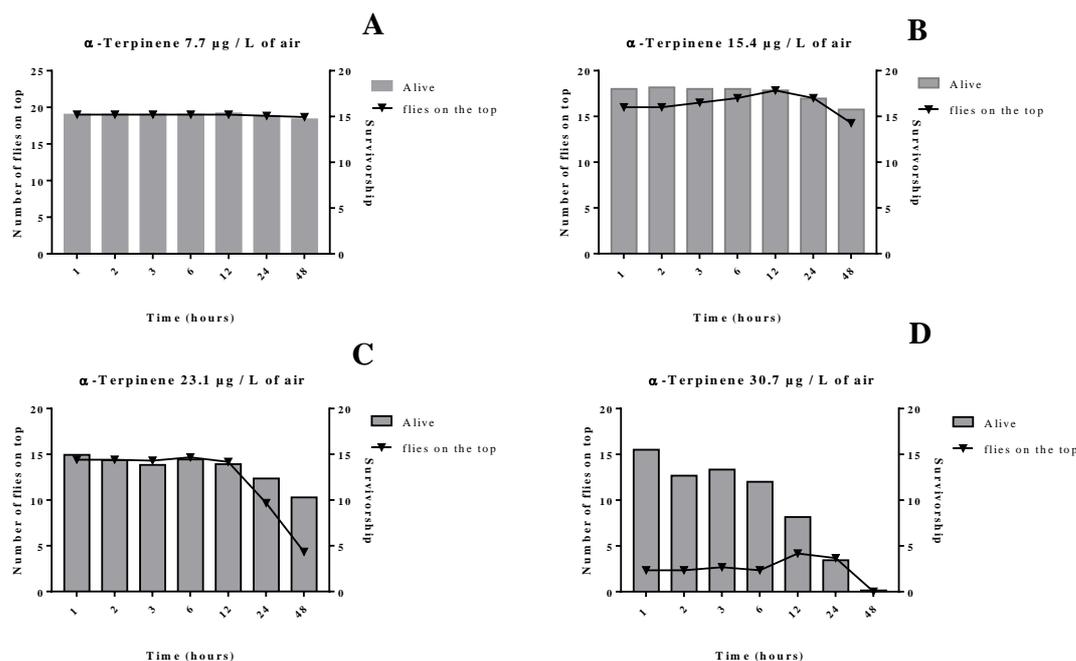
fumigação, Zhang et al [11] determina a CL_{50} do α -Terpineno diluído em acetona e com leitura em 24 horas sendo de 1,96 $\mu\text{L/L}$ de ar e que monoterpenos hidrocarbonetos possuem menor atividade inseticida que monoterpenos oxigenados.

Alterações no sistema nervoso são os principais mecanismos para promoção do efeito letal de terpenos, sejam alterações em rotas sinalizadoras ou reguladoras, tais como: interferência na acetilcolinesterase, em receptores nicotínicos, GABA, de ocitocina e tiramina [11], além de interferir no funcionamento do sistema CitocromoP450, responsável pelo processo de desintoxicação [13]. Sabendo que o α -Terpineno inibe a ação da acetilcolinesterase fica evidente a ação desse composto nessa rota interferindo no sistema nervoso levando o inseto à morte [51]. E ainda é possível a ativação simultânea de duas ou mais rotas citadas, como demonstrado na ação do carvacrol do pulegone que atuam em receptores GABA e octopamine [52–55].

A inibição da acetilcolinesterase é um dos fatores responsáveis pela diminuição da mobilidade da mosca ou pelo dano ao aparelho locomotor. Além disso, é possível notar que concentrações maiores que 15,4 $\mu\text{g/L}$ de ar alteram a média de moscas capazes de chegar ao topo da coluna do frasco já na primeira hora de registros quando comparados com o controle, isso sugere investigações futuras para elucidar a participação enzimas capazes de reduzir o estresse oxidativo como glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), e Superóxido Dismutase (SOD) além de proteínas alvo envolvidas no estresse oxidativo [56], além da participação de participação de atuação no sistema nervoso [11].

A interpolação dos resultados de mortalidade e dano ao aparelho locomotor nas concentrações de 7,7 $\mu\text{g/L}$ (Figure 4A), 15,4 $\mu\text{g/L}$ de ar (Figure 4B), 23,1 $\mu\text{g/L}$ de ar (Figure 4C) e 30,7 $\mu\text{g/L}$ de ar (Figure 4B) possibilitou que pudéssemos verificar que na concentração de 30,7 $\mu\text{g/L}$ de ar a diminuição da mobilidade ocorre rapidamente e é em seguida acompanhada pela mortalidade, sendo possível observar que após seis horas a curva de mortalidade apresentava-se estável enquanto a curva que indica a quantidade de moscas com danos mínimos ao aparelho locomotor apresentou crescimento. Estudos demonstram que após a ação das enzimas Superóxido Dismutase e Glutathione S-Transferase as células podem expressar a proteína Hsp70, uma Chaperona 70 (~kDa) produzindo uma ação tardia na proteção contra o estresse oxidativo [57]. Sendo este mais um ponto a ser esclarecido em novos estudos do α -Terpineno.

Figure 4 – Relação entre moscas vivas e alterações na mobilidade.



5 Conclusão

O α -Terpineno apresentou em associação com as quinolonas e oxacilina uma redução da CIM das mesmas frente a cepas resistentes, demonstrando uma atividade sinérgica do produto como esses antibióticos. Não foi observada influência do α -Terpineno sobre as bombas de efluxo das cepas de *S. aureus* testadas não sendo observada diminuição da CIM do Brometo de etídeo. Entretanto, foi possível verificar a toxicidade do α -Terpineno contra *D. melanogaster*, mostrando claramente que ele apresenta elevada toxicidade neste modelo eucarionte. Assim, esta toxicidade demonstrada contra insetos e modulação de antibióticos quinolônicos contra *S. aureus* inspira a investigação de seu potencial modulador e perfil de toxicidade contra um modelo eucarionte, como possibilidade de extrapolação para teste em outros modelos, incluído mamíferos.

6 Referências

- [1] A. Newman, D. Smith, R.R. Ghai, R.M. Wallace, M.K. Torchetti, C. Loiacono, L.S. Murrell, A. Carpenter, S. Moroff, J.A. Rooney, C. Barton Behravesh, First Reported Cases of SARS-CoV-2 Infection in Companion Animals - New York, March-April 2020., MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 69 (2020) 710–713. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6923e3>.
- [2] N. Thomford, D. Senthebane, A. Rowe, D. Munro, P. Seele, A. Maroyi, K. Dzobo, Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel

- Drug Discovery, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 1578. <https://doi.org/10.3390/ijms19061578>.
- [3] Q.W. Zhang, L.G. Lin, W.C. Ye, Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review, *Chinese Med. (United Kingdom)*. 13 (2018) 1–26. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>.
- [4] M. Sorokina, C. Steinbeck, Review on natural products databases: where to find data in 2020, (2020). <https://doi.org/10.1186/s13321-020-00424-9>.
- [5] S.E. Rossiter, M.H. Fletcher, W.M. Wuest, Natural Products as Platforms to Overcome Antibiotic Resistance, *Chem. Rev.* 117 (2017) 12415–12474. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00283>.
- [6] I. Dusfour, J. Vontas, J.-P. David, D. Weetman, D.M. Fonseca, V. Corbel, K. Raghavendra, M.B. Coulibaly, A.J. Martins, S. Kasai, F. Chandre, Management of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses: Advances and challenges, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13 (2019) e0007615. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007615>.
- [7] J. Pu, Z. Wang, H. Chung, Climate change and the genetics of insecticide resistance, *Pest Manag. Sci.* 76 (2020) 846–852. <https://doi.org/10.1002/ps.5700>.
- [8] A. Gupta, S. Mumtaz, C.H. Li, I. Hussain, V.M. Rotello, Combatting antibiotic-resistant bacteria using nanomaterials, *Chem. Soc. Rev.* 48 (2019) 415–427. <https://doi.org/10.1039/c7cs00748e>.
- [9] B.D. Schindler, P. Jacinto, G.W. Kaatz, Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: Current status of potentiating existing antibiotics, *Future Microbiol.* 8 (2013) 491–507. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.16>.
- [10] G.W. Kaatz, F. McAleese, S.M. Seo, Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 1857–1864. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1857-1864.2005>.
- [11] 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>.
- [12] P. Calap-Quintana, J. González-Fernández, N. Sebastiá-Ortega, J. Llorens, M. Moltó, P. Calap-Quintana, J. González-Fernández, N. Sebastiá-Ortega, J.V. Llorens, M.D. Moltó, *Drosophila melanogaster* Models of Metal-Related Human Diseases and Metal Toxicity, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 1456.

- <https://doi.org/10.3390/ijms18071456>.
- [13] L. Finetti, L. Tiedemann, X. Zhang, S. Civolani, G. Bernacchia, T. Roeder, Monoterpenes alter TAR1-driven physiology in *Drosophila* species, *J. Exp. Biol.* 224 (2021). <https://doi.org/10.1242/jeb.232116>.
- [14] M.E. Scharf, S.N. Nguyen, C. Song, Evaluation of volatile low molecular weight insecticides using *Drosophila melanogaster* as a model, *Pest Manag. Sci.* 62 (2006) 655–663. <https://doi.org/10.1002/ps.1222>.
- [15] A.C. de Groot, E. Schmidt, Tea tree oil: contact allergy and chemical composition, *Contact Dermatitis.* 75 (2016) 129–143. <https://doi.org/10.1111/cod.12591>.
- [16] L.J. de Lacerda Neto, A.G.B. Ramos, R.E.R. da Silva, L. Pereira-de-Morais, F.M. Silva, R.H.S. da Costa, L.B. Rodrigues Dantas, J.G.M. da Costa, H.D.M. Coutinho, G. Kowalska, J. Hawlena, R. Kowalski, R. Barbosa, F.A.B. da Cunha, Myorelaxant Effect of the *Dysphania ambrosioides* Essential Oil on *Sus scrofa* domesticus Coronary Artery and Its Toxicity in the *Drosophila melanogaster* Model, *Molecules.* 26 (2021) 2041. <https://doi.org/10.3390/molecules26072041>.
- [17] K.M. Marzec, I. Reva, R. Fausto, K. Malek, L.M. Proniewicz, Conformational space and photochemistry of α -terpinene, *J. Phys. Chem. A.* 114 (2010) 5526–5536. <https://doi.org/10.1021/jp100770v>.
- [18] G.W. McGraw, R.W. Hemingway, L.L. Ingram, C.S. Canady, W.B. McGraw, Thermal degradation of terpenes: Camphene, Δ^3 -carene, limonene, and α -terpinene, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 4029–4033. <https://doi.org/10.1021/es9810641>.
- [19] J. Rudbäck, M.A. Bergström, A. Börje, U. Nilsson, A.T. Karlberg, α -terpinene, an antioxidant in tea tree oil, autoxidizes rapidly to skin allergens on air exposure, *Chem. Res. Toxicol.* 25 (2012) 713–721. <https://doi.org/10.1021/tx200486f>.
- [20] P. Noriega, Terpenes in Essential Oils: Bioactivity and Applications, in: *Terpenes and Terpenoids [Working Title]*, IntechOpen, 2020. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93792>.
- [21] E. Scalerandi, G.A. Flores, M. Palacio, M.T. Defagó, M.C. Carpinella, G. Valladares, A. Bertoni, S.M. Palacios, Understanding Synergistic Toxicity of Terpenes as Insecticides: Contribution of Metabolic Detoxification in *Musca domestica*, *Front. Plant Sci.* 9 (2018) 1579. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01579>.
- [22] N.A. Mahizan, S.-K. Yang, C.-L. Moo, A.A.-L. Song, C.-M. Chong, C.-W. Chong, A. Abushelaibi, S.-H.E. Lim, K.-S. Lai, Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens, *Molecules.* 24 (2019) 2631.

- <https://doi.org/10.3390/molecules24142631>.
- [23] F. Cappiello, M.R. Loffredo, C. Del Plato, S. Cammarone, B. Casciaro, D. Quaglio, M.L. Mangoni, B. Botta, F. Ghirga, antibiotics The Revaluation of Plant-Derived Terpenes to Fight Antibiotic-Resistant Infections, (2018). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060325>.
- [24] E. Sieniawska, M. Swatko-Ossor, R. Sawicki, K. Skalicka-Woźniak, G. Ginalska, Natural Terpenes Influence the Activity of Antibiotics against Isolated *Mycobacterium tuberculosis*, Med. Princ. Pract. 26 (2017) 108–112. <https://doi.org/10.1159/000454680>.
- [25] 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>.
- [26] M. Elshikh, S. Ahmed, S. Funston, P. Dunlop, M. McGaw, R. Marchant, I.M. Banat, Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants, Biotechnol. Lett. 38 (2016) 1015–1019. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2079-2>.
- [27] J.M. Andrews, Determination of minimum inhibitory concentrations, J. Antimicrob. Chemother. 48 (2001) 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5.
- [28] 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>.
- [29] 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>.
- [30] E. Breitmaier, Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones, Wiley, 2006. <https://doi.org/10.1002/9783527609949>.
- [31] 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>.
- [32] C.D. de Moraes Oliveira-Tintino, S.R. Tintino, P.W. Limaverde, F.G. Figueredo, F.F. Campina, F.A.B. da Cunha, R.H.S. da Costa, P.S. Pereira, L.F. Lima, Y.M.L.S. de Matos, H.D.M. Coutinho, J.P. Siqueira-Júnior, V.Q. Balbino, T.G. da Silva, Inhibition of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L. and α -terpinene on the NorA efflux-pump of *Staphylococcus aureus*, *Food Chem.* 262 (2018) 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.040>.
- [33] N.Z. Mamadaliyeva, N.S. Abdullaeva, T. Rosenau, M. Fakhrutdinova, S.S. Azimova, S. Böhmendorfer, Composition of essential oils from four Apiaceae and Asteraceae species growing in Uzbekistan, *Nat. Prod. Res.* 32 (2018) 1118–1122. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1375928>.
- [34] Y.F. Zheng, X.M. Liu, Q. Zhang, F. Lai, L. Ma, Constituents of the Essential Oil and Fatty Acid from Rare and Endangered Plant *Magnolia kwangsiensis* Figlar & Noot, *J. Essent. Oil-Bearing Plants.* 22 (2019) 141–150. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1604168>.
- [35] P.R. Quiroga, V. Nepote, M.T. Baumgartner, Contribution of organic acids to α -terpinene antioxidant activity, *Food Chem.* 277 (2019) 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.100>.
- [36] P.I. Gallegos-Flores, R. Bañuelos-Valenzuela, L. Delgadillo-Ruiz, C. Meza-López, F. Echavarría-Cháirez, Antibacterial activity of five terpenoid compounds: Carvacrol, limonene, linalool, α -terpinene and thymol, *Trop. Subtrop. Agroecosystems.* 22 (2019) 241–248. <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/2838> (accessed May 1, 2021).
- [37] J.T. Floyd, S. Kumar, M.M. Mukherjee, G. He, M.F. Varela, A review of the molecular mechanisms of drug efflux in pathogenic bacteria: A structure-function perspective, in: *Recent Res. Dev. Membr. Biol.*, Research Signpost, Trivandrum, India, 2013: pp. 15–66.
- [38] J.H. Jorgensen, M.J. Ferraro, Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices, *Clin. Infect. Dis.* 49 (2009) 1749–1755. <https://doi.org/10.1086/647952>.
- [39] N.Q. Balaban, S. Helaine, K. Lewis, M. Ackermann, B. Aldridge, D.I. Andersson, M.P. Brynildsen, D. Bumann, A. Camilli, J.J. Collins, C. Dehio, S. Fortune, J.M.

- Ghigo, W.D. Hardt, A. Harms, M. Heinemann, D.T. Hung, U. Jenal, B.R. Levin, J. Michiels, G. Storz, M.W. Tan, T. Tenson, L. Van Melderen, A. Zinkernagel, Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence, *Nat. Rev. Microbiol.* 17 (2019) 441–448. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3>.
- [40] EUCAST, EUCAST: Clinical breakpoints and dosing of antibiotics, *Eur. Comm. Antimicrob. Susceptibility Testing. Break. Tables Interpret. MICs Zo. Diameters*, V11.0. (2021). https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (accessed May 2, 2021).
- [41] C. and L.S.I. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing CLSI supplement M100S, 28th ed., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2018. www.clsi.org. (accessed May 2, 2021).
- [42] M. Balouiri, M. Sadiki, S.K. Ibsouda, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *J. Pharm. Anal.* 6 (2016) 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- [43] B. Kowalska-Krochmal, R. Dudek-Wicher, The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance, *Pathogens.* 10 (2021) 165. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>.
- [44] P.. Todd, P. Benfield, Amoxicillin/clavulanic acid, *Drugs.* 39 (1990) 264–307. <https://doi.org/10.2165/00003495-199039020-00008>.
- [45] L. Auezova, A. Najjar, M. Kfoury, S. Fourmentin, H. Greige- Gerges, Antibacterial activity of free or encapsulated selected phenylpropanoids against *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*, *J. Appl. Microbiol.* 128 (2020) 710–720. <https://doi.org/10.1111/jam.14516>.
- [46] I. Ullah, A.L. Khan, L. Ali, A.R. Khan, M. Waqas, J. Hussain, I.J. Lee, J.H. Shin, Benzaldehyde as an insecticidal, antimicrobial, and antioxidant compound produced by *Photobacterium temperata* M1021, *J. Microbiol.* 53 (2015) 127–133. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-4632-4>.
- [47] S.E.C.B. Vasconcelos, H.M. Melo, T.T.A. Cavalcante, F.E.A.C. Júnior, M.G. de Carvalho, F.G.R. Menezes, O.V. de Sousa, R.A. Costa, *Plectranthus amboinicus* essential oil and carvacrol bioactive against planktonic and biofilm of oxacillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, *BMC Complement. Altern. Med.* 17 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1968-9>.
- [48] J.R. Scherf, C.R. Barbosa dos Santos, T. Sampaio de Freitas, J.E. Rocha, N.S. Macêdo, J.N. Mascarenhas Lima, H.D. Melo Coutinho, F.A. Bezerra da Cunha, Effect of terpinolene against the resistant *Staphylococcus aureus* strain, carrier of the

- efflux pump QacC and β -lactamase gene, and its toxicity in the *Drosophila melanogaster* model, *Microb. Pathog.* 149 (2020) 104528. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104528>.
- [49] M. Nelson, Modulation of Antibiotic Efflux in Bacteria, *Curr. Med. Chem. -Anti-Infective Agents.* 1 (2002) 35–54. <https://doi.org/10.2174/1568012023355054>.
- [50] J.M. Pagès, L. Amaral, Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1794 (2009) 826–833. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.12.011>.
- [51] A.C.A.X. De-Oliveira, L.F. Ribeiro-Pinto, F.J.R. Paumgarten, In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by β -myrcene and other monoterpenoid compounds, *Toxicol. Lett.* 92 (1997) 39–46. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(97\)00034-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(97)00034-9).
- [52] F.; Tong, J.R.. Coats, Quantitative structure-activity relationships of monoterpenoid binding activities to the housefly GABA receptor, *Pest Manag. Sci.* 68 (2012) 1122–1129. <https://doi.org/10.1002/ps.3280>.
- [53] F. Tong, J.R. Coats, Effects of monoterpenoid insecticides on [3H]-TBOB binding in house fly GABA receptor and $^{36}\text{Cl}^-$ uptake in American cockroach ventral nerve cord, *Pestic. Biochem. Physiol.* 98 (2010) 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.07.003>.
- [54] E.E. Enan, Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35 (2005) 309–321. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.12.007>.
- [55] E. Enan, Insecticidal activity of essential oils: Octopaminergic sites of action, *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 130 (2001) 325–337. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00255-1](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00255-1).
- [56] 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>.
- [57] N.R. De Carvalho, N.R. Rodrigues, G.E. Macedo, I.J. Bristot, A.A. Boligon, M.M. De Campos, F.A.B. Cunha, H.D. Coutinho, F. Klamt, T.J.S. Merritt, T. Posser, J.L. Franco, *Eugenia uniflora* leaf essential oil promotes mitochondrial dysfunction in *Drosophila melanogaster* through the inhibition of oxidative phosphorylation,

Toxicol. Res. (Camb). 6 (2017) 526–534. <https://doi.org/10.1039/c7tx00072c>.

5. CAPÍTULO V: CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 Discussão geral

Os produtos naturais continuam sendo uma fonte importante na descoberta de novos compostos como atividade biológica, e tendo participação essencial na descoberta de novas drogas. Os óleos essenciais e seus constituintes, álcoois, éteres ou óxidos, aldeídos, cetonas, ésteres, aminas, amidas, fenóis e terpenos, apresentam uma vasta gama de atividades biológicas listadas.

Os óleos essenciais são produtos naturais complexos formados por vários constituintes que podem variar diante das condições climáticas, de cultivo, de coleta e de extração já revelam uma grande complexidade para seu estudo. Outro ponto que não devemos deixar de levado em consideração é o fato da ação conjunta dos diversos componentes de um produto natural complexo sobre os sistemas biológicos e vice-versa. Assim, podemos observar respostas biológicas de intensidade distintas quando comparado um óleo essencial e seu constituinte majoritário isolado, pois quando isolado temos um único composto para ser absorvido, transportado, metabolizado e excretado, já quando se utiliza um produto natural complexo (por exemplo, óleos essenciais ou extratos) existem ali uma mistura de compostos que podem alterar qualquer uma das etapas farmacocinéticas citadas anteriormente, fazendo que um componente tenha absorção maior ou menor, seja mais rápida ou lentamente metabolizado ou excretado, alterando assim a biodisponibilidade do composto e provavelmente alterando a intensidade da resposta.

A *Drosophila melanogaster* não é considerado apenas um modelo de para controle de dípteros, mas sim um modelo para triagem do risco ambiental causado por diversos produtos, e de triagem de pesquisa de medicamentos e mecanismos de ação de droga, apesar de potenciais diferenças farmacocinéticas e farmacodinâmicas. A grande similaridade genética, entre humanos e a mosca, permite a extrapolação de informações na busca por medicamentos, porém nunca esquecendo limitações promovidas por diferenças metabólicas e farmacocinéticas. Os resultados mostraram toxicidade dos dois compostos testados com diminuição da sobrevivência e perda da capacidade locomotora. Os mecanismos envolvidos nesses resultados talvez possam ser comprovados como a conclusão dos testes de bioquímicos que informarão o nível de estresse oxidativo e interferência na cadeia respiratória.

Os testes de relaxamento de contração da artéria coronária evidenciaram a capacidades dos compostos envolvidos dos testes de promover o relaxamento após contração tanto induzida por potássio (eletromecânico) quanto por serotonina (fármaco-

mecânico), sendo necessário estudos mais minuciosos capazes de esclarecer os mecanismos envolvidos na promoção desse relaxamento.

Apesar do α -terpineno ter mostrado potencial tóxico contra a *Drosophila melanogaster* não foi observado atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* nem modulação em bombas de efluxo distintas. Entretanto, foi capaz de reduzir a CIM do norfloxacino e ciprofloxacino frente às cepas 1199B, K2068 e K4410, respectivamente. Porém não foi observado a diminuição da CIM do brometo de etídio em nem uma das cepas testadas o que mostra que o α -terpineno não interfere em nem uma das bombas testadas

5.2 Conclusões gerais

Ao final da elaboração desse trabalho foi possível verificar que do óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* e do α -terpineno foram tóxicos contra *Drosophila melanogaster*, sendo que o óleo essencial foi mais eficaz com uma concentração proporcional menor. A capacidade de reverter a contração de artéria coronária de suínos, tanto induzida eletromecânica quanto de forma fármaco-mecânica, pelo óleo essencial, possibilitando o estudo de compostos com capacidade de relaxamento da contração de vasos sanguíneos e possível controle de alterações vasculares. Os testes microbiológicos revelaram a que a associação entre α -terpineno componente de óleo essencial de *C. ambrosioides*, e antibióticos diminuíram a CIM destas drogas.

Em resumo podemos concluir que produtos naturais continuam sendo importantes pontos de partida para descoberta de compostos, complexos ou isolados, naturais ou semi-sintéticos, com atividade biológica de interesse farmacológico ou toxicológico.

5.3 Perspectivas de investigações futuras

Após a realização desse trabalho fica evidente a possibilidade de investigações sobre atividade miorelaxante vascular tendo como modelo artérias coronárias de suínos, modelo que apresenta baixo custo de aquisição e manutenção. Outra possibilidade é a investigação de atividades farmacológicas utilizando a *Drosophila melanogaster* além da busca de compostos seguros toxicologicamente e biodegradáveis com eficácia comprovada no combate de pragas. Sendo vislumbrando a possibilidade de da utilização da mosca como modelo para atividades farmacológicas (antioxidante, antimutagênica, antigenotoxicidade, neuroprotetiva, anti-apoptótica e outras) e entendimento de diversas doenças, além de estudos *in vivo* e *in silico* com possibilidade de elucidação dos mecanismos envolvidos na diminuição da locomoção e efeito tóxico promovido pelas substâncias objeto do estudo.

APÊNDICES



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº AD69F71

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AD69F71**
 Usuário: **LUIZ JARDELINO DE LACERDA NETO**
 CPF/CNPJ: **031.905.594-90**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Chenopodium ambrosioides

Título da Atividade: **Estudo do óleo essencial de Chenopodium ambrosioides e seu constituinte e α -terpineno a luz do efeito vasorelaxante, antimicrobiano e potencial tóxico em modelo de Drosophila melanogaster**

Equipe

LUIZ JARDELINO DE LACERDA NETO **INDEPENDENTE**

Data do Cadastro: **08/07/2021 12:41:18**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **12:42** de **08/07/2021**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

Article

Myorelaxant Effect of the *Dysphania ambrosioides* Essential Oil on *Sus scrofa domesticus* Coronary Artery and Its Toxicity in the *Drosophila melanogaster* Model

Luiz Jardelino de Lacerda Neto ¹, Andreza Guedes Barbosa Ramos ¹, Renata Evaristo Rodrigues da Silva ¹, Luis Pereira-de-Morais ¹, Fernanda Maria Silva ¹, Roger Henrique Sousa da Costa ¹, Lindaiane Bezerra Rodrigues Dantas ¹, José Galberto Martins da Costa ¹, Henrique Douglas Melo Coutinho ^{1,*}, Grażyna Kowalska ², Joanna Hawlena ², Radosław Kowalski ^{3,*}, Roseli Barbosa ¹ and Francisco Assis Bezerra da Cunha ¹



Citation: de Lacerda Neto, L.J.; Ramos, A.G.B.; da Silva, R.E.R.; Pereira-de-Morais, L.; Silva, F.M.; da Costa, R.H.S.; Rodrigues Dantas, L.B.; da Costa, J.G.M.; Coutinho, H.D.M.; Kowalska, G.; et al. Myorelaxant Effect of the *Dysphania ambrosioides* Essential Oil on *Sus scrofa domesticus* Coronary Artery and Its Toxicity in the *Drosophila melanogaster* Model. *Molecules* 2021, 26, 2041. <https://doi.org/10.3390/molecules26072041>

Academic Editors: Vincenzo De Feo and Md. Moshfekus Saleh-E-In

Received: 13 March 2021
Accepted: 26 March 2021
Published: 2 April 2021

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



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato 63105-000, Brazil; luizjardelino@gmail.com (L.J.d.L.N.); andrezaurca@gmail.com (A.G.B.R.); renata_ers@hotmail.com (R.E.R.d.S.); luispereira256@gmail.com (L.P.-d.-M.); fernandamsmv@gmail.com (F.M.S.); rogerhenrique8@hotmail.com (R.H.S.d.C.); lindaianebrd@gmail.com (L.B.R.D.); galberto.martins@gmail.com (J.G.M.d.C.); roselibarbo@gmail.com (R.B.); cunha.urca@gmail.com (F.A.B.d.C.)
- ² Department of Tourism and Recreation, University of Life Sciences in Lublin, 15 Akademicka Street, 20-950 Lublin, Poland; grazyna.kowalska@up.lublin.pl (G.K.); hawlena@interia.pl (J.H.)
- ³ Department of Analysis and Evaluation of Food Quality, University of Life Sciences in Lublin, 8 Skromna Street, 20-704 Lublin, Poland
- * Correspondence: hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M.C.); radoslaw.kowalski@up.lublin.pl (R.K.)

Abstract: Purpose: Alternative methods for the use of animals in research have gained increasing importance, due to assessments evaluating the real need for their use and the development of legislation that regulates the subject. The principle of the 3R's (replacement, reduction and refinement) has been an important reference, such that in vitro, ex vivo and cord replacement methods have achieved a prominent place in research. Methods: Therefore, due to successful results from studies developed with these methods, the present study aimed to evaluate the myorelaxant effect of the *Dysphania ambrosioides* essential oil (EODa) using a *Sus scrofa domesticus* coronary artery model, and the toxicity of both the *Dysphania ambrosioides* essential oil and its major constituent, α -terpinene, against *Drosophila melanogaster* in toxicity and negative geotaxis assays. Results: The EODa relaxed the smooth muscle of swine coronary arteries precontracted with K^+ and 5-HT in assays using *Sus scrofa domesticus* coronary arteries. The toxicity results presented LC_{50} values of 1.546 mg/mL and 2.282 mg/mL for the EODa and α -terpinene, respectively, thus showing the EODa and α -terpinene presented toxicity to these dipterans, with the EODa being more toxic. Conclusions: Moreover, the results reveal the possibility of using the EODa in vascular disease studies since it promoted the relaxation of the *Sus scrofa domesticus* coronary smooth muscle.

Keywords: essential oil; natural product; myorelaxative activity; toxicity

1. Introduction

The use of animals in essential research has been constantly questioned in terms of the principles of the 3R's (replacement, reduction and refinement), thus creating the need for reflection in the number of animals used in research (reduction), the possibility of replacing vertebrate animals with invertebrates, embryos, microorganisms, organs or isolated tissues, in addition to guaranteeing the quality of experiments (refinement), where this principle underscores training for the correct use of animal handling techniques, aseptic techniques in surgical procedures, correct dose administrations and other recommendations for carrying out high quality experiments [1].

The replacement of animals by in vitro and ex vivo methodologies efficiently promotes one of the R's, avoiding the use of animals in assays, with the ability to clarify the toxic potential or the effectiveness of a substance or product under analysis [2]. In the 1990s, in vitro methodologies were practically unused to verify toxicity and efficacy, however, in the early 2000s a great growth in the use of this methodology to assess genotoxicity, pharmaceutical safety and pharmacokinetic assays was seen [3]. Another alternative method that is worth noting is the replacement of vertebrate animals by invertebrate ones in assays, which permit Parkinson's disease, memory, endocrine, diabetes and toxicological assays to be studied. *Drosophila melanogaster* is a frequently used invertebrate, where this substitution is beneficial for a number of reasons such as cost reduction, short life cycle, small size and simple fly anatomy, in addition to being able to observe a larger number of animals per experiment [2]. *Drosophila melanogaster* is a model of great importance as it generates information for fighting pests and disease vectors. The search for new agents that are effective in the control of vectors, explore options that are economically viable, with lower environmental pollution and lower toxicity to non-target organisms, including humans [4].

In this context, the search for products with biological and/or pharmacological activity has reignited the interest in natural products, especially those with a plant origin, among which essential oils (EOs) occupy a prominent place. EOs are liquids at room temperature and are usually complex compounds formed by various substances such as alcohols, aldehydes, ketones, phenols, ethers, esters and terpenes at different proportions, with the latter being predominantly mono and sesquiterpenes. EOs possess antioxidant, metal chelation, free radical scavenging, pain-modulating, anticonvulsant, neuroprotective and anti-inflammatory activities [5,6].

Dysphania ambrosioides (L.), Mosyakin and Clematis (Chenopodiaceae), also known as *Chenopodium ambrosioides*, occurs frequently in subtropical and subtemperate regions with a cosmopolitan characteristic, and is popularly used for the treatment of worms [7], as a diuretic and in respiratory and inflammatory alterations. According to the world health organization [8], *D. ambrosioides* is one of the most commonly used medicinal plants in the world, this being due to its wide distribution and ethnomedical knowledge. The *D. ambrosioides* EO has previously been reported in the literature with insecticidal activity against bees and houseflies [9], as an antiviral, anthelmintic, antifungal antileishmanial and antioxidant. The EO possesses components with known medicinal value such as: ascaridol, isoascaridol, p-cymene, limonene and α -terpinene. Bioactive products isolated from plants are used for the treatment of tuberculosis, rheumatism, uterine hemorrhaging and respiratory diseases [10]. Studies have demonstrated α -terpinene as safe in embryofetotoxicity tests in rats [11], however, other studies have revealed some toxic effects in the oral use of this substance [12,13]. Therefore, among the concerns for the development of new products with biological and/or pharmacological activity is the determination of toxic doses and safety margins. Several studies demonstrate anatomical and physiological similarities between the cardiovascular system of humans and pigs (*Sus scrofa domestica*), in particular the control of smooth muscle, with effects involving electromechanical and pharmacomechanical mechanisms being reported [14–17]. The myorelaxant effect that drugs and medications have on vascular smooth muscle is a fundamental tool in the control of conditions in which vasoconstriction or vascular obstruction are responsible for damage to tissues, organs, systems or even the survival of the organism. Therefore, tests with swine coronary arteries yield relevant information on the subject, as some studies have already demonstrated the myorelaxant action of extracts, essential oils and their components [18–24]. Thus, smooth muscle effects, particularly in coronary arteries, provide important information, which may generate enormous possibilities for other studies involving the action and mechanisms of contraction of smooth muscle. This study aimed to evaluate the myorelaxant activity of the *Dysphania ambrosioides* essential oil (EODa) in an ex vivo *Sus scrofa domestica* coronary model, as well as to verify the toxic concentrations

of the EODa and its major constituent, α -terpinene, against the *Drosophila melanogaster* alternative model.

2. Results

2.1. Phytochemical Analysis

The percentage of the identified compounds can be observed in the histogram resulting from the analysis of the chromatographic and spectral data (Figure 1).

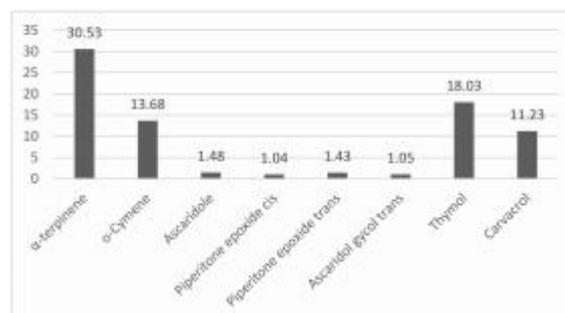


Figure 1. Histogram profile of the *Dysphania ambrosioides* essential oil composition.

2.2. Ex Vivo Smooth Muscle Contractility Assay

2.2.1. Effect of the *Dysphania ambrosioides* Essential Oil on K^+ -Induced Contractions Using a *Sus scrofa domestica* Coronary Artery Model

Increasing and cumulative concentrations of the EODa (1, 3, 10, 30, 100, 300, 600 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were administered to evaluate its myorelaxant effect in contractions promoted and sustained by K^+ in swine coronary artery smooth muscle (electromechanical coupling). Increasing concentrations of the EODa promoted a concentration-dependent relaxation, where its significant effects were observed from the 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration ($p < 0.001$, one-way ANOVA followed by Holm-Sidak) (Figure 2).

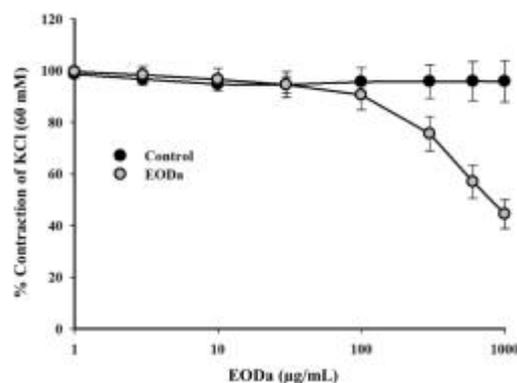


Figure 2. Relaxant effect of the *Dysphania ambrosioides* essential oil (EODa) on contractions maintained by potassium in isolated swine coronary arteries. Representative graph of the relaxant effect of the EODa in contractions maintained by KCl (60 mM) in isolated swine coronary arteries. Values are expressed as the mean \pm S.E.M.; n represents the number of experiments ($p < 0.001$, one-way ANOVA followed by Holm-Sidak).

2.2.2. Effect of the *Dysphania ambrosioides* Essential Oil on Contractions Induced by Serotonin (5-HT) Using a *Sus scrofa domestica* Coronary Artery Model

Increasing and cumulative concentrations of the EODa (1, 3, 10, 30, 100, 300, 600 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were administered to evaluate its myorelaxant effect on 5-HT-induced contractions in swine smooth muscle coronary arteries (pharmacomechanical coupling). Increasing concentrations of the EODa promoted a concentration-dependent relaxation that was statistically significant from the 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration ($p < 0.005$, one-way ANOVA followed by Holm-Sidak) (Figure 3).

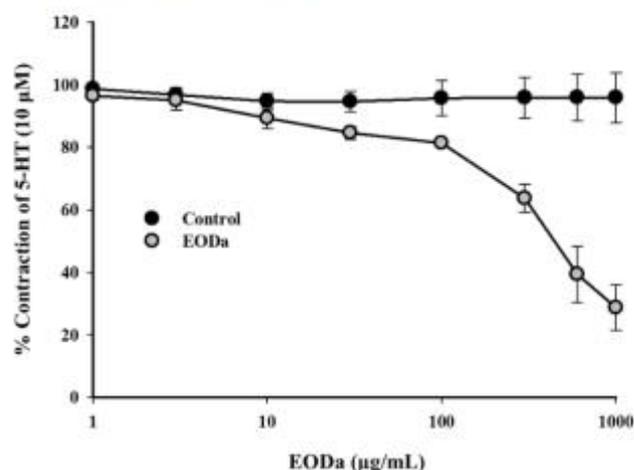


Figure 3. Relaxant effect of the EODa on contractions maintained by serotonin in isolated swine coronary arteries. Representative graph of the relaxant effect of the EODa on contractions maintained by 5-HT in isolated swine coronary arteries. Values are expressed as the mean \pm S.E.M.; n represents the number of experiments ($p < 0.005$, one-way ANOVA followed by Holm-Sidak).

The EODa presented a myorelaxant activity in both the electromechanical and pharmacomechanical pathways, however, with a greater efficiency in the pharmacomechanical pathway where contractions were evoked by 5-HT.

2.3. *D. melanogaster*-Alternative Model

2.3.1. Toxicity Assay

The toxicity tests for the *Dysphania ambrosioides* essential oil and α -terpinene against *D. melanogaster* were performed with three concentrations (1, 2 and 4 mg/mL) using the fumigation method. This test uses flies as an alternative model to the use of mammals, generating information for the determination of the toxicity profile of the essential oil and the compound. The calculation for the average lethal concentration (LC_{50}) of the EODa was determined as 1.806 mg/mL , by sigmoidal regression, whereas for α -terpinene an EC_{50} of 2.282 was obtained. The aforementioned results were similar to those observed by [25], where the EODa obtained an LC_{50} of 1.96 mg/mL , this being lower than the isolated constituent (Table 1). The same methodology was used to determine the EC_{50} for mobility, for which a value of 1.646 mg/mL was obtained.

Table 1. Fumigant toxicity of the *Dysphania ambrosioides* essential oil and α -terpinene against *D. melanogaster* adult flies.

Compound	LC ₅₀ (mg L ⁻¹ Air)	95% Fiducial Limits
EODa	1.806	1.588–2.296
α -Terpinene	2.282	1.933–2.671

The EODa showed a significant difference with the 4 mg/mL concentration, when compared to the control and the 1 mg/mL concentration, during all reading times (between 1 and 8 h). From the third hour onwards, a difference between the 2 mg/mL concentration and the control was registered, a fact that was only identified after the sixth hour of reading with the 1 mg/mL concentration, as shown in Figure 4.

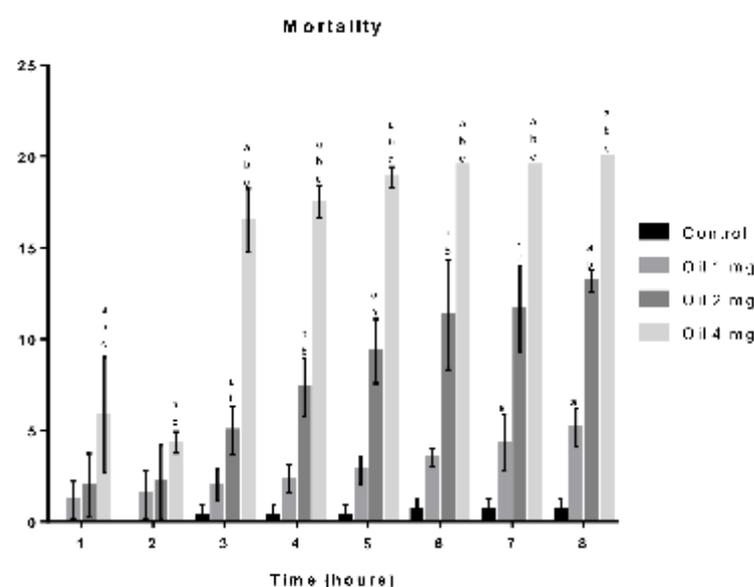


Figure 4. Effect of the *D. ambrosioides* leaf essential oil on *D. melanogaster* survival. Subtitle: Survival was analyzed at the indicated time points. Results are expressed as the Mean \pm SD of the number of dead flies after each exposure time. a = $p < 0.05$ compared to the control, b = $p < 0.05$ compared to 1 mg/mL and c = $p < 0.05$ compared to 2 mg/mL.

The α -terpinene toxicity assays were performed using the following concentrations: 1, 2 and 4 mg/mL. The readings were performed every hour for 8 h, where the 4 mg/mL concentration presented significant differences against all other groups (control, 1 and 2 mg/mL), with this characteristic not being evident in any of the other comparisons, as shown in Figure 5.

The α -terpinene compound present in the *D. ambrosioides* essential oil showed a toxic effect against *D. melanogaster*.

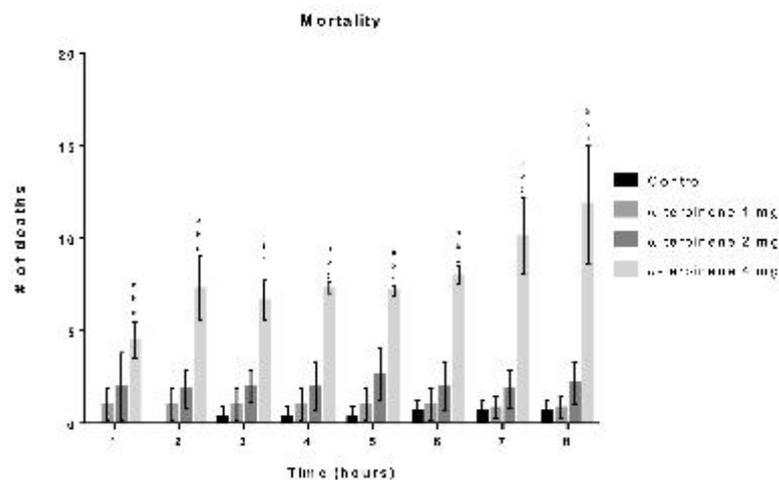


Figure 5. Effect of α -terpinene on *D. melanogaster* survival. Subtitle: Survival was analyzed at the indicated time points. Results are expressed as the Mean \pm SD of the number of dead flies after each exposure time. a = $p < 0.05$ compared to the control, b = $p < 0.05$ compared to 1 mg/mL and c = $p < 0.05$ compared to 2 mg/mL.

2.3.2. Geotaxis

Damage to the flies' locomotor capacity was recorded with all concentrations at all eight recording hours, with the exception of the 1 mg/mL concentration in the first hour, which did not differ statistically from the control. In addition, the 2 mg/mL concentration did not differ significantly from the 4 mg/mL concentration in the last hour (Figure 6).

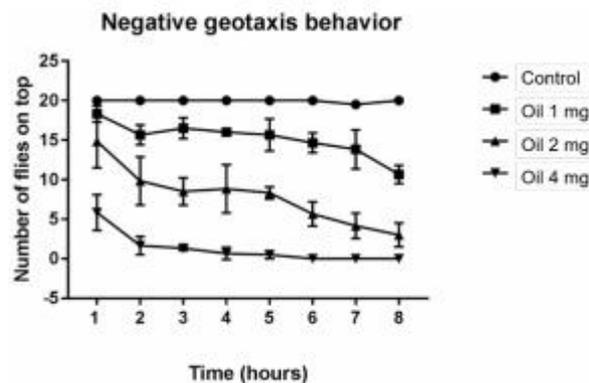


Figure 6. Effect of the *D. ambrosioides* leaf essential oil on the locomotor ability of *D. melanogaster*. Subtitle: Locomotor activity was determined by negative geotaxis behavior. Results are expressed as the mean \pm SD of the number of flies able to climb a marked glass column, as previously described, during each exposure time.

In terms of α -terpinene and insect locomotion, only the 4 mg/mL concentration altered locomotion at all recording times, while the 2 mg/mL concentration also proved to be effective at damaging locomotor capacity up until the sixth hour, after which no differences were observed when compared to the control, thus indicating a reversible action (Figure 7).

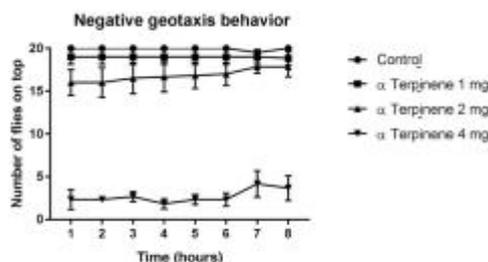


Figure 7. Effect of α -terpinene on *D. melanogaster* locomotor ability. Subtitle: Locomotor activity was determined by negative geotaxis behavior. Results are expressed as the mean \pm SD of the number of flies able to climb a marked glass column, as previously described, at each exposure time.

When superimposing the results from the mortality and negative geotaxis assays, all the tested EODA concentrations (1, 2 and 4 mg/mL) reduced the mobility of the flies that remained alive, a fact that can be well observed in the first hours of exposure to the 2 and 4 mg/mL concentrations, a behavior that was also maintained during the remaining evaluation hours (Figure 8). This section may be divided by subheadings. It should provide a concise and precise description of the experimental results, their interpretation and the experimental conclusions that can be drawn.

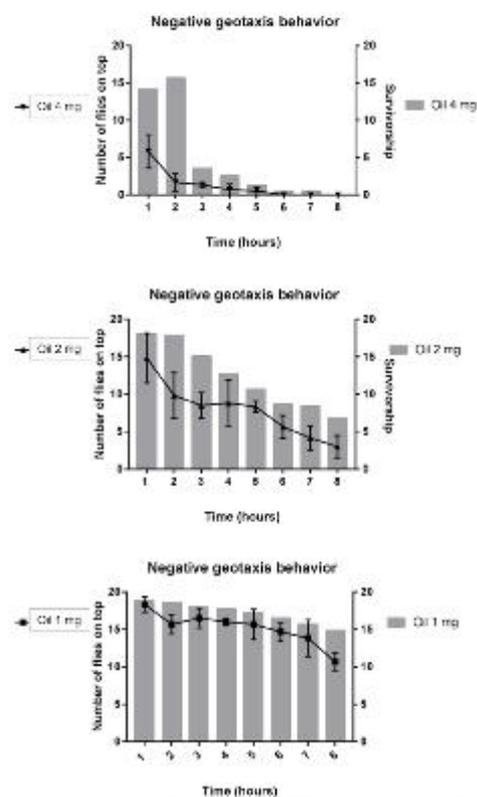


Figure 8. Relationship between alive flies and alterations in mobility.

3. Discussion

The phytochemical profile of the oil studied was established by chromatography and had α -terpinene as a major constituent, with a percentage of 30.53%. The secondary constituents with the highest percentage were: thymol and *o*-cymene, with 18.11% and 13.68%, respectively. The percentage of the identified compounds can be observed in the histogram resulting from the analysis of the chromatographic and spectral data (Figure 1), and which corroborate with the results presented by [23].

Several studies list the constituents of the EODa, where its composition can be variable, such as in the study by [24], where mainly oxygenated terpenes and sesquiterpenes (α -terpinene 61.04%, 4-carene 13.55% and *p*-cymene 12.94%) were identified, meanwhile the study by (9) registered *cis* and *trans* ascaridol (35.4% and 26.0%, respectively), and *p*-cymene (29.2%), as the major constituents.

The constituent variations in the aforementioned analyses may be explained by the numerous variables present when comparing studies using the same plant species that have been grown and collected from different locations. These variables include the type of soil, pluviosity indices, wind intensity, collection time and collection season, among other factors that are important influencers in the constitution of essential oils, where such differences have been previously reported [25]. Another factor that must be taken into account is the maturation or age of the plant, which can alter the essential oil composition [26]. Changes in composition can also be observed by chemical reactions that may occur spontaneously following EO extraction, such as by the self-oxidation of α -terpinene, increasing the concentration of several other constituents such as ascaridol and thus reducing its own concentration when in contact with the air [27].

The high potassium concentration generated by the addition of KCl promotes a depolarization of the membrane through a change in electrical charge, which consequently results in the activation of L-type voltage dependent calcium channels (or channels sensitive to dihydropyridine) permitting the entry of Ca^{2+} ions from the external environment into the cytosol. The increase in intracellular Ca^{2+} concentration is the protagonist of excitation-contraction coupling, where this increase in cytosolic calcium concentration mediates the release of calcium from the sarcoplasmic reticulum, further raising calcium ion levels that are available for myosin light chain phosphorylation, one of the final stages of smooth muscle contraction [28,29]. It is noteworthy to highlight that the membrane depolarization caused by potassium also promotes a Ca^{2+} -dependent contraction, mediated by the G RhoA protein associated with Rho kinase [30].

Pereira-de-Morais et al. [23] demonstrated that the EODa relaxed the smooth muscle of isolated rat tracheas, with the data indicating that this effect is supposedly due to the blockage of L-type calcium channels. Similarly, Menezes et al. [31] reported a relaxant effect for the *Lippia origanoides* essential oil against contractions promoted by KCL, whilst also indicating the involvement of KCa and KV potassium channels in smooth muscle relaxation, a fact that may explain the relaxation promoted by the EODa since both of these have the same compounds at greater quantities in their composition.

Any effects over K^+ need to be understood to understand the EO's mechanism of action, since this ion contributes to the membrane potential in excitable cells, especially neurons, skeletal muscle fiber and smooth muscle fiber, through their action on their channels. On the other hand, EODa effects on serotonin-induced contractions may occur through an external agonist mechanism, where the EODa may bind to membrane receptors and modify the activity of ion channels such as Na^+ and K^+ [32,33]. This mechanism begins with the coupling of serotonin to the Gq/11 protein receptor, activating phospholipase C (PLC), which hydrolyzes phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) into inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) and diacylglycerol (DAG). IP_3 diffuses into the cytoplasm and binds to inositol trisphosphate receptor (IP_3R receptors), these being calcium channels present in the SR membrane, which when activated release Ca^{2+} . Meanwhile DAG together with Ca^{2+} activate PKC that acts in several processes including the regulation of transmembrane Ca^{2+} transport [34]. The observed relaxation may be due, in part, to a blockage of IP_3R

activation by IP_3 , as observed in Pelaia et al., [35], and by other mechanisms such as: increased Ca^{2+} -ATPase activity, decreased IP_3 formation, protein kinase A (PKA) activity and stimulation of the Na^+ / Ca^{2+} exchanger.

Studies with essential oils from aromatic medicinal plants such as *Melissa officinalis* and *Lippia alba* have shown inhibition of contractions promoted by K^+ and 5-HT (electromechanical and pharmacomechanical pathways) in several organs from rats such as: ileum, trachea, aorta and uterus [6,23,36,37]. Jarvis [38] report the *Lippia alba* essential oil inhibits smooth muscle contractions caused by 5-HT in the trachea and ileum. Assaidi et al. [39] report that the intravenous administration of the aqueous, methanolic and ethyl acetate *Chenopodium ambrosioides* leaf extracts induced arterial hypotension in anesthetized normotensive rats. Thus, results from the present study indicate a relaxant effect for aromatic plants, suggesting the potential *Dysphania ambrosioides* has as a smooth muscle relaxant.

Fruit fly exposure by fumigation to the *Dysphania ambrosioides* essential oil caused a significant increase in mortality. This effect depends on the exposure time and the oil concentration. In the study by Pinho et al. [40], the *Psidium guajava* essential oil presented significant action in terms of *D. melanogaster* mortality, where additionally, the tested concentrations caused a total loss of motor capacity in the flies, depending on the dose and time of exposure. These findings corroborate with the present study and suggest that aromatic plant essential oils may be toxic to arthropods.

The toxic action of the *D. ambrosioides* essential oil has also been investigated in other important models, with studies reporting that this species has pesticidal, larvicidal and insecticidal activity. The *D. ambrosioides* essential oil presented a remarkable in vitro schistosomicidal action, killing 100% of the adult worms in 24 and 72 h, and significantly reducing in vitro cell viability, obtaining however, a selectivity index 31.8 times more toxic to adult *Schistosoma mansoni* worms than the tested cells [41], which suggests a toxic activity with potential applications in pest control.

EODA has also been shown to be toxic to adult houseflies [9] and toxic to *Alphitobius diaperinus* [42]. Therefore, the EODA can be considered in new strategies looking at new possibilities in integrated pest management.

The toxic effect of the EODA may be associated with a change in acetylcholinesterase activity, which in turn is associated with an increase in reactive oxygen and nitrogen species in the neuronal system, which initially would lead to an increase in the activity and concentration of antioxidant enzymes such as catalase and glutathione S-transferase [43,44].

The α -terpinene compound present in the *D. ambrosioides* essential oil showed a toxic effect against *D. melanogaster*. Studies have shown that the toxicity of α -terpinene against *Sitophilus zeamais* adults has LC_{50} values of 5.46 mg L^{-1} [25], this being an important adjuvant component in the composition of other oils used for this purpose [45]. Paes et al. [46] showed that α -terpinene was one of the main compounds identified in the *C. ambrosioides* essential oil, which showed an acaricidal activity. However, the use of essential oil in their entirety have shown greater toxic activity than their major constituents in isolation, thus corroborating with studies that demonstrate the toxicity of selected constituents from mixtures present a synergistic effect between the supposedly active and inactive compounds, and that the presence of all the constituents is necessary for the complete toxicity and/or action of essential oils [45].

The lethal effect of terpenes and/or essential oils is the result of the toxic action of these compounds on various receptor targets, especially in signaling or regulatory pathways that are directly associated with the nervous system, such as: acetylcholinesterase interference, binding to oxytocin, nicotinic, GABAergic and tyramine receptors [47]. In addition to numerous target effects, where these substances do not act on a single target, the complex composition of essential oils contribute to the lethality of insects, not only because of their pharmacodynamic effect, but also because of the possibility of activating on several targets, and pharmacokinetic effects [48], where the complex itself may contribute to better absorption, thus greater bioavailability of active compounds, resulting in the competition

of metabolic pathways by the EO constituents, among many other variations, which may occur in this process [49].

It has been suggested that the reduced mobility of *D. melanogaster*, observed by the lower number of flies reaching the top of the column, is a result of the effective inhibition of acetylcholinesterase (AChE) [50,51]. Thus, we may infer the EO's ability to induce relaxation in smooth muscle may be explained by an increased concentration of acetylcholine in the vascular endothelium. Acetylcholine in the endothelium acts through muscarinic receptors coupled to G proteins, which contrary to stimulating calcium influx for an effective contraction, induces the activation of nitric oxide synthase promoting the production of nitric oxide and relaxation [52–55]. However, it is noteworthy that other pathways causing changes in the mobility of flies may be involved, including the dopaminergic pathway, since decreases in dopamine significantly alter insect mobility [56].

The α -terpinene was one of the main compounds identified in the *D. ambrosioides* essential oil, also known as *Chenopodium ambrosioides*, which showed acaricidal activity [46]. Moreover, α -terpinene has shown an acetylcholinesterase inhibitory activity [57], thus corroborating with the findings in this study, since α -terpinene is the main monoterpene of present in the EODa.

The greatest damage to locomotor capacity was recorded when comparing the EODa to its isolated major constituent, a fact that consolidates the observation that toxic effects are more potent when a complex mixture is tested rather than a single constituent.

Several studies report that decreased acetylcholinesterase activity is strongly associated with decreased mobility [58–60] or permanent locomotor disability [61]. The comparison between live and mobile flies shows a direct negative correlation, both in terms of the EODa concentration and the exposure time, which suggests that locomotor disability precedes general toxic effects, which may lead to the death of the insect, where this result may be explained by the action of essential oil constituents on different target enzymes and genes [50,62].

4. Materials and Methods

4.1. Plant Collection and Identification

The *Dysphania ambrosioides* (L.), Mosyakin and Clemants, botanical material was collected from the Botanical Garden of the Natural Products Research Laboratory (Horto Botânico do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais—LPPN), at the Regional University of Cariri (Universidade Regional do Cariri—URCA, Crato, Brazil) (coordinates: 07°14'19.2" latitude S. and 39°24'52.8" longitude W.). The species was identified by Prof. Dr. Maria Arlene Pessoa da Silva as belonging to the *Dysphania ambrosioides* (L.), Mosyakin and Clemants, species, from the Chenopodiaceae family. An exsiccate was deposited at the Caririense Dárdano de Andrade-Lima Herbarium (Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima, Crato, Brazil), from the Regional University of Cariri (Universidade Regional Cariri—URCA, Crato, Brazil), under voucher # 12.208.

4.2. Essential Oil Extraction

The leaves from the plants were collected and cut into approximately 1 cm² pieces. Subsequently, the plant material was immersed in distilled water and subjected to extraction by hydrodistillation in a Clevenger type apparatus to obtain the essential oil. The extractions were performed in triplicates and treated with anhydrous sodium sulfate. The oil was then filtered through cotton and transferred with a Pasteur pipette to an amber glass and stored at −20 °C. The extraction and analysis procedures were performed at the Natural Products Research Laboratory (Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais—LPPN)-Regional University of Cariri (Universidade Regional do Cariri—URCA, Crato, Brazil).

4.3. Phytochemical Analysis

The essential oil was subjected to gas chromatography with an HP-5 non-polar column (Agilent J&W, Santa Clara, CA, USA, 60 m × 0.25 mm internal diameter; film thickness

0.25 μm) and coupled to a mass spectrometer with an Agilent 5975C Series quadrupole analyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). The conditions of analysis were as follows: carrier gas helium with constant flow of 1 mL per min and for injection of the sample initial temperature of 40 $^{\circ}\text{C}$ (maintained for 2 min), heating ramp of 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and final temperature of 230 $^{\circ}\text{C}$, which was maintained for 5 min. The compounds eluted from the chromatographic column were ionized by electron impact at 70 eV. The ionization source was maintained at 230 $^{\circ}\text{C}$ and the quadrupole at 150 $^{\circ}\text{C}$. The compounds were identified by analyzing the mass spectra of each chromatographic peak, comparing with authentic standards and calculating retention indices. The calculated values were compared with the retention rates published in the literature [23].

The same solution was quantified by injection in triplicate of 1 μL in the splitless mode of this solution in a gas chromatograph (Thermo trace GC ultra) equipped with non-polar column VB-5 (60 m \times 0.25 mm internal diameter; film thickness 0.25 μm). The samples were analyzed under the following conditions: initial temperature of 40 $^{\circ}\text{C}$ (maintained for 2 min), heating ramp of 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and final temperature of 230 $^{\circ}\text{C}$, which was maintained for 5 min. The carrier gas used was nitrogen, at a constant flow of 1 mL per minute and the injector temperature was maintained at 250 $^{\circ}\text{C}$. The compounds eluted from the chromatographic column were detected using flame burners (FID) at 250 $^{\circ}\text{C}$.

4.4. Ex Vivo Assays and Pharmacological Tests

According to the Normative Resolution Conceca n $^{\circ}$ 30, on 2 February 2016, cadavers and their parts, originating from the activities of slaughterhouses, butchers or rural producers for consumption, are exempt from going through the Commission for Animal Use and Experimentation (Comissão de uso e Experimentação Animal—CEUA).

Adult swine (*Sus scrofa domesticus*) coronary arteries were obtained from a local slaughterhouse (Frigorífico Industrial do Carir—Leandro Bezerra located at Av. Paulo Maia n $^{\circ}$ 2000, São José district, Juazeiro do Norte—Ceará, Brazil).

During transport to the laboratory, the coronaries were placed in a modified Tyrode (TM or Tyrode) nutrient solution at 4 $^{\circ}\text{C}$ with the following composition in mM: (136.0 NaCl; 5.0 KCl; 0.98 MgCl $_2$; 0.36 NaH $_2$ PO $_4$; 11.9 NaHCO $_3$; 2.0 CaCl $_2$ and 5.5 glucose). The pH was adjusted to 7.4 with 1 M HCl and/or 1 M NaOH. The coronaries were dissected and sectioned into rings measuring between 4 and 5 mm in length. The coronary rings were kept in an isolated organ bath with a 10 mL capacity for the Tyrode nutrient solution, maintained under continuous aeration by air bubbling and a temperature of 37 $^{\circ}\text{C}$. The contractile activity measurements for the tissues were recorded using a rod connected to a force transducer (TRI, model 210, Panlab, Spain), coupled to a differential amplifier (DATAQ, model PM-1000, Akron, OH, USA), with input to a digital analog converter board (DATAQ DI-200) installed on a computer, whose collected data were converted into traces and stored into files using the WINDAQ software (DATAQ Instruments, Inc. Akron, OH, USA). The isolated coronary rings were subjected to a 1 gf (gram force) tension and acclimatized for a period of 1 h. All protocols started with two subsequent contractions reproduced by the addition of 60 mM KCl (K60) to the studied coronary rings, in a hypertonic manner, where after reaching stable values, a plateau, the maximum response obtained was considered the maximum contraction of the ring. Only experiments with reproducible contractions were considered viable for the experimental series.

All experiments were performed in triplicates, accompanied by their control, which was subjected to the same conditions and the same experimental protocols. The control preparations received only the vehicle, Tween, diluted in Tyrode's solution, in the same proportions used in the experimental preparations.

4.5. Toxicity Test with the *Drosophila melanogaster* Alternative Model

4.5.1. *Drosophila* Stock and Culture

D. melanogaster (Harwich strain) flies were obtained from the National Species Stock Center, Bowling Green, OH. The flies were raised in 330 mL glass bottles (15 cm in height

and 6.5 cm in diameter), cultured with a medium containing: (83% corn mass, 4% sugar, 4% lyophilized milk, 4% soy bran, 4% wheat bran and 1% salt), 1 g of Nipagin (Methylparaben) and 1 mL of a solution containing *Saccharomyces cerevisiae*. The flies were kept at a temperature of 25 °C with a relative humidity of 60% [23]. All experiments were performed with the same strain.

4.5.2. *D. melanogaster* Assays and Essential Oil Exposure

Fly exposure to the essential oil was performed using the fumigation protocol as described: 20 adult flies (male and female) were placed in 130 cm³ flasks, containing a filter paper soaked with 20% sucrose in distilled water at the bottom. A filter paper (1 cm²) was attached to the inside of the bottle's screw cap to apply different doses of the essential oil. In doing so, the flies feed on the sucrose solution at the bottom of the flasks while the essential oil is allowed to volatilize from the top and reached the fly's respiratory system. The bottles received the following treatments: 1% sucrose (control) and 1, 2 or 4 µg/mL of the essential oil or the tested constituent. Fly survival readings were taken every hour until the eighth hour. The results are shown as the number of live flies (mean ± SD) obtained from six independent experiments.

4.5.3. Locomotor Assay

Locomotor capacity was evaluated following the negative geotaxis behavior as described by S. Boutkhil et al. [24], with some modifications. Twenty adult flies (1–4 days old, males and females) were exposed to the essential oil as described in the previous section. Briefly, after the hourly fly mortality count, a negative geotaxis test was performed simultaneously with the surviving flies, where this consisted of counting the number of flies that rise above 5 cm in the glass column of the experiment itself, during a 5 s time interval. The tests were repeated five times with 1 min intervals. The results are presented as the number of flies that reached the top ± SD obtained from three independent experiments.

4.6. Statistical Analysis

Data are expressed as the mean ± S.E.M. For statistical analysis and graph production, the Sigma Plot 11.0 software was used for the ex vivo assays using a one-way ANOVA followed by Holm-Sidak, and the GraphPad Prism 7.0 software for the other tests. Results considered statistically significant obtained a null hypothesis probability of less than 5% ($p < 0.05$). Student's *t*-tests and analysis of variance (two-way ANOVA), followed by Tukey's *t*-test were used. For calculating the EC₅₀ values, logarithmic interpolation and sigmoidal regression were performed, with the concentration capable of producing 50% of the maximum effect being considered as the EC₅₀, with the calculations being performed for each experiment.

5. Conclusions

The *Sus scrofa domestica* coronary artery ex vivo muscle contractility methodology has shown the relaxant activity of both the EODa and its major compound on smooth muscle contractions induced by potassium and serotonin. The EODa composition revealed the presence of oxygenated terpenes, which are capable of promoting toxic effects in insects from a low concentration, in addition to inducing a precocious impairment in fly mobility, which creates a difficulty in dispersing these insects. The above makes the EODa a potential product for carrying out necessary studies on the safety of these compounds for humans, both for its myorelaxant action on the vascular system, and its toxicity for cultivating crops, with the possibility of developing formulations with more effective, safe and attractive cost benefits.

Author Contributions: Conceptualization, L.J.d.L.N. and F.A.B.d.C.; methodology, L.J.d.L.N., J.G.M.d.C. and F.A.B.d.C.; validation, J.H. and G.K.; formal analysis, J.H. and G.K.; investigation, L.J.d.L.N., A.G.B.R., R.E.R.d.S., F.M.S., L.B.R.D., L.P.-d.-M., R.H.S.d.C.; resources, L.J.d.L.N., A.G.B.R., R.E.R.d.S., F.M.S., L.B.R.D., L.P.-d.-M. and R.H.S.d.C.; data curation, L.J.d.L.N.; writing—original

draft preparation, L.J.d.L.N.; writing—review and editing, R.B., H.D.M.C., R.K. and F.A.B.d.C.; supervision, R.B., H.D.M.C., R.K. and F.A.B.d.C.; project administration, F.A.B.d.C.; funding acquisition, F.A.B.d.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico—FUNCAP (BP3-0139-00077.01.00/18). Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES and Geopark Araripe.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico—FUNCAP (BP3-0139-00077.01.00/18). Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES and Geopark Araripe.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Sample Availability: Not available.

References

- Gruber, F.P.; Hartung, T. Alternatives to animal experimentation in basic research. *ALTEX* **2004**, *21* (Suppl. 1), 3–31. [\[PubMed\]](#)
- Doke, S.K.; Dhawale, S.C. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharm. J.* **2015**, *23*, 223–229. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hamm, J.; Sullivan, K.; Clippinger, A.J.; Strickland, J.; Bell, S.; Bhatarai, B.; Blaauboer, B.; Casey, W.; Dorman, D.; Forsby, A.; et al. Alternative approaches for identifying acute systemic toxicity: Moving from research to regulatory testing. *Toxicol. Vitr.* **2017**, *41*, 245–259. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mwanauta, R.W.; Mtei, K.A.; Ndakidemi, P.A. Prospective Bioactive Compounds from *Vernonia amygdalina*, *Lippia javanica*, *Dysphania ambrosioides* and *Tithonia diversifolia* in Controlling Legume Insect Pests. *Agric. Sci.* **2014**, *5*, 1129–1139. [\[CrossRef\]](#)
- Aumeeruddy-Elalfi, Z.; Mahomoodally, F. Essential oils and nanoemulsions alternative tool to biofilm eradication. In *Essential Oils and Nanotechnology for Treatment of Microbial Diseases*; Rai, M., Zacchino, S., Derita, M.G., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA; CRC Press/Taylor & Francis Group: Milton Park, UK, 2017; pp. 159–174, ISBN 9781351806077.
- De Lavor, É.M.; Fernandes, A.W.C.; de Andrade Teles, R.B.; Leal, A.E.B.P.; de Oliveira Júnior, R.G.; Gama e Silva, M.; De Oliveira, A.P.; Silva, J.C.; de Moura Fontes Araújo, M.T.; Coutinho, H.D.M.; et al. Essential Oils and Their Major Compounds in the Treatment of Chronic Inflammation: A Review of Antioxidant Potential in Preclinical Studies and Molecular Mechanisms. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 6468593. [\[CrossRef\]](#)
- Simões, R.R.; dos Santos Coelho, L.; Junqueira, S.C.; Pigatto, G.R.; Salvador, M.J.; Santos, A.R.S.; de Faria, F.M. Oral treatment with essential oil of *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae) reduces acute pain and inflammation in mice: Potential interactions with transient receptor potential (TRP) ion channels. *J. Ethnopharmacol.* **2017**, *200*, 8–15. [\[CrossRef\]](#)
- Lorenzi, H.; Matos, F.J. *Plantas Medicinais No Brasil: Nativas e Exóticas*, 2nd ed.; Instituto Plantarum: Nova Odessa, Brazil, 2002.
- Pavela, R.; Maggi, F.; Lupidi, G.; Mbuntcha, H.; Woguemu, V.; Womeni, H.M.; Barboni, L.; Tapondjou, L.A.; Benelli, G. *Clausena anisata* and *Dysphania ambrosioides* essential oils: From ethno-medicine to modern uses as effective insecticides. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 10493–10503. [\[CrossRef\]](#)
- Zohra, T.; Ovais, M.; Khalil, A.T.; Qasim, M.; Ayaz, M.; Shinwari, Z.K. Extraction optimization, total phenolic, flavonoid contents, HPLC-DAD analysis and diverse pharmacological evaluations of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. *Nat. Prod. Res.* **2019**, *33*, 136–142. [\[CrossRef\]](#)
- Araujo, I.B.; Souza, C.A.M.; De-Carvalho, R.R.; Kuriyama, S.N.; Rodrigues, R.P.; Vollmer, R.S.; Alves, E.N.; Paumgarten, F.J.R. Study of the embryofetotoxicity of α -terpinene in the rat. *Food Chem. Toxicol.* **1996**, *34*, 477–482. [\[CrossRef\]](#)
- Baldissera, M.D.; Souza, C.F.; Dolci, G.S.; Grandó, T.H.; Sagrillo, M.R.; Vaucher, R.A.; da Luz, S.C.A.; Silveira, S.O.; Duarte, M.M.M.F.; Duarte, T.; et al. Monoterpene α -terpinene induced hepatic oxidative, cytotoxic and genotoxic damage is associated to caspase activation in rats. *J. Appl. Biomed.* **2017**, *15*, 187–195. [\[CrossRef\]](#)
- Baldissera, M.D.; Souza, C.F.; Grandó, T.H.; Sagrillo, M.R.; De Brum, G.F.; Nascimento, K.; Peres, D.S.; Maciel, M.F.; Silveira, S.O.; Da Luz, S.C.A.; et al. Memory deficit, toxic effects and activity of Na^+ , K^+ -ATPase and NTPDase in brain of Wistar rats submitted to orally treatment with α -terpinene. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2016**, *46*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
- Rodrigues, M.S.A.C.; Silva, A.C.; Aguiar, A.P.; Grande, N.R. The coronary circulation of the pig heart: Comparison with the human heart. *Eur. J. Anat.* **2021**, *9*, 67–87.
- Goodwill, A.G.; Noblet, J.N.; Sassoon, D.; Fu, L.; Kassab, G.S.; Schepers, L.; Herring, B.P.; Rottgen, T.S.; Tune, J.D.; Dick, G.M. Critical contribution of Kv1 channels to the regulation of coronary blood flow. *Basic Res. Cardiol.* **2016**, *111*, 1–13. [\[CrossRef\]](#)
- Grover, A.K. Sodium-Calcium Exchanger in Pig Coronary Artery. In *Advances in Pharmacology*; Academic Press Inc.: Cambridge, MA, USA, 2017; Volume 78, pp. 145–170.

17. Lawandy, I.; Liu, Y.; Shi, G.; Zhang, Z.; Scrimgeour, L.A.; Pavlov, V.; Jaworski, R.; Sellke, F.W.; Feng, J. Increased coronary arteriolar contraction to serotonin in juvenile pigs with metabolic syndrome. *Mol. Cell. Biochem.* **2019**, *461*, 57–64. [\[CrossRef\]](#)
18. Bell, D.R.; Goehenaur, K. Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *J. Appl. Physiol.* **2006**, *100*, 1164–1170. [\[CrossRef\]](#)
19. Auger, C.; Pollet, B.; Arnold, C.; Marx, C.; Schini-Kerth, V.B. Great heterogeneity of commercial fruit juices to induce endothelium-dependent relaxations in isolated porcine coronary Arteries: Role of the phenolic content and composition. *J. Med. Food* **2015**, *18*, 128–136. [\[CrossRef\]](#)
20. Elle, R.E.; Defraigne, J.-O.; Schini-kerth, V.; Pollet, B.; Augier, C.; Kevers, C.; Tabart, J.; Pincemail, J. Ex-vivo vasorelaxation induced by polyphenol-rich extracts from plant, fruits and berries on porcine coronary artery rings. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *120*, 580. [\[CrossRef\]](#)
21. Tabart, J.; Auger, C.; Kevers, C.; Dommès, J.; Pollet, B.; Defraigne, J.O.; Schini-Kerth, V.B.; Pincemail, J. The potency of commercial blackcurrant juices to induce relaxation in porcine coronary artery rings is not correlated to their antioxidant capacity but to their anthocyanin content. *Nutrition* **2018**, *51–52*, 53–59. [\[CrossRef\]](#)
22. Wu, H.C.; Horng, C.T.; Tsai, S.C.; Lee, Y.L.; Hsu, S.C.; Tsai, Y.J.; Tsai, F.J.; Chiang, J.H.; Kuo, D.H.; Yang, J.S. Relaxant and vasoprotective effects of ginger extracts on porcine coronary arteries. *Int. J. Mol. Med.* **2018**, *41*, 2420–2428. [\[CrossRef\]](#)
23. Pereira-de-Morais, L.; de Alencar Silva, A.; da Silva, R.E.R.; Navarro, D.M.D.A.F.; Coutinho, H.D.M.; de Menezes, I.R.A.; Kerntopf, M.R.; da Cunha, F.A.B.; Leal-Cardoso, J.H.; Barbosa, R. Myorelaxant action of the *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants essential oil and its major constituent α -terpinene in isolated rat trachea. *Food Chem.* **2020**, *325*, 126923. [\[CrossRef\]](#)
24. Boutkhil, S.; El Idrissi, M.; Amechrouq, A.; Chbicheb, A.; Chakir, S.; El Badaoui, K. Chemical composition and antimicrobial activity of crude, aqueous, ethanol extracts and essential oils of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. *Acta Bot. Gall.* **2009**, *156*, 201–209. [\[CrossRef\]](#)
25. Chu, S.S.; Feng Hu, J.; Liu, Z.L. Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Pest Manag. Sci.* **2011**, *67*, 714–718. [\[CrossRef\]](#)
26. Johnson, M.A.; Croteau, R. Biosynthesis of ascaridole: Iodide peroxidase-catalyzed synthesis of a monoterpene endoperoxide in soluble extracts of *Chenopodium ambrosioides* fruit. *Arch. Biochem. Biophys.* **1984**, *235*, 254–266. [\[CrossRef\]](#)
27. Rudbäck, J.; Bergström, M.A.; Börje, A.; Nilsson, U.; Karlberg, A.-T. α -Terpinene, an antioxidant in tea tree oil, autoxidizes rapidly to skin allergens on air exposure. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 713–721. [\[CrossRef\]](#)
28. Bolton, T.B.; Prestwich, S.A.; Zhokos, A.V.; Gordienko, D.V. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. *Annu. Rev. Physiol.* **1999**, *61*, 85–115. [\[CrossRef\]](#)
29. Catterall, W.A. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a003947. [\[CrossRef\]](#)
30. Clelland, L.J.; Browne, B.M.; Alvarez, S.M.; Miner, A.S.; Ratz, P.H. Rho-kinase inhibition attenuates calcium-induced contraction in β -escin but not Triton X-100 permeabilized rabbit femoral artery. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **2011**, *32*, 77–88. [\[CrossRef\]](#)
31. Menezes, P.M.N.; Brito, M.C.; de Paiva, G.O.; dos Santos, C.O.; de Oliveira, L.M.; de Araújo Ribeiro, L.A.; de Lima, J.T.; Lucchese, A.M.; Silva, F.S. Relaxant effect of *Lippia origanoides* essential oil in guinea-pig trachea smooth muscle involves potassium channels and soluble guanylyl cyclase. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *220*, 16–25. [\[CrossRef\]](#)
32. Hille, B. *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed.; Sinauer: Sunderland, MA, USA, 2001; Volume 507.
33. Jackson, W.F.; Boerman, E.M. Voltage-gated Ca^{2+} channel activity modulates smooth muscle cell calcium waves in hamster cremaster arterioles. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2018**, *315*, H871–H878. [\[CrossRef\]](#)
34. Morgado, M.; Cairrão, E.; Santos-Silva, A.J.; Verde, I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, *69*, 247–266. [\[CrossRef\]](#)
35. Pelaia, G.; Renda, T.; Gallelli, L.; Vatrella, A.; Busceti, M.T.; Agati, S.; Caputi, M.; Cazzola, M.; Maselli, R.; Marsico, S.A. Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: Implications for asthma. *Respir. Med.* **2008**, *102*, 1173–1181. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Sadraei, H.; Ghannadi, A.; Malekshahi, K. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. *Fitoterapia* **2003**, *74*, 445–452. [\[CrossRef\]](#)
37. Ribeiro, T.F.; Da Silva, R.E.R.; de Moraes, L.P.; Carvalho, P.M.M.; Macêdo, C.A.F.; Silva, A.A.; Menezes, I.R.A.; Barbosa, R.; Kerntopf, M.R. Effect of the *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its main constituents, citral and limonene, on the tracheal smooth muscle of rats. *Biotechnol. Rep.* **2017**, *17*, 31–34. [\[CrossRef\]](#)
38. Jarvis, G.E.; Barbosa, R.; Thompson, A.J. Noncompetitive inhibition of 5-HT₃ receptors by citral, linalool, and eucalyptol revealed by nonlinear mixed-effects modeling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2016**, *356*, 549–562. [\[CrossRef\]](#)
39. Assaidi, A.; Legssyer, A.; Berrichi, A.; Aziz, M.; Mekhfi, H.; Bnouham, M.; Ziyat, A. Hypotensive property of *Chenopodium ambrosioides* in anesthetized normotensive rats. *J. Complement. Integr. Med.* **2014**, *11*, 1–7. [\[CrossRef\]](#)
40. Pinho, A.I.; Wallau, G.L.; Nunes, M.E.M.; Leite, N.F.; Tintino, S.R.; da Cruz, L.C.; da Cunha, F.A.B.; da Costa, J.G.M.; Douglas Melo Coutinho, H.; Posser, T. Fumigant activity of the *Psidium guajava* var. *pomifera* (Myrtaceae) essential oil in *Drosophila melanogaster* by means of oxidative stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*, 696785. [\[CrossRef\]](#)
41. Soares, M.H.; Dias, H.J.; Vieira, T.M.; de Souza, M.G.M.; Cruz, A.F.F.; Badoco, F.R.; Nicoletta, H.D.; Cunha, W.R.; Groppo, M.; Martins, C.H.G.; et al. Chemical Composition, Antibacterial, Schistosomicidal, and Cytotoxic Activities of the Essential Oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (Chenopodiaceae). *Chem. Biodivers.* **2017**, *14*, e1700149. [\[CrossRef\]](#)

42. Arena, J.S.; Omarini, A.B.; Zunino, M.P.; Peschiutta, M.L.; Defagó, M.T.; Zygadlo, J.A. Essential oils from *Dysphania ambrosioides* and *Tagetes minuta* enhance the toxicity of a conventional insecticide against *Alphitobius diaperinus*. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *122*, 190–194. [[CrossRef](#)]
43. Da 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.; et al. *Eugenia uniflora* leaves essential oil induces toxicity in *Drosophila melanogaster*: Involvement of oxidative stress mechanisms. *Toxicol. Res.* **2015**, *4*, 634–644. [[CrossRef](#)]
44. Adedara, L.A.; Abolaji, A.O.; Rocha, J.B.T.; Farombi, E.O. Diphenyl Diselenide Protects Against Mortality, Locomotor Deficits and Oxidative Stress in *Drosophila melanogaster* Model of Manganese-Induced Neurotoxicity. *Neurochem. Res.* **2016**, *41*, 1430–1438. [[CrossRef](#)]
45. Jiang, Z.; Akhtar, Y.; Bradbury, R.; Zhang, X.; Isman, M.B. Comparative toxicity of essential oils of *Litsea pungens* and *Litsea cubeba* and blends of their major constituents against the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4833–4837. [[CrossRef](#)]
46. Paes, J.P.P.; Rondelli, V.M.; Costa, A.V.; Vianna, U.R.; De Queiroz, V.T. Chemical characterization and effect of the essential oil from santa-maria herb on the strawberry mite. *Rev. Bras. Frutic.* **2015**, *37*, 346–354. [[CrossRef](#)]
47. Zhang, Z.; Yang, T.; Zhang, Y.; Wang, L.; Xie, Y. Fumigant toxicity of monoterpenes against fruitfly, *Drosophila melanogaster*. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *81*, 147–151. [[CrossRef](#)]
48. Omolo, M.O.; Okinyo, D.; Ndiege, L.O.; Lwande, W.; Hassanali, A. Fumigant toxicity of the essential oils of some African plants against *Anopheles gambiae* sensu stricto. *Phytomedicine* **2005**, *12*, 241–246. [[CrossRef](#)]
49. Lacerda-Neto, L.J.; Barbosa, A.G.; Quintans-Junior, L.J.; Coutinho, H.D.; da Cunha, F.A. The complex pharmacology of natural products. *Future Med. Chem.* **2019**, *11*, 797–799. [[CrossRef](#)]
50. Abolaji, A.O.; Kamdem, J.P.; Lugokenski, T.H.; Farombi, E.O.; Souza, D.O.; da Silva Loreto, É.L.; Rocha, J.B.T. Ovotoxicants 4-vinylcyclohexene 1, 2-monoepoxide and 4-vinylcyclohexene diepoxide disrupt redox status and modify different electrophile sensitive target enzymes and genes in *Drosophila melanogaster*. *Redox Biol.* **2015**, *5*, 328–339. [[CrossRef](#)]
51. Medeiros, E.; Prigol, M.; Alves, D.; do Sacramento, M.; Musachio, E.A.S.; de Freitas Couto, S. Assessment of toxicity of compound 4-phenylselenenyl-7-chloroquinoline and its changes in the fruit fly model *Drosophila melanogaster*. *An. Salão Int. Ensino Pesqui. Extensão* **2018**, *9*, 56–56.
52. Brunner, F.; Kühberger, E.; Groschner, K.; Poch, G.; Kukovetz, W.R. Characterization of muscarinic receptors mediating endothelium-dependent relaxation of bovine coronary artery. *Eur. J. Pharmacol.* **1991**, *200*, 25–33. [[CrossRef](#)]
53. Obi, T.; Kabeyama, A.; Nishio, A. Characterization of muscarinic receptor subtype mediating contraction and relaxation in equine coronary artery in vitro. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **1994**, *17*, 226–231. [[CrossRef](#)]
54. Bruder-Nascimento, T.; Campos, D.H.S.; Cicogna, A.C. Chronic stress improves NO- and Ca²⁺ flux-dependent vascular function: A pharmacological study. *Arq. Bras. Cardiol.* **2015**, *104*, 226–233. [[CrossRef](#)]
55. Storch, A.S.; Mattos, J.D.D.; Alves, R.; Galdino, L.D.S.; Rocha, H.N.M. Methods of Endothelial Function Assessment: Description and Applications. *Int. J. Cardiovasc. Sci.* **2017**, *30*. [[CrossRef](#)]
56. Hanna, M.E.; Bednářová, A.; Rakshit, K.; Chaudhuri, A.; O'Donnell, J.M.; Krishnan, N. Perturbations in dopamine synthesis lead to discrete physiological effects and impact oxidative stress response in *Drosophila*. *J. Insect Physiol.* **2015**, *73*, 11–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. De-Oliveira, A.C.A.X.; Ribeiro-Pinto, L.F.; Paumgarten, F.J.R. In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by β -myrcene and other monoterpenoid compounds. *Toxicol. Lett.* **1997**, *92*, 39–46. [[CrossRef](#)]
58. Sanchez-Hernandez, J.C.; Sanchez, B.M. Lizard cholinesterases as biomarkers of pesticide exposure: Enzymological characterization. *Environ. Toxicol. Chem.* **2002**, *21*, 2319–2325. [[CrossRef](#)]
59. Kavitha, P.; Rao, J.V. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2007**, *87*, 182–188. [[CrossRef](#)]
60. Sharma, A.; Mishra, M.; Shukla, A.K.; Kumar, R.; Abidin, M.Z.; Chowdhuri, D.K. Organochlorine pesticide, endosulfan induced cellular and organismal response in *Drosophila melanogaster*. *J. Hazard. Mater.* **2012**, *221*, 275–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Ramin, M.; Azizi, P.; Motamedi, F.; Khodaghali, F.; Haghparast, A.; Fatahi, Z.; Alamdary, S.Z. Inhibition of JNK phosphorylation reverses memory deficit induced by β -amyloid (1–42) associated with decrease of apoptotic factors. *Behav. Brain Res.* **2014**, *266*, 222. [[CrossRef](#)]
62. Wei, H.; Liu, J.; Li, B.; Zhan, Z.; Chen, Y.; Tian, H.; Lin, S.; Gu, X. The toxicity and physiological effect of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* against the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Prot.* **2015**, *76*, 68–74. [[CrossRef](#)]

Microbial Pathogenesis
Alpha-terpinene as an antibacterial agent, enhancing the effectiveness of antibiotics and lethality in dipterans.
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	VSI:Advances in Micro. Path
Keywords:	antibacterial; toxicity; alfa-terpinene; resistance
Corresponding Author:	Luiz Jardelino de Lacerda Neto BRAZIL
First Author:	Luiz Jardelino de Lacerda Neto
Order of Authors:	Luiz Jardelino de Lacerda Neto Andreza Guedes Barbosa Ramos Thiago Sampalo de Freitas Janaína Esmeraldo Rocha Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa Dárcio Luiz de Sousa Júnior Nair Silva Macedo Zildene de Sousa Silveira Lucindo José Quintans Júnior Irwin Rose Alencar de Menezes Henrique Douglas Melo Coutinho Francisco Assis Bezerra da Cunha
Abstract:	<p>α-Terpinene is a monoterpene derived from the secondary metabolism of plants, and is known for its antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer properties. The present work aimed to verify the antibacterial activity of α-Terpinene against <i>Staphylococcus aureus</i> strains, as well as the ability to modify the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of antibiotics and Ethidium Bromide (EtBr), including the inhibition of efflux pumps, and toxicity against <i>Drosophila melanogaster</i>. By performing microdilution tests, it was determined an MIC \geq 1024 μg/mL for α-Terpinene; it was also observed its inability to inhibit the efflux pumps involved in the assays. However, α-Terpinene was able to reduce the MIC of the norfloxacin, ciprofloxacin and oxacillin antibiotics against the strains 1199B, K2068 and K4100, respectively. Fumigation assays were effective in demonstrating lethality with a mean lethal concentration (LC 50) of 22.8 μg/L of air, and the damage to the locomotor apparatus. Consequently, as a natural product, α-Terpinene inspires further studies regarding its use associated with norfloxacin, ciprofloxacin, and oxacillin; including the toxic effect against <i>Drosophila melanogaster</i>.</p>
Suggested Reviewers:	Radosław Kowalski radoslaw.kowalski@up.lublin.pl Marcello Irti marcello.irti@unimi.it Datiane Morais datianemorais@hotmail.com
Opposed Reviewers:	

Cover Letter

Cover Letter

Dear editor, I would like to submit to be evaluated by the referees of **MICROBIAL PATHOGENESIS** the **ARTICLE** entitled **Alpha-terpinene as an antibacterial agent, enhancing the effectiveness of antibiotics and lethality in dipterans**. I affirm that all authors are according with this submission, that this article is not being considered for publication elsewhere and that the copyright will be under authorization of the publisher. There is no conflict of interest of any author. This article is according with to the international, national and institutional rules considering biodiversity rights. On behalf all other authors, I affirm that all agree with this submission.

LUIZ JARDELINO DE LACERDA NETO
FRANCISCO ASSIS BEZERRA DA CUNHA
Corresponding authors

Alpha-terpinene as an antibacterial agent, enhancing the effectiveness of antibiotics and lethality in dipterans.

Luiz Jardelino de Lacerda Neto^{1,3}, Andreza Guedes Barbosa Ramos³, Thiago Sampaio de Freitas^{2,3}, Janaina Esmeraldo Rocha^{2,3}, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa^{2,3}; Dárcio Luiz de Sousa Júnior^{1,3}, Nair Silva Macedo¹, Zildene de Sousa Silveira¹, Lucindo José Quintans Júnior³, Irwin Rose Alencar de Menezes³, Henrique Douglas Melo Coutinho^{2,3*}; Francisco Assis Bezerra da Cunha^{1,3};

¹ Laboratory of Semi-Arid Bioprospecting (LABSEMA), Regional University of Cariri - URCA, Crato, CE, Brazil.; luizjardelino@gmail.com (L.J.L.N.); andrezaurca@gmail.com (A.G.B.R.); darciolsjr@gmail.com (D.L.S.J.); nairmacedo@gmail.com (N.S.M), zildenesousa15@gmail.com (Z.S.S.), cunha.urca@gmail.com (D.A.B.C.);

² Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Regional University of Cariri - URCA, Crato, CE, Brazil. thiagocrato@hotmail.com (T.S.F.); cristinase75@gmail.com (C.R.S.B.); janaimaesmeraldo@gmail.com (J.E.R.)

³ Graduate Program in Biological Chemistry - Regional University of Cariri; lucindojr@gmail.com (L.J.Q.J.) irwinalencar@yahoo.com.br (I.R.A.M.)

* Correspondence: hdmcoutinho@gmail.com

Abstract

α -Terpinene is a monoterpene derived from the secondary metabolism of plants, and is known for its antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer properties. The present work aimed to verify the antibacterial activity of α -Terpinene against *Staphylococcus aureus* strains, as well as the ability to modify the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of antibiotics and Ethidium Bromide (EtBr), including the inhibition of efflux pumps, and toxicity against *Drosophila melanogaster*. By performing microdilution tests, it was determined an MIC $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ for α -Terpinene; it was also observed its inability to inhibit the efflux pumps involved in the assays. However, α -Terpinene was able to reduce the MIC of the norfloxacin, ciprofloxacin and oxacillin antibiotics against the strains 1199B, K2068 and K4100, respectively. Fumigation assays were effective in demonstrating lethality with a mean lethal concentration (LC₅₀) of 22.8 $\mu\text{g/L}$ of air, and the damage to the locomotor apparatus. Consequently, as a natural product, α -Terpinene inspires further studies regarding its use associated with norfloxacin, ciprofloxacin, and oxacillin; including the toxic effect against *Drosophila melanogaster*.

Keywords: antibacterial, toxicity, alfa-terpinene, resistance.

1 Introduction

The secondary metabolites of plants have been increasingly studied in an attempt to discover substances with relevant biological activities, and less toxic or environmental contamination. Thus, and once more, natural products are at the vanguard among the searches for compounds with applicability to human welfare, whether in medicine, agriculture, or by allowing safer use, both toxically and environmentally. These compounds can be present in extracts and/or essential oils from many different parts of plants, ranging from roots to fruits. Furthermore, they can be separate from these plant drugs with the possibility to be used as isolated drugs with a defined chemical structure, which would naturally be pharmacon [1–4].

In addition to toxicological and environmental security of natural compounds used to promote human welfare, another concern that should guide research into the use of these constituents is the development of resistance, which comes mainly from the prolonged and indiscriminate use of substances in order to eliminate or control the proliferation of specific organisms, whether bacteria or insects. Thus, nowadays several compounds that were once efficient in fighting these organisms have partly or completely lost their effectiveness. Among the strategies to confront this resistance, it can be mentioned the development of new products, especially those of natural origin, and the association with products that have lost their effectiveness [5–7].

Bacterial resistance has been one of the biggest challenges in the development of new antibiotics [8]. As a result, the *Staphylococcus aureus* bacterium is greatly and clinically important, since it is resistant to most of antibiotics currently available. This resistance can be the result of several mechanisms; however, efflux pumps take a prominent role among these mechanisms, once they can extrude the antibiotic out of the bacterial cell [9,10].

The experimental model *Drosophila melanogaster* has been broadly used to determine the insecticidal activity of natural products, for it is easy to handle, and, additionally, for having a low cost. Also, it can be easily used to determine the lethal concentration and damage to the locomotor apparatus of the fly; therefore, it is possible to indicate a potential toxic or repellent effect on this diptera [11]. Moreover, this species has many ortholog genes in comparison to human genes related to homeostasis; thereby, it is an important tool for studies on toxicity, which is apt to clarify some unanswered questions about some diseases [12].

Moreover, this species has many ortholog genes in comparison to human genes related to homeostasis; thereby, it is an important tool for studies on toxicity, which is apt to clarify some unanswered questions about some diseases [11,13,14].

α -terpinene (1-isopropyl-4-methyl-1,3-cyclohexadiene) is a monoterpene derived from the secondary metabolism of plants, which is present, for instance, in the essential oil of *Dysphania ambrosioides*. This compound proves to be attractive, because it has several activities such as antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer, besides being used as a fragrance in the cosmetic and food industries due to its odor [15–19].

Generally, Terpenes have been shown antibacterial activities and toxic effects against insects [20]. Studies have shown toxic potential against *Musca domestica* by terpenes, such as linalool, citronellal, (R)-

α -pinene, 1,8-cineole, γ -terpinene, limonene, α -terpinene, (S)- β -pinene, thymol and (R)-pulegone [21]. Antibacterial activity has also been observed for terpenes, whether in isolation, or in association with antibiotics [22–24].

Therefore, this work intended to verify the α -terpinene potential as an antibacterial agent, as well as its ability to modify the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of antibiotics and Ethidium Bromide (EtBr), including the inhibition of efflux pump mechanism in *S. aureus* strains, and its toxicity potential against *Drosophila melanogaster* from fumigation tests to measure lethality and damage to the locomotor apparatus.

2 Material and Methods

2.1 Microbiological Assay

2.1.1 Drugs utilized

α -Terpinene, and Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl-hydrazone (CCCP) were purchased from SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA and Clopromazine (CPMZ) was purchased through Aché. CPMZ and EtBr were dissolved in sterile distilled water, while CCCP was dissolved in methanol / water (1:3, v/v). The antibiotics (Erythromycin, Tetracycline, Norfloxacin, Ciprofloxacin, Penicillin, and Oxacillin), as well as α -terpinene, were diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) and in sterile water. All substances were diluted to a standard concentration of 1024 $\mu\text{g/mL}$ and the proportion of DMSO used was less than 5%.

2.1.2 Microorganisms

The strains of *S. aureus* used were: 1199 wild strain, 1199B carrying the *norA* Small D gene that encodes the NorA efflux protein, resistant to hydrophilic fluoroquinolones, IS-58, endowed with the plasmid PT181 carrying the gene that expresses the efflux protein of TetK Tetracycline, K2068 strain that has the MepA pump, decoded in the *mepA* gene that confers resistance to Ciprofloxacin, K4100 strain that has the QacC pump, decoded by the *qacC* gene conferring resistance to Oxacillin, the K4414 strain that expresses the QacA/B pump, decoded by the *qacA/B* gene, which promotes resistance against Penicillin and RN4220 carrying the pUL5054 plasmid, which carries the gene that encodes the macrolide efflux MsrA protein. The strains were kindly provided by Prof. S. Gibbons (University of London) and Prof. Glenn Kaatz (Wayne State University). All strains were initially kept on blood agar to prove the type of strain (Laboratórios Difco Ltda., Brazil), then were transferred to the stock. Being kept in two stocks: one in Heart Infusion Agar (HIA, Difco) at 4 °C and the other kept in glycerol in a freezer -80 °C. The plasmid-bearing strain was maintained in the culture medium under sub-inhibitory conditions of antibiotics, with the objective of the resistance genes and plasmids to be expressed and not to be lost.

2.1.3 Antibacterial activity test by Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

For these tests, the method described by Javadpour *et al* [25] was used, using only α -terpinene to determine the MIC.

2.1.4 Efflux pump inhibition tests by modifying the MIC of the antibiotic and ethidium bromide

In order to observe whether α -terpinene acts as a potential inhibitor of the efflux mechanism, a comparative study between the effects of the standard inhibitors of the efflux pump was used, evaluating the ability of both to decrease the MIC of antibiotics and EtBr. The inhibition of the Efflux Pump was tested

using a Sub-inhibitory Concentration (CIM / 8) of the inhibitors and of the α -terpinene. In the tests, 170 μ L of each suspended bacterial inoculum in saline solution, corresponding to the Mcfarland 0.5 scale, which corresponds to 1.5×10^8 (CFU) / mL, was added to the inhibitors and α -terpinene (CIM / 8) and completed with BHI. These were then transferred to 96-well microdilution plates, to which 100 μ L of antibiotic or EtBr were added in serial dilutions (1: 1) ranging from 512 to 0.25 μ g / mL. The plates were incubated at 37 °C for 24h and bacterial growth was evaluated with resazurin (7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one) at a concentration of 400 μ g / mL. Resazurin was oxidized in the presence of acid medium caused by bacterial growth, causing the color to change from blue to pink [26]. MIC was defined as the lowest concentration at which no growth can be observed [27]. The MIC of the controls was evaluated using only microdiluted plates with antibiotics and EtBr.

2.2 *Drosophilas melanogaster*

2.2.1 *Drosophila* Stock and Culture

D. melanogaster (Harwich strain) flies were obtained from the National Species Stock Center, Bowling Green, OH. The maintenance of the flies was done as described by Lacerda Neto et al. [16].

2.2.2 Mortality assay

The tests were performed according to the method proposed by Da Cunha [28], with some modifications. Thus, 20 adult flies (male and female) were placed in 130 mL glass containers (6 cm high and 6.5 cm in diameter), containing tracing paper at the bottom previously prepared with 1mL of 20% sucrose solution, at the inside part of the container lid received filter paper where it was impregnated with α -Terpinene in concentrations of 0.75 μ g (5.77 μ g / L of air), 1 μ g (7.7 μ g / L of air), 1.5 μ g (11.54 μ g / L of air), 2 μ g (15.4 μ g / L of air), 3 μ g (23.1 μ g / L of air), 3.25 μ g (25 μ g / L of air), 3.5 μ g (26.9 μ g / L of air), 3.75 μ g (28.8 μ g / L of air), and 4 μ g (30.7 μ g / L of air). In the control group, only sucrose was added to the tracing paper. Along the entire procedure, the 12-hour light / dark cycle was maintained and temperature controlled at 26 °C and 60% relative humidity. The test was performed in triplicate where each "n" was composed of two containers. The readings for mortality checking were taken in the following hours after applying the compound to the filter paper: 1, 2, 3, 6, 9, 12, 24 and 48 hours.

2.2.3 Negative Geotaxis Assay

The damage to the locomotor system was verified through the Negative Geotaxis test described by Coulom and Birman [29]. Each group of live flies exposed to Benzaldehyde at reading times of 1, 2, 3, 6, 9, 12, 24 and 48 hours, were taken to the bottom of the containers and after 5 seconds, the number of flies that reached 5 cm height of the container were counted. The tests were repeated twice at one minute intervals. The results were presented as average time (\pm) EP obtained in two independent experiments [29].

2.3 Statistical analysis

2.3.1 Statistical analysis of microbiological results

The test results were done in triplicate and expressed in geometric average. One-way ANOVA was used for statistical analysis, followed by Tukey or Bonferroni post hoc using GraphPad Prism 5.0. In some analyzes, the T test was used.

2.3.2 Statistical analysis of toxicity results

The analysis of toxicity data was performed using a two-way ANOVA test, followed by a Tukey multiple comparison test. There was no statistical difference with the same concentration as a function of time.

3 Results

3.1 Microbiological Assay

3.1.1 Antibacterial activity test by Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The assays to determine the MIC of α -Terpinene showed an MIC value $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ against all the strains used in the assays. The MIC of each antibiotic in relation to the specific strains are described in Table 1.

Table 1: MIC of Antibiotics and α -Terpinene

STRAIN	PUMP	MIC OF ANTIBIOTICS	MIC OF ALFA-TERPINENE
1199	NorA	Norfloxacin 288 $\mu\text{g/mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$
1999B	NorA	Norfloxacin 256 $\mu\text{g/mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$
IS-58	TetK	Tetracycline 128 $\mu\text{g/mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$
RN 4220	MepA	Erythromycin $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$
K 2068	QacC	Ciprofloxacin 64 $\mu\text{g/mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$
K 4414	QacA/B	Penicillin 262 $\mu\text{g/mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$
K 4100	MsrA	Oxacilin 161 $\mu\text{g/mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$

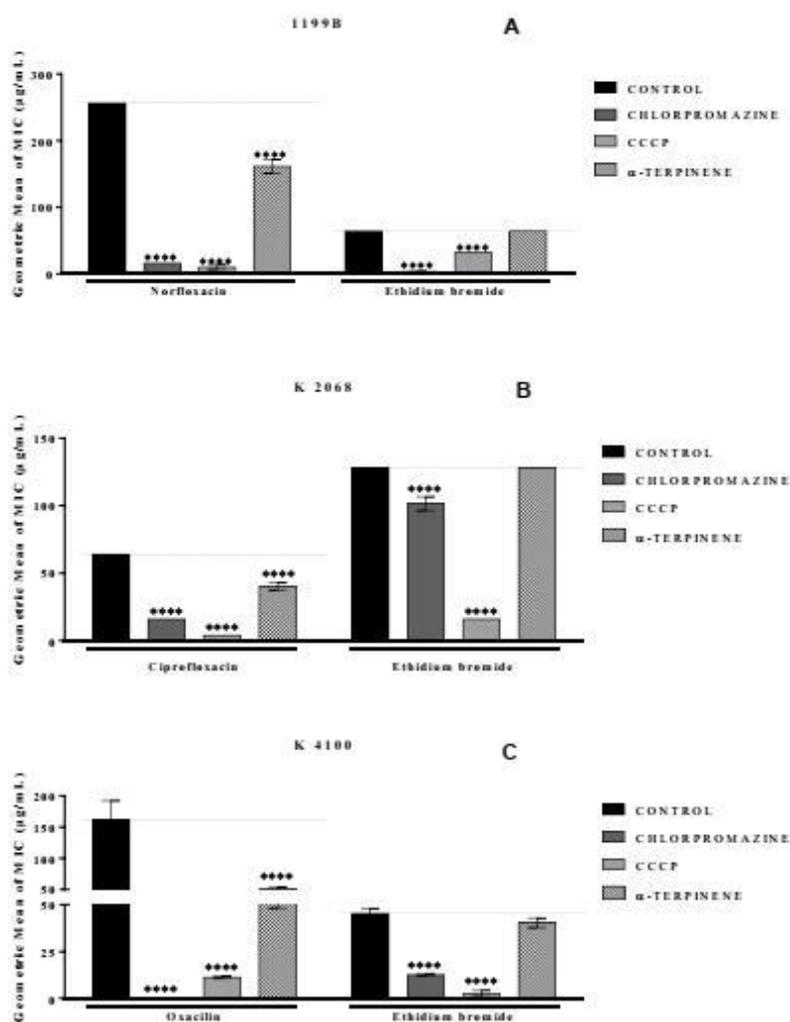
3.1.2 Efflux pump inhibition tests by modifying the MIC of the antibiotic and ethidium bromide

The comparison between the geometric mean MICs of the isolated antibiotics and the MIC of the antibiotic associated with α -Terpinene, as well as the comparison between the MIC of isolated EtBr and the MIC of EtBr in association with α -Terpinene, can reveal whether there are differences in the effective concentration of the antibiotic when associated with MIC/8 of α -Terpinene, indicating if this association alters the efficacy of the antibiotic or if α -Terpinene acts on the efflux pumps studied.

In assays with strain 1199, which is considered wild-type due to the exhibition of efflux pump (NorA) mechanism in a basement form, reductions in MIC concentration were observed from 287 $\mu\text{g/mL}$ to 228 $\mu\text{g/mL}$, and from 80 $\mu\text{g/mL}$ to 64 $\mu\text{g/mL}$ for antibiotic and BrEt, respectively. Association assays between α -Terpinene and Norfloxacin on strain 1199B, on the other hand, were responsible for reducing the MIC of the antibiotic from 80 $\mu\text{g/mL}$ to 64 $\mu\text{g/mL}$. This strain expresses the NorA pump that confers resistance to fluoroquinolones, which explains the use of Norfloxacin in this assay (Figure 1A). Our results also showed a reduction from 64 $\mu\text{g/mL}$ to 40 $\mu\text{g/mL}$ in the MIC of the antibiotic Ciprofloxacin, caused by its association with α -Terpinene on the strain K2068, carrier of the MepA efflux pump, which expresses effect on fluoroquinolones such as Ciprofloxacin (Figure 1B). For strain K4100, which expresses the QacC pump, responsible for Oxacillin extrusion, a reduction in the MIC of the antibiotic was observed due to its association with α -Terpinene, in contrast to the MIC of the antibiotic alone, with a reduction from 161 $\mu\text{g/mL}$ to 50.79 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 1C).

Figure 1: A: MIC of the antibiotic Norfloxacin isolated and in association with α -Terpinene and standard inhibitors CCCP and Chlorpromazine and MIC of EtBr isolated and in association with standard inhibitors

CCCP and Chlorpromazine and α -Terpinene on strain 1199B. B: MIC of the antibiotic ciprofloxacin alone and in association with α -Terpinene and standard inhibitors CCCP and Chlorpromazine and MIC of EtBr alone and in association with standard inhibitors CCCP and Chlorpromazine and α -Terpinene on strain K2068. C: MIC of the antibiotic Oxacillin alone and in association with α -Terpinene and standard inhibitors CCCP and Chlorpromazine and MIC of EtBr in association with standard inhibitors CCCP and Chlorpromazine and α -Terpinene on strain K4100. CCCP = carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone; **** represents statistical significance compared to control.

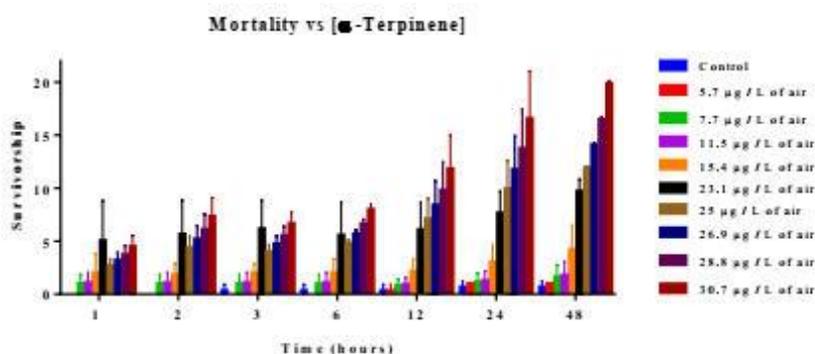


In the other assays with strains 1199B, IS-58, RN4220, K2068, K4414, and K4100, no reductions in the MIC of EtBr in association with α -Terpinene were observed compared to the MIC of EtBr alone, which is the reason for not inserting the graphs referring to these data.

3.1.3 Mortality assay

Through the mortality assay, it was demonstrated the effect of α -Terpinene on the mortality of *D. melanogaster* at concentrations of 5.77 $\mu\text{g/L}$; 7.7 $\mu\text{g/L}$; 11.54 $\mu\text{g/L}$; 15.4 $\mu\text{g/L}$; 23.1 $\mu\text{g/L}$; 25 $\mu\text{g/L}$; 26.9 $\mu\text{g/L}$; 28.8 $\mu\text{g/L}$ and 30.7 $\mu\text{g/L}$ of air (Figure 2). The results obtained showed statistical importance in concentrations $> 23.1 \mu\text{g/L}$ of air in relation to the control after 2 hours of exposure to the compound, and this effect remained until the end of the experiment. Also, it was possible to verify that the mortality rate reached 100% from the 48 hours reading at the concentration of 30.7 $\mu\text{g/L}$ of air, obtaining a LC50 value of 22.8 $\mu\text{g/L}$.

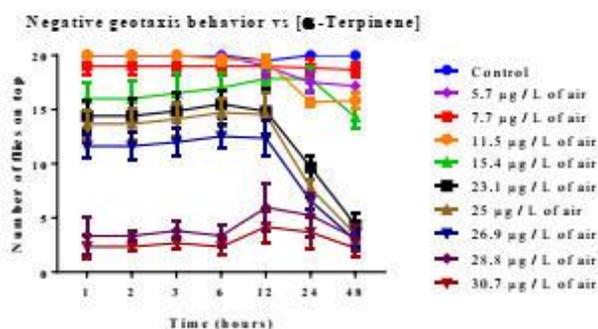
Figure 2: Mortality assays with the *Drosophila melanogaster* model against the compound α -Terpinene Negative Geotaxis Assay



3.1.4 Negative Geotaxis Assay

Our results indicate that the concentrations 15.4 $\mu\text{g/L}$ of air were able to cause damage to the locomotor apparatus of *D. melanogaster*, starting from 1h of exposure to the compound compared to the control, and this result was maintained until the last reading. The concentrations of 23.1, 25 and 26.9 $\mu\text{g/L}$ of air showed a marked reduction in the number of flies able to reach the top of the flask column after 12 h of exposure to α -Terpinene. Concentrations of 28.8 and 30.7 $\mu\text{g/L}$ of air showed similar patterns regarding the geotaxis of flies, with a reduction in the number of flies at the top of the flask after 12 h of exposure. Interestingly, between 6 and 12 h there was a recovery in the number of flies that reached the top (Figure 3).

Figure 3: Negative geotaxis assays with the *Drosophila melanogaster* model in the face of α -Terpinene.



4 Discussion

α -terpinene is a monocyclic terpene derived from cis-trans isomerization of p-menthane considered to be a mentadiene existing in several plant species (Citrus, Mentha, Juniperus, and Pinus), and associated with termite combat. In addition, it is commercially widely used as a fragrance by the pharmaceutical and perfume industries [17,22,30].

Its biological activities have been described both as an isolated constituent and as part of the essential oil composition. Essential oils which contain α -terpinene in their composition are present in *Chenopodium ambrosioides* [31,32] *Pulicaria sahiiifolia*, *Dyophania multifida* [33] and *Magnolia kwangziensis* [34]. Some activities, as antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, anticancer, and antioxidant [17,35,36], have been isolately reported.

Bacterial resistance to antibiotics is a fact of increasing concern. This resistance results from an intense interaction among bacteria as an exchange of genetic information, and from the pressure caused by the exposure of these bacteria to bactericidal substances. The main mechanisms involved in the development of resistance are: antibiotic degradation (I), antibiotic target modification (II), alteration of permeability (III), ribosomal protection (IV), biofilm production (V), and efflux pump action (VI) [37]. Among these mechanisms, the action of efflux pumps, which cause the reduction of antibiotic levels in the interior of bacteria, is considered one of the main types of resistance mechanism.

Microdilution assays provide quantitative results of substances against bacteria, such as the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), which is defined as the lowest concentration that inhibits bacterial growth [38,39]. Despite the fact that α -Terpinene is a terpene that can interfere with oxygen scavenging and oxidative phosphorylation [22], it showed MIC $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ against all tested strains, corroborating the results obtained by de Moraes Oliveira-Tintino et. al [32] and Limaverde et. al [31]. Extrapolation to clinical use shows that the MIC value needs to be 4-5 times higher to ensure the efficacy of the substance, and MIC values $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ result in high concentrations that make assessments of criteria such as dosage, target organism and its resistance, mechanisms, clinical indications, pharmacokinetic/pharmacodynamic properties, toxicity, and desired clinical outcome virtually impossible. All these criteria are necessary to determine the MIC of the clinical breakpoint, which is defined as the highest safe plasma concentration of

the substance in the patient and whether the microorganism is susceptible or resistant. These values are published and defined mainly by EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) and by CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) [40–43].

The aforementioned mechanisms used by bacteria can be reversed by using as a strategy the association of several substances with antibiotics that have reduced efficacy in order to observe their modulation by these substances and that are able to recover this efficacy, such as the association between amoxicillin and clavulanic acid [44]. The results indicated that the subinhibitory concentration of α -Terpinene in association with Norfloxacin, Ciprofloxacin and Oxacillin were able to modulate the antibiotics against strains 1199B, K2098 and K4100, respectively. Contrastingly to our results, in a previous report by Moraes Oliveira-Tintino and collaborators [32], there was no demonstrated modulation of Norfloxacin in strain 1199B. This modulation may have altered quinolone resistance by interfering with efflux pump action, changing the site of action of the antibiotic, and altering permeability [45,46]. This same explanation can be used to explain the modulation of Ciprofloxacin by α -Terpinene against K2068 strains. The antibiotic modulation results obtained for the K4100 strain, which presents resistance to Oxacillin resulting from the production of β -lactamases and the action of the QacC efflux pump, may be associated with the ability of monoterpenes, such as α -Terpinene, to interfere with cell membrane permeability, coagulase activities, enterotoxin production, and halotolerance [47,48].

Efflux pumps has an important role among the various mechanisms of antibiotic resistance, as they are responsible for reducing the intracellular availability of antibiotics, thus decreasing their efficacy. *S. aureus* is a Gram-positive bacterium with several strains with efflux pumps from different families [49]. In this study, seven *S. aureus* strains bearing different specific active efflux mechanisms were used. Efflux pump inhibitors, such as CCCP and chlorpromazine, along with BrEt are an interesting way to demonstrate the presence and inhibition of efflux pumps. Efflux pump inhibitors can interfere with pump function in five ways: (I) by preventing energy flow into the pump, as in the case of CCCP; (II) by decreasing pump expression, example chlorpromazine, (III) by preventing multicomponent pump assembly, (IV) by blocking the external channel of the pump, and (V) by generating a competitive or non-competitive inhibition with the antibiotic; another strategy that should be considered is chemical remodeling of antibiotics to the point that they are no longer substrates of the pumps [9,50]. The results of the present study showed that the association between the MIC of EtBr with α -terpinene did not differ from the control of EtBr only, and there was no modification in the MIC of EtBr for any of the strains studied, so α -terpinene does not act by either of the mechanisms cited above. Results from previous studies also showed that there was no modulation of EtBr at the NorA efflux pump of strain 1199B [32] and TetK efflux pumps of strain IS-58 by α -Terpinene [31]. Thereby, the absence of influence of α -Terpinene on efflux pumps is evident, reinforcing the understanding that this modulation presented in the MIC of antibiotics is a result of a possible interaction with the cell membrane causing its disintegration and/or intracellular coagulation, both mechanisms leading to cell death [46].

Concerning toxicity assays, it was possible to determine the LC_{50} 22.8 μ g/L of air after 48 hours of exposure to the compound. This is the concentration required to kill half of the flies exposed to α -Terpinene in the fumigation test. The study by Lacerda Neto et al [16] with α -Terpinene reports an LC_{50} of 2,282 mg/L, but the readings were limited to 8 hours. After studying 40 monoterpenes following the fumigation

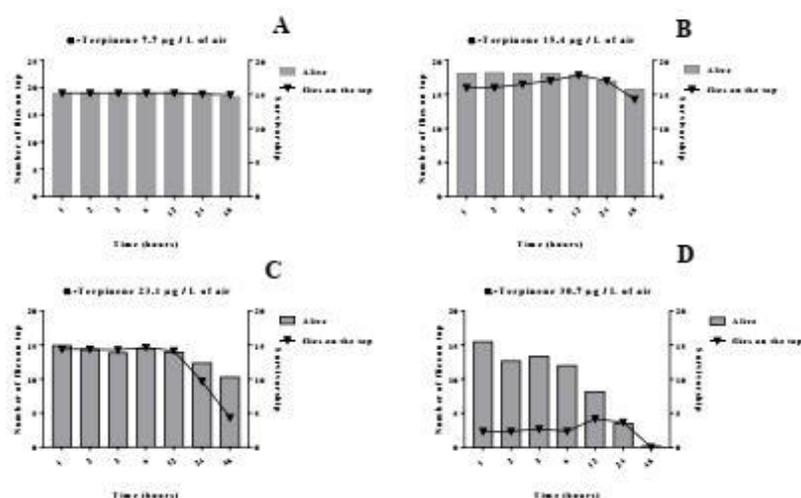
method, Zhang et al [11] determined the LC₅₀ of α -Terpinene diluted in acetone and reading at 24 hours to be 1.96 μ L/L of air, and found hydrocarbon monoterpenes to have lower insecticidal activity than oxygenated monoterpenes.

Alterations in the nervous system are the main mechanisms to promote the lethal effect of terpenes, whether alterations in signaling or regulatory pathways, such as: interference with acetylcholinesterase, nicotinic, GABA, oxytocin and tyramine receptors, [11], apart from interfering with the functioning of the CytochromeP450 system, responsible for the detoxification process [13]. Since α -Terpinene inhibits the action of acetylcholinesterase, it is evident that this compound acts in this route, interfering in the nervous system and causing the death of the insect. [51]. The simultaneous activation of two or more of the aforementioned routes is also possible, as demonstrated by the action of carvacrol and pulegone, which act on GABA and octopamine receptors [52–55].

The inhibition of acetylcholinesterase is one of the factors responsible for the decreased mobility of the fly or damage to the locomotor apparatus. Furthermore, it is possible to note that concentrations higher than 15.4 μ g/L of air alter the average number of flies able to reach the top of the flask column in the first hour of recordings when compared to the control; this suggests further investigations to elucidate the participation of enzymes capable of reducing oxidative stress such as glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), and Superoxide Dismutase (SOD), as well as target proteins involved in oxidative stress [56] in addition to the participation of acting on the nervous system [11].

The mortality results interpolation, and damage to the locomotor apparatus in concentrations of 7.7 μ g/L (Figure 4A), 15.4 μ g/L of air (Figure 4B), 23.1 μ g/L of air (Figure 4C) and 30.7 μ g/L of air (Figure 4B) allowed us to verify that in the concentration of 30.7 μ g/L of air, decreasing in mobility occurs rapidly and is followed by mortality, making it possible to observe that after six hours the mortality curve was stable while the curve indicating the amount of flies with minimal damage to the locomotor apparatus showed growth. Studies show that after the action of the enzymes Superoxide Dismutase and Glutathione S-Transferase, cells can express the protein Hsp70, a Chaperone 70 (~kDa) producing a late action in protecting against oxidative stress. This is another point to be clarified in new studies of α -Terpinen(CUNHA *et al.*, 2015a).

Figure 4 - Relationship between living flies and alterations in mobility



5 Conclusion

In association with quinolones and oxacillin, α -Terpinene reduced the MIC of resistant strains, demonstrating a synergistic activity of the product with these antibiotics. No influence of α -Terpinene on the efflux pumps of *S. aureus* strains tested was observed, and no decrease in the MIC of ethidium bromide was observed. However, it was possible to verify the toxicity of α -Terpinene against *D. melanogaster*, clearly showing that it exhibits high toxicity in this eukaryotic model. Thus, this demonstrated toxicity against insects and modulation of quinolone antibiotics against *S. aureus* inspires the investigation of its modulating potential and toxicity profile against a eukaryotic model, as a possibility of extrapolation for testing in other models, including mammals.

Author Contributions: Conceptualization, F.A.B.C. and H.D.M.C.; methodology, L.J.L.N, A.G.B.R, T.S.F., J.E.R., N.S.M., Z.S.S., C.R.S.B. and D.L.S.J.; validation, L.J.L.N and F.A.B.C.; formal analysis, L.J.L.N and T.S.F.; resources, L.J.L.N.; writing—original draft preparation, L.J.L.N.; writing—review and editing, L.J.Q.J, I.R.A.M., F.A.B.C., and H.D.M.C.; supervision, F.A.B.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received external funding of the FUNCAP.

Acknowledgments: This study was funded by the Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP (BP3-0172-00168.01.00/20 SPU 09673071/2020). Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –CAPES- and Geopark Araripe

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

6 Referências

- [1] A. Newman, D. Smith, R.R. Ghai, R.M. Wallace, M.K. Torchetti, C. Loiacono, L.S. Murrell, A. Carpenter, S. Moroff, J.A. Rooney, C. Barton Behravesh, First Reported Cases of SARS-CoV-2 Infection in Companion Animals - New York, March-April 2020., *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 69 (2020) 710–713. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6923e3>.
- [2] N. Thomford, D. Senthane, A. Rowe, D. Munro, P. Seele, A. Maroyi, K. Dzobo, Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 1578. <https://doi.org/10.3390/ijms19061578>.
- [3] Q.W. Zhang, L.G. Lin, W.C. Ye, Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review, *Chinese Med. (United Kingdom)*, 13 (2018) 1–26. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>.
- [4] M. Sorokina, C. Steinbeck, Review on natural products databases: where to find data in 2020, (2020). <https://doi.org/10.1186/s13321-020-00424-9>.
- [5] S.E. Rossiter, M.H. Fletcher, W.M. Wuest, Natural Products as Platforms to Overcome Antibiotic Resistance, *Chem. Rev.* 117 (2017) 12415–12474. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00283>.
- [6] I. Dusfour, J. Vontas, J.-P. David, D. Weetman, D.M. Fonseca, V. Corbel, K. Raghavendra, M.B. Coulibaly, A.J. Martins, S. Kasai, F. Chandre, Management of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses: Advances and challenges, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13 (2019) e0007615. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007615>.
- [7] J. Pu, Z. Wang, H. Chung, Climate change and the genetics of insecticide resistance, *Pest Manag. Sci.* 76 (2020) 846–852. <https://doi.org/10.1002/ps.5700>.
- [8] A. Gupta, S. Mumtaz, C.H. Li, I. Hussain, V.M. Rotello, Combatting antibiotic-resistant bacteria using nanomaterials, *Chem. Soc. Rev.* 48 (2019) 415–427. <https://doi.org/10.1039/c7cs00748e>.
- [9] B.D. Schindler, P. Jacinto, G.W. Kaatz, Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: Current status of potentiating existing antibiotics, *Future Microbiol.* 8 (2013) 491–507. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.16>.
- [10] G.W. Kaatz, F. McAleese, S.M. Seo, Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 1857–1864. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1857-1864.2005>.
- [11] 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>.
- [12] P. Calap-Quintana, J. González-Fernández, N. Sebastia-Ortega, J. Llorens, M. Moltó, P. Calap-Quintana, J. González-Fernández, N. Sebastia-Ortega, J.V. Llorens, M.D. Moltó, *Drosophila melanogaster* Models of Metal-Related Human Diseases and Metal Toxicity, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 1456. <https://doi.org/10.3390/ijms18071456>.
- [13] L. Finetti, L. Tiedemann, X. Zhang, S. Civolani, G. Bernacchia, T. Roeder, Monoterpenes alter TAR1-driven physiology in *Drosophila* species, *J. Exp. Biol.* 224 (2021). <https://doi.org/10.1242/jeb.232116>.
- [14] M.E. Scharf, S.N. Nguyen, C. Song, Evaluation of volatile low molecular weight insecticides using

- Drosophila melanogaster* as a model, *Pest Manag. Sci.* 62 (2006) 655–663. <https://doi.org/10.1002/ps.1222>.
- [15] A.C. de Groot, E. Schmidt, Tea tree oil: contact allergy and chemical composition, *Contact Dermatitis*. 75 (2016) 129–143. <https://doi.org/10.1111/cod.12591>.
- [16] L.J. de Lacerda Neto, A.G.B. Ramos, R.E.R. da Silva, L. Pereira-de-Morais, F.M. Silva, R.H.S. da Costa, L.B. Rodrigues Dantas, J.G.M. da Costa, H.D.M. Coutinho, G. Kowalska, J. Hawlena, R. Kowalski, R. Barbosa, F.A.B. da Cunha, Myorelaxant Effect of the *Dysphania ambrosioides* Essential Oil on *Sus scrofa domestica* Coronary Artery and Its Toxicity in the *Drosophila melanogaster* Model, *Molecules*. 26 (2021) 2041. <https://doi.org/10.3390/molecules26072041>.
- [17] K.M. Marzec, I. Reva, R. Fausto, K. Malek, L.M. Proniewicz, Conformational space and photochemistry of α -terpinene, *J. Phys. Chem. A*. 114 (2010) 5526–5536. <https://doi.org/10.1021/jp100770v>.
- [18] G.W. McGraw, R.W. Hemingway, L.L. Ingram, C.S. Canady, W.B. McGraw, Thermal degradation of terpenes: Camphene, Δ^3 -carene, limonene, and α -terpinene, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 4029–4033. <https://doi.org/10.1021/es9810641>.
- [19] J. Rudbäck, M.A. Bergström, A. Börje, U. Nilsson, A.T. Karlberg, α -terpinene, an antioxidant in tea tree oil, autoxidizes rapidly to skin allergens on air exposure, *Chem. Res. Toxicol.* 25 (2012) 713–721. <https://doi.org/10.1021/tx200486f>.
- [20] P. Noriega, Terpenes in Essential Oils: Bioactivity and Applications, in: *Terpenes and Terpenoids* [Working Title], IntechOpen, 2020. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93792>.
- [21] E. Scalerandi, G.A. Flores, M. Palacio, M.T. Defagó, M.C. Carpinella, G. Valladares, A. Bertoni, S.M. Palacios, Understanding Synergistic Toxicity of Terpenes as Insecticides: Contribution of Metabolic Detoxification in *Musca domestica*, *Front. Plant Sci.* 9 (2018) 1579. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01579>.
- [22] N.A. Mahizan, S.-K. Yang, C.-L. Moo, A.A.-L. Song, C.-M. Chong, C.-W. Chong, A. Abushelaibi, S.-H.E. Lim, K.-S. Lai, Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens, *Molecules*. 24 (2019) 2631. <https://doi.org/10.3390/molecules24142631>.
- [23] F. Cappiello, M.R. Loffredo, C. Del Plato, S. Cammarone, B. Casciaro, D. Quaglio, M.L. Mangoni, B. Botta, F. Ghirga, antibiotics The Revaluation of Plant-Derived Terpenes to Fight Antibiotic-Resistant Infections, (2018). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060325>.
- [24] E. Sieniawska, M. Swatko-Ossor, R. Sawicki, K. Skalicka-Woźniak, G. Ginalska, Natural Terpenes Influence the Activity of Antibiotics against Isolated *Mycobacterium tuberculosis*, *Med. Princ. Pract.* 26 (2017) 108–112. <https://doi.org/10.1159/000454680>.
- [25] 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>.
- [26] M. Elshikh, S. Ahmed, S. Funston, P. Dunlop, M. McGaw, R. Marchant, I.M. Banat, Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants, *Biotechnol. Lett.* 38 (2016) 1015–1019.

- <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2079-2>.
- [27] J.M. Andrews, Determination of minimum inhibitory concentrations, *J. Antimicrob. Chemother.* 48 (2001) 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5.
- [28] 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>.
- [29] 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>.
- [30] E. Breitmaier, *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*, Wiley, 2006. <https://doi.org/10.1002/9783527609949>.
- [31] 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>.
- [32] C.D. de Morais Oliveira-Tintino, S.R. Tintino, P.W. Limaverde, F.G. Figueredo, F.F. Campina, F.A.B. da Cunha, R.H.S. da Costa, P.S. Pereira, L.F. Lima, Y.M.L.S. de Matos, H.D.M. Coutinho, J.P. Siqueira-Júnior, V.Q. Balbino, T.G. da Silva, Inhibition of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L. and α -terpinene on the NorA efflux-pump of *Staphylococcus aureus*, *Food Chem.* 262 (2018) 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.040>.
- [33] N.Z. Mamadalieva, N.S. Abdullaeva, T. Rosenau, M. Fakhrudinova, S.S. Azimova, S. Böhmendorfer, Composition of essential oils from four Apiaceae and Asteraceae species growing in Uzbekistan, *Nat. Prod. Res.* 32 (2018) 1118–1122. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1375928>.
- [34] Y.F. Zheng, X.M. Liu, Q. Zhang, F. Lai, L. Ma, Constituents of the Essential Oil and Fatty Acid from Rare and Endangered Plant *Magnolia kwangsiensis* Figlar & Noot, *J. Essent. Oil-Bearing Plants*. 22 (2019) 141–150. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1604168>.
- [35] P.R. Quiroga, V. Nepote, M.T. Baumgartner, Contribution of organic acids to α -terpinene antioxidant activity, *Food Chem.* 277 (2019) 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.100>.
- [36] P.I. Gallegos-Flores, R. Bañuelos-Valenzuela, L. Delgadillo-Ruiz, C. Meza-López, F. Echavarría-Cháirez, Antibacterial activity of five terpenoid compounds: Carvacrol, limonene, linalool, α -terpinene and thymol, *Trop. Subtrop. Agroecosystems*. 22 (2019) 241–248. <https://www.revista.cba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/2838> (accessed May 1, 2021).
- [37] J.T. Floyd, S. Kumar, M.M. Mukherjee, G. He, M.F. Varela, A review of the molecular mechanisms of drug efflux in pathogenic bacteria: A structure-function perspective, in: *Recent Res. Dev.*

- Membr. Biol., Research Signpost, Trivandrum, India, 2013: pp. 15–66.
- [38] J.H. Jorgensen, M.J. Ferraro, Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices, *Clin. Infect. Dis.* 49 (2009) 1749–1755. <https://doi.org/10.1086/647952>.
- [39] N.Q. Balaban, S. Helaine, K. Lewis, M. Ackermann, B. Aldridge, D.I. Andersson, M.P. Brynildsen, D. Bumann, A. Camilli, J.J. Collins, C. Dehio, S. Fortune, J.M. Ghigo, W.D. Hardt, A. Harms, M. Heinemann, D.T. Hung, U. Jenal, B.R. Levin, J. Michiels, G. Storz, M.W. Tan, T. Tenson, L. Van Melderen, A. Zinkernagel, Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence, *Nat. Rev. Microbiol.* 17 (2019) 441–448. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3>.
- [40] EUCAST, EUCAST: Clinical breakpoints and dosing of antibiotics, *Eur. Comm. Antimicrob. Susceptibility Testing. Break. Tables Interpret. MICs Zo. Diameters, V11.0.* (2021). https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (accessed May 2, 2021).
- [41] C. and L.S.I. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing CLSI supplement M100S, 28th ed., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2018. www.clsi.org. (accessed May 2, 2021).
- [42] M. Balouiri, M. Sadiki, S.K. Ibsouda, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *J. Pharm. Anal.* 6 (2016) 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpaha.2015.11.005>.
- [43] B. Kowalska-Krochmal, R. Dudek-Wicher, The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance, *Pathogens.* 10 (2021) 165. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>.
- [44] P. Todd, P. Benfield, Amoxicillin/clavulanic acid, *Drugs.* 39 (1990) 264–307. <https://doi.org/10.2165/00003495-199039020-00008>.
- [45] L. Anezova, A. Najjar, M. Kfoury, S. Fourmentin, H. Greige- Gerges, Antibacterial activity of free or encapsulated selected phenylpropanoids against *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*, *J. Appl. Microbiol.* 128 (2020) 710–720. <https://doi.org/10.1111/jam.14516>.
- [46] I. Ullah, A.L. Khan, L. Ali, A.R. Khan, M. Waqas, J. Hussain, I.J. Lee, J.H. Shin, Benzaldehyde as an insecticidal, antimicrobial, and antioxidant compound produced by *Photobacterium temperata* M1021, *J. Microbiol.* 53 (2015) 127–133. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-4632-4>.
- [47] S.E.C.B. Vasconcelos, H.M. Melo, T.T.A. Cavalcante, F.E.A.C. Júnior, M.G. de Carvalho, F.G.R. Menezes, O.V. de Sousa, R.A. Costa, *Plectranthus amboinicus* essential oil and carvacrol bioactive against planktonic and biofilm of oxacillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, *BMC Complement. Altern. Med.* 17 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1968-9>.
- [48] J.R. Scherf, C.R. Barbosa dos Santos, T. Sampaio de Freitas, J.E. Rocha, N.S. Macêdo, J.N. Mascarenhas Lima, H.D. Melo Coutinho, F.A. Bezerra da Cunha, Effect of terpinolene against the resistant *Staphylococcus aureus* strain, carrier of the efflux pump QacC and β -lactamase gene, and its toxicity in the *Drosophila melanogaster* model, *Microb. Pathog.* 149 (2020) 104528. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104528>.
- [49] M. Nelson, Modulation of Antibiotic Efflux in Bacteria, *Curr. Med. Chem. -Anti-Infective Agents.* 1 (2002) 35–54. <https://doi.org/10.2174/1568012023355054>.
- [50] J.M. Pagès, L. Amaral, Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the

- efflux pump of Gram-negative bacteria, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 1794 (2009) 826–833. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.12.011>.
- [51] A.C.A.X. De-Oliveira, L.F. Ribeiro-Pinto, F.J.R. Paumgarten, In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by β -myrcene and other monoterpenoid compounds, *Toxicol. Lett.* 92 (1997) 39–46. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(97\)00034-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(97)00034-9).
- [52] F.; Tong, J.R. Coats, Quantitative structure-activity relationships of monoterpenoid binding activities to the housefly GABA receptor, *Pest Manag. Sci.* 68 (2012) 1122–1129. <https://doi.org/10.1002/ps.3280>.
- [53] F. Tong, J.R. Coats, Effects of monoterpenoid insecticides on [3H]-TBOB binding in house fly GABA receptor and 36Cl- uptake in American cockroach ventral nerve cord, *Pestic. Biochem. Physiol.* 98 (2010) 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.07.003>.
- [54] E.E. Enan, Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35 (2005) 309–321. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.12.007>.
- [55] E. Enan, Insecticidal activity of essential oils: Octopaminergic sites of action, *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 130 (2001) 325–337. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00255-1](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00255-1).
- [56] 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>.
- [57] 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>.

Figure

[Click here to access/download;Figure;Figure.docx](#) 

Figure 1: A: MIC of the antibiotic Norfloxacin isolated and in association with α -Terpinene and standard inhibitors CCCP and Chlorpromazine and MIC of EtBr isolated and in association with standard inhibitors CCCP and Chlorpromazine and α -Terpinene on strain 1199B. B: MIC of the antibiotic ciprofloxacin alone and in association with α -Terpinene and standard inhibitors CCCP and Chlorpromazine and MIC of EtBr alone and in association with standard inhibitors CCCP and Chlorpromazine and α -Terpinene on strain K2068. C: MIC of the antibiotic Oxacillin alone and in association with α -Terpinene and standard inhibitors CCCP and Chlorpromazine and MIC of EtBr in association with standard inhibitors CCCP and Chlorpromazine and α -Terpinene on strain K4100. CCCP = carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone; **** represents statistical significance compared to control.

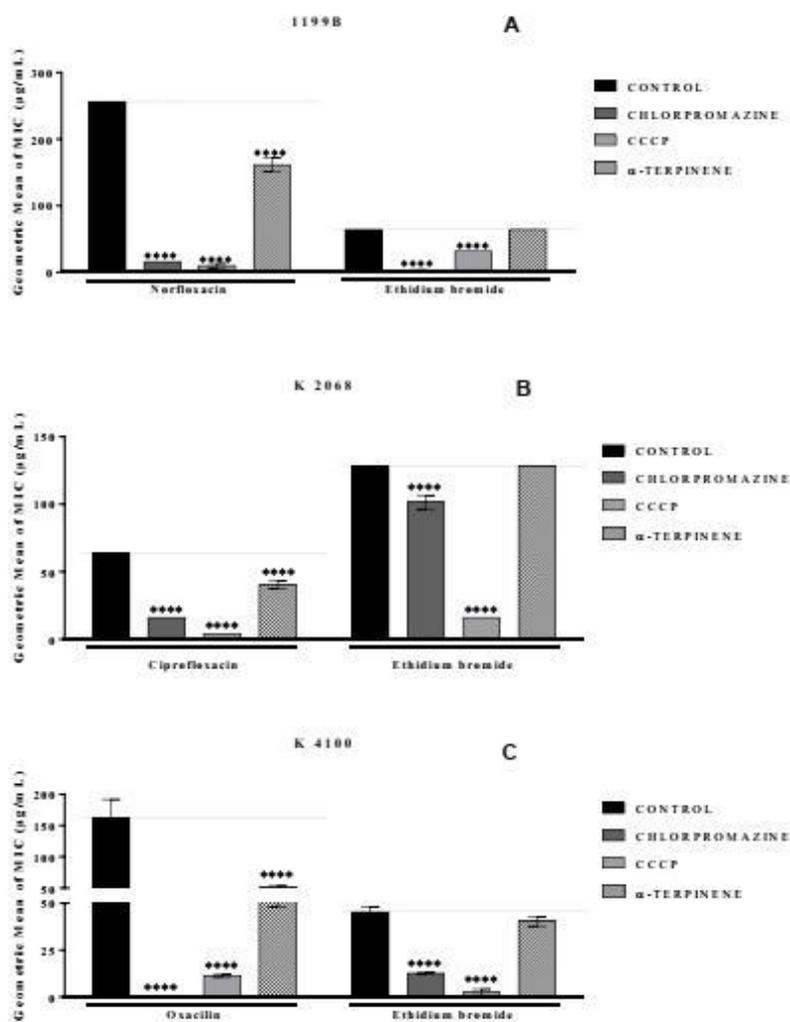


Figure 2: Mortality assays with the *Drosophila melanogaster* model against the compound α -Terpinene
Negative Geotaxis Assay

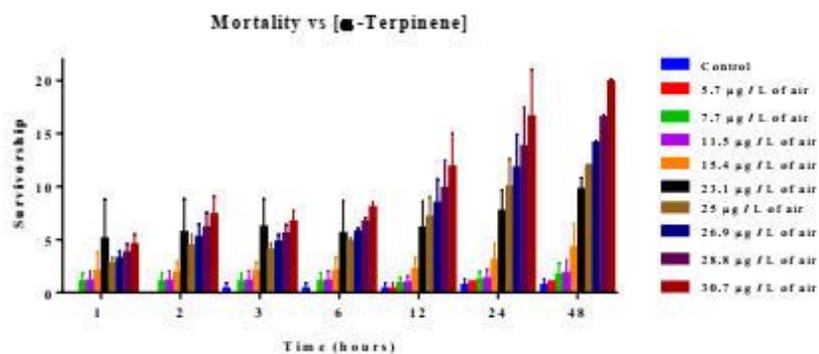


Figure 3: Negative geotaxis assays with the *Drosophila melanogaster* model in the face of α -Terpinene.

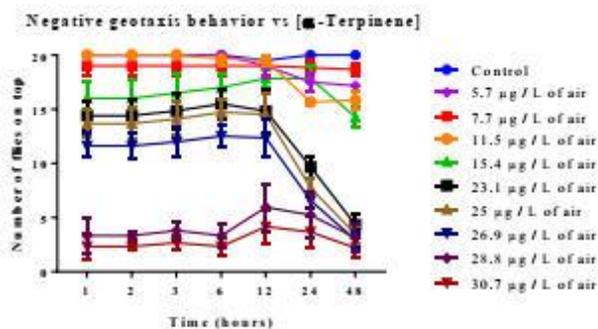
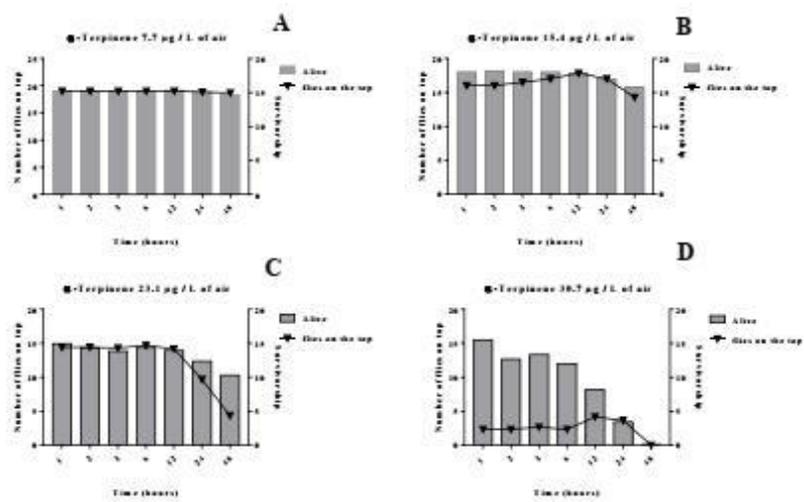


Figure 4 - Relationship between living flies and alterations in mobility



Table

[Click here to access/download;Table;table.docx](#)Table 1: MIC of Antibiotics and α -Terpinene

STRAIN	PUMP	MIC OF ANTIBIOTICS	MIC OF ALFA-TERPINENE
1199	NorA	Norfloxacin 288 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g}/\text{mL}$
1999B	NorA	Norfloxacin 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g}/\text{mL}$
IS-58	TetK	Tetracycline 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g}/\text{mL}$
RN 4220	MepA	Erythromycin $\geq 1024 \mu\text{g}/\text{mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g}/\text{mL}$
K 2068	QacC	Ciprofloxacin 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g}/\text{mL}$
K 4414	QacA/B	Penicillin 262 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g}/\text{mL}$
K 4100	MsrA	Oxacilin 161 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g}/\text{mL}$

Conflict of Interest

Conflicts of Interest

We affirm that all authors are according with this submission, that this article is not being considered for publication elsewhere and that the copyright will be under authorization of the publisher. **There is no conflict of interest of any author.** This article is according with to the international, national and institutional rules considering biodiversity rights. On behalf all other authors, I affirm that all agree with this submission.

LUIZ JARDELINO DE LACERDA NETO
ANDREZA GUEDES BARBOSA RAMOS
THIAGO SAMPAIO DE FREITAS
JANAÍNA ESMERALDO ROCHA
CRISTINA RODRIGUES DOS SANTOS BARBOSA
DÁRCIO LUIZ DE SOUSA JÚNIOR
NAIR SILVA MACEDO
ZILDENE DE SOUSA SILVEIRA
LUCINDO JOSÉ QUINTANS JÚNIOR
IRWIN ROSE ALENCAR DE MENEZES
HENRIQUE DOUGLAS MELO COUTINHO
FRANCISCO ASSIS BEZERRA DA CUNHA

Authors

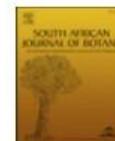
Apêndice B - Artigos publicados e não relacionados a tese durante o doutoramento.

South African Journal of Botany 124 (2019) 160–165



Contents lists available at ScienceDirect

South African Journal of Botany

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

Review

Adulticide and repellent activity of essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) – A review



M.A. de Souza, L. da Silva, M.J.F. Macêdo, L.J. Lacerda-Neto, M.A.C. dos Santos, H.D.M. Coutinho*, F.A.B. Cunha

Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato (CE), Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 March 2019

Received in revised form 28 April 2019

Accepted 11 May 2019

Available online 24 May 2019

Edited by J Van Staden

Keywords:

Essential oils

Aedes aegypti

Adulticide

Repellent

ABSTRACT

Aedes aegypti (*Ae. aegypti*) is responsible for the spread of diseases that compromise public health such as dengue fever, urban yellow fever, chikungunya and zika. Synthetic insecticides are used to control *Ae. aegypti*, however, this substance use results in vector resistance and environment contamination. Essential oils (EOs) derived from plants are natural alternatives to replace the commercial synthetic insecticides and repellents, since they present components that may be toxic to this vector. This review had as its objective to research the literature surrounding the repellent and adulticide action of essential oils against *Ae. aegypti*, using electronic research databases (Pubmed, Science Direct and Scielo), to provide an overall view on the plant species used to obtain EOs, the plant parts, extraction methods and analytical techniques used as well as the major components in the EOs. The data showed 16 families, 35 genera and 49 species, with Lamiaceae, Zingiberaceae, Myrtaceae and Rutaceae families being the ones with the most species. Moreover, all plant parts were shown to be used to extract essential oils, especially with hydro-distillation and steam-distillation methods, with Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC–MS) as the main analytical technique. The data revealed the chemical composition of EOs, especially of terpenes. Therefore, essential oils are promising options for the production of natural insecticides due many reasons: they are less harmful to human beings and to the environment; they can be used in association with synthetic insecticides and repellents, reducing the concentration used of the last ones; and can be produced in a perennial manner by producers, using subproducts from the crop industries. By all these reasons, they can be used in insect vector control programs, rather than using synthetic insecticides.

© 2019 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	160
2. Methodology	161
3. Results and discussion	161
3.1. Adulticide activity	161
3.2. Repellent activity	163
4. Conclusion	164
References	164

1. Introduction

Aedes aegypti L. is a cosmopolitan insect from the Diptera order which prefers tropical and subtropical regions, where the weather

favors its reproduction (Jansen and Beebe, 2010). It is believed that the mosquitos arrived in Brazil during the slave trafficking in the colonial era (Consoli and de Oliveira, 1994). *Aedes aegypti* is considered the main vector for diseases than compromise public health such as dengue fever, urban yellow fever, chikungunya and zika (Brasil, 2015).

The dengue virus is spread by the bite of an infected female mosquito. Once bitten, the human being is also infected, becoming the primary carrier, multiplier of this infectious agent and the viral source

* Corresponding author at: Universidade Regional do Cariri, Urca, Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta 63105-000, Brasil.
E-mail addresses: hdmcoutinho@urca.br, hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M. Coutinho).

<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.05.007>

0254-6299/© 2019 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.05.007>

The complex pharmacology of natural products

Luiz J Lacerda-Neto¹, Andreza GR Barbosa¹, Lucindo J Quintans-Junior², Henrique DM Coutinho^{*,1} & Francisco AB da Cunha¹

¹Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, CE, Brazil

²Department of Physiology, Federal University of Sergipe, Aracaju, SE, Brazil

*Author for correspondence: Tel.: +55 88 3102 1212; Fax: +55 88 3102 1291; hdmrcoutinho@gmail.com

“The chemistry of natural products has always been considered important for the development of new pharmacological prototypes due to their great structural diversity and functional groups”

First draft submitted: 13 July 2018; Accepted for publication: 24 January 2019; Published online: 18 April 2019

Keywords: natural products • pharmacology • plant drug interactions

The chemistry of natural products has always been considered important for the development of new pharmacological prototypes due to their great structural diversity and functional groups. These molecules are relevant in the cosmetic, food and other bioproducts industry [1]. Secondary metabolites are present in thousands of organisms and function as the mediators of biological interactions. The isolation of these metabolites is the focus of many researchers – who aim to obtain molecules with biological activity for the development of new drugs and other products [2].

Secondary metabolism, from which bioactive substances are produced, occurs in plant species and is the result of a variety of anabolic and catabolic reactions. These processes result in a large diversity of organic compounds that can display biological activities. Among plant species, the main classes of secondary metabolites already identified are the nitrogenous, phenolic and terpenoid compounds [3].

The chemical defenses of plants include complex mixtures of organic compounds and typically do not involve individual substances; these compounds appear in different concentrations (majority or minority) within various products derived from natural species. The biological activities of these products can be found to originate from their ability to interact among themselves and other substances through synergistic, additive, antagonistic effects – and can be optimized through the modification of the pharmacokinetics and/or pharmacodynamics of the component substances. The biological effects may occur from the interaction with all the organic compounds or by the interaction among certain components, which may present themselves as majority or minority [4].

In natural product researches, the major compound's role and mechanism in its associated biological activity is commonly investigated. Thus, in the scientific literature, there are innumerable published studies where the major components have been found to be responsible for these activities. However, this disregards the possible interactions among the totality of compounds that may be present at lower concentrations in natural products. De Oliveira *et al.* [5] carried out a study with the essential oil *Thymus vulgaris* and its major constituent, thymol – and identified that the effect of the constituents of the oil was not phytotoxic to lettuce seeds, whereas the isolated action of thymol caused significant inhibitory effects on seed germination, raising the possibility of a partial inhibition of thymol activity by other components of the oil. This proves the importance of considering the interactions among all components of the product.

Another study that verifies the importance of the interactions between the biological components of a natural product and its biological activities is the study of Liu *et al.* [6], which evaluated the activity of the sap of *Dracaena cochinchinensis* and three active constituents regarding the analgesic activity from the inhibition of currents on the TRPV1 channel, induced by capsaicin. As a result, the authors found that the combination of the three active components of the sap is responsible for the analgesic activity of the species in question, where these components

newlands
press



Contents lists available at ScienceDirect

Sustainable Chemistry and Pharmacy

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/scp>

Repellent activity of essential oils against culicids: A review

Maria Aurea Soares de Oliveira^a, Henrique Douglas Melo Coutinho^{b,*},
Luiz Jardelino de Lacerda Neto^c, Lígia Cláudia Castro de Oliveira^c,
Francisco Assis Bezerra da Cunha^c

^a Program of Residency in Collective Health - Regional University of Cariri, Crato, Ceará, Brazil

^b Laboratory of Microbiology and Molecular Biology - Regional University of Cariri, Crato, Ceará, Brazil

^c Laboratory of Bioprospection of the Sertão - Regional University of Cariri, Crato, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Essential oils
Culicidae
Repellent

ABSTRACT

The use of plants with repellent properties has been evidenced as an important tool in the biocontrol of Culicidae that threaten public health. Studies on the main genera used for the biological control of these vectors were systematically reviewed including articles published from 2000 to 2019. Specialized databases such as Web of Science, Pubmed, Science Direct, Scopus BioMed, Bioline, Doaj and Scielo and the descriptors volatile oils, culicidae, arthropod vectors and medicinal plants were used. In the present study, 121 species distributed across 31 families were identified, with Lamiaceae, Myrtaceae and Verbenaceae possessing the largest number of species. For EO extraction virtually all plant parts were found to be used, including seeds, roots, rhizomes, stems, leaves, bracts, fruits, bark and inflorescences, these being mainly extract by hydrodistillation and steam distillation extraction. Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) was the main analytical technique used to identify the EO constituents. It is necessary to take into account the importance of developing alternative products which do not harm nature or the human species, nor any of the properties and uses these vegetables possess, which are essential for biological control.

1. Introduction

Since the dawn of time insect vectors have been regarded as unpleasant and annoying beings. Over the years, with the growing global changes and the evolution of research, the first evidences of these insects as propagators of diseases and infections began to emerge. Studies began to establish relationships between these beings and diseases such as malaria, arboviruses and filariases (Forattini, 2002).

Anthropic actions, rapid climate change, deforestation, globalization, population increase, disorderly occupation of urban areas and inconsistent health conditions that favor expansion and viral transmission have consequently increased the number of arboviruses, one of the current threats (Rust, 2012).

A ordem Diptera, que abrange moscas, mosquitos e afins, é um grupo de insetos bem diverso, tanto ecologicamente quanto em termos de riqueza de espécies (Courtney and Merritt, 2008). Com aproximadamente 150 mil espécies descritas, classificadas em cerca de 10 mil

gêneros e 188 famílias (Thompson, 2006).

The Culicidae (Diptera) family encompasses several epidemiologically important insects, justifying the numerous studies focused on endemics including arboviruses, malaria parasites, filariases, etc. Roughly 3000 Culicidae species are currently known, some with no medical importance. However, some *Anopheles*, *Culex*, *Aedes* and other species are known for their ability to propagate endemics for insect vectors (Rey, 2010).

Insecticides have been widely used, both in agriculture and livestock and in the area of public health. There are numerous types of compounds that are toxic to mosquitoes, which include organochlorates, Organophosphorates, Carbamates, phytoetroids, among others. However, the indiscriminate use of these substances has caused resistance to these vectors, in addition to its use to present environmental toxicity (Lima et al., 2004; Beserra et al., 2007). These problems warned and motivated many researchers to search for safer and more biodegradable vector control products (Simas et al., 2004).

* Corresponding author. Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, CE, Brazil.

E-mail addresses: aureasoares16@hotmail.com (M.A. Soares de Oliveira), hdmcoutinho@gmail.com, hdmcoutinho@uneca.br (H.D. Melo Coutinho), ligiaclaudia@yahoo.com.br (L.C. Castro de Oliveira), cunha.ucca@gmail.com (F.A. Bezerra da Cunha).

<https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100328>

Received 10 May 2020; Received in revised form 12 September 2020; Accepted 20 September 2020

Available online 30 October 2020

2352-5541/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.



Article

Antiedematogenic and Anti-Inflammatory Activity of the Monoterpene Isopulegol and Its β -Cyclodextrin (β -CD) Inclusion Complex in Animal Inflammation Models

Andreza Guedes Barbosa Ramos ¹, Irwin Rose Alencar de Menezes ¹,
 Maria Sanádia Alexandre da Silva ¹, Renata Torres Pessoa ¹, Luiz Jardelino de Lacerda Neto ¹,
 Fabiolla Rocha Santos Passos ², Henrique Douglas Melo Coutinho ¹, Marcello Iriti ^{3,*} and
 Lucindo José Quintans-Júnior ²

¹ Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato 63105-000, Brazil; andrezaurca@gmail.com (A.G.B.R.); irwinalencar@urca.br (I.R.A.d.M.); sanadiaalexandre@gmail.com (M.S.A.d.S.); trabalho.renata18@gmail.com (R.T.P.); luizjardelino@gmail.com (L.J.d.L.N.); hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M.C.)

² Department of Physiology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Aracaju-SE 49100-000, Brazil; fabiollarsp@hotmail.com (F.R.S.P.); lucindojr@gmail.com (L.J.Q.-J.)

³ Department of Agricultural and Environmental Sciences, Milan State University, via G. Celoria 2, 20133 Milan, Italy

* Correspondence: marcello.iriti@unimi.it

Received: 10 April 2020; Accepted: 8 May 2020; Published: 14 May 2020



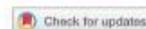
Abstract: Isopulegol (ISO) is an alcoholic monoterpene widely found in different plant species, such as *Melissa officinalis*, and has already been reported to have a number of pharmacological properties. Like other terpenes, ISO is a highly volatile compound that is slightly soluble in water, so its inclusion into cyclodextrins (CDs) is an interesting approach to increase its solubility and bioavailability. Thus, our aim was to evaluate the antiedematogenic and anti-inflammatory activity of isopulegol and a β -cyclodextrin–isopulegol inclusion complex (ISO/ β -CD) in rodent models. For the anti-inflammatory activity evaluation, antiedematogenic plethysmometry and acute (peritonitis and pleurisy), as well as chronic (cotton pellet-induced granuloma) anti-inflammatory models, were used. The docking procedure is used to evaluate, analyze, and predict their binding mode of interaction with H1 and Cox-2 receptors. The animals ($n = 6$) were divided into groups: ISO and ISO/ β -CD, negative control (saline), and positive control (indomethacin and promethazine). ISO and ISO/ β -CD were able to reduce acute inflammatory activity by decreasing albumin extravasation, leukocyte migration, and MPO concentration, and reducing exudate levels of IL-1 β and TNF- α . ISO and ISO/ β -CD significantly inhibited edematogenic activity in carrageenan- and dextran-induced paw edema. Moreover, both significantly reduced chronic inflammatory processes, given the lower weight and protein concentration of granulomas in the foreign body granulomatous inflammation model. The results suggest that the inclusion of ISO in β -cyclodextrins improves its pharmacological properties, with the histamine and prostaglandin pathways as probable mechanisms of inhibition, and also reinforces the anti-inflammatory profile of this terpene.

Keywords: terpenes; antiedematogenic effect; interleukin; tumor necrosis factor

1. Introduction

Functional foods contain ingredients that can be used for disease prevention, health promotion, and reductions of symptoms of inflammatory processes. These inflammatory processes are non-specific

SHORT COMMUNICATION



Modulation of antibiotic activity by the hydroalcoholic extract from leaves of *Caryocar coriaceum* WITTM

Luís J. de Lacerda Neto^{a,b}, A. G. B. Ramos^a, M. R. Kerntopf^a, H. D. M. Coutinho^a,
 L. J. Quintans-Junior^c, J. R. G. S. Almeida^d, J. Ribeiro-Filho^e and I. R. A. Menezes^a

^aDepartamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato, Brasil; ^bUnidade Acadêmica Ciências da Vida, Universidade Federal de Campina Grande, Cajazeiras, Brasil; ^cDepartamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Brasil; ^dDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Brasil; ^eDepartamento de Biomedicina, Centro Universitário Dr. Leão Sampaio – UNILEAO, Juazeiro do Norte, Brasil

ABSTRACT

The aim of this study was to identify the presence of tannins, phenols and flavonoids on the hydroalcoholic extract of *Caryocar coriaceum* leaves (HECCL) and to determine the antioxidant and antibacterial activity of this extract. The extract was tested alone (1024–1 µg/mL) or associated (MIC/8) with several antibiotics in order to identify any antibacterial activity against multiresistant bacterial strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*). The existence of tannins, total phenols (901.31 mg/g) and flavonoids (89.68 mg/g) was confirmed in the HECCL. The presence of rutin and quercetin were confirmed by Thin-layer chromatography (TLC). Using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method, the antioxidant activity of the extract (9 µg/mL) was determined. Moreover, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) value found for HECCL was 1024 µg/mL and the association between HECCL (MIC/8) with benzylpenicillin significantly changed its minimum inhibitory concentration from 2500 to 625 µg/mL against *E. coli*.

ARTICLE HISTORY

Received 9 November 2016
 Accepted 21 March 2017

KEYWORDS

Antibiotic; antibiotic
 modifying activity;
 synergism; pequi



CONTACT H. D. M. Coutinho  hdmcoutinho@gmail.com, hdmcoutinho@urca.br

 Supplemental data for this article can be accessed at <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2017.1312396>.

© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

<https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1312396>

REVIEW ARTICLE

Larvicidal Activity of Essential Oils Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Mikael A. de Souza¹, Larissa da Silva¹, Maria A. C. dos Santos¹, Márcia J. F. Macêdo¹, Luiz J. Lacerda-Neto¹, Henrique D. M. Coutinho^{1,*}, Lígia C. C. de Oliveira¹ and Francisco A. B. Cunha¹

¹Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato (CE), Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: March 12, 2020

Accepted: July 20, 2020

DOI:

[10.2174/1381612826666200806100500](https://doi.org/10.2174/1381612826666200806100500)



Abstract: The *Aedes aegypti* is responsible for the transmission of arboviruses, which compromise public health. In the search for synthetic product alternatives, essential oils (OEs) have been highlighted by many researchers as natural insecticides. This systematic review (SR) was performed according to PRISMA guidelines (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) and its objective was to evaluate studies addressing OEs with larvicidal properties against *Ae. aegypti*, through electronic database searches (Pubmed, Science Direct and Scielo), covering an overview of the plant sources OEs, which plant parts were used, the extraction methods, analytical techniques, major and/or secondary constituents with greater percentages, as well as the LC₅₀s responsible for larval mortality. Following study analysis, plants distributed across 32 families, 90 genera and 175 species were identified. The Lamiaceae, Myrtaceae, Piperaceae, Asteraceae, Rutaceae, Euphorbiaceae and Lauraceae families obtained the highest number of species with toxic properties against larvae from this vector. Practically all plant parts were found to be used for OE extraction. Hydrodistillation and steam distillation were the main extraction methods identified, with GC-MS/GC-FID representing the main analytical techniques used to reveal their chemical composition, especially of terpene compounds. In this context, OEs are promising alternatives for the investigation of natural, ecologically correct and biodegradable insecticides with the potential to be used in *Ae. aegypti* control programs.

Keywords: *Aedes aegypti*, essential oils, bioinsecticides, larvicidal activity, hydrodistillation, steam distillation.

1. INTRODUCTION

Dengue is an arbovirus transmitted by infected female *Ae. aegypti* mosquitoes, with the virus having four serotypes (1, 2, 3 and 4 DEN). A more severe form of the disease, hemorrhagic dengue fever, has become an important cause of hospitalization and death among children and adults in most Asian and Latin American countries [1]. According to the World Health Organization (WHO), dengue is one of the main public health problems, having around 50 to 100 million new infectious cases per year [2]. This mosquito is also responsible for the transmission of other arboviruses such as urban yellow fever, chikungunya and the zika virus [3].

These diseases manifest themselves with greater occurrence in tropical and temperate regions where climatic conditions are favorable for the mosquito's reproduction. The mosquito develops, usually when the population provides artificial breeding grounds such as bottles, disposable tires, plant pots, water tanks and any other container which may accumulate clean water and facilitates *Ae. aegypti* development and consequently the insect's dissemination [4, 5].

A constant concern for a means to control this mosquito, aiming to reduce its spread and the spread of diseases, exists in research. Synthetic chemicals are generally used where substances such as *fentothion*, *temephos* and *malathion* are the main measure used by public health programs to control *Ae. aegypti* [6]. However, the indiscriminate use of synthetic substances has caused vector resistance, in addition to its use presenting toxicity to the environment [7-9].

*Address correspondence to this author at the Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Urea, Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000, Crato (CE), Brazil; Tel: +55(88)31021212; Fax: +55(88)31021291; E-mail: hdmcoutinho@gmail.com

These problems have alerted and motivated many researchers to search for vector control products which are safer and biodegradable. An alternative pointed out by several researchers is the use of natural products, among which are the essential oils (OEs) [10-12].

OEs are complex mixtures of volatile, lipophilic, odoriferous and generally liquid substances obtained from plants [13-15]. OEs are produced by more than 17,500 aromatic plant species belonging to families, such as Asteraceae, Lauraceae, Myrtaceae and Lamiaceae [16]. As for their composition, these are formed mainly by monoterpenes, sesquiterpenes and phenylpropanoids, metabolites which confer their organoleptic properties [17].

The sedative and anxiolytic activities [18], anti-inflammatory [19], antinociceptive and antispasmodic [20], antimicrobial [21], and insect vector repellent [22, 23] properties stand out among the bioactivities exerted by volatile oils.

With respect to insecticidal activities displayed by natural products, especially against *Ae. aegypti*, studies report a toxic potential for OEs against all stages of vector development, that is, these exert ovidal, larvicidal, pupicidal and adulticidal activities [24-27].

Knowing the importance of controlling this vector and based on the activities exerted by compounds with plant origin, this review had the objective of carrying out a bibliographic survey of publications reporting OEs with insecticidal properties. This SR was restricted to a larvicidal activity against *Ae. aegypti*, with the emphasis being given to aspects associated with the plant species used for extracting the OEs, the extraction methods, chromatographic techniques, chemical constituents and lethal concentrations (LC₅₀) responsible for larval mortality.

2. METHODOLOGY

This SR was executed according to PRISMA guidelines [28]. The search of studies was carried out through a database search



Enhancement of the antibiotic activity by quercetin against *Staphylococcus aureus* efflux pumps

Joycy F. S. dos Santos¹ · Saulo R. Tintino² · Ana R. P. da Silva² · Cristina R. dos S. Barbosa¹ · Jackelyne R. Scherf¹ · Zildene de S. Silveira¹ · Thiago S. de Freitas² · Luiz J. de Lacerda Neto¹ · Luiz M. Barros¹ · Irwin Rose de A. Menezes³ · Henrique D.M. Coutinho^{2,4} · José P. Siqueira-Júnior⁵ · Francisco A.B. Cunha¹

Received: 5 October 2020 / Accepted: 25 February 2021 / Published online: 8 March 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

The objective of this work was to evaluate the inhibitory effect of quercetin on *S. aureus* Efflux Pumps. The MIC of Quercetin was evaluated through the broth microdilution method, as well as the Efflux Pump inhibition assay through the method of reducing the antibiotic minimum inhibitory concentration as well as that of ethidium bromide. The *in silico* approach through bioinformatics was performed to demonstrate the molecular mechanism of interaction of the substrate and the binding cavity. The Quercetin inhibition concentration was not clinically relevant. With respect to the reversal of bacterial resistance effect by efflux pump inhibition, this effect was observed with the strains carrying the TetK and NorA pumps. Regarding the interaction between the Quercetin complex and the NorA pump, the extra stability was provided by hydrogen bonds produced by the hydroxyl group.

Keywords Phenolic compounds · Antibacterial drugs · Active efflux

✉ Henrique D.M. Coutinho
 hdmcoutinho@gmail.com

Joycy F. S. dos Santos
 joycy.sampaio22@gmail.com

Saulo R. Tintino
 saulorelison@gmail.com

Ana R. P. da Silva
 ana.raque@urca.br

Cristina R. dos S. Barbosa
 cristinase75@gmail.com

Jackelyne R. Scherf
 jackelyne_scherf@yahoo.com.br

Zildene de S. Silveira
 zildenesousa15@gmail.com

Thiago S. de Freitas
 thiagocrato@hotmail.com

Luiz J. de Lacerda Neto
 luizjardelino@gmail.com

Luiz M. Barros
 lmarivando@hotmail.com

Irwin Rose de A. Menezes
 irwinalencar@yahoo.com.br

José P. Siqueira-Júnior
 jpsiq@uol.com.br

Francisco A.B. Cunha
 cunha.urca@gmail.com

¹ Laboratory of Semi-Arid Bioprospecting (Lab-Bioprospec), Department of Biological Chemistry, DQB/URCA, Crato, Ceará, Brazil

² Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Department of Biological Chemistry, DQB/URCA, Crato, Ceará, Brazil

³ Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry (LPQM), Department of Biological Chemistry, DQB/URCA, Crato, Ceará, Brazil

⁴ Department of Biological Chemistry, Microbiology and Molecular Biology Laboratory (LMBM), Regional University of Cariri, DQB/URCA, Av. Cel. Antonio Luiz, 1161. Pimenta, Crato, Ceará CEP: 63105-000, Brazil

⁵ Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba CEP: 58051-900, Brazil

Springer