



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

**NADGHIA FIGUEIRÊDO LEITE SAMPAIO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E POTENCIALIZADORA**  
**DE (+)- $\alpha$ -PINENO E (-)-BORNEOL CONTRA BACTÉRIAS**  
**MULTIRRESISTENTES**

**Crato**

**2022**



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA**

**NADGHIA FIGUEIRÊDO LEITE SAMPAIO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E POTENCIALIZADORA**  
**DE (+)- $\alpha$ -PINENO E (-)-BORNEOL CONTRA BACTÉRIAS**  
**MULTIRRESISTENTES**

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

Orientador: Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

**Crato**  
**2022**

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

Leite Sampaio, Nadghia Figueirêdo

L533a AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E  
POTENCIALIZADORA DE (+)- $\alpha$ -PINENO E (-)-BORNEOL CONTRA  
BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES / Nadghia Figueirêdo Leite Sampaio. Crato  
- CE, 2022.

60p. il.

Tese. Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade  
Regional do Cariri - URCA.

Orientador(a): Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

1.Monoterpenos, 2.Resistência microbiana, 3.Antibacterianos; I.Título.

CDD: 571.7

## Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações Eletrônicas

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação abaixo identificada, autorizo à Universidade Regional do Cariri – URCA, a disponibilizar por tempo indeterminado ao alcance do público a obra abaixo citada, através do site <http://bdt.d.ibict.br/bdt.d/>, bem como da rede mundial de computadores – Internet, sem pagamento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, conforme permissões assinaladas, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data, atendendo à Portaria Nº 13 de 15/02/2006 da CAPES.

Identificação do Material Bibliográfico:		<input type="checkbox"/> Dissertação	<input checked="" type="checkbox"/> Tese
Autor: Nadghia Figueirêdo Leite Sampaio			
CPF:		RG:	
Nacionalidade: Brasileira		Estado Civil: Casada	
Endereço Completo: Rua Maria Senhorinha da Silva, nº 41. Bairro: Betolândia			
CEP: 63038-126		Cidade: Juazeiro do Norte	Estado: Ceará
Fone/Celular: (88) 9 9804-4853		E-mail: nadghia.fl@gmail.com	
Título: Doutor			
Orientador: Henrique Douglas Melo Coutinho			
Coorientador:			
Membros da Banca: Dr. José Galberto Martins da Costa			
Dr. Hélcio Silva dos Santos			
Dra Celestina Elba Sobral de Souza			
Dr Saulo Relinson Tintino			
Dr. Diniz Maciel de Sena Junior			
Data da Defesa: 20/06/2022		Curso: Doutorado em Química Biológica	
Área do Conhecimento: Ciências Biológicas			
Palavras-Chave: monoterpenos, resistência microbiana, antibacterianos.			
3. Agência de Fomento:			
Informações de Acesso ao Documento: para publicação		<input checked="" type="checkbox"/> Acesso Total	<input type="checkbox"/> Acesso Parcial
Em caso de publicação parcial, especifique o(s) arquivo(s) e/ou capítulo(s) restrito(s):			

Crato, 16 de agosto de 2022

Havendo concordância com a publicação eletrônica enviamos o(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação gerada a partir da versão final corrigida e aprovada pelo Orientador. A restrição (parcial ou total) poderá ser mantida por até dois anos a partir da data de autorização da publicação sob responsabilidade do Programa. A extensão deste prazo demandará justificativa formal apresentada será comunicada à CAPES

Assinatura do Autor:

Assinatura do Orientador:

**NADGHIA FIGUEIRÊDO LEITE SAMPAIO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E POTENCIALIZADORA  
DE (+)- $\alpha$ -PINENO E (-)-BORNEOL CONTRA BACTÉRIAS  
MULTIRRESISTENTES**

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

**Tese defendida e aprovada em: 20 de julho de 2022.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho  
Orientador - (URCA).**

---

**Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa  
Membro Titular Interno - URCA**

---

**Prof. Dr. Hécio Silva dos Santos  
Membro Titular Interno - URCA**

---

**Prof. Dra Celestina Elba Sobral de Souza**  
**Membro Titular Externo - (UNIVS)**

---

**Prof. Dr Saulo Relinson Tintino**  
**Membro Titular Externo - (URCA)**

---

**Prof. Dr Diniz Maciel de Sena Junior**  
**Membro Suplente Interno – (URCA)**

Dedico este trabalho à Deus e a minha família,  
em especial à minha filha Camila.

À Deus, por nunca me abandonar, por me guiar e colocar no meu caminho pessoas tão especiais.  
Ao Prof. Dr. Henrique Douglas por mais uma vez ter acreditado em mim e ter ajudado tanto no desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores do programa por transmitir seus conhecimentos.

À Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte – ESTÁCIO|FMJ, pelo espaço para realização dos testes dessa pesquisa.

Aos colegas de curso pela oportunidade do convívio e pela cooperação mútua durante estes anos.

À minha família: pais, irmãs, sobrinhos e cunhados, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando ao longo de toda a minha trajetória.

Ao meu marido Bruno.

Ao amor da minha vida, minha filha Camila.

À todos que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão desse trabalho.



“A ciência nunca resolve um problema sem  
criar pelo menos outros dez”.

George Bernard Shaw

## INTRODUÇÃO GERAL

**Figura 1.** Estrutura química do (+)- $\alpha$ -pineno 22

**Figura 2.** Estrutura química do (-)-borneol 22

## PRODUÇÃO CIENTÍFICA

### Artigo 1

**Fig. 1.** Evaluation of the modulating activity of  $\alpha$ -pinene against *Escherichia coli* - EC, *E. coli* Enterotoxigenic - ETEC and *E. coli* Enteropathogenic - EPEC. 33

**Fig. 2.** Evaluation of the modulating activity of borneol against *Escherichia coli* - EC, *E. coli* Enterotoxigenic - ETEC and *E. coli* Enteropathogenic - EPEC. 34

### Artigo 2

**Table 1:** Resistant profile of the strains. 39

**Table 2:** Minimum inhibitory concentration of (+)- $\alpha$ -pinene and (-)-borneol. 40

**Figure 1:** Antibiotic-modulating activity of (+)- $\alpha$ -pinene associated with antibiotics against *S. aureus*. 42

**Figure 2:** Antibiotic-modulating activity of (-)-borneol associated with antibiotics against *S. aureus*. 42

**Figure 3:** Antibiotic-modulating activity of (+)- $\alpha$ -pinene associated with antibiotics against *E. coli*. 42

**Figure 4:** Antibiotic-modulating activity of (-)-borneol associated with antibiotics against *E. coli*. 43

**Figure 5:** Antibiotic-modulating activity of (+)- $\alpha$ -pinene associated with antibiotics against *P. aeruginosa*. 43

**Figure 6:** Antibiotic-modulating activity of (-)-borneol associated with antibiotics against *P. aeruginosa*. 44

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

aEPEC	Atypical enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>
BHI	Brain Heart Infusion
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
DEC	Diarrheogenic <i>Escherichia coli</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPEC	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>
DNA	Desoxyribonucleic acid
EAEC	Enteroggregative <i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>
LMBM	Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular
MRSA	Methicillin Resistant <i>S. aureus</i>
PABA	para-aminobenzoico acid
RND	Resistance-nodulation-cell division
tEPEC	Typical enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
EFGM	Universidade Federal de Minas Gerais
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
URCA	Universidade Regional do Cariri
WHO	World Health Organization

---

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1</b>	<b>ESTRATÉGIAS DE PESQUISA.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2</b>	<b>ESTRUTURA DA TESE.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3</b>	<b>OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS.....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>TERPENOS.....</b>	<b>20</b>
3.1.1	Atividade antibacteriana de terpenos.....	20
3.1.2	Terpenos como adjuvantes.....	21
3.1.3	(+)- $\alpha$ -pineno.....	21
3.1.4	(-)-borneol.....	22
<b>3.2</b>	<b>MICRO-ORGANISMOS.....</b>	<b>23</b>
3.2.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	23
3.2.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	24
3.2.3	<i>Escherichia coli</i> .....	25
<b>3.3</b>	<b>ANTIBACTERIANOS.....</b>	<b>26</b>
3.3.1	CLASSES DE ANTIMICROBIANOS USADOS NA PESQUISA.....	26
3.3.1.1	Sulfonamidas.....	26
3.3.1.2	Aminoglicosídeos.....	27
3.3.1.3	Nitroimidazóis.....	28
3.3.1.4	Lincosamidas.....	28
3.3.1.5	Quinolonas.....	29
<b>3.4</b>	<b>RESISTÊNCIA MICROBIANA.....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>49</b>
<b>5.1</b>	<b>ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....</b>	<b>49</b>
<b>5.2</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>50</b>
<b>5.3</b>	<b>PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS.....</b>	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>

---

**Avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora de (+)- $\alpha$ -pineno e (-)-borneol contra bactérias multirresistentes**

**RESUMO**

**Introdução:** A resistência antimicrobiana é considerada uma das maiores ameaças à saúde humana. Agentes antimicrobianos estão cada vez mais restritos devido a capacidade de resistência dos microorganismos. Para superar a resistência aos antibióticos uma alternativa é desenvolver novos medicamentos, no entanto, há uma limitação no desenvolvimento de novos fármacos e uma alternativa, ao combate a microrganismos multirresistentes, é a investigação da combinação dos antimicrobianos com outros medicamentos ou fitocompostos. Os monoterpenos têm despertado interesse da comunidade científica, por ter mostrado potencial antimicrobiano. **Objetivo:** Avaliar a atividade antibacteriana dos terpenos (+)- $\alpha$ -pineno e (-)-borneol e sua capacidade moduladora de medicamentos antimicrobianos contra cepas de bactérias multirresistentes *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e sorotipos enteropatogênicos (EPEC) e enterotoxigênicos (ETEC) de *E. coli*. **Metodologia:** Para determinação da Concentração inibitória mínima e modulação de antimicrobianos foi utilizado o método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços. **Resultados e discussões:** (+)- $\alpha$ -pineno e (-)-borneol apresentaram baixa ação antimicrobiana contra *E. coli* multirresistente, porém essa ação não foi observada contra os sorotipos EPEC e ETEC. Foi verificada uma ação potencializadora do borneol associado à ciprofloxacino contra ETEC. O (-)-borneol apresentou atividade antimicrobiana frente a *E. coli* e moduladora das drogas ciprofloxacino e gentamicina frente a *S. aureus* e na combinação com sulfametoxazol+trimetoprima contra a *E. coli* o (-)-borneol agiu aumentando a CIM do fármaco. O (+)- $\alpha$ -pineno exibe eficiência tanto na associação com ciprofloxacino, amicacina e gentamicina frente a *S. aureus*, quanto na combinação com a gentamicina frente a *E. coli* e a amicacina e gentamicina frente a *P. aeruginosa*. Embora os mecanismos específicos envolvidos na ação antimicrobiana dos terpenos permaneçam pouco caracterizados, o que justifica poderia justificar a diminuição da CIM dos antibióticos são os danos estruturais e funcionais causados à membrana bacteriana. A ação desses compostos na membrana bacteriana leva à expansão, aumento da fluidez e permeabilidade, distúrbio da função da proteína e inibição do transporte de íons. No entanto, não se pode descartar a existência de certas interações epistáticas que resultam em respostas variáveis em estudos com diferentes espécies e antibióticos. **Conclusões:** Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que os (+)- $\alpha$ -pineno e (-)-borneol se mostram como compostos adjuvantes em potencial para ser usado no enfrentamento da resistência aos antimicrobianos, no entanto, análise de toxicidade e investigações com outras espécies bacterianas devem ser realizadas para que a combinação seja segura e eficaz no tratamento de infecções.

**Palavras-Chave:** monoterpenos, resistência microbiana, antibacterianos.

**Evaluation of the antimicrobial and modulatory activity of (+)- $\alpha$ -pinene and (-)-borneol against multidrug-resistant bacteria**

**ABSTRACT**

**Introduction:** Antimicrobial resistance is considered one of the greatest threats to human health. Antimicrobial agents are increasingly restricted due to the ability of microorganisms to resist. To overcome resistance to antibiotics an alternative is to develop new drugs, however, there is a limitation in the development of new drugs and an alternative, to combat multi-resistant microorganisms, is the investigation of the combination of antimicrobials with other drugs or phytochemicals. The monoterpenes have aroused interest in the scientific community, for having shown antimicrobial potential. **Objective:** To evaluate the antibacterial activity of the terpenes (+)- $\alpha$ -pinene and (-)-borneol and their modulating capacity of antimicrobial drugs against multi-resistant bacterial strains *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and enteropathogenic (EPEC) and enterotoxigenic (ETEC) serotypes of *E. coli*. **Methodology:** To determine the Minimum Inhibitory Concentration and antimicrobial modulation, the broth microdilution method was used in 96-well plates. **Results and discussions:** (+)- $\alpha$ -pinene and (-)-borneol showed low antimicrobial action against multidrug-resistant *E. coli*, but this action was not observed against EPEC and ETEC serotypes. A potentiating action of borneol associated with ciprofloxacin was found against ETEC. The (-)-borneol showed antimicrobial activity against *E. coli* and modulator of the drugs ciprofloxacin and gentamicin against *S. aureus* and in combination with sulfamethoxazole+trimethoprim against *E. coli* the (-)-borneol acted increasing the MIC of the drug. The (+)- $\alpha$ -pinene exhibited efficiency both in association with ciprofloxacin, amikacin and gentamicin against *S. aureus*, and in combination with gentamicin against *E. coli* and amikacin and gentamicin against *P. aeruginosa*. Although the specific mechanisms involved in the antimicrobial action of terpenes remain poorly characterized, what could justify the decrease in the MIC of antibiotics is the structural and functional damage caused to the bacterial membrane. The action of these compounds on the bacterial membrane leads to expansion, increased fluidity and permeability, disturbance of protein function, and inhibition of ion transport. However, the existence of certain epistatic interactions that result in variable responses in studies with different species and antibiotics cannot be ruled out. **Conclusions:** The results found in the present study suggest that (+)- $\alpha$ -pinene and (-)-borneol are shown as potential adjuvant compounds to be used to address antimicrobial resistance, however, toxicity analysis and investigations with other bacterial species should be carried out in order for the combination to be safe and effective in treating infections.

**Keywords:** monoterpenes, microbial resistance, antibacterial.

## IMPORTÂNCIA/RELEVÂNCIA PARA A SOCIEDADE

---

Como uma bactéria tão simples do ponto de vista evolutivo pode causar prejuízos ao ser humano e a outras espécies? Essa pesquisa mostrou que compostos sintéticos podem ter ação antibiótica como também atuar potencializando a ação de medicamentos antibacterianos. A quantidade de micro-organismos multirresistentes é crescente e com isso faz-se necessário a descoberta de novas drogas antimicrobianas. O estudo de compostos bioativos é de extrema importância para os avanços na medicina como também para qualidade de vida da sociedade. Assim, essa pesquisa pode incentivar outras investigações para produção de novos fármacos ou combinações dos compostos isolados às drogas comerciais para o combate às infecções causadas por cepas multirresistentes.

### 1.1 ESTRATÉGIAS DE PESQUISA

A princípio foi decidido trabalhar com sorotipos diarreigênicos de *Escherichia coli*, devido ao grave problema de saúde pública causada por essas cepas, principalmente em crianças. Para investigação da atividade antimicrobiana, os terpenos são compostos conhecidos por suas atividades biológicas, sendo assim, haveria uma maior probabilidade de um composto desse grupo apresentar efeito antimicrobianos frente os sorotipos de *E. coli*. No decorrer dos testes cepas multirresistentes de *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foram inseridas na avaliação, por também serem bactérias de importância médica envolvidas em diversas infecções humanas.

Os compostos escolhidos foram de acordo com a atividade antimicrobiana já comprovada na literatura, bem como ausência de avaliações frente a cepas selecionadas. Pela facilidade de aquisição foi decidido o uso de compostos sintéticos, ao invés de trabalharmos com o isolamento de fitocompostos.

Após ponderar o objetivo deste estudo, com a forma escolhida para coleta dos dados, optou-se por tratá-los de forma quantitativa, empregando a estatística para análise dos resultados e construção de gráficos.

Levando em consideração o escopo deste estudo, as metodologias dos testes foram definidas de acordo com a aplicabilidade diante dos objetivos escolhidos. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração capaz de impedir o crescimento bacteriano, nas cavidades da placa de microdiluição conforme detectado macroscopicamente (CLSI, 2021). O método de microdiluição em caldo foi selecionado para determinar a CIM dos produtos, que de acordo com a CLSI (2018), podem ser usados para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano.

Para avaliar a atividade moduladora foram utilizadas as concentrações subinibitórias da CIM (CIM/ 8) das substâncias frente aos antibióticos, usando a metodologia descrita por Coutinho et al., (2008), o teste de modulação foi realizado na presença e na ausência das substâncias.

Os compostos foram fornecidos pelo professor José Maria Barbosa Filho da Universidade Federal da Paraíba - UFPB. Os sorotipos de *Escherichia coli* enteropatogênica - EPEC e *Escherichia coli* enterotoxigênica - ETEC foram fornecidas pelo professor Dr. Rodrigo Otávio Silveira Silva, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As bactérias padrões e multirresistentes foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM, da Universidade Regional do Cariri – URCA. As atividades foram desenvolvidas no



laboratório de microbiologia da Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte – ESTÁCIO|FMJ.

Nesse contexto, trata-se de um trabalho científico original, bibliográfico e de laboratório que se propôs a analisar os dados de forma quantitativa. No que diz respeito à metodologia é possível destacar que a estratégia de pesquisa apresentará vantagens e limitações, mas que abre um viés para futuras investigações no melhoramento de fármacos usados para o combate de bactérias multirresistentes.

## 1.2 ESTRUTURA DA TESE

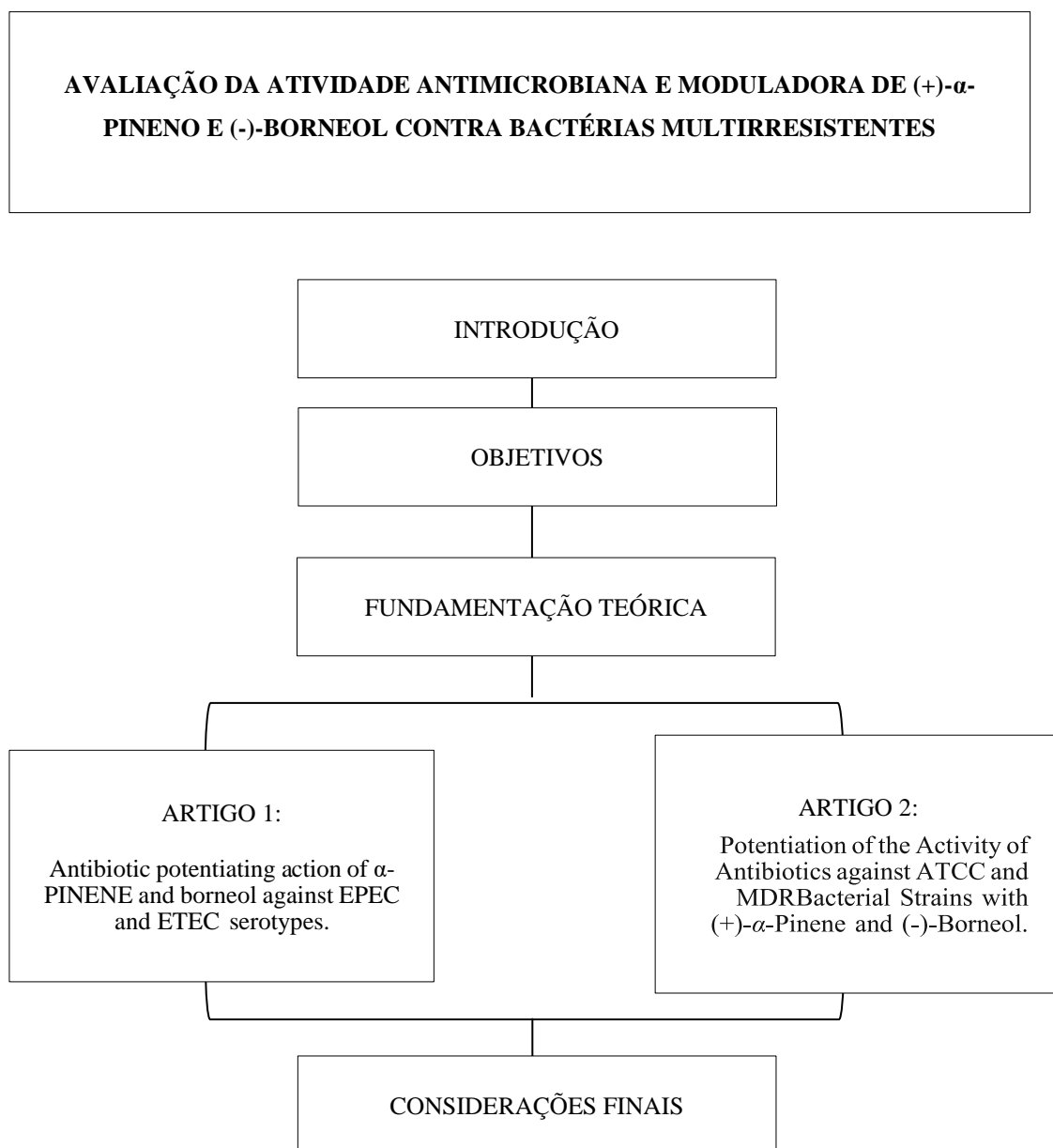
A tese está estruturada em 5 tópicos: 4 capítulos e referências. O capítulo 1 aborda uma introdução geral onde descreve as estratégias de pesquisa e a estrutura do trabalho. No capítulo 2, expõe os objetivos geral e específicos como também os questionamentos, explicando a motivação para realização da tese e contextualizando com a literatura. No capítulo 3, é apresentado o referencial teórico dividido em subtópicos expondo informações importantes sobre o tema da tese direcionam para o tratamento do problema, bem como relata informações de outros pesquisadores que trabalham na mesma linha de pesquisa. Esse capítulo discorre sobre a resistência microbiana e o uso de compostos sintéticos pela comunidade científica, além de discorrer sobre os micro-organismos e antimicrobianos usados.

Os resultados da pesquisa estão divididos em 2 artigos e foram apresentados no capítulo 4. O primeiro artigo intitulado “Antibiotic potentiating action of  $\alpha$ -PINENE and borneol against EPEC and ETEC serotypes”. foi publicado na *Microbial Pathogenesis*, (IF=3,7), qualis B2 na área de Ciências Biológicas II.

Na sequência do Capítulo 4, é apresentado o segundo artigo “Potentiation of the Activity of Antibiotics against ATCC and MDRBacterial Strains with (+)- $\alpha$ -Pinene and (-)-Borneol”, publicado na *BioMed Research International* (IF= 3,4), Qualis B2 em Ciências Biológicas II.

O capítulo 5 refere-se as considerações finais onde é apresentado a discussão geral que dá sentido ao conjunto de evidências e achados da tese. As conclusões gerais bem como as perspectivas de investigações futuras envolvendo os monoterpenos são apresentados nessa seção.

Fluxograma 1: Estrutura da tese



Fonte: LEITE-SAMPAIO, 2022

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Verificar a ação antibacteriana *in vitro* de (+) –  $\alpha$ -pineno e (-) – borneol, diretamente e em conjunto com antibacterianos, contra sorotipos de *Escherichia coli* e bactérias multirresistentes.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a concentração inibitória mínima dos compostos sintéticos sobre *Escherichia coli* e os sorotipos EPEC e ETEC.
- Revelar a concentração inibitória mínima dos compostos sintéticos sobre *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.
- Investigar a atuação dos compostos sintéticos como modificadora da ação de antibacterianos.

### **2.3 OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS**

O surgimento de resistência antimicrobiana é uma resposta evolutiva natural à exposição aos fármacos na qual para sobreviver, as bactérias desenvolveram estratégias complexas e criativas para evitar o ataque de antibióticos, sendo que tal processo provavelmente é pressionado pelo aumento do uso de antimicrobianos na prática clínica. Outros fatores que também podem aumentar a prevalência de micro-organismos resistentes a antimicrobianos são decorrentes do uso na agricultura e da poluição do meio ambiente (HOLMES *et al.*, 2016; MUNITA e ARIAS, 2016).

Quase todos os novos antibióticos lançados no mercado nas últimas décadas são variações das classes de antibióticos descobertos na década de 1980 (WHO, 2021). A produção de um medicamento antimicrobiano é uma missão complexa, demorada, além de ter alto custo para as indústrias farmacêuticas. O que ocorre com frequência são modificações na estrutura das moléculas que já existem, sendo a criação de uma nova classe uma situação mais atípica (CAEIRÃO, 2004).

Sem ferramentas eficazes para a prevenção e tratamento adequado de infecções resistentes a medicamentos e melhor acesso aos antimicrobianos existentes e novos com garantia de qualidade, o número de pessoas cujo tratamento está falhando ou que morrem de infecções aumentará. Procedimentos médicos, como cirurgia, incluindo cesarianas ou próteses

de quadril, quimioterapia para câncer e transplante de órgãos, se tornarão mais arriscados. (WHO, 2020)

Muitas substâncias isoladas de plantas são consideradas como fontes de medicamentos (FOGLIO, 2006). Estes produtos podem ser usados como modelos moleculares para a síntese total de novos compostos bioativos ou ser utilizado como estrutura de base para obter moléculas farmacologicamente ativas, no intuito de melhorar as propriedades farmacológicas de medicamentos já usuais (SIMÕES *et al.*, 2017).

Nesse contexto, os terpenos se apresentam como um importante grupo de fitocompostos apropriados para o desenvolvimento de fármacos. Foram escolhidos o  $\alpha$ -pineno e o borneol para dar início a investigação da atividade microbiana contra sorotipos de *Escherichia coli*, EPEC e ETEC. Foram adicionadas mais cepas bacterianas, a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Por serem importantes causadoras de infecções em seres humanos e animais, além de apresentarem diferentes tipos de mecanismos de sobrevivência na presença de agente antimicrobianos.

Em seguida, foram avaliados quanto a capacidade de modular a ação de antimicrobianos escolhidos pelo uso na prática médica no tratamento da diarreia sendo eles: ciprofloxacino, metronidazol e sulfametoxazol+trimetoprima. Além desses, foram adicionados os antibióticos amicacina, clindamicina e gentamicina, para avaliar a interação dos compostos com outras classes de antibacterianos.

Os compostos escolhidos para essa pesquisa apresentaram uma concentração inibitória mínima melhor em cepas de *E. coli*. E conseguiu modular a resposta de alguns dos antibióticos. Dessa forma, os terpenos e terpenóides poderão ser importantes alternativas para o controle de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos convencionais (TEPLITSKI *et al.*, 2000; ZHANG, 2003).

Com os resultados obtidos espera-se auxiliar na busca de agentes com atividade antimicrobiana e que também podem atuar melhorando a capacidade de ação dos medicamentos antibacterianos usuais.

#### 3.1 TERPENOS

Os terpenos são constituídos de carbono e hidrogênio, quando apresentam oxigênio na cadeia carbônica são chamados de terpenoides. Ambos derivam do isopreno, a partir da rota biossintética do ácido mevalônico. Nessa classe, compõe-se os monoterpenos (10 átomos de carbono), sesquiterpenos (15 átomos de carbono), diterpenos (20 átomos de carbono), sesterpenos (25 átomos de carbonos), triterpenos (30 átomos de carbonos), tetraterpenos (40 átomos de carbonos) e polisoprenoides. Os compostos encontrados com maior frequência nos óleos essenciais são os monoterpenos e sesquiterpenos que podem ser subdivididos em três grupos: os acíclicos, monocíclicos ou bicíclicos (SIMÕES et al., 2007).

Conforme Sartori (2005) tem sido demonstrado que os terpenos são possuem atividade antimicrobiana, seu mecanismo de ação supostamente envolve a ruptura da membrana celular por compostos lipofílicos.

##### 3.1.1 Atividade antibacteriana de terpenos

Alguns trabalhos demonstram a atividade antimicrobiana de terpenos, como  $\alpha$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno, linalol,  $\alpha$ -terpineol, carvacrol e timol (COSENTINO et al., 1999), canfora (MAGIATIS et al., 2002), timol, carvacrol (GUARDA et al., 2011; CAMPOS-REQUENA et al., 2015), citronelol, citronelal, carveol e carvona (LOPEZ-ROMERO et al., 2015) e geraniol (TOMADONI et al., 2015).

Nos estudos de Guimarães (2016) os compostos carvacrol e timol apresentaram atividade positiva, contra as linhagens de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Salmonella typhimurium*, em todas as concentrações. Timol se apresentou como um potente composto bacteriostático. O eugenol apresentou ação bactericida contra *S. typhimurium*. O terpineol demonstrou atividade antimicrobiana contra cepas de *S. aureus*. Já os compostos carveol, citronelol e geraniol apresentaram efeito bactericida frente as cepas de *E. coli*.

Foi demonstrada uma atividade bacteriostática sobre as cepas de *Escherichia coli* ESBL (*extended-spectrum  $\beta$ -lactamase*) pelo carvacrol e timol (DE LIMA et al. 2017) e citronelol (DE LIMA et al, 2020).

Nogueira (2019) demonstra em seus estudos que carvona, carvacrol, eugenol e trans-cinamaldeído apresentaram atividade biológica sobre *E. coli* e *S. aureus*, e  $\beta$ -citronelol possui

potencial antibacteriano sobre *S. aureus*, para justificar a atividade investigou o mecanismo de ação desses compostos sobre as bactérias *E. coli* e *S. aureus* e revelou que os terpenos examinados foram capazes de provocar danos à membrana bacteriana, supostamente por alterar a sua permeabilidade. Ainda afirma que dentre os compostos avaliados foram observadas que cada amostra possui um mecanismo de ação distinto, que culmina em alterações estruturais na membrana, sem resultar na lise celular.

### 3.1.2 Terpenos como adjuvantes

Embora as indústrias químicas e farmacêuticas tenham produzido uma variedade de diferentes antibióticos, o aumento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis no mercado é crescente, o que incentiva a busca por novas fontes de substâncias, com atividades antimicrobianas (RIBEIRO, 2008). Para Padilha *et al.* (2010) a resistência aos antimicrobianos é um problema sério em todo o mundo, sendo a pesquisa por novos agentes antimicrobianos, de fundamental importância. Nesse contexto, o interesse em avaliar a atividade antimicrobiana de plantas está cada vez maior.

Coutinho *et al.* (2015) avaliaram a capacidade potencializadora da ação antibiótica frente a *S. aureus* e constatou que o geraniol aumentou a ação da canamicina e o cariofileno aumentou a resistência da bactéria contra a neomicina.

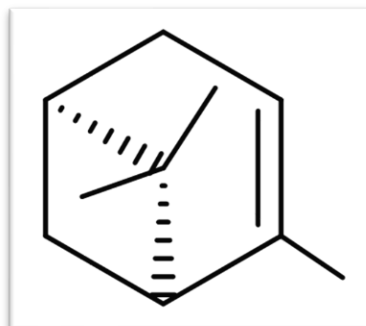
O d-limoneno apresentou efeito sinérgico quando associado à Gentamicina frente a *S. aureus* e *E. coli*. (DE SOUZA *et al.*, 2018)

Lima (2018) em seus estudos mostrou que o linalol agiu potencializando a ação de aminoglicosídeos (polimixina B e tigeciclina), inibindo as cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase.

### 3.1.3 (+)- $\alpha$ -pineno

Pineno (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>) é um monoterpeneo bicíclico (Figura 1) (WINNACKER, 2018). Está entre os representantes mais conhecidos de uma ampla família de monoterpeneos. Possui dois enantiômeros. O  $\alpha$ -pineno é um líquido orgânico incolor, insolúvel em água, mas solúvel em óleo e etanol. Seu ponto de ebulição é 155 ° C, foi detectado em pelo menos 40 óleos essenciais diferentes (VESPERMANN *et al.*, 2017; BERGER, 2007). Como componente majoritário é visto nos óleos essenciais das folhas de *Protium grandifolium* (SILVA *et al.*, 2009) *Ugni myricoides* (QUINTÃO *et al.*, 2010), *Syzygium cumin* (DA FRANCA RODRIGUES, *et al.*, 2015), *Plectranthus barbatus* (GOVINDARAJAN *et al.* 2016), *Baccharis reticulata* (FREITAS *et al.*, 2020) *Croton blanchetianus* (PORTO *et al.*, 2021).

**Figura 1:** Estrutura química do (+)- $\alpha$ -pineno



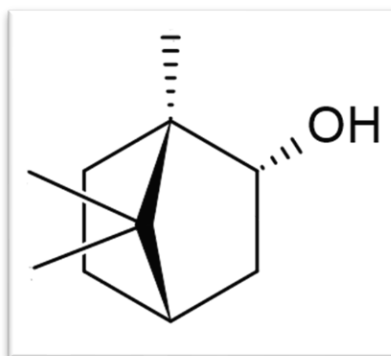
Fonte: LEITE SAMPAIO, 2022

O  $\alpha$ -pineno apresenta atividade larvicida, detergente, inseticida (SIMAS *et al.* 2004). Gayoso *et al.* (2004) e Lima *et al.* (2005) encontraram eficácia antimicrobiana de pinenos contra fungos e leveduras patogênicas. Os resultados obtidos por SOBRAL-SOUZA *et al.* (2014) indicam que o  $\alpha$ -pineno é eficaz contra as cepas de *Leishmania brasiliensis*.

#### 3.1.4 (-)-borneol

O borneol ( $C_{10}H_{18}O$ ) é um álcool mono-terpenóide bicíclico (Figura 2) que possui diversas aplicações na medicina popular e em alimentos na China e na Índia, usado também em especiarias como composto aromático sênior e em materiais químicos (CHEN *et al.*, 2011). A exemplo disso temos o borneol sendo usado como um ingrediente de fragrâncias cosméticas decorativos, fragrâncias finas, shampoos, sabonetes assim como em outros produtos de higiene pessoal, em produtos não cosméticos, como produtos de limpeza e detergentes domésticos (BHATIA, LETIZIA, API, 2008).

**Figura 2:** Estrutura química do (-)-borneol



Fonte: LEITE-SAMPAIO, 2021

Existe como dois enantiômeros nas formas d e l, podendo ser encontrado em óleos essenciais de várias plantas medicinais, como a valeriana (*Valeriana*

*officinalis* subsp. *Collina* (Wallr.) Nyman), camomila (*Matricaria chamomilla* L. Rydb.) e alfazema (*Lavandula officinalis* Chaix). (ZIELIŃSKA-BŁAJET, FEDER-KUBIS, 2020).

O (-) - borneol e seus derivados apresentam atividade antimicrobiana (SHI, *et al.*, 2015), antiinflamatória (VASCONCELOS *et al.*, 2012) e antiviral (SOKOLOVA *et al.* 2017). Xu *et al.* (2016) mostraram em seus estudos que o borneol demonstrou promover a passagem de drogas através da barreira hematoencefálica, melhorando assim a eficiência de medicamentos.

### 3.2 MICRO-ORGANISMOS

Os agentes de doenças infecciosas humanas pertencem aos cinco principais grupos de organismos, são eles: bactérias, fungos, protozoários, helmintos e vírus. Com exceção dos vírus todos os outros são celulares e se distinguem principalmente pela estrutura, mecanismo de replicação e natureza do ácido nucleico (LEVINSON, 2016).

As bactérias (e outros microrganismos) podem adaptar-se a vários ambientes como solo, água e matéria orgânica, ou ser encontrados nos insetos-vetor, animais e em seres humanos, onde normalmente habitam e subsistem. São consideradas patogênicas quando apresentam capacidade de se disseminar, aderir e persistir, e invadir células e tecidos do hospedeiro, como também possuem virulência e habilidade de escapar ou sobreviver ao sistema imunológico do hospedeiro. A resistência a antibacterianos e desinfetantes também pode levar à virulência, a capacidade dos microrganismos de causar doenças (JAWETZ, 2022).

A seguir, encontram-se algumas informações sobre as bactérias selecionadas para investigação nesse trabalho.

#### 3.2.1 *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* é uma espécie de bactéria pertence a família Staphylococcaceae, classificada como gram-positiva, anaeróbia facultativa, e capaz de produzir biofilmes. Suas colônias formam cachos e reagem positivamente a coagulase, maltose e manitol (BERNARDES, JORGE e LEÃO, 2004). Os estafilococos são microrganismos mesófilos com temperatura de crescimento entre 7 e 47,8 °C e podem produzir enterotoxinas termoresistentes a temperaturas entre 10 e 46°C, com temperatura ótima entre 40 e 45° C (SANTANA, 2006; SANTANA *et al.*, 2010).

*S. aureus* é responsável por uma variedade de infecções, e o tratamento deles depende de antibióticos. Os antibióticos usados na terapia de infecções estafilocócicas têm como alvo os principais processos bacterianos, incluindo a síntese da parede celular, tradução, transcrição,



e síntese de DNA (VESTERGAARD; FREES; INGMER, 2019). Mesmo fazendo parte da microbiota humana, principalmente da pele, tem potencialidade de se tornar patogênico e causar infecção quando há quebra da barreira cutânea ou diminuição da imunidade (KIM *et al.*, 2019; KAUR e CHATE, 2015).

Patologias causadas por essa bactéria constituem um problema de saúde única devido à grande interação e adaptação ao homem, animal e meio ambiente sendo, então, considerado um patógeno oportunista altamente potente, devido à sua capacidade de adquirir genes responsáveis por potencializar fatores de patogenicidade e resistência aos antimicrobianos (MENDEM *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2017).

Estão cada vez maiores as taxas de resistência à infecção por *S. aureus* e cepas multirresistentes, esse cenário dificulta o tratamento clínico anti-infeccioso. A permeabilidade da membrana celular, o sistema de efluxo e a produção excessiva de  $\beta$ -lactamase são os três principais mecanismos de resistência endógena (GUO *et al.*, 2020).

Métodos alternativos para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus* vêm sendo pesquisados há muitos anos, classificado como um dos principais agentes patogênicos causadores de enfermidades ligadas aos animais (BARRERA-RIVAS *et al.*, 2017) e humanos (ALEGRE *et al.*, 2016).

### 3.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

É bacilo gram-negativo pertencente à família Pseudomonadaceae que apresenta-se em forma de bastonetes, aeróbio, não-esporulado, não fermentador de glicose, possuindo flagelo polar. Apesar de fazer parte da microbiota residente, é considerado um patógeno humano oportunista importante. Possui extensa difusão podendo ser encontrado no meio ambiente, nas superfícies de plantas, no solo, na água e fazer parte da microbiota intestinal em seres humanos, como também na cavidade bucal de indivíduos hospitalizados sendo dessa forma repetidamente associada a infecções hospitalares, acometendo, principalmente, pacientes imunossuprimidos (LYCZAK; CANNON; PIER, 2000; LUCENA *et al.*, 2014; DE FREITAS *et al.*, 2018).

*Pseudomonas aeruginosa* pode causar pneumonia, infecções do trato urinário, e bacteremias, bem como alta morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística, em detrimento de infecções crônicas que acarretam danos ao nível pulmonar e insuficiência respiratória (OCHOA *et al.*, 2013). A importância clínica da infecção por *P. aeruginosa* caracteriza-se pela expressão de múltipla resistência aos antimicrobianos associados a uma difícil erradicação da doença, com elevados índices de morbidade e mortalidade (NEVES *et al.*, 2011).

Este micro-organismo apresenta resistência antimicrobiana natural ou adquirida, devido a fatores como a capacidade metabólica flexível e seu genoma que codifica uma série de genes de resistência como os sistemas de efluxo da família RND - resistance-nodulation-cell division (MULCAHY *et al.*, 2014).

### 3.2.3 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa em forma de bastonete, classificada como membro da família Enterobacteriaceae, pode crescer rapidamente em condições ideais de crescimento, replicando em aproximadamente 20 minutos. Muitos sistemas de manipulação de genes foram desenvolvidos usando *E. coli* como bactéria hospedeira, produzindo inúmeras enzimas e outros produtos industriais. As características de crescimento rápido de *E. coli* tornam-o adequado para estudar a evolução de microrganismos (TENAILLON *et al.*, 2010).

É considerada comensal que pode ser encontrada na microflora intestinal de uma variedade de animais, incluindo o homem, no entanto, nem todas as estirpes são inofensivas, e alguns podem adquirir genes de virulência que resultaram num aumento da patogenicidade para humanos e animais e causar doenças debilitantes, por vezes, fatais (KASNOWSKI *et al.*, 2007; BELANGER *et al.*, 2011).

As espécies de *E. coli* são sorotipadas com base em seu antígeno somático (O), flagelar (H) e capsular (K). Já foram identificados 171 diferentes antígenos O, sendo que a quantidade de diferentes antígenos descobertos aumenta a cada ano. Uma combinação específica de antígenos O e H define o sorotipo de uma linhagem, enquanto que na identificação perfunctória apenas o antígeno O é utilizado para definição do sorogrupo da linhagem (NATARO; KAPER, 1998).

#### 3.2.3.1 *Escherichia coli* diarreiogênicas

Organismos diarreiogênicos de *Escherichia coli* (DEC) são relevantes causadores de diarreia endêmica e epidêmica no mundo, bem como importantes contribuintes da diarreia dos viajantes em países industrializados. Nos países em desenvolvimento, a morbidade e a mortalidade relacionadas à diarreia bacteriana pediátrica são amplamente atribuídas à DEC. Recém-nascidos e crianças até 1 ano de idade são particularmente vulneráveis quando não foram amamentados. O grupo DEC compreende diversos patótipos que podem induzir a diarreia, e são sub-agrupados em: *E. coli* enteroagregativa (EAEC); *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) que pertence ao produtor de toxina Shiga; *E. coli* enteropatogênica típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC), *E. coli* enterotoxigênica produtora de enterotoxina (ETEC), *E. coli*

enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (NATARO e KAPER, 1998; SHAH *et al.*, 2009, GOMES *et al.*, 2016).

Dos diversos tipos de *Escherichia coli*, temos os patótipos diarreiogênicos de *E. coli*: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* enteropatogênicos (EPEC). A EPEC desenvolve uma lesão histopatológica intestinal característica, conhecida como fixação e apagamento, acometendo uma diarreia aquosa no doente. A ETEC, também atua na diarreia aquosa, coloniza o epitélio do intestino delgado e produz enterotoxinas, termolábil e/ou termoestável, que interferem nos processos de absorção e secreção intestinal (CROXEN, 2013).

É importante mencionar que em 1995, a EPEC foi classificada em duas subcategorias: EPEC típica (EPEC-t), identificadas pela presença do gene *eae* (EPEC *attaching and effacing*) e plasmídeo EAF (EPEC *adherence factor*), e atípica (EPEC-a) apresentam o gene *eae*, porém são desprovidas do plasmídeo EAF. TRABULSI *et al.*, 2002.

### 3.3 ANTIBACTERIANOS

Mesmo com a inovação perante o uso dos antibióticos, as patologias infecciosas se destacam por sua resistência e por gerar muitas mortes entre os humanos. Assim há uma corrida em busca de novos compostos eficientes contra esses seres patogênicos (GARCIA *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de fármacos antimicrobianos representa um dos avanços mais importantes na terapêutica, tanto no controle como na cura de infecções graves e na prevenção e no tratamento de complicações infecciosas (KATZUNG, 2017).

Para que o antibiótico seja útil clinicamente ele deve apresentar a toxicidade seletiva, ou seja, deve inibir processos bacterianos de forma mais significativa que processos de células humanas. Os fármacos antibióticos possuem quatro alvos: parede celular, ribossomos, membrana celular e ácidos nucleicos (LEVINSON, 2016).

#### 3.3.1 CLASSES DE ANTIMICROBIANOS USADOS NA PESQUISA

##### 3.3.1.1 Sulfonamidas

A primeira síntese de uma sulfonamida foi relatada no início do século XX, porém estes compostos só obtiveram um maior destaque entre 1932-1935 após a descoberta do Prontosil (*Prontosil rubrum*) pelo alemão Gerhard Domagk. Este composto foi o primeiro antimicrobiano efetivo no combate a infecções (HAIM, 1941; TACIC *et al.*, 2017).

As sulfonamidas são fármacos sintéticos derivados do *p*-aminobenzenosulfonamida, caracterizados por um grupo arila contendo um grupo amino e um grupo sulfonamida em

posição *para*, e são amplamente utilizados no tratamento de infecções causadas por micro-organismos gram-positivos e gram-negativos (MARTINEZ *et al.*, 2003; PASTOR-NAVARRO *et al.*, 2007). De acordo com Katzung (2022), as sulfonamidas são produzidas acoplando-se substitutos ao grupamento amido ( $-\text{SO}_2-\text{NH}-\text{R}$ ) ou amino ( $-\text{NH}_2$ ) no núcleo da sulfanilamida.

As sulfonamidas são análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido para-aminobenzoico (PABA), sendo assim, inibem competitivamente a di-hidropteroato-sintetase, a enzima bacteriana encarregada pela incorporação do PABA no ácido di-hidropteroico, precursor imediato do ácido fólico, como consequência as bactérias são impedidas de sintetizar o ácido fólico ou vitamina B9. Os micro-organismos sensíveis a esses fármacos são aqueles que precisam sintetizar seu próprio ácido fólico, as bactérias capazes de utilizar o folato pré-formado não são afetadas. (GILMAN *et al.*, 2006).

Uma característica importante para a atividade biológica de derivados dessa classe de compostos é o fato de o grupo sulfona ( $-\text{SO}_2-$ ) está ligado covalentemente a um átomo carbono e a um átomo de nitrogênio (LAVANYA, 2017; TACIC *et al.*, 2017). É importante destacar a necessidade do átomo de enxofre estar ligado diretamente a um anel aromático, uma vez que a presença de grupos retiradores de elétrons ligados a esse anel, pode potencializar algumas atividades, em especial a atividade bactericida (ASHFAQ *et al.*, 2013; KOŁACZEK *et al.*, 2014).

### 3.3.1.2 Aminoglicosídeos

Desde a descoberta da estreptomicina na década de 1940, os aminoglicosídeos têm desfrutado de ampla aplicação como agentes quimioterápicos no tratamento de muitos tipos de infecções bacterianas, incluindo patógenos gram-positivos e gram-negativos. (DAVIES; WRIGHT, 1997). As principais drogas dessa classe são: estreptomicina, gentamicina, tobramicina, amicacina, netilmicina, paramomicina e espectinomicina (ANVISA, 2007).

Os aminoglicosídeos possuem um anel de hexose, ao qual diversos aminoaçúcares se conectam por ligações glicosídicas. São hidrossolúveis, estáveis em solução e mais ativos em pH alcalino do que no ácido (KATZUNG, 2022).

O nome se deve ao fato de que a molécula é constituída por dois ou mais açúcares amino ligados por ligações glicídicas à hexose ou aminociclitol que normalmente assume a posição central. Aqueles que terminam em micina são derivados diretos ou indiretos de *Micromonospora* e aqueles que terminam em mycina são diretos ou derivados indiretos de *Streptomyces*, nesse contexto, o nome da substância está relacionado a origem. A atividade antimicrobiana ocorre principalmente em meio aeróbico e em pH alcalino, eles requerem

oxigênio para o transporte ativo na membrana celular e são mais ativos em condições alcalinas do que ácidas (OLIVEIRA, CIPULLO e BURDMANN, 2006).

Os antibióticos aminoglicosídeos agem sobre a célula bacteriana inibindo a síntese proteica, conduzindo à produção de proteínas irregulares “non sense”, alteram a permeabilidade celular bacteriana e, por fim, inibem a replicação do DNA, sendo que o principal mecanismo de morte celular da bactéria é a inibição da síntese proteica (SOUSA, 2006).

#### 3.3.1.3 Nitroimidazóis

A descoberta dos antibióticos nitroimidazol data do início dos anos 50, quando a azomicina foi isolada pela primeira vez de um extrato bruto da bactéria *Streptomyces* (NAKAMURA, 1955). Baseados em modificações da estrutura química da azomicina, cientistas do grupo Rhône-Poulenc sintetizaram, em 1957, o 1-(β-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol (metronidazol) (COSAR e JULOU., 1959).

Nitroimidazóis pertencem a um grupo de compostos nitro-heterocíclicos com atividade de amplo espectro contra parasitas, micobactérias e bactérias gram-positivas e gram-negativas (TORREELE *et al.*, 2010; STOVER *et al.*, 200; LÖFMARK *et al.*, 2010).

De acordo com a ANVISA (2007) a droga entra na célula por difusão passiva, e é ativado por um processo de redução. O grupo nitro do fármaco atua como receptor de elétrons, levando à liberação de compostos tóxicos e radicais livres que atuam no DNA, inativando-o e impedindo a síntese enzimática das bactérias.

#### 3.3.1.4 Lincosamidas

As lincosamidas constituem uma família de antibióticos que compreende dois representantes: lincomicina e clindamicina. São derivados alquil de prolina e são desprovidos de um anel de lactona. Caracterizados por um aminoácido e um açúcar unidos por um ligação amida. Possuem um átomo de nitrogênio ligado ao seu grupo carbonila. A lincomicina foi obtida em 1962 a partir da purificação de um actinomiceto (*Streptomyces lincolnensis*), possui cinco derivados semissintéticos, dos quais somente a clindamicina é utilizada na clínica. Possuem atividade bacteriostática tendo como seu mecanismo de ação a ligação à subunidade 50S dos ribossomos bacterianos e inibindo a transpeptidação, evitando como consequência a síntese de proteínas (LECLERCQ; COURVALIN, 1991; STAHL, 2017).

A clindamicina é usada no tratamento de infecções de pele e tecidos moles causadas por estafilococos. Boa absorção oral faz deste antimicrobiano uma opção importante na terapia

ambulatorial ou como seguimento após terapia intravenosa (CIRAJ et al., 2009; SADERI; EMADI; OWLIA, 2011).

### 3.3.1.5 Quinolonas

As infecções no início do século XX eram as maiores responsáveis pelos óbitos, somando com as que eram acometidas pelas bactérias causando mais da metade das doenças. Com o uso das sulfonamidas e depois da penicilina, repercutiu no desenvolvimento de novos compostos antibacterianos para tratar patologias, bem como diminuiu exacerbadamente o índice de óbitos (NAEEM *et al.*, 2016).

O desenvolvimento das quinolonas teve início com a identificação do ácido nalidíxico por Lesher et al. (1962), à partir de um subproduto da síntese da cloroquina, o 6-cloro-1-H-etil-4-oxoquinolona-3-ácido carboxílico (BARLOW, 1963). A estrutura química geral das quinolonas contém dois anéis quinolônicos, com um átomo de nitrogênio na posição 1, um grupo carbonila na posição 4 e um grupo carboxila na posição 3. De acordo com a composição química desses anéis, as quinolonas se classificam em diferentes grupos (DE SOUZA, 2010).

A adição de substituintes selecionados nos ligantes-chave da estrutura principal da quinolona viabilizou o desenvolvimento de antimicrobianos que fossem mais potentes e capazes de agir contra um maior grupo de micro-organismos (RODRIGUES-SILVA *et al.*, 2014).

## 3.4 RESISTÊNCIA MICROBIANA

O surgimento de micro-organismos patogênicos resistentes a ação de antimicrobianos é uma problemática de relevância para a saúde pública (LOREIRO *et al.*, 2016). A resistência pode ser uma característica intrínseca do micro-organismo ou ser alcançada por mutações (DA COSTA e JUNIOR, 2017). A resistência intrínseca aos antibióticos de uma espécie bacteriana refere-se à sua capacidade inata de diminuir a eficácia de um antibiótico específico por meio de características estruturais ou funcionais inerentes (BLAIR *et al.*, 2015).

Após a criação dos primeiros antimicrobianos, a pressão seletiva por diferentes fármacos foi percebida e continuou no decorrer das décadas. Populações inteiras a exibir resistência a múltiplas drogas já que os microrganismos passaram a desenvolver diferentes mecanismos de resistência. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiela pneumoniae* com  $\beta$ -lactamases de espectro estendido, enterococos resistentes à vancomicina e MRSA resistentes à vancomicina são classificados como alguns dos organismos mais problemáticos

(ALEKSHUN e LEVY, 2007)

A resistência de micro-organismos a múltiplas drogas é atribuída ao uso indiscriminado de antibióticos, gerando a necessidade de novas fórmulas para fármacos em geral. Por serem fonte de uma extensa diversidade molecular com diferentes mecanismos antimicrobianos, os extratos e óleos essenciais de origem vegetal podem ser uma alternativa ao combate a micro-organismos. Por esse motivo tem sido intensificada e incentivada a procura por propriedades antimicrobianas em extratos de plantas (YAP *et al.*, 2014).

É necessário encontrar novos compostos com atividade mais eficaz do que os antimicrobianos existentes. Sem confrontar a medicina tradicional, mas resgatando a ideia das práticas milenares, que encontraram nos recursos naturais, a fonte de cura e prevenção de doenças, tornando a extração de compostos vegetais (fitoquímicos ou quimótipos), como óleos fixos e óleos essenciais bastante pertinentes (LUZ, 2005; CINTRA e FIGUEIREDO, 2010).

Com toda diversidade existente, presume-se que há consideráveis possibilidades de encontrar nos fitoquímicos que atuem na cura de diversas patologias, como a cura para doenças e infecções que até então são consideradas incuráveis. A grande biodiversidade brasileira desperta interesse em mais estudos acerca dos micro-organismos, somando com a carência de novos agentes terapêuticos para o combate destes (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

**Artigo 1** – Antibiotic potentiating action of  $\alpha$ -PINENE and borneol against EPEC and ETEC serotypes.

Autores: Nadghia F. Leite-Sampaio, Cicera Natalia F.L. Gondim, Celestina E.Sobral de Souza, Henrique D.M. Coutinho

Publicado na **Microbial Pathogenesis** (Qualis B2 em Ciências Biológicas II)

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401021006458?via%3Dihub>

### Resumo

A *Escherichia coli* é considerada a principal causa de infecções intestinais e extra-intestinais, possuem mecanismos de virulência em diferentes patótipos e capacidade de receber ou transmitir genes de resistência antimicrobiana. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade moduladora antibacteriana e antimicrobiana de  $\alpha$ -pineno e borneol contra *E. coli* e sorotipos enteropatogênicos (EPEC) e enterotoxigênicos (ETEC). A metodologia de microdiluição em caldo com *Escherichia coli* multirresistente, EPEC e ETEC foi utilizada para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e avaliação da atividade moduladora de antibióticos (ciprofloxacina, sulfametoxazol-trimetoprim e metronidazol) de  $\alpha$ -pineno e borneol. Concluiu-se que o  $\alpha$ -pineno e o borneol apresentaram baixa ação antimicrobiana contra *E. coli* multirresistente, porém, essa ação não foi observada contra os sorotipos EPEC e ETEC. Notou-se uma ação sinérgica do borneol associado à ciprofloxacina contra a ETEC.

Norma para autores:

<https://www.elsevier.com/journals/microbial-pathogenesis/0882-4010/guide-for-authors>

## Antibiotic potentiating action of $\alpha$ -PINENE and borneol against EPEC and ETEC serotypes

Nadghia F. Leite-Sampaio<sup>\*</sup>, Cicera Natalia F.L. Gondim, Celestina E. Sobral de Souza, Henrique D.M. Coutinho

Regional University of Cariri – URCA, Crato, Ceará, Brazil

### ABSTRACT

*Escherichia coli* is considered the main cause of intestinal and extra-intestinal infections, they have virulence mechanisms in different pathotypes and the ability to receive or transmit antimicrobial resistance genes. The aim of this work was to investigate the antibacterial and antimicrobial modulating activity of  $\alpha$ -pinene and borneol against *E. coli* and enteropathogenic (EPEC) and enterotoxigenic (ETEC) serotypes. The broth microdilution methodology with multidrug-resistant *Escherichia coli*, EPEC and ETEC was used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and evaluation of the modulating activity of antibiotics (ciprofloxacin, sulfamethoxazole-trimethoprim and metronidazole) of  $\alpha$ -pinene and borneol. It was concluded that  $\alpha$ -pinene and borneol showed a low antimicrobial action against multi-resistant *E. coli*, however, this action was not observed against the EPEC and ETEC serotypes.



A synergistic action of borneol associated with ciprofloxacin against ETEC was noted.

*Escherichia coli* is a species of bacterium that is part of the microbiota of different hosts, however, it has the potential to cause serious infections in human beings and other animals. It can be transmitted by direct contact, excretions of animals or through the food chain [1].

Most strains of *E. coli* are harmless to the host and is classified as commensals, but has a number of pathogenic isolates that are prone to causing intestinal problems and extra-intestinal infections. The pathogenic isolates of *E. coli* may be classified into different pathotypes, where each pathotype causes a different disease [2].

Disturbances in the intestine caused by *E. coli* range from mild diarrhea to severe colitis, and there is also the possibility of migration to other parts of the body, such as the urinary tract or blood [3].

The increase in bacterial infections in the bloodstream may be justified by the widespread use of iatrogenic immunosuppressive interventions, intravenous catheters and bone marrow, stem cell transplants. Gram-negative bacteria, more specifically *E. coli*, are the organisms predominantly responsible for bloodstream infections and they are repeatedly involved in fatal sepsis [4,5].

Considering the specific virulence mechanisms, the type of interaction with cell lines (HeLa or HEp-2) grown in vitro, and the clinical syndromes that cause *E. coli* strains are classified into six distinct pathotypes. The samples associated with intestinal infections are called diarrheal *E. coli* (ECD) [6]: Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), Enterohemorrhagic *E. coli* (EAEC), Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) and *E. coli* that diffusely adhere to epithelial cells (DAEC) [2]. [6].

Poirel et al. (2018) states that *E. coli* is a reservoir of resistance genes, acting as a donor and recipient and, therefore, it may acquire or transmit genetic material to other bacteria. The consequence of this characteristic is the failure of treatment in human and veterinary medicine.

Microbial resistance is a challenge, considered a worldwide public health problem, therefore, this work aims to investigate the antibacterial and antimicrobial modulating activity of  $\alpha$ -pinene and borneol.

## 1. Results & discussion

### 1.1. Antimicrobial activity

Dorman and Deans (2000) [7] stated that the components of essential oils, such as  $\alpha$ -pinene and borneol have antimicrobial activities. Khalil and Li (2011) [8] evaluated the essential oil of *Salvia officinalis* which proved to have antibacterial activity against Gram-positive and negative bacteria, presenting as major components: 1,8-cineol, camphor, borneol,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, camphene,  $\beta$ -myrcene and

karyophyllene.

In the evaluation of the minimum inhibitory concentration (MIC), the substances showed activity in the 512  $\mu\text{g mL}^{-1}$  concentration against the multidrug resistant strain of *Escherichia coli*. However, they did not show antimicrobial activity against EPEC and ETEC, as the result was  $\geq 1024 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Concentrations above this value are preclinically irrelevant [9].

### 1.2. Antimicrobial modulating activity

Fig. 1 shows the results obtained in the association of  $\alpha$ -pinene with antimicrobials. A significant result was perceived against the multidrug-resistant *E. coli* strain, but it is an antagonism since Sulfametoxazol + trimethoprine acted in lower concentrations alone (512  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) than when associated with  $\alpha$ -pinene ( $\geq 1024 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Silva et al. (2012) [10] states that the positive enantiomers of pinene have antimicrobial activity against *C. albicans*, *C. neoformans*, *R. oryzae* and MRSA. When they are combined with commercial antimicrobials, ciprofloxacin plus (+) -  $\alpha$ -pinene or (+) -  $\beta$ -pinene showed synergistic activity against *Staphylococcus aureus* which is resistant to metacycline -MRSA.

Gómez-Aldapa et al. (2016) [11] demonstrated that EPEC and ETEC exhibited resistance to at least seven antibiotics: streptomycin, erythromycin, kanamycin, amikacin, gentamycin, colistin neomycin and amoxicillin/clavulanic acid. *E. coli* pathotypes also exhibited high level of resistance, in a study by Thakur et al. (2018) [12], with the antibiotics ampicillin, cefixime and nalidixic acid.

All other associations had insignificant results since the concentration required to eliminate the strains is the same for the antimicrobial drug alone or in combination with the substances analyzed.

Fig. 2 shows the associations between borneol and antimicrobials, when they are associated with ciprofloxacin, a synergistic action was perceived against ETEC, with concentrations of 0.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for modulation and 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in the control of the antimicrobial.

Borneol has natural antibiotic properties and is present in medicinal plants, such as lavender, valerian and chamomile [13].

The antimicrobial effect of borneol has also been reported by Vardar-Unlu et al. (2003) [14]. Al-Farhan et al. (2010) [15] showed the antimicrobial action of (-) borneol against strains *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Escherichia coli* ATCC25292 and *Candida albicans* ATCC27853.

A series of borneol-based polymers, polyborneolacrylate (PBA) have shown superior antibacterial adhesion properties, have been evaluated as non-cytotoxic and may be simply synthesized, demonstrating their great potential for biomedical applications [16].

Wang, Jing, Liu, Liu, & Tan, (2017) [17] synthesized a polymer containing borneol that showed excellent antibacterial capacity against *E. coli* and *S. aureus*.

Borneol esters were synthesized and tested against *Streptococcus sanguinis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*, the bornyl compounds 4-methoxy-benzoic, bornyl 3,4-di-methoxy-benzoic and bornyl 3,4,5-tri-methoxy-benzoyl exhibited an activity equal to the standard ampicillin (MIC<sub>50</sub> = 62.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) [18,19].

## 2. Conclusion

The substances  $\alpha$ -pinene and borneol showed a low antimicrobial action against multidrug-resistant *E. coli*, whereas against the EPEC

and ETEC serotypes, the activity was not observed. But, a synergistic action was observed in the association with ciprofloxacin against ETEC. The substances evaluated in this work need to be studied in association with other drugs used as anti-diarrheal agents in order to reduce the harmful effects that bacteria may cause to human beings. The search for agents with antimicrobial or potentiating action on drugs already used in medical practice must be continued and intensified in order to limit resistance to drugs.

### 3. Methods

#### 3.1. Substances

To assess the antimicrobial activity, monoterpenes were used, (+)- $\alpha$ -pinene and (-)-borneol obtained by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Antibiotics were used for MIC and modulation tests: antibiotics: Trimethoprim/sulfamethoxazole, metronidazole and ciprofloxacin were diluted in sterile water to the initial rush of 1024  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

#### 3.2. Obtaining *Escherichia coli* serotypes

The *E. coli* EPEC and ETEC serotypes were provided by the professor Dr. Rodrigo Otávio Silveira Silva, of Federal University of Minas Gerais (UFMG).

#### 3.3. Minimum inhibitory concentration (MIC)

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) is defined as the lowest concentration that may inhibit bacterial growth in the cavities of the microdilution plate as detected macroscopically [20].

MIC was performed by broth microdilution method. The inoculum deposited in saline solution to form a suspension of  $10^5$  CFU/mL; the extracts concentrations ranged from 1024 to 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Then, 100  $\mu\text{L}$  of this solution was distributed into each cavity of the microdilution plate, and after that, 100  $\mu\text{L}$  of the extract was added in the first cavity and

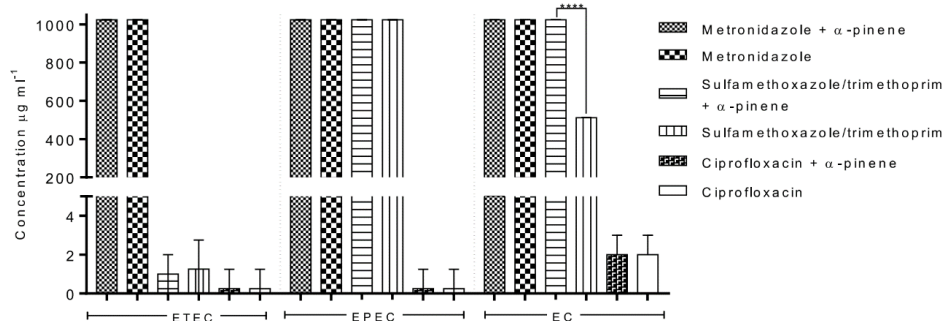


Fig. 1. Evaluation of the modulating activity of  $\alpha$ -pinene against *Escherichia coli* - EC, *E. coli* Enterotoxigenic - ETEC and *E. coli* Enteropathogenic - EPEC.

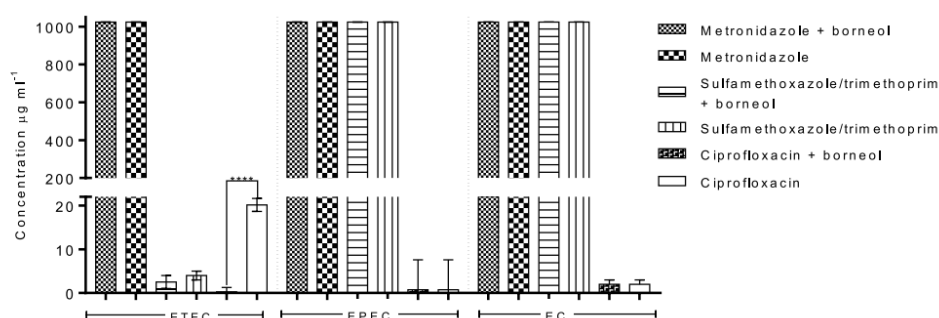


Fig. 2. Evaluation of the modulating activity of borneol against *Escherichia coli* - EC, *E. coli* Enterotoxigenic - ETEC and *E. coli* Enteropathogenic - EPEC.

passed to the others through successive dilutions in the ratio of 1:1 to the penultimate cavity. The last cavity was reserved for the growth of microorganisms without interference from the evaluated substances. The plate will be placed in the oven at a temperature of approximately 37  $^{\circ}\text{C}$  for a period of 24 h, the plates containing bacteria developed with specific dye, resazurin, a calorimetric oxidoreduction indicator [21]. To

perform the test reading it was necessary to add 20  $\mu\text{L}$  of the solution in each cavity of the plates and to incubate them for 1h at room temperature [22].

The disclosure of MIC considered as inhibition of growth for cavities that remained with blue staining and non-inhibition were those that obtained red staining.

#### 3.4. Modulation of antibiotic activity by microdilution

The extract was tested in subinhibitory concentration (MIC/8). 1163  $\mu\text{L}$  of a solution containing BHI, 150  $\mu\text{L}$  of inoculum and 187  $\mu\text{L}$  of the extract were distributed in each cavity identified as MIC. In the cavities identified as control, 1350  $\mu\text{L}$  of BHI and 150  $\mu\text{L}$  of

inoculum were distributed. All distribution done in the alphabetical order of the plate. Subsequently, 100  $\mu\text{L}$  of the antibiotic, in concentration of 5000  $\mu\text{L mL}^{-1}$  were mixed into the first cavity, acting the microdiluted in serie at a ratio of 1:1 to the penultimate cavity. Antimicrobial concentrations varied gradually from 5000 to 2.44  $\mu\text{g mL}^{-1}$  [23].

### 3.5. Statistical analysis

The statistical analysis of the microbiological results were performed using the Graphpad Prism 7.0 software, followed by the Bonferroni post-test with  $p < 0.05$  for results with significance.

### Author statement

Nadghia F. Leite-Sampaio – Conceptualization; Methodology. Cicera Natalia F. L. Gondim – Investigation. Celestina E. Sobral de Souza – Write of the first draft. Henrique D. M. Coutinho – Supervision; Coordination of the project.

### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Data availability

Data will be made available on request.

## References

- [1] L. Poirel, J.Y. Madec, A. Lupo, A.K. Schink, N. Kieffer, P. Nordmann, S. Schwarz, Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*, *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals* (2018) 289–316, <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017>.
- [2] J.B. Kaper, J.P. Nataro, H.L. Mobley, Pathogenic *Escherichia coli*, *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (2004) 123–140, <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>.
- [3] C.D. Köhler, U. Dobrindt, What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *Int. J. Med. Microbiol.* 301 (2011) 642–647, <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.006>.
- [4] A.Y. Peleg, D.C. Hooper, Hospital-acquired infections due to gramnegative bacteria, *N. Engl. J. Med.* 362 (2010) 1804–1813, <https://doi.org/10.1056/NEJMra0904124>.
- [5] K.B. Laupland, Incidence of bloodstream infection: a review of populationbased studies, *Clin. Microbiol. Infect.* 19 (2013) 492–500, <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12144>.
- [6] J.P. Nataro, J.B. Kaper, Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Clin. Microbiol. Rev.* 11 (1)(1998) 142–201.
- [7] H.D. Dorman, S.G. Deans, Antimicrobial agents from plants, antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88 (2000) 308–316, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>.
- [8] R. Khalil, Z.G. Li, Antimicrobial activity of essential oil of *Salvia officinalis* L. collected in Syria, *Afr. J. Biotechnol.* 10 (42) (2011) 8397–8402.
- [9] P.J. Houghton, M.J. Howes, C.C. Lee, G. Steventon, Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant, 2007 Apr, *J. Ethnopharmacol.* 4; 110 (3) (2007) 391–400. Epub 2007 Jan 31. Review.
- [10] A.C.R.D. Silva, P.M. Lopes, M.M.B.D. Azevedo, D.C.M. Costa, C.S. Alviano, D. S. Alviano, Biological activities of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene enantiomers, *Molecules* 17 (6) (2012) 6305–6316.
- [11] C.A. Gómez-Aldapa, J.A. Segovia-Cruz, J.F. Cerna-Cortes, E. Rangel-Vargas, L. P. Salas-Rangel, E.J. Gutiérrez-Alcántara, J. Castro-Rosas, Prevalence and behavior of multidrug-resistant shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteropathogenic *E. coli* and enterotoxigenic *E. coli* on coriander, *Food Microbiol.* 59 (2016) 97–103.
- [12] N. Thakur, S. Jain, H. Changotra, R. Shrivastava, Y. Kumar, N. Grover, J. Vashist, Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes: association of virulent genes, serogroups, and antibiotic resistance among moderate-to-severe diarrhea patients, *J. Clin. Lab. Anal.* 32 (5) (2018), e22388.
- [13] R.E. Granger, E.L. Campbell, G.A. Johnston, (+)-And (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant  $\alpha 1\beta 2\gamma 2\text{L}$  GABAA receptors, *Biochem. Pharmacol.* 69 (7) (2005) 1101–1111, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.01.002>.

- [14] G. Vardar-Unlu, F. Candan, A. Sokmen, D. Daferera, M. Polissiou, M. Sokmen, E. Donmez, B. Tepe, Antimicrobial and antioXidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae), *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 63–67, <https://doi.org/10.1021/jf025753e>.
- [15] K. Al-Farhan, I. Warad, S. Al-Resayes, M. Fouda, M. Ghazzali, Synthesis, structural chemistry and antimicrobial activity of (-)-borneol derivative, *Open Chem.* 8 (5) (2010) 1127–1133, <https://doi.org/10.2478/s11532-010-1093-0>.
- [16] L. Luo, G. Li, D. Luan, Q. Yuan, Y. Wei, X. Wang, Antibacterial adhesion of borneol-based polymer via surface chiral stereochemistry, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6 (21) (2014) 19371–19377, <https://doi.org/10.1021/am505481q>.
- [17] X. Wang, S. Jing, Y. Liu, S. Liu, Y. Tan, Diblock copolymer containing bioinspired borneol and dopamine moieties: synthesis and antibacterial coating applications, *Polymer* 116 (2017) 314–323, <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2017.03.078>.
- [18] A.T.M E Silva, V.V. Pereira, J.A. Takahashi, R.R. Silva, L.P. Duarte, Microwave-assisted synthesis of borneol esters and their antimicrobial activity, *Nat. Prod. Res.* 32 (14) (2018) 1714–1720, <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1399380>.
- [19] M. Öztekin, B. Yılmaz, D. Ağagündüz, R. Capasso, Overview of *Helicobacter pylori* infection: clinical features, treatment, and nutritional aspects, *Diseases* 9 (2021) 66–75.
- [20] J.B. Patel, F.R. Cockerill, P.A. Bradford, G.M. Eliopoulos, J.A. Hindler, S. G. Jenkins, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, NCCLS 32 (2012). NCCLS approved standard M7-A9.
- [21] .M. Javadpour, M.M. Juban, W.C.J. Lo, S.M. Bishop, J.B. Albery, S.M. Cowell, M. L. McLaughlin, De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity, *J. Med. Chem.* 39 (16) (1996) 3107–3113, <https://doi.org/10.1021/jm9509410>.
- [22] A. Salvat, L. Antonnacci, R.H. Fortunato, E.Y. Suárez, H.M. Godoy, Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity, *Lett. Appl. Microbiol.* 32 (5) (2001) 293–297, <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00923.x>.
- [23] H.D. Coutinho, J.G. Costa, E.O. Lima, V.S. Falcão-Silva, J.P. Siqueira-Júnior, Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine, *Chemotherapy* 54(4) (2008) 328-330, <https://doi.org/10.1159/000151267>.

## Artigo 2 – Potentiation of the Activity of Antibiotics against ATCC and MDR Bacterial Strains with (+)- $\alpha$ -Pinene and (-)-Borneol

Nadghia F. Leite-Sampaio,<sup>1</sup> Cicera N. F. L. Gondim,<sup>1</sup> Rachel A. A. Martins,<sup>1</sup> Abolghasem Siyadatpanah,<sup>2</sup> Roghayeh Norouzi,<sup>3</sup> Bonglee Kim,<sup>4</sup> Celestina E. Sobral-Souza,<sup>5</sup> Gonçalo E. C. Gondim,<sup>6</sup> Jaime Ribeiro-Filho,<sup>7</sup> and Henrique D. M. Coutinho<sup>1</sup>

Publicado na BioMed Research International (Qualis B2 em Ciências Biológicas II)

<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2022/8217380/>

### Resumo

As crescentes taxas de resistência antimicrobiana têm exigido o desenvolvimento de novos medicamentos, uma vez que os antibióticos convencionais tornaram-se significativamente menos eficazes. Evidências identificaram uma variedade de fitocompostos com potencial para serem utilizados no combate a infecções causadas por bactérias multirresistentes (MDR). Considerando a constatação de que os terpenos são compostos antibacterianos promissores, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e moduladora de antibióticos de (+)- $\alpha$ -pineno e (-)-borneol contra cepas bacterianas MDR. O método de microdiluição em caldo foi utilizado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos e antibióticos e ainda avaliar a atividade antibiótica intrínseca e associada. Essas análises revelaram que o (+)- $\alpha$ -pineno apresentou atividade antibacteriana significativa apenas contra *E. coli* (CIM=512 $\mu$ g/ml), enquanto não foi observada inibição significativa do crescimento de *S. aureus* e *P. aeruginosa* (CIM  $\geq$  1024 $\mu$ g/ml). No entanto, quando combinado com antibióticos, esse composto induziu uma melhora significativa na atividade dos antibióticos convencionais, como observado para ciprofloxacina, amicacina e gentamicina contra *Staphylococcus aureus*, bem como para amicacina e gentamicina contra *Escherichia coli* e amicacina contra *Pseudomonas aeruginosa*. Por outro lado, verificou-se que o (-)-borneol inibe o crescimento de *E. coli* e aumenta a atividade antibiótica de ciprofloxacina e gentamicina contra *S. aureus*. Os presentes achados indicam que (+)- $\alpha$ -pineno e (-)-borneol são fitocompostos com potencial para serem utilizados no combate à resistência antibacteriana.

Norma para autores:

<https://www.hindawi.com/journals/bmri/guidelines/>

# Potential of the Activity of Antibiotics against ATCC and MDR Bacterial Strains with (+)- $\alpha$ -Pinene and (-)-Borneol

Nadghia F. Leite-Sampaio,<sup>1</sup> Cicera N. F. L. Gondim,<sup>1</sup> Rachel A. A. Martins,<sup>1</sup> Abolghasem Siyadatpanah,<sup>2</sup> Roghayeh Norouzi,<sup>3</sup> Bonglee Kim,<sup>4</sup> Celestina E. Sobral-Souza,<sup>5</sup> Gonçalo E. C. Gondim,<sup>6</sup> Jaime Ribeiro-Filho,<sup>7</sup> and Henrique D. M. Coutinho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Regional University of Cariri-URCA, Crato, Brazil

<sup>2</sup>Ferdows School of Paramedical and Health, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

<sup>3</sup>Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

<sup>4</sup>Department of Pathology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, Seoul 02447, Republic of Korea

<sup>5</sup>Vale do Salgado University Center, Ico, Brazil

<sup>6</sup>Institute of Technological Education Center/Cariri, Juazeiro do Norte, Brazil

<sup>7</sup>Gonçalo Moniz Institute (IGM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Salvador, Bahia, Brazil

Correspondence should be addressed to Abolghasem Siyadatpanah; asiyadatpanah@yahoo.com, Bonglee Kim; bongleekim@khu.ac.kr, and Henrique D. M. Coutinho; hdmcoutinho@gmail.com

Received 2 February 2022; Revised 15 March 2022; Accepted 7 May 2022; Published 25 May 2022

Academic Editor: Sanket Kaushik

Copyright © 2022 Nadghia F. Leite-Sampaio et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The increasing rates of antimicrobial resistance have demanded the development of new drugs as conventional antibiotics have become significantly less effective. Evidence has identified a variety of phytochemicals with the potential to be used in the combat of infections caused by multidrug-resistant (MDR) bacteria. Considering the verification that terpenes are promising antibacterial compounds, the present research aimed to evaluate the antibacterial and antibiotic-modulating activity of (+)- $\alpha$ -pinene and (-)-borneol against MDR bacterial strains. The broth microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the compounds and antibiotics and further evaluate the intrinsic and associated antibiotic activity. These analyses revealed that (+)- $\alpha$ -pinene showed significant antibacterial activity only against *E. coli* (MIC = 512  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), while no significant inhibition of *S. aureus* and *P. aeruginosa* growth was observed (MIC  $\geq 1024 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). However, when combined with antibiotics, this compound induced a significant improvement in the activity of conventional antibiotics, as observed for ciprofloxacin, amikacin, and gentamicin against *Staphylococcus aureus*, as well as for amikacin and gentamicin against *Escherichia coli*, and amikacin against *Pseudomonas aeruginosa*. On the other hand, (-)-borneol was found to inhibit the growth of *E. coli* and enhance the antibiotic activity of ciprofloxacin and gentamicin against *S. aureus*. The present findings indicate that (+)- $\alpha$ -pinene and (-)-borneol are phytochemicals with the potential to be used in the combat of antibacterial resistance.

## 1. Introduction

In the last decades, the treatment of infections has been threatened by the emergence and spread of an increasing variety of pathogens developing resistance mechanisms against antimicrobial drugs. Antimicrobial resistance occurs when microorganisms such as bacteria, viruses, fungi, and parasites present modifications to evade the action of antimicrobial drugs, resulting in increased rates of transmission, morbidity, and mortality [1]. Consistent evidence has indicated that the antibiotic resistance process has been accelerated in recent years due to the inadequate and uncontrolled use of these drugs, which represents an issue of significant concern for future generations [2].

In order to reduce the irrational use of antimicrobials, the Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA) has published a resolution [3] to regulate and control the use of anti-microbials drugs so that, either alone or in association, they should be sold exclusively under prescription.

In response to the bacterial resistance threat, researchers have made significant efforts to isolate and identify new compounds with antibacterial properties [4], as conventional antibiotics have become significantly less effective [5]. In this context, the development of studies using plant-derived natural products has been pointed as a promising strategy to accelerate and cheapen the production of novel

antibacterial compounds [6].

In fact, the use of medicinal plants for therapeutic purposes is an ancient practice. Currently, it is well-established that the therapeutic properties of medicinal species are due to the presence of secondary metabolites [7] which, besides playing critical physiological roles, can interfere with pharmacological targets in human beings and many other species. Therefore, medicinal plants are relevant sources of new molecules with the potential to be used in drug development [8, 9].

However, the development of new antibiotics is limited by the high cost of the process and the restrictions on profits compared to other drugs. In addition, the clinical benefits of antibiotics can decrease over time, so their use needs to be restricted to prevent antibacterial resistance [10].

Terpenes are a class of lipophilic hydrocarbon compounds composed of isoprene units. Such physicochemical characteristic favors their interaction with the lipid bilayer of cell membranes. Consequently, terpenoids can induce significant changes in the structure of membrane components in different microorganisms [11-13].

Pinene (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>) is a bicyclic, double-bonded terpenoid hydrocarbon compound [14]. The compound  $\alpha$ -pinene is found in nature in essential oils (EO) approximately 40 different essential oils. It is among the best-known representatives of an extensive family of monoterpenes. This compound has two enantiomers (+) and (-), which are commercially available and have proven pharmacological activities, among which their antimicrobial properties stand out [15, 16]. Additionally, these isomers present a number of applications, especially in the composition of flavors and fragrances [17] and in the composition of medicines for the treatment of renal and hepatic diseases [18]. Importantly, it has been postulated that the antibacterial properties of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene are due to their toxic effects on the cell membrane [19].

Borneol is a monoterpene identified in the essential oils of several medicinal plants. It is classified as a bicyclic mono-terpenoid alcohol that exists as the D and L enantiomers. This compound has been used in the treatment of gastrointestinal diseases in traditional medicine in China and India [9]. A large number of borneol derivatives have been both

designed and synthesized, demonstrating significant activity against *Streptococcus sanguinis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*. Among them, the bornyl 3',4'-dimethoxybenzoate derivative stood out for its strong activity against several pathogens [20].

Recent research identified a number of pharmacological activities for borneol including neuroprotective [21], analgesic [22, 23], muscle relaxing [24], anti-inflammatory [25], antitumor [26], antiasthmatic [27], and anxiolytic [28]. In addition, due to its antiadhesive antimicrobial properties, borneol has potential applications in multifunctional textiles and healthcare [29].

Consistent evidence has indicated that the effectiveness of combined drugs against microorganisms can be greater than that of isolated antibiotics, which has long been observed from studies analyzing the synergism between natural products and conventional antibiotics [30].

Therefore, considering the verification that terpenes are promising antibacterial compounds, the present research aimed to evaluate the antibacterial and antibiotic-modulating activity of (+)- $\alpha$ -pinene and (-)-borneol against MDR bacterial strains.

## Materials and Methods

2.1. Bacterial Cultures. The standard bacteria used in the tests were obtained from the American Type Culture Collection, clinical isolates were obtained from the University Hospital of the Federal University of Paraíba, and both were stored under refrigeration (8°C) in slanted test tubes containing heart infusion agar (Heart Infusion Agar-HIA, Difco, USA). The standard bacterial strains *Escherichia coli* ATCC 2592, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, and multiresistant isolates of *E. coli* 06, *S. aureus* 10, and *P. aeruginosa* 24 were used in the antibacterial tests. All experimental protocols were carried out at the Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMMB) of the Regional University of Cariri (URCA). Antibiotic susceptibility testing (Table 1) was performed by Kirby-Bauer's disk diffusion method on Muller-Hinton agar (Hi Media, Mumbai, India) in accordance with the standards of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) [31].

## 2.2. Drugs and Reagents.

The compounds (+)- $\alpha$ -pinene and (-)-borneol were weighed and 10 mg of each substance was diluted in 1 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO, purity = 99:9%) and sterile distilled water until reaching a concentration of 1,024  $\mu\text{g/mL}$ . Resazurin, sodium salt (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as a colorimetric indicator of bacterial growth through the oxidation-reduction method [32, 33].

The test substances were prepared as previously described in the literature [34, 35]. The antibiotics, trimethoprim/sulfamethoxazole, metronidazole, ciprofloxacin, clindamycin, amikacin, and gentamicin, were dissolved and diluted in sterile water to 1,024  $\mu\text{g/mL}$ .

Table 1: Resistant profile of the strains.

Bacteria	Origin	Resistance profile
<i>Staphylococcus aureus</i> 10	Rectal swab	Amc, Amox, Amp, Asb, Azi, Ca, Cef, Cf, Cip, Cla, Clin, Eri, Lev, Mox, Oxa, Pen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 24	Nasal discharge	Ami, Cip, Cpm, Ctz, Imi, Lev, Mer, Ptz
<i>Escherichia coli</i> 06	Urine culture	Asb, Ca, Cef, Cfo, Cmp, Cro

Subtitle: Amc: amoxicillin + clavulanic acid (20/10  $\mu\text{g}$ ); Ami: amikacin (30  $\mu\text{g}$ ); Amox: amoxicillin (20  $\mu\text{g}$ ); Amp: ampicillin (10  $\mu\text{g}$ ); Asb: ampicillin + sulbactam (10/10  $\mu\text{g}$ ); Azi: azithromycin (15  $\mu\text{g}$ ); Ca: cefadroxil (30  $\mu\text{g}$ ); Cef: cephalexin (30  $\mu\text{g}$ ); Cfo: cefoxitin (30  $\mu\text{g}$ ); Cip: ciprofloxacin (5  $\mu\text{g}$ ); Cla: clarithromycin (15  $\mu\text{g}$ ); Clin: clindamycin (2  $\mu\text{g}$ ); Cmp: cefepime (30  $\mu\text{g}$ ); Cro: ceftriaxone (30  $\mu\text{g}$ ); Ctz: ceftazidime (30  $\mu\text{g}$ ); Eri: erythromycin (15  $\mu\text{g}$ ); Imi: imipenem (10  $\mu\text{g}$ ); Lev: levofloxacin (5  $\mu\text{g}$ ); Mer: meropenem (10  $\mu\text{g}$ ); Mox: moxifloxacin (5  $\mu\text{g}$ ); Oxa: oxacillin (1  $\mu\text{g}$ ); Pen: penicillin (30  $\mu\text{g}$ ); Ptz: piperacillin (100  $\mu\text{g}$ ) [40].

### 2.3. Strains.

Bacterial culture samples were seeded in Petri dishes containing solid heart infusion agar (HIA) medium and stored at 37°C for growth for 24 h. Then, an aliquot of the microbial culture was removed with an inoculation loop and transferred to test tubes containing sterile saline solution (0.9%). The turbidity of the inoculum was compared to the McFarland scale corresponding to  $1 \times 10^8$  CFU. This test was carried out in triplicate.

### 2.4. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration capable of preventing bacterial growth in the microdilution plate wells as detected macroscopically [31]. The MIC was determined using standard nonresistant bacterial strains. To this end, each strain was cultured in three Petri dishes containing HIA. After 24 h, an aliquot of each plate was collected to obtain an inoculum with a final concentration of 105 CFU. Test tubes were filled with 1350  $\mu\text{L}$  of 10% brain heart infusion BHI + 150  $\mu\text{L}$  of inoculum. Then, 100  $\mu\text{L}$  of this solution was distributed in each well of 96-well plates. Then, 100  $\mu\text{L}$  of each monoterpene was added to the first well, and a serial dilution was performed in each column of the plate to achieve concentrations ranging from 512  $\mu\text{g/mL}$  to 0.5  $\mu\text{g/mL}$ . The plates were then placed in an incubator for 24 h at 37°C, followed by the addition of 20  $\mu\text{L}$  of resazurin to each well. After 1 h, the reading was carried out by ocular observation of the solution color, so that a change from blue to red or purple was used as an indication of bacterial growth. Of note, according to Houghton et al. [36], a natural product with an effective concentration higher than 1 mg/mL cannot be considered clinically relevant due to the impossibility of achieving adequate plasma concentrations.

### 2.5. Modulation Antibiotic Activity by Direct Contact.

The method proposed by Coutinho et al. [37] was used in the analysis of antibiotic activity modulation against MDR isolates. Briefly, the bacterial inoculum was prepared in BHI as described above, and the compounds were added at a subinhibitory concentration (equivalent to its MIC $\div$ 8). The wells in a 96-well plate were filled with 100  $\mu\text{L}$  of this solution, followed by the addition of 100  $\mu\text{L}$  of each antibiotic at concentrations ranging from 512 to 0.5  $\mu\text{g/mL}$ . The MIC of each drug in the presence or absence of the natural product was determined, and the occurrence of synergism was interpreted as increased antibiotic activity. Experimental controls and readings were performed as previously described.



## Statistical Analysis.

The data were analyzed through the statistical program GraphPad Prism version 7.0. The analysis was performed by two-way ANOVA, using the geometric average of the triplicates as the central data and the standard deviation of the average. A Bonferroni post hoc test was then performed, and a  $p < 0:05$  was considered significant.

## 3. Results

As shown in Table 2, both (+)- $\alpha$ -pinene and (-)-borneol presented a MIC of 512  $\mu\text{g/mL}$  against the ATCC strain of *E. coli*, while MICs  $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$  were obtained against *S. aureus* and *P. aeruginosa*. Therefore, both compounds were found to present significant antibacterial effects only against *E. coli*.

To evaluate the potentiation of antibiotic activity, we investigated the ability of the natural products to reduce the antibiotic MIC. Figure 1 shows that the MIC of ciprofloxacin against *S. aureus* was reduced from 101.5  $\mu\text{g/mL}$  to 80.6  $\mu\text{g/mL}$  when associated with (+)- $\alpha$ -pinene. The results were even more expressive with the drugs amikacin and gentamicin whose MIC was reduced by 90% and 92%, respectively, against the same strain. On the other hand, the association of (+)- $\alpha$ -pinene with the trimethoprim/sulfamethoxazole, metronidazole, and clindamycin had no significant impact on their MIC, indicating an absence of antibiotic activity modulation.

The analysis of antibiotic-enhancing activity of (-)-borneol in *S. aureus* cultures (Figure 2) demonstrated that its association with ciprofloxacin caused a reduction of 37% in the antibiotic MIC. In addition, the association with gentamicin, reduced the antibiotic MIC by 75%, changing from 32  $\mu\text{g/mL}$  to 8  $\mu\text{g/mL}$ , indicating potentiated antibiotic activity.

The analysis of antibiotic resistance modulation by (+)- $\alpha$ -pinene against *E. coli* is shown in Figure 3. Among the antibiotics, only amikacin and gentamicin had their MIC changed by the compound. While the MIC of amikacin was reduced from 50.8  $\mu\text{g/mL}$  to 40.3  $\mu\text{g/mL}$ , the MIC of gentamicin was reduced from 20.1  $\mu\text{g/mL}$  to 16  $\mu\text{g/mL}$ .

On the other hand, under the same conditions described above, an antagonistic activity was observed from the combination of (-)-borneol with trimethoprim/sulfamethoxazole against *E. coli*, since the antibiotic MIC increased from 512  $\mu\text{g/mL}$  to  $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$  (Figure 4). However, no significant modulation of antibiotic activity was observed from the association of (-)-borneol with the other drugs.

Table 2: Minimum inhibitory concentration of (+)- $\alpha$ -pinene and (-)-borneol.

Microorganisms	MIC	
	(+)- $\alpha$ -Pinene	(-)-Borneol
<i>E. coli</i>	512 $\mu\text{g/mL}$	512 $\mu\text{g/mL}$
<i>S. aureus</i>	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$
<i>P. aeruginosa</i>	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$

*P. aeruginosa* was found to present significant resistance to antibiotics, whose MIC was poorly affected by the association with (+)- $\alpha$ -pinene. Nevertheless, it is worth mentioning that this monoterpene caused a reduction of 37% in the MIC of amikacin in comparison with the control (Figure 5). Under the same conditions described above, (-)-borneol failed to modulate the activity of all antibiotics against *P. aeruginosa*, as no significant MIC change was observed (Figure 6).

## Discussion

The use of these natural compounds in the treatment of infections is considered a traditional alternative to the use of synthetic drugs [33]. Studies have demonstrated that monoterpenes can improve the activity of antimicrobial drugs, increasing their effectiveness against resistant pathogens, which can accelerate the healing, as well as hinder the microbial adaptability. Resistance to aminoglycosides and other antibacterial drugs has been a major threat to public health. Aminoglycosides inhibit protein synthesis by altering the conformation of the bacterial ribosome [34, 38] presenting enzymatic inactivation and efflux pump expression as major resistance mechanisms [37].

A significant body of research has demonstrated that antibiotic resistance can be reversed using

natural products such as extracts, fractions, essential oils, and isolated phytochemicals, as well as their synthetic and semisynthetic derivatives [33, 34, 37, 38]. While the molecular mechanism underlying this phenomenon remains mostly unknown, it has been suggested that it involves interactions between the natural product structure and constituents of the bacterial cell membrane, such as transmembrane proteins [37, 38].

Yousefzadi et al. [39] isolated  $\alpha$ -pinene from the essential oil of *Salvia chloroleuca* and evaluated its antibacterial activity, demonstrating moderate and strong inhibitory activities against *S. aureus* and *E. coli*, respectively. However, no activity was found against *P. aeruginosa*, which can be explained due to differences in the structure of the cell membrane of Gram-positive and Gram-negative bacteria, in particular, the lipid bilayer [38, 40].

Da Silva et al. [17] evaluated the antimicrobial activity of pinenes, demonstrating that (-)- $\alpha$ -pinene and (-)- $\beta$ -pinene had no significant antimicrobial activity at concentrations below 20 mg/mL, while the positive enantiomers showed inhibitory activities against methicillin-resistant *S. aureus* strains with MIC values ranging from 117  $\mu$ g/mL to 6,250  $\mu$ g/mL. Accordingly, the studies of Da Silva et al. [17] and Dhar et al. [41] found that (+)- $\alpha$ -pinene presented antibacterial activity against *S. aureus* strains. Moreover, De Sousa Eduardo et al. [42] and Freitas et al. [43] showed that  $\alpha$ -pinene has promising effects against *S. aureus*, demonstrating a potential to be used in the combat of antibacterial resistance.

The results of the present work corroborate those presented by Da Silva et al. [17] who evaluated the combination of (+)- $\alpha$ -pinene and (+)- $\beta$ -pinene with ciprofloxacin, showing synergistic activity against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA).

An antibiotic-potentiating effect was also obtained by Do Amaral et al. [44] who showed that the association of  $\alpha$ -pinene with ceftazidime, amoxicillin, cefepime, ceftoxitin, and amikacin resulted in enhanced antibiotic activity against *E. coli*.

This enhanced antibiotic effect may result from different mechanisms such as alteration in membrane permeability; inhibition of efflux pumps activity, or alteration in the expression of genes that codify proteins that mediate these mechanisms [45].

*S. aureus* can become resistant to antibiotics through genetic mutations that alter the target DNA gyrase or reduce outer membrane proteins, thus reducing drug accumulation [46, 47]. Martin et al. [48] reported a marked increase in resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and 7 genera of Enterobacteriaceae, including *E. coli*, from 1988-1995 at a hospital in California.

*E. coli* is naturally susceptible to almost all clinically relevant antimicrobial agents, in addition to being capable of accumulating resistance genes, mainly through horizontal gene transfer [49].

Studies performed by Breidenstein et al. [50] showed that *Pseudomonas aeruginosa* presents a high level of intrinsic resistance to most antibiotics, which can be explained by the restricted permeability of its outer membrane, in addition to the expression of efflux systems and antibiotic-inactivating enzymes such as  $\beta$ -lactamases.

Corroborating the results of this study, Ali et al. [51] evaluated *P. aeruginosa* isolates and found significant resistance to amikacin, while resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole was described by Bayraktar et al. [52].

Barbosa [53] evaluated the essential oil of *Chamaemelum nobile*, which has  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene as major components. The oil strongly modulated the activity of amikacin activity against *P. aeruginosa* PA01, causing a 128-fold reduction in the MIC of this antibiotic, corroborating the results of this study.

Nitroimidazole prodrugs such as metronidazole are activated by the reduction of the nitro group, which occurs at low oxygen rates, since oxygen can inhibit metronidazole uptake. Thus, the effective use of nitroimidazoles is limited to anaerobic bacteria, protozoa, and microaerophiles [54-57], corroborating the resistance profile observed in this study.

It is known lipophilic substances like beta-caryophyllene can induce significant changes in the membrane structure, resulting in morpho-physiological damage, such as reduced membrane potential, cytochrome C/protein and radical loss, proton pump collapse, and ATP depletion, among other toxic effects [30, 58-63]. Accordingly, studies by Andrews et al. [63], Harrewijn et al. [64], and Singh et al. [65] state that the mechanism of action by  $\alpha$ -pinene is associated with cell membrane damage.

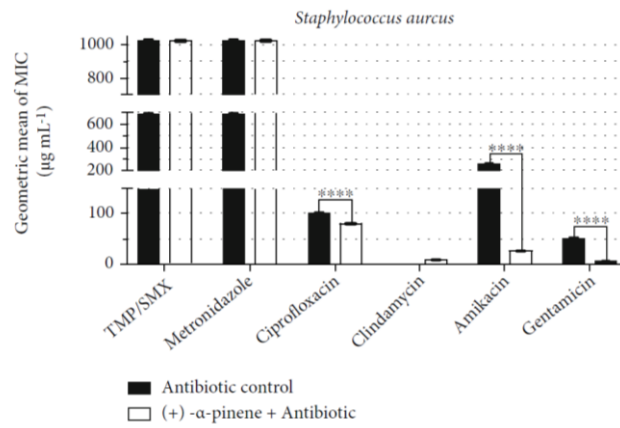


FIGURE 1: Antibiotic modulating activity of (+)- $\alpha$ -pinene associated with antibiotics against *S. aureus*. TMP/SMX: trimethoprim/sulfamethoxazole.  $p < 0,0001 = ****$ .

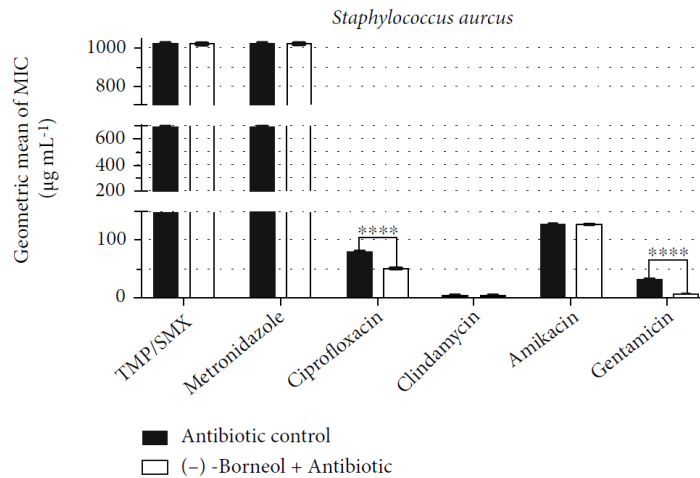


FIGURE 2: Antibiotic modulating activity of (-)-borneol associated with antibiotics against *S. aureus*. TMP/SMX: trimethoprim/sulfamethoxazole.  $p < 0,0001 = ****$ .

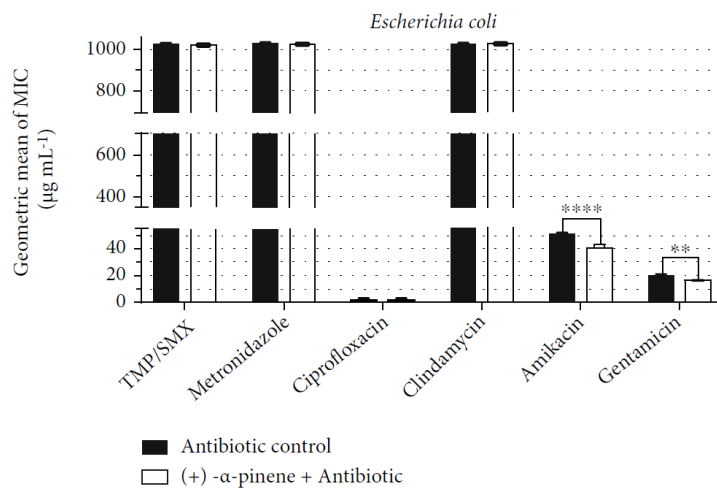


FIGURE 3: Antibiotic modulating activity of (+)- $\alpha$ -pinene associated with antibiotics against *E. coli*. TMP/SMX: trimethoprim/sulfamethoxazole.  $p < 0,0001 = ****$ .

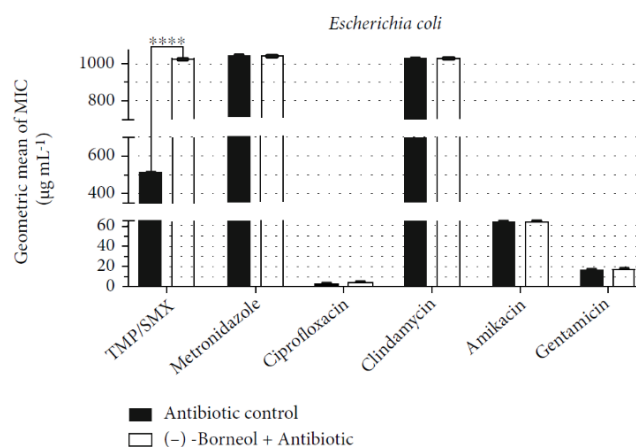


FIGURE 4: Antibiotic modulating activity of (-)-borneol associated with antibiotics against *E. coli*. TMP/SMX: trimethoprim/sulfamethoxazole.  $p < 0,0001 = ****$ .

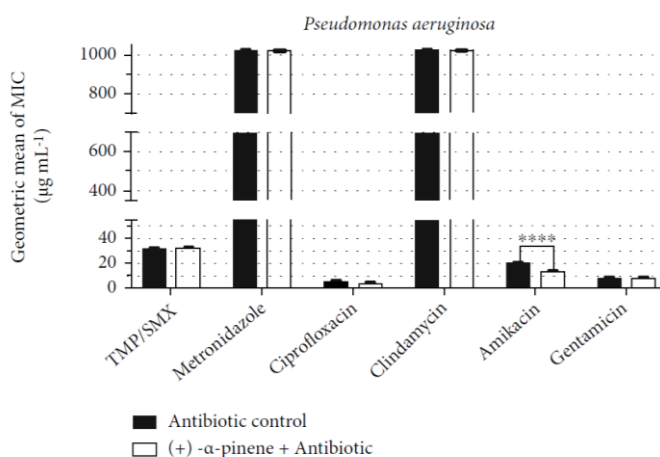


FIGURE 5: Antibiotic modulating activity of (+)-α-pinene associated with antibiotics against *P. aeruginosa*. TMP/SMX: trimethoprim/sulfamethoxazole.  $p < 0,0001 = ****$ .

Kovač et al. [66] evaluated the antibacterial activity of the negative enantiomer  $\alpha$ -pinene at the concentration of 125 mg/L, showing that this compound increased the membrane permeability, in addition to inducing an intracellular accumulation of antibiotics due to the inhibition of antimicrobial efflux systems, providing further inhibition of antimicrobial resistance. A number of studies [63–66] have also demonstrated that pinene compounds have caused damage to the membrane, which may also explain its effects on antibiotic activity potentiation, as demonstrated in this research.

Badawy et al. [67] described the antimicrobial effects of various monoterpenes, among which thymol and  $\alpha$ -terpineol had the most potent activity against *E. coli* and *S. aureus*. De Souza et al. [68] evidenced the efficacy of the association between carvone and penicillin against MRSA, as well as demonstrated the potentiating effects of eugenol and thymol associated with penicillin against beta-lactam-resistant *E. coli*. In corroboration, the work of De Souza et al. [68] found that d-limonene had a synergistic effect when associated with gentamicin against *S. aureus* and *E. coli* while the monoterpene geraniol enhanced the activity of kanamycin against the bacterial strain 358 of *S. aureus* [69].

Sill with regard to effects of monoterpenes against resistant *S. aureus* strains, Freitas et al. [43] also stated that  $\alpha$ -pinene potentiated the effect of tetracycline against the *S. aureus* IS-58 strain, while studies with *E. coli* conducted by Pereira et al. [70] showed that the complex (+)-

$\beta$ -citronellol ( $\beta$ CT)/ $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) in combination with gentamicin showed a synergistic effect against *E. coli*.

Research by Gachkar et al. [71] has attributed the anti-microbial activity of some essential oils to the presence borneol, which has been identified as a major constituent of the essential oils obtained from the flowers, leaves, and stem of *Rhynchanthus beesianus* [72], which presented significant antibacterial activity against *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, and *E. coli*.

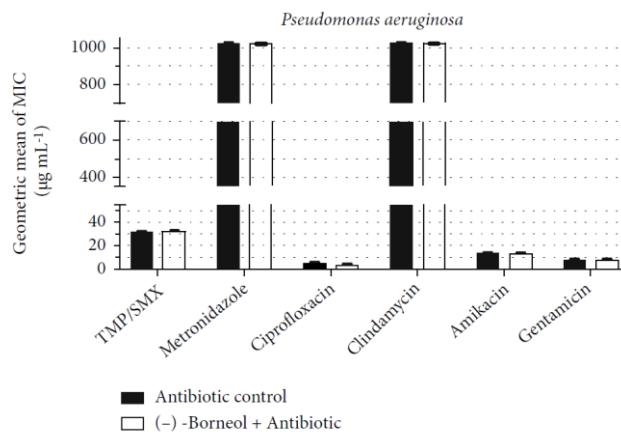


FIGURE 6: Antibiotic modulating activity of (-)-borneol associated with antibiotics against *P. aeruginosa*. TMP/SMX: trimethoprim/sulfamethoxazole.  $p < 0,0001 = ****$ .

Studies on the antibacterial mechanism of action of terpenes [73-75] have indicated that the antimicrobial activities of thymol and carvacrol are associated with their ability to cause changes in membrane permeability. According to Breidenstein et al. [50] the restricted permeability of the outer membrane, as well as the presence of efflux systems, and the production of antibiotic-inactivating enzymes, such as  $\beta$ -lactamases, collaborate to the high level of antibiotic resistance observed in *Pseudomonas aeruginosa*, which could justify the lack of significant modulation of the antibiotic activity by the compounds evaluated in the present research. Finally, the present findings corroborate those obtained by Siddique et al. [76] who showed that borneol did not exhibit antibacterial activity against MDR clinical isolates of *S. aureus* and MRSA.

While specific mechanisms involved in the antimicrobial action of monoterpenes remain poorly characterized, studies by Sikkema et al. [61] and Sikkema et al. [11] have suggested that due to their lipophilic character, monoterpenes will preferentially divide from an aqueous phase into membrane structures, thus causing structural and functional damage, which has been used to explain the antimicrobial action of oils and their monoterpenoid components in most works. According to Trombetta et al. [77], the action of these compounds on the bacterial membrane leads to expansion, increased fluidity and permeability, disturbance of protein function, and inhibition of ion transport. Thus, the existence of certain epistatic interactions that result in variable responses in studies addressing different species and antibiotics cannot be ruled out.

Besides the antibacterial activity, research has demonstrated that borneol has analgesic, anti-inflammatory, anti-oxidant, healing, and antifungal activities [78, 79].

Yang et al. [79] reported that (+)-borneol (BNL1) and (-)-borneol (BNL2) can induce drug accumulation in cells due to its interference with P-glycoprotein (Pgp), an efflux protein that contributes to multidrug resistance to antibiotics and anticancer drugs, which could potentially explain the synergistic effects observed from the association between monoterpenes and antibiotics, as demonstrated in this work. Of note, to date, no study evaluating the antibiotic-enhancing activity of (-)-borneol has been found in the literature, highlighting the

pioneering aspect of the present research.

#### 4. Conclusions

The results presented in this work suggest that (+)- $\alpha$ -pinene and (-)-borneol are promising compounds in the inhibition of antibiotic resistance, although further research is required to investigate both the safety and effectiveness of this combined treatment in the management of infections caused by *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*.

The results of this work can contribute to the development of new antibacterial therapies using lower doses of monoterpenes and antibiotics, increasing the effectiveness and reducing the side effects resulting from antibiotic therapy.

#### References

- [1] World Health Organization–Who, “Antimicrobial resistance,” 2020.
- [2] M. Yagui, “Antimicrobial resistance: a new approach and opportunity,” *Revista peruana de medicina experimental y salud publica*, vol. 35, no. 1, pp. 7–8, 2018.
- [3] “Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação,” p. 2011, 2011, Anvisa. Resolução- rdc n° 20, de 5 de maio de.
- [4] P. W. Taylor, P. D. Stapleton, and L. J. Paul, “New ways to treat bacterial infections,” *Drug Discovery Today*, vol. 7, no. 21, pp. 1086–1091, 2002.
- [5] C. G. P. da Silva Marangoni, T. N. Machado, J. Thaler et al., “Detecção E Caracterização De Antimicrobianos Usando Espectroscopia Raman Amplificada Por Superfície,” *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, vol. 26, article 101999, 2022.
- [6] D. O. Guimaraes, L. S. Momesso, and M. T. Pupo, “Antibiotics: therapeutic importance and prospects for the discovery and development of new agents,” *Quím. Nova*, vol. 33, no. 3, pp. 667–679, 2010.
- [7] C. F. de Oliveira, A. T. Morey, R. P. Biasi-Garbin, M. R. E. Perugini, L. M. Yamauchi, and S. F. Yamada-Ogatta, “Emergência de *Staphylococcus aureus* resistentes aos antimicrobianos: um desafio contínuo,” *Rev. Ciênc. Méd. Biol.*, vol. 13, pp. 242–247, 2015.
- [8] J. R. Almeida Neto, R. F. M. de Barros, and P. R. R. Silva, “Uso de plantas medicinais em comunidades rurais da Serra do Passa-Tempo, estado do Piauí,” *Nordeste do Brasil. Rev. Bras. Biociênc.*, vol. 13, pp. 165–175, 2015.
- [9] M. Zielińska-Blajet and J. Feder-Kubis, “Monoterpenes and their derivatives—recent development in biological and medical applications,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 19, p. 7078, 2020.
- [10] G. D. Wright, “The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity,” *Nature Reviews. Microbiology*, vol. 5, no. 3, pp. 175–186, 2007.
- [11] J. Sikkema, J. A. M. Bont, and B. Poolman, “Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons,” *Microbiological Reviews*, vol. 59, no. 2, pp. 201–222, 1995.
- [12] S. Burt, “Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 94, no. 3, pp. 223–253, 2004.
- [13] M. Morales-Yuste, F. Morillas-Márquez, J. Martín-Sánchez, A. Valero-López, and M. Navarro-Moll, “Activity of (-)- $\alpha$ -bisabolol against *Leishmania infantum* promastigotes,” *Phyto-medicine*, vol. 17, no. 3–4, pp. 279–281, 2010.
- [14] M. Winnacker, “Pinenes: abundant and renewable building blocks for a variety of sustainable polymers,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 57, no. 44, pp. 14362–14371, 2018.
- [15] K. A. Vespermann, B. N. Paulino, M. C. Barcelos, M. G. Pes-sôa, G. M. Pastore, and G. Molina, “Biotransformation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene into flavor compounds,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 101, no. 5, pp. 1805–1817, 2017.
- [16] R. G. Berger, “Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability,” *Springer Science & Business Media: Berlin*, vol. 1, pp. 1–648, 2007.
- [17] A. C. da Silva, P. M. Lopes, M. M. de Azevedo, D. C. Costa, C. S. Alviano, and D. S. Alviano, “Biological activities of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene enantiomers,” *Molecules*, vol. 17, no. 6, pp. 6305–6316, 2012.
- [18] D. Sybilska, J. Kowalczyk, M. Asztemborska, R. J. Ochocka, and H. Lamparczyk, “Chromatographic studies of the enantiomeric composition of some therapeutic compositions applied in the treatment of liver and kidney diseases,” *Journal of Chromatography. A*, vol. 665, no. 1, pp. 67–73, 1994.
- [19] M. H. Alma, S. Nitz, H. Kollmannsberger, M. Digrak, F. T. Efe, and N. Yilmaz, “Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish pistachio (*Pistacia vera* L.),” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, no. 12, pp. 3911–3914, 2004.
- [20] E. Silva, A. T. Macie, V. V. Pereira, J. A. Takahashi, R. R. Silva, and L. P. Duarte, “Microwave-assisted synthesis of borneol esters and their antimicrobial activity,” *Natural Product Research*, vol. 32, no. 14, pp. 1714–1720, 2018.
- [21] Z. X. Chen, Q. Q. Xu, C. S. Shan et al., “Borneol for regulating the permeability of the blood-brain barrier in experimental ischemic stroke: preclinical evidence and possible mechanism,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2019, 16 pages, 2019.

- [22]H. H. Zhou, L. Zhang, Q. G. Zhou, Y. Fang, and W. H. Ge, "(+)-Borneol attenuates oxaliplatin-induced neuropathic hyperalgesia in mice," *Neuroreport*, vol. 27, no. 3, pp. 160–165, 2016.
- [23]S. Wang, D. Zhang, J. Hu et al., "A clinical and mechanistic study of topical borneol-induced analgesia," *EMBO Molecular Medicine*, vol. 9, no. 6, pp. 802–815, 2017.
- [24]S. E. Santos, F. P. R. A. Ribeiro, P. M. N. Menezes et al., "New insights on relaxant effects of (—)-borneol monoterpene in rataortic rings," *Fundamental & Clinical Pharmacology*, vol. 33, no. 2, pp. 148–158, 2019.
- [25]S. Bansod, S. Chilvery, M. A. Saifi, T. J. Das, H. Tag, and C. Godugu, "Borneol protects against cerulein-induced oxidative stress and inflammation in acute pancreatitis mice model," *Environmental Toxicology*, vol. 36, no. 4, pp. 530–539, 2021.
- [26]Z. Wang, Q. Li, L. Xia et al., "Borneol promotes apoptosis of human glioma cells through regulating HIF-1 $\alpha$  expression via mTORC1/eIF4E pathway," *Journal of Cancer*, vol. 11, no. 16, pp. 4810–4822, 2020.
- [27]J. Y. Wang, X. Dong, Z. Yu et al., "Borneol inhibits CD4<sup>+</sup> T cells proliferation by down-regulating miR-26a and miR-142-3p to attenuate asthma," *International Immunopharmacology*, vol. 90, article 107223, 2021.
- [28]B. Cao, H. Y. Ni, J. Li et al., "(+)-Borneol suppresses conditioned fear recall and anxiety-like behaviors in mice," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 495, no. 2, pp. 1588–1593, 2018.
- [29]Y. Xin, H. Zhao, J. Xu et al., "Borneol-modified chitosan: anti-microbial adhesion properties and application in skin flora protection," *Carbohydrate Polymers*, vol. 228, article 115378, 2020.
- [30]R. F. Hector and P. C. Braun, "Synergistic action of nikkomy-cins X and Z with papulacandin B on whole cells and regenerating protoplasts of *Candida albicans*," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 29, no. 3, pp. 389–394, 1986.
- [31]C. L. S. I., "Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—ninth edition," in *CLSI document M07-A9*, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2012.
- [32]G. W. P. Sales, A. H. M. Batista, L. Q. Rocha, and M. A. P. Nogueira, "Efeito antimicrobiano e modulador do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbaril* L.," *Rev. Ciênc. Farm. Apl.*, vol. 35, pp. 709–715, 2014.
- [33]A. Salvat, L. Antonnacci, R. H. Fortunato, E. Y. Suarez, and H. M. Godoy, "Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 32, no. 5, pp. 293–297, 2001.
- [34]L. Hollis and R. S. Jones, "US Environmental Protection Agency Office of pesticide programs," *Biopestic. Pollut. Prev. Div. Farnesol. Nerolidol.*, vol. 1, p. 24, 2009.
- [35]M. Canton and S. B. Onofre, "Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 20, no. 3, pp. 348–354, 2010.
- [36]P. J. Houghton, M. J. Howes, C. C. Lee, and G. Steventon, "Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 110, no. 3, pp. 391–400, 2007.
- [37]H. D. M. Coutinho, J. G. M. Costa, E. O. Lima, V. S. Falcão-Silva, and J. P. Siqueira-Júnior, "Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine," *Chemotherapy*, vol. 54, no. 4, pp. 328–330, 2008.
- [38]S. Jana and J. K. Deb, "Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 70, no. 2, pp. 140–150, 2006.
- [39]M. Yousefzadi, A. Sonboli, S. N. Ebrahimi, and S. H. Hashemi, "Antimicrobial activity of essential oil and major constituents of *Salvia chloroleuca*," *Zeitschrift für Naturforschung C*, vol. 63, no. 5-6, pp. 337–340, 2008.
- [40]H. D. M. Coutinho, J. G. M. Costa, V. S. Falcão-Silva, J. P. Siqueira-Júnior, and E. O. Lima, "Fruits to potentiate the antibiotic activity: the effect of *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum* L. against MRSA," *Acta Alimentaria*, vol. 41, pp. 67–72, 2011.
- [41]P. Dhar, P. Chan, D. T. Cohen et al., "Synthesis, antimicrobial evaluation, and structure–activity relationship of  $\alpha$ -pinene derivatives," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, no. 16, pp. 3548–3552, 2014.
- [42]L. De Sousa Eduardo, T. C. Farias, S. B. Ferreira, P. B. Ferreira, Z. N. Lima, and S. B. Ferreira, "Antibacterial activity and time-kill kinetics of positive enantiomer of  $\alpha$ -pinene against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*," *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 18, no. 11, pp. 917–924, 2018.
- [43]P. R. Freitas, A. C. J. De Araújo, C. R. Barbosa et al., "Inhibition of efflux pumps by monoterpene ( $\alpha$ -pinene) and impact on *Staphylococcus aureus* resistance to tetracycline and erythromycin," *Current Drug Metabolism*, vol. 22, no. 2, pp. 123–126, 2021.
- [44]do Amaral, E. Felipe Lemos, T. C. Farias et al., "Effect of the association and evaluation of the induction to adaptation of the (+)- $\alpha$ -pinene with commercial antimicrobials against strains of *Escherichia coli*," *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 20, no. 25, pp. 2300–2307, 2020.
- [45]J. M. A. Blair, M. A. Webber, A. J. Baylay, D. O. Ogbolu, and L. J. Piddock, "Molecular mechanisms of antibiotic resistance," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 13, no. 1, pp. 42–51, 2015.
- [46]L. Kime, C. P. Randall, F. I. Banda et al., "Transient silencing of antibiotic resistance by mutation represents a significant potential source of unanticipated therapeutic failure," *MBio*, vol. 10, no. 5, article e01755, p. 19, 2019.
- [47]J. J. Yang, A. Cheng, H. M. Tai, L. W. Chang, M. C. Hsu, and W. H. Sheng, "Selected mutations by nemonoxacin and fluoroquinolone exposure among relevant gram-positive bacterial strains in Taiwan," *Microbial Drug Resistance*, vol. 26, no. 2, pp. 110–117, 2020.
- [48]J. N. Martin, D. A. Rose, W. K. Hadley, F. Perdreau-Remington, P. K. Lam, and J. L. Gerberding, "Emergence of

- trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in the AIDS era," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 180, no. 6, pp. 1809–1818, 1999.
- [49] L. Poirel, J. Y. Madec, A. Lupo et al., "Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*," *Microbiology Spectrum*, vol. 6, pp. 1–27, 2018.
- [50] E. B. M. Breidenstein, C. De La Fuente-Núñez, and R. E. W. Hancock, "Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance," *Trends in Microbiology*, vol. 19, no. 8, pp. 419–426, 2011.
- [51] N. M. Ali, S. Chatta, I. Liaqat, S. A. Mazhar, B. Mazhar, and S. Zahid, "Pseudomonas aeruginosa associated pulmonary infections and in vitro amplification virulent rhamnolipid (rhlR) gene," *Brazilian Journal of Biology*, vol. 82, pp. 1–9, 2021.
- [52] M. Bayraktar, E. Kaya, A. Ozturk, and B. M. S. İbahim, "Anti-microbial susceptibility of bacterial pathogens isolated from healthcare workers' cellphones," *Infectious Diseases Now*, pp. 1–7, 2021.
- [53] M. P. Barbosa, *Atividade antimicrobiana do óleo essencial decamomila romana (Chamaemelum nobile) Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, 2019.
- [54] S. A. Dingsdag and N. Hunter, "Metronidazole: an update on metabolism, structure–cytotoxicity and resistance mechanisms," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 73, no. 2, pp. 265–279, 2018.
- [55] A. D. Baughn and M. H. Malamy, "The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen," *Nature*, vol. 427, no. 6973, pp. 441–444, 2004.
- [56] R. A. Moore, B. Beckthold, and L. E. Bryan, "Metronidazole uptake in *Helicobacter pylori*," *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 41, no. 8, pp. 746–749, 1995.
- [57] D. L. Church and E. J. Laishley, "Reduction of metronidazole by hydrogenase from clostridia," *Anaerobe*, vol. 1, no. 2, pp. 81–92, 1995.
- [58] M. Almirall, J. Montana, E. Escribano, R. Obach, and J. D. Berrozpe, "Effect of d-limonene, alpha-pinene and cineole on in vitro transdermal human skin penetration of chlorpromazine and haloperidol," *Arzneimittel Forschung*, vol. 46, no. 7, pp. 676–680, 1996.
- [59] M. J. Werf, J. A. de Bont, and D. J. Leak, "Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes," in *In Biotechnology of Aroma Compounds*, R. G. Berger, W. Babel, H. W. Blanch, C. L. Cooney, S. O. Enfors, K. E. L. Eriksson, A. Fiechter, A. M. Klibanov, B. Mattiasson, and S. B. Primrose, Eds., pp. 147–177, Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1997.
- [60] K. B. Hirayama, P. G. Speridiao, and U. Fagundes-Neto, "Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa," *The Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases*, vol. 10, pp. 1–10, 2006.
- [61] J. Sikkema, J. A. M. De Bont, and B. Poolman, "Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 11, pp. 8022–8028, 1994.
- [62] A. D. V. Turina, M. V. Nolan, J. A. Zygodlo, and M. A. Perillo, "Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning," *Biophysical Chemistry*, vol. 122, no. 2, pp. 101–113, 2006.
- [63] R. E. Andrews, L. W. Parks, and K. D. Spence, "Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 40, no. 2, pp. 301–304, 1980.
- [64] P. Harrewijn, A. M. van Oosten, and P. G. Piron, *Natural terpenoids as messengers: a multidisciplinary study of their production, biological functions, and practical applications*, Springer Science & Business Media, 2001.
- [65] H. P. Singh, D. R. Batish, S. Kaur, K. Arora, and R. K. Kohli, "α-Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots," *Annals of Botany*, vol. 98, no. 6, pp. 1261–1269, 2006.
- [66] J. Kovač, K. Šimunović, Z. Wu et al., "Antibiotic resistance modulation and modes of action of (-)-α-pinene in *Campylobacter jejuni*," *PLoS one*, vol. 10, no. 4, p. e0122871, 2015.
- [67] M. E. Badawy, G. I. K. Marei, E. I. Rabea, and N. E. Taktak, "Antimicrobial and antioxidant activities of hydrocarbon and oxygenated monoterpenes against some foodborne pathogens through in vitro and in silico studies," *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 158, pp. 185–200, 2019.
- [68] I. S. De Souza, C. E. Duarte Filho, M. do Socorro Costa, R. T. Pereira, and M. A. de Lima, "Atividade antibacteriana do D-limoneno simples e complexado com a β-ciclodextrina e em avaliação do potencial modulador associado com diferentes classes de antibióticos," in *Anais do III Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde*, Editora Realize, Campina Grande, 2018.
- [69] H. D. M. Coutinho, M. A. de Freitas, C. N. F. L. Gondim, R. S. de Albuquerque, J. V. de Alencar Ferreira, and J. C. Andrade, "Actividad antimicrobiana de Geraniol e Cariofileno contra *Staphylococcus aureus*," *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, vol. 20, no. 1, pp. 98–105, 2015.
- [70] R. L. S. Pereira, F. F. Campina, M. do Socorro Costa et al., "Antibacterial and modulatory activities of β-cyclodextrin complexed with (+)-β-citronellol against multidrug-resistant strains," *Microbial Pathogenesis*, vol. 156, p. 104928, 2021.
- [71] L. Gachkar, D. Yadegari, M. B. Rezaei, M. Taghizadeh, S. A. Astaneh, and I. Rasooli, "Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils," *Food Chemistry*, vol. 102, no. 3, pp. 898–904, 2007.
- [72] Q. Chen, X. Zhao, T. Lu et al., "Chemical composition, anti-bacterial, and anti-inflammatory activities of essential oils from flower, leaf, and stem of *Rhynchanthus beesianus*," *BioMed Research International*, vol. 2021, 11 pages, 2021.
- [73] I. M. Helander, H. L. Alakomi, K. Latva-Kala et al., "Characterization of the action of selected essential oil components on



- gram-negative bacteria," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 46, no. 9, pp. 3590–3595, 1998.
- [74] M. Cristani, M. D'Arrigo, G. Mandalari et al., "Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, no. 15, pp. 6300–6308, 2007.
- [75] R. García-García, A. López-Malo, and E. Palou, "Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*," *Journal of Food Science*, vol. 76, pp. 95–100, 2011.
- [76] H. Siddique, B. Pendry, and M. M. Rahman, "Terpenes from *Zingiber montanum* and their screening against multi-drug resistant and methicillin resistant *Staphylococcus aureus*," *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 24, no. 3, p. 385, 2019.
- [77] D. Trombetta, F. Castelli, M. G. Sarpietro et al., "Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 49, no. 6, pp. 2474–2478, 2005.
- [78] K. Al-Farhan, I. Warad, S. Al-Resayes, M. Fouda, and M. Ghazzali, "Synthesis, structural chemistry and antimicrobial activity of (–) borneol derivative," *Open Chemistry*, vol. 8, no. 5, pp. 1127–1133, 2010.
- [79] R. Yang, Z. Chen, F. Xie et al., "(+/-)-Borneol reverses mitoxantrone resistance against P-glycoprotein," *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 61, no. 1, pp. 252–262, 2021.

### 5.1 ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA

O uso de substâncias naturais para a descoberta de novos compostos é um caminho promissor. De acordo com o que foi apresentado no decorrer desse trabalho, os monoterpenos mostram uma ampla multiplicidade de atividades biológicas que podem ser exploradas em vários ramos da medicina e da farmácia.

Nessa pesquisa os compostos apresentaram CIM de 512 µg/mL frente a *E. coli*. Dados que corroboram com outros pesquisadores que avaliaram a atividade antimicrobiana das substâncias usando outras metodologias.

Com o sorotipo ETEC o (-)-borneol reduziu a concentração do ciprofloxacino. O (-)-borneol modulou também a resposta do ciprofloxacino e da gentamicina frente a *S. aureus* e *E. coli*. Já o (+)- $\alpha$ -pineno apresentou sinergismo com ciprofloxacina, gentamicina e amicacina contra *S. aureus*, com *E. coli* somente a amicacina teve seu efeito melhorado. Esses antibacterianos têm seu mecanismo de ação na inibição da síntese proteica, assim, para sua ação ter sucesso é preciso entrar na célula bacteriana. Provavelmente, os monoterpenóides favoreceram a entrada dos antibióticos, justificado os sinergismos encontrados.

A *P. aeruginosa* se mostrou resistente a todos os antimicrobianos avaliados. A atividade a amicacina foi potencializada quando usado em associação ao (+)- $\alpha$ -pineno. Estudos que buscam elucidar a interação entre (+)- $\alpha$ -pineno e (-)-borneol com antibacterianos ainda são escassos. Assim, nossa pesquisa encontra limitações para justificar as diminuições da CIM dos antibacterianos reveladas na modulação. O que podemos supor é que diante do mecanismo de ação de cada agente antimicrobiano, os compostos tenham aumentado a permeabilidade da membrana, facilitando o acesso do fármaco ao interior da célula bacteriana, para assim sua atividade ser desempenhada com êxito.

As pesquisas já existentes demonstram que os constituintes isolados podem induzir mais de uma resposta inibitória na célula bacteriana. Estudos visando elucidar a atuação dos constituintes isolados devem ser cada vez mais frequentes para serem utilizados como base na apresentação dos mecanismos de ações.

Os micro-organismos usados nessa investigação fazem parte da microbiota humana e de outros animais e são considerados seres comensais. No entanto, podem adquirir resistência e assim conseguir se adaptar e sobreviver. A resistência pode ser conseguida a partir de processos como mutação, transformação ou conjugação. A consequência é

apresentar um perfil de resistência a múltiplos antimicrobianos, dificultando o tratamento das patologias que esses seres podem causar.

As questões que envolvem a resistência bacteriana são uma ameaça cada vez mais preocupante para os órgãos de saúde pública, e não conseguiremos reverter isso a menos que medidas eficazes sejam desenvolvidas e implementadas para combater essas bactérias. Pesquisadores de todo o mundo, continuam buscando desenvolver pesquisas relacionadas ao tema em benefício de populações inteiras, embora com pouca ajuda e incentivos econômicos para torná-las realidade. Diante disso, mais estudos sobre a resistência microbiana e como limitá-las devem ser incentivados.

Superar a resistência antimicrobiana é uma responsabilidade conjunta dos profissionais de saúde e pesquisadores. No que diz respeito ao desenvolvimento de novos agentes antibióticos, uma ampla fonte ainda encontra-se inexplorada na natureza. No entanto, Gould e Bal (2013) acreditam que as razões pelas quais muitas empresas abandonam o desenvolvimento de novos produtos são em decorrência dos longos anos de pesquisa, a falta de retorno sobre o investimento, além da resistência microbiana levar à rápida obsolescência dos antibióticos.

Os métodos tradicionais de encontrar compostos naturais e não naturais levaram à descoberta da maioria dos antibióticos atualmente disponíveis, mas nas últimas décadas essa rota rendeu poucos novos antibióticos. Segundo Coutinho et al., (2015) a busca pelo sinergismo entre novas drogas ou nas combinações de substâncias com medicamentos já disponíveis na terapêutica ainda necessita de mais pesquisas.

Sendo assim, a associação de substâncias extraídas de vegetais aos antimicrobianos usuais se mostra uma opção eficaz. Nesse contexto, o presente trabalho contribui para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas direcionadas exclusivamente ao tratamento de doenças causadas por cepas multirresistentes, cada vez mais difíceis de tratar, aliviando assim o transtorno da falta de medicamentos específicos e também da resistência bacteriana.

## **5.2 CONCLUSÕES GERAIS**

Com a pesquisa foi possível perceber que desde a descoberta e uso de agentes antimicrobianos que é percebido a resistência bacteriana. Esse fato traz um grande problema na saúde pública uma vez que a descoberta de novos fármacos não acompanha o acelerado processo de resistência aos antimicrobianos. Assim, há uma urgência e grande necessidade de encontrar novos medicamentos ou substâncias que possam potencializar a ação das drogas já utilizadas na prática médica.

Mesmo com algumas discussões contraditórias encontradas na literatura científica

acerca da atividade antimicrobiana dos terpenos. Nesse estudo os compostos sintéticos apresentaram uma ação antimicrobiana contra a *E. coli* multirresistente.

Foi demonstrado também que o (+)- $\alpha$ -pineno se apresenta como uma substância eficaz na associação com alguns dos antibióticos testados, diminuindo a concentração inibitória mínima dos fármacos ciprofloxacino, amicacina e gentamicina contra *S. aureus*, da gentamicina frente a *E. coli* e da amicacina contra a *P. aeruginosa*.

Já o (-)-borneol mostrou capacidade de diminuir a CIM das drogas ciprofloxacino e gentamicina frente a *S. aureus*. Com a *E. coli* foi mostrado um aumento da CIM na associação com o sulfametoxazol+trimetoprima. E em relação a *P. aeruginosa*, o composto se mostrou indiferente não interferindo na ação dos medicamentos investigados.

### **5.3 PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS**

Os resultados desse trabalho podem auxiliar na produção de medicamentos associados ao (+)- $\alpha$ -pineno como também ao (-)-borneol, podendo tratar as infecções de forma mais eficaz e ainda usando uma concentração menor do fármaco, havendo possibilidade também de diminuir os efeitos colaterais provocados pelo tratamento.

Espera-se com essa pesquisa, a continuidade das investigações dos monoterpenos, (+)- $\alpha$ -pineno e (-)-borneol com análises sobre a toxicidade e possibilidade de uso terapêutico em humanos, a fim de obter uma comprovação da segurança e eficácia de seu uso em humanos.

É importante também a avaliação antimicrobiana frente a outros patógenos e a investigação da capacidade moduladora de outros antibióticos, como também se faz necessário a verificação do mecanismo de ação na célula bacteriana.

## REFERÊNCIAS

---

- ALEGRE, Maria-Luisa et al. Impact of *Staphylococcus aureus* USA300 colonization and skin infections on systemic immune responses in humans. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 4, p. 1118-1126, 2016.
- ALEKSHUN, Michael N.; LEVY, Stuart B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1037-1050, 2007.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2007. Disponível em: [https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/antimicrobianos.htm](https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/antimicrobianos.htm). Acessado em: 10 de agosto de 2022.
- ASHFAQ, Muhammad et al. Synthetic routes of sulfonamide derivatives: a brief review. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 160-170, 2013.
- BARLOW, A. M. Nalidixic acid in infections of urinary tract. **British Medical Journal**, London, v. 2, n. 5368, p. 1308–1310, 1963.
- BARRERA-RIVAS, Claudia I. et al. Bacteriophage Therapy: An alternative for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections in animals and animal models. **Frontiers in Staphylococcus aureus**, v. 10, p. 65761, 2017.
- BÉLANGER, Louise et al. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 1-10, 2011.
- BERGER, Ralf Günter (Ed.). **Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability**. Springer Science & Business Media, 2007.
- BERNARDES, Renata de Cássia; JORGE, Antonio Olavo Cardoso; LEÃO, Mariella Vieira Pereira. Sensibilidade à oxacilina, vancomicina e teicoplanina de *Staphylococcus coagulase-positivos* isolados de pacientes hospitalizados em São José dos Campos. **Revista Biociências**, v. 10, 2004.
- BHATIA, S. P.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on borneol. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 11, p. S77-S80, 2008.
- BLAIR, Jessica MA et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.
- CAEIRÃO J. et, al. Novos Antimicrobianos: realidade e perspectivas. NewsLab - edição 66 – 2004.
- CAMPOS-REQUENA, Víctor H. et al. The synergistic antimicrobial effect of carvacrol and thymol in clay/polymer nanocomposite films over strawberry gray mold. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 390-396, 2015.
- CHEN, Lei et al. A new source of natural D-borneol and its characteristic. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 15, p. 3440-3447, 2011.
- CINTRA, Maria Elisa Rizzi; FIGUEIREDO, Regina. Acupuntura e promoção de saúde: possibilidades no serviço público de saúde. **Interface-Comunicação, Saúde, Educação**, v. 14, p. 139-154, 2010.

- CIRAJ, A. M. et al. Inducible clindamycin resistance among clinical isolates of staphylococci. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 49, 2009.
- CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 11th ed. CLSI standard M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2021.
- COSENTINO, S. C. I. G. et al. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. **Letters in applied microbiology**, v. 29, n. 2, p. 130-135, 1999.
- COUTINHO, Henrique DM et al. Evaluación comparativa de la modulación de antibióticos frente a cepas bacterianas de Escherichia coli, Staphylococcus. **Revista Ciencias de la Salud**, v. 13, n. 03, p. 345-354, 2015.
- COUTINHO, Henrique Douglas Melo et al. Actividad antimicrobiana de Geraniol e Cariofileno contra Staphylococcus aureus. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 20, n. 1, p. 98-105, 2015.
- CROXEN, Matthew A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.
- DA COSTA, Anderson Luiz Pena; JUNIOR, Antonio Carlos Souza Silva. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.
- DA FRANCA RODRIGUES, Klinger Antonio *et al.* *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent  $\alpha$ -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 160, p. 32-40, 2015.
- DAVIES, Julian; WRIGHT, Gerard D. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. **Trends in microbiology**, v. 5, n. 6, p. 234-240, 1997.
- DE FREITAS, Maiara Brusco et al. Altered intestinal microbiota composition, antibiotic therapy and intestinal inflammation in children and adolescents with cystic fibrosis. **PLoS one**, v. 13, n. 6, p. e0198457, 2018.
- DE LIMA, Dijaci Santos et al. Atividade antibacteriana de citronelal e citronelol contra cepas de Escherichia coli produtoras de ESBL. **ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION**, v. 9, n. 3, 2020.
- DE LIMA, Dijaci Santos et al. Estudo da atividade antibacteriana dos monoterpenos timol e carvacrol contra cepas de Escherichia coli produtoras de  $\beta$ -lactamases de amplo espectro. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 8, n. 1, p. 5-5, 2017.
- DE SOUZA, Iara Santos et al. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO D-LIMONENO SIMPLES E COMPLEXADO COM A B-CICLODEXTRINA E EM AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MODULADOR ASSOCIADO COM DIFERENTES CLASSES DE ANTIBIÓTICOS. In: **Anais do III Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde**. Campina Grande: Editora Realize, 2018.

DE SOUZA, Roberta Barreiros; MAGNANI, Marciane; DE OLIVEIRA, Tereza Cristina Rocha Moreira. Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella* spp. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 413-427, 2010.

DHIMAN, Prashant et al. Recent advances in the synthetic and medicinal perspective of quinolones: A review. **Bioorganic chemistry**, v. 92, p. 103291, 2019.

FOGLIO, Mary Ann et al. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, p. 1-8, 2006.

FREITAS, Priscilla Ramos *et al.* GC-MS-FID and potentiation of the antibiotic activity of the essential oil of *Baccharis reticulata* (ruiz & pav.) pers. and  $\alpha$ -pinene. **Industrial Crops and Products**, v. 145, p. 112106, 2020.

GARCIA, Francia et al. Antimicrobial peptides from arachnid venoms and their microbicidal activity in the presence of commercial antibiotics. **The Journal of antibiotics**, v. 66, n. 1, p. 3-10, 2013.

GAYOSO, C. W. et al. Ação inibitória do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno sobre fungos isolados de onicomioses. **J. Bras. Fitomed**, v. 1, n. 1-4, p. 25-29, 2004.

GILMAN, G. A.; Rall, T. W.; Nies, A. S.; Taylor, P.; Goodman & Gilman - **As Bases farmacológicas da terapêutica**, 8ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2006.

GOMES, T. A. et al. Diarreogênica *Escherichia coli*. **Braz J Microbiol.**; 47: 3-30. 2016.

GOULD, Ian M.; BAL, Abhijit M. New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 185-191, 2013.

GOVINDARAJAN, Marimuthu *et al.* Eugenol,  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -caryophyllene from *Plectranthus barbatus* essential oil as eco-friendly larvicides against malaria, dengue and Japanese encephalitis mosquito vectors. **Parasitology research**, v. 115, n. 2, p. 807-815, 2016.

GUARDA, Abel et al. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International journal of food microbiology**, v. 146, n. 2, p. 144-150, 2011.

GUIMARÃES, Aline Cristina. **Atividade Antibacteriana de terpenos e sesquiterpenos**. 2016. Tese de Doutorado. Brasil. Disponível em:  
<<https://repositorio.uvv.br/handle/123456789/691>>

GUO, Yunlei et al. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 107, 2020.

HAIM, Arthur. Sulfonamide group of drugs: general properties, use and dosage. **California and Western Medicine**, v. 55, n. 3, p. 123, 1941.

HOLMES, Alison H. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176-187, 2016.

JAWETZ, Melnick & Adelbergs. **Medical Microbiology**, 28th Edition, Porto Alegre, AMGH Editora Ltda., 2022.

KASNOWSKI, Maria Carmela et al. *Escherichia coli*: uma revisão bibliográfica. **Hig. alim.**,

p. 44-48, 2007.

KATZUNG, Bertram G. **Farmacologia básica e clínica**, 13. ed. – Porto Alegre: AMGH, 2017.

KATZUNG, Bertram G.; TREVOR, Anthony J. **Farmacologia Básica e Clínica**, 15. ed. – Porto Alegre: AMGH, 2022.

KAUR, Dardi Charan; CHATE, Sadhana Sanjay. Study of antibiotic resistance pattern in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with special reference to newer antibiotic. **Journal of global infectious diseases**, v. 7, n. 2, p. 78, 2015.

kCOSAR, C.; JULOU, L. Activité de l'(hydroxy-2'éthyl)-1 méthyl-2 nitro-5 imidazole (8.823 RP) vis-à-vis des infections expérimentales à *Trichomonas vaginalis*. **Ann Inst Pasteur (Paris)**, v. 96, n. 2, p. 238-241, 1959.

KIM, Justin J. et al. Successful control of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a burn intensive care unit by addition of universal decolonization with intranasal mupirocin to basic infection prevention measures. **American journal of infection control**, v. 47, n. 6, p. 661-665, 2019.

KOŁACZEK, Aneta *et al.* Biological activity and synthesis of sulfonamide derivatives: A brief review. **Chemik**, vol. 68, p. 620–628, 2014.

LAVANYA, R. Sulphonamides: a pharmaceutical review. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**, v. 6, n. 2, p. 1-3, 2017.;

LECLERCQ, ROLAND; COURVALIN, PATRICE. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 35, n. 7, p. 1267-1272, 1991.

LESHER, George Y. et al. 1, 8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 5, p. 1063-1065, 1962.

LEVINSON, Warren. **Microbiologia médica e imunologia**. 13th Edition Porto Alegre, AMGH Editora Ltda., 2016.

LIMA, Igara O. et al. Inhibitory effect of some phytochemicals in the growth of yeasts potentially causing opportunistic infections. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 199-203, 2005.

LIMA, Raissa Ximenes. **Atividade antimicrobiana de terpenos e antibióticos convencionais e suas associações frente klebsiella pneumoniae produtoras de carbapenemase**. 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

LÖFMARK, Sonja; EDLUND, Charlotta; NORD, Carl Erik. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. **Clinical infectious diseases**, v. 50, n. Supplement\_1, p. S16-S23, 2010.

LOPEZ-ROMERO, Julio Cesar et al. Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.



- LOUREIRO, Rui João et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de saúde pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.
- LUCENA, A. et al. Nosocomial infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: molecular epidemiology, risk factors, clinical features and outcomes. **Journal of Hospital Infection**, v. 87, n. 4, p. 234-240, 2014.
- LUZ, Madel T. Cultura contemporânea e medicinas alternativas: novos paradigmas em saúde no fim do século XX. **Physis: revista de saúde coletiva**, v. 15, p. 145-176, 2005.
- LYCZAK, Jeffrey B.; CANNON, Carolyn L.; PIER, Gerald B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. **Microbes and infection**, v. 2, n. 9, p. 1051-1060, 2000.
- MAGIATIS, Prokopios et al. Chemical composition and in-vitro antimicrobial activity of the essential oils of three Greek *Achillea* species. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57, n. 3-4, p. 287-290, 2002.
- MARTÍNEZ, Fleming; ÁVILA, Carolina M.; GÓMEZ, Alfredo. Thermodynamic study of the solubility of some sulfonamides in cyclohexane. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 803-808, 2003.
- MENDEM, Suresh Kumar *et al.* Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus*: A multicenter study from India. **Microbial pathogenesis**, v. 98, p. 167-170, 2016.
- MULCAHY, Lawrence R.; ISABELLA, Vincent M.; LEWIS, Kim. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. **Microbial ecology**, v. 68, n. 1, p. 1-12, 2014.
- MUNITA, Jose M.; ARIAS, Cesar A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 2, 2016.
- NAEEM, Abdul *et al.* The current case of quinolones: synthetic approaches and antibacterial activity. **Molecules**, v. 21, n. 4, p. 268, 2016.
- NAKAMURA, Shoshiro. Structure of azomycin, a new antibiotic. **Pharmaceutical bulletin**, v. 3, n. 5, p. 379-383, 1955.
- NATARO, James P.; KAPER, James B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.
- NEVES, Patrícia R. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, p. 409-420, 2011.
- NOGUEIRA, J. O e. Ação antimicrobiana de diferentes terpenos e fenilpropanoides em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. 2019. 111 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/34257>.
- OCHOA, Sara A. *et al.* Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. **Boletín médico del Hospital Infantil de México**, v. 70, n. 2, p. 136-150, 2013.
- OLIVEIRA, João Fernando P.; CIPULLO, José Paulo; BURDMANN, Emmanuel A.

- Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 21, p. 444-452, 2006.
- PADILHA, I.Q.M. et al. Antimicrobial activity of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. From Northeast Brazil against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.20 n.1, p.45-47, Jan./Mar. 2010.
- PASTOR-NAVARRO, Nuria *et al.* Development of a group-specific immunoassay for sulfonamides: Application to bee honey analysis. **Talanta**, v. 71, n. 2, p. 923-933, 2007.
- PORTO, Jhonatas Cley Santos *et al.* Composição química e atividade antifúngica de plantas típicas da região nordeste do Brasil. *Revista Interdisciplinar*, v. 14, n. 1, p. 3, 2021.
- QUINTAO, Nara LM *et al.* Chemical composition and evaluation of the anti-hypernociceptive effect of the essential oil extracted from the leaves of *Ugni myricoides* on inflammatory and neuropathic models of pain in mice. *Planta medica*, v. 76, n. 13, p. 1411-1418, 2010.
- RIBEIRO, C.M. *Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na Medicina popular da Amazônia*- 2008. 66p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Pará, Belém
- RODRIGUES-SILVA, Caio et al. Ocorrência e degradação de quinolonas por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 37, p. 868-885, 2014.
- SADERI, Horieh; EMADI, Behzad; OWLIA, Parviz. Phenotypic and genotypic study of macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLSB) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 17, n. 2, p. 48-53, 2011.
- SANTANA, E. H. W. *et al.* Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 545-554, 2010.
- SANTANA, E.H.W. Determinação do perigo de consumo do leite cru relacionado a intoxicação estafilocócica. Londrina, PR. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Londrina - UEL; 2006.
- SARTORI, M.R.K. **Atividade antimicrobiana de fração de compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae)**. 2005, 81p. Dissertação (Mestrado) Ciências Farmacêuticas. Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina.
- SHAH, Nipam; DUPONT, Herbert L.; RAMSEY, David J. Global etiology of travelers' diarrhea: systematic review from 1973 to the present. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 80, n. 4, p. 609-614, 2009.
- SHI, Bing *et al.* Borneol-grafted cellulose for antifungal adhesion and fungal growth inhibition. **RSC advances**, v. 5, n. 64, p. 51947-51952, 2015.
- SILVA, Jefferson Rocha de A. *et al.* Analysis of the hexane extracts from seven oleoresins of *Protium* species. *Journal of Essential Oil Research*, v. 21, n. 4, p. 305-308, 2009.

- SIMAS, Naomi Kato *et al.* Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue-atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Quím nova**, v. 27, n. 1, p. 46-9, 2004.
- SIMÕES, C. M. O. et al (org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6a ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 1104 p.
- SIMÕES, C., SCHENKEL, E., Mello, J., *et al.* **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed Editora, pp. 502 – 537, 2017.
- SOBRAL-SOUZA, Celestina E. *et al.* Avaliação da atividade citotóxica e potencial antiparasitário in vitro do  $\alpha$ -pineno e carvacrol. **Acta toxicológica argentina**, v. 22, n. 2, p. 76-81, 2014.
- SOKOLOVA, Anastasiya S. *et al.* Synthesis and biological activity of heterocyclic borneol derivatives. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 53, n. 3, p. 371-377, 2017.
- SOUSA, J. C. **Manual de Antibióticos Antibacterianos**. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, 2006.
- SOUZA, C.S.M.; TEIXEIRA, N.B.; CUNHA, M.L.R.S. Community-associated *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) in special groups. In: CUNHA, M.L.R.S *Staphylococcus aureus*. **New York: Nova biomedical**, p.25-34. 2017.
- STAHL, J.-P. Lincosamidas. **EMC-Tratado de Medicina**, v. 21, n. 4, p. 1-4, 2017.
- STOVER, C. Kendall *et al.* A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. **Nature**, v. 405, n. 6789, p. 962-966, 2000.
- TAČIĆ, Ana *et al.* Antimicrobial sulfonamide drugs. **Advanced technologies**, v. 6, n. 1, p. 58-71, 2017.
- TEIXEIRA, M. S.; SILVA, T. A.; PALHETA, R. A. **Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada**. Amazonas: EDUA, 2013.
- TENAILLON, Olivier *et al.* The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature reviews microbiology**, v. 8, n. 3, p. 207-217, 2010.
- TEPLITSKI, Max; ROBINSON, Jayne B.; BAUER, Wolfgang D. Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 6, p. 637-648, 2000.
- TOMADONI, B. et al. Efficacy of vanillin and geraniol in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on strawberry juice. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 554-557, 2015.
- TORREELE, Els *et al.* Fexinidazole—a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 12, p. e923, 2010.
- TRABULSI, Luiz R.; KELLER, Rogéria; GOMES, Tânia A. Tardelli. 10.321/eid0805. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 5, p. 508, 2002.

VASCONCELOS, Renata Marcia Costa *et al.* Synthesis, acute toxicity and anti-inflammatory effect of bornyl salicylate, a salicylic acid derivative. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 34, n. 6, p. 1028-1038, 2012.

VESPERMANN, Kele A. C. *et al.* Biotransformation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene into flavor compounds. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 5, p. 1805-1817, 2017.

VESTERGAARD, Martin; FREES, Dorte; INGMER, Hanne. Antibiotic resistance and the MRSA problem. **Microbiology spectrum**, v. 7, n. 2, p. 7.2. 18, 2019.

WINNACKER, Malte. Pinenes: abundant and renewable building blocks for a variety of sustainable polymers. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 57, n. 44, p. 14362-14371, 2018.

WORLD HEART ORGANIZATION - WHO. Antimicrobial resistance. 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acessado em 01 de jun 2020.

WORLD HEART ORGANIZATION - WHO. Global shortage of innovative antibiotics fuels emergence and spread of drug-resistance. 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/15-04-2021-global-shortage-of-innovative-antibiotics-fuels-emergence-and-spread-of-drug-resistance>>. Acessado em 01 de jun 2021.

XU, XiuLing *et al.* A novel doxorubicin loaded folic acid conjugated PAMAM modified with borneol, a nature dual-functional product of reducing PAMAM toxicity and boosting BBB penetration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, p. 178-190, 2016.

YAP, Polly Soo Xi et al. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. **The open microbiology journal**, v. 8, p. 6, 2014.

ZHANG, Lian-Hui. Quorum quenching and proactive host defense. **Trends in plant science**, v. 8, n. 5, p. 238-244, 2003.

ZIELIŃSKA-BŁAJET, Mariola; FEDER-KUBIS, Joanna. Monoterpenes and their derivatives—Recent development in biological and medical applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 7078, 2020.