



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA**

SAULO RELISON TINTINO

**AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXOS EM LINHAGENS DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS POR SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS DE ORIGEM
NATURAL**

**Recife
2018**

SAULO RELISON TINTINO

**AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXOS EM LINHAGENS DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS POR SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS DE ORIGEM
NATURAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pernambuco, na Rede de Biotecnologia do Nordeste – RENORBIO, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino

Co-orientador: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Tintino, Saulo Relison

Avaliação da inibição de bombas de efluxos em linhagens de *Staphylococcus aureus* por substâncias sintéticas de origem natural/
Saulo Relison Tintino- 2018.

137 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Valdir de Queiroz Balbino

Coorientador: Henrique Douglas Melo Coutinho

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Recife, 2018.

Inclui referências e apêndice

1. *Staphylococcus aureus* 2. Bomba de efluxo 3. Expressão gênica
I. Balbino, Valdir de Queiroz (orient.) II. Coutinho, Henrique Douglas Melo (coorient.) III. Título

579.353

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-353

SAULO RELISON TINTINO

**AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXOS EM LINHAGENS DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS POR SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS DE ORIGEM
NATURAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pernambuco, na Rede de Biotecnologia do Nordeste – RENORBIO, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em: 15/06/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Valdir de Queiroz Balbino (Orientador)
Universidade Federal do Pernambuco – UFPE

Prof^o. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho (Examinador Externo)
Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof^a. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva (Examinadora Interna)
Universidade Federal do Pernambuco – UFPE (Interno)

Prof^a. Dr^a. Daniela Maria do Amaral Ferraz e Navarro (Examinadora Interna)
Universidade Federal do Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Antônio Pereira das Neves Neto (Examinador Interno)
Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz / CPqAM

Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva (Suplente)
Universidade Federal do Pernambuco – UFPE

Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Leal-Balbino (Suplente)
Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz / CPqAM

Aos meus pais Lucineide Maria Tintino e Antônio Tintino, e a minha linda esposa Cícera Datiane Morais Oliveira Tintino.

AGRADECIMENTOS

A Deus todo poderoso, pois tudo posso neste que me fortalece, através dele pude vencer diante dos desafios até o presente momento vindouro deste trabalho.

Aos meus pais, pelo apoio, amor e força em todos os momentos, momentos difíceis. Além disso, através de seus exemplos de honestidade e dignidade que são minha base de vida.

A minha linda esposa Datiane, minha companheira de luta do dia-a-dia, pelo seu amor, carinho, por estar sempre comigo nos momentos difíceis.

Ao meu Orientado, Prof Valdir Queiroz, por aceitar me orientar mesmo sabendo que não possuo o título de mestre, pela confiança que sempre depositou em mim, pelos ensinamentos, por proporcionar oportunidade de aprendizado.

Ao meu Co-orientador, Henrique Douglas, que está comigo desde a graduação, pelos seus conselhos, pelos ensinamentos, por ter gentilmente cedido horas de seu tempo para discutirmos sobre metodologias e resultados, além do espaço do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM, por transmitir muito além de conhecimento, mas sabedoria.

A Prof^a. Tereza Cristina, pelo apoio que vem nos fornecendo até o presente momento nesse trabalho, e na continuidade desse trabalho.

Aos Professores Siqueira e Humberto por cederem às linhagens e algumas substâncias, desde já muitíssimo obrigado.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação, por terem transmitido com muita dignidade seus conhecimentos, os quais adquiriram com muito esforço e dedicação.

A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, e a todo o colegiado no nome da Profa. Teresinha Gonçalves da Silva, pela disponibilidade de sempre tirar dúvidas a respeito do PPB-RENORBIO.

Aos membros da banca de qualificação e de defesa pelas suas valorosas contribuições.

A colega de laboratório e amiga Fábiana Campina “Mendonça” que teve papel fundamental durante a fase experimental e auxiliando em diversas etapas do desenvolvimento do projeto, por nunca se negar a ajudar.

Aos colegas da Pós-Graduação, por termos juntos vencidos tantas disciplinas, apresentações de artigos, relatórios e avaliações com um saldo maravilhoso.

Aos colegas de Laboratório Maria do Socorro, Raimundo Luiz, Rafael Cruz, Ana Raquel, Antônia, Thassya, Tiago Sampaio, Janaina, Camila, Jacqueline Cosme, Prof Cunha pelas distrações e alegrias que me ajudaram a livrar da tensão e estresse do dia-a-dia.

Ao meu ex-aluno de TCC Paulo, que me ajudou em alguns experimentos com toda a disposição.

Aos amigos Anselmo, Pedro e Bruno por sempre me recebem em suas residências e sempre me darem apoio, quando necessário em Recife.

As amigas e Professoras Yedda e Flaviana, pelo seu carinho e apoio.

A Universidade Federal do Pernambuco, pela disponibilidade de seus espaços físicos utilizados ao longo do Curso.

A Universidade Regional do Cariri, pela disponibilidade de seu espaço físico no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM.

A CAPES, FUNCAP e CNPq por terem colaborado financeiramente durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

“É melhor pescar a sabedoria do que pérolas.”
(Jó 28,18)

RESUMO

A bactéria *Staphylococcus aureus* é um micro-organismo que é comumente citado como sendo um importante patógeno de infecções hospitalares. Os mecanismos de resistências presentes em *S. aureus* são vários, dentre estes estão aqueles que reduzem as concentrações de antibiótico dentro da bactéria, como as bombas de efluxos. Diversos compostos naturais sejam extratos, óleos ou compostos isolados, já se mostraram capazes de inibir o efluxo bacteriano. O ácido tânico um dos compostos utilizados no presente estudo é um composto natural de plantas, que apresenta diversas atividades biológicas comprovadas. As vitaminas lipossolúveis são substâncias naturais, também conhecidos por apresentar diversas atividades biológicas e efeitos benéficos para a saúde humana. Tendo vista o potencial biológico desses compostos, o presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito inibidor sobre o funcionamento de bomba de efluxo dessas substâncias naturais em cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes. As cepas utilizadas de *S. aureus* usadas foram: RN4220 portadora do plasmídeo pUL5054 que apresenta o gene responsável por codificar a proteína de efluxo MsrA que age sobre macrolídios; IS-58 dotada do plasmídeo PT181 portador do gene da proteína de efluxo de tetraciclina TetK; 1199B cepa resistente a fluoroquinolonas hidrofílicas via proteína de efluxo NorA e a cepa selvagem 1199 referente a mesma. Foi realizado o ensaio de concentração inibitória mínima de todas as substâncias de origem natural sintéticas, utilizando o método de microdiluição em caldo. Para verificar o efeito de redução do CIM do brometo de etídeo e do antibiótico, foi utilizado inóculos obtidos de placas incubadas em estufa bacteriológica por 24h a 37°C com o repique do estoque. Após esse período foi utilizado inóculos em solução salina de acordo com McFarland 0,5 que corresponde a 10^5 UFC. Os resultados dos testes foram feitos em triplicatas e como média geométrica. Na análise estatística foi utilizada ANOVA de uma via, seguida do *post teste hoc* Tukey usando GraphPad Prism 5.0. Com relação à atividade inibitória mínima o ácido tânico, o mesmo não apresentou resultado clinicamente relevante com valor ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, de acordo com os resultados do presente estudo, o ácido tânico foi capaz de reduzir diferentes sistemas de efluxo, igual ou melhor que inibidores conhecidos de bomba de efluxo. Resultado observado pela ação tanto sobre o brometo de etídeo como sobre os antibióticos. Entre as vitaminas lipossolúveis analisadas, a menadiona além de mostrar atividade clinicamente relevante frente às cepas testadas, esta também apresentou capacidade de reduzir o efluxo com mais eficiência que as demais vitaminas, sendo principalmente frente às cepas RN4220 e 1199B. Acredita-se que o composto ácido tânico, possa ter seu efeito sobre

as bombas de efluxo através da ligação em sítios de interação dessa proteína, caracterizando uma ação direta ou também pode ter atuado indiretamente pela retenção de ferro necessário para atividade da bomba efluxo. Com relação a vitaminas K, é possível que a inibição do efluxo observado com essa vitamina lipossolúvel, seja responsável pela desestabilização de membrana, e como consequência desse efeito alterar a funcionalidade da bomba de efluxo, já que a mesma é uma proteína de membrana.

Palavras-chave: Bomba de efluxo. Expressão gênica. Vitaminas lipossolúveis. Produtos naturais. Resistência bacteriana.

ABSTRACT

The bacterium *Staphylococcus aureus* is a microorganism that is commonly cited as an important pathogen of hospital infections. The mechanisms of resistance present in *S. aureus* are several, among these are those that reduce the concentrations of antibiotic within the bacterium, such as efflux pumps. Several natural compounds are extracts, oils or compounds isolated, have already been shown to inhibit bacterial efflux. Tannic acid one of the compounds used in the present study is a natural plant compound, which has several proven biological activities. The fat-soluble vitamins are natural substances, also known to present various biological activities and beneficial effects to human health. Considering the biological potential of these compounds, the present work had as objective to study the inhibitory effect on the efflux pump functioning of these natural substances in strains of multiresistant *Staphylococcus aureus*. The used strains of *S. aureus* used were: RN4220 carrying the plasmid pUL5054 which shows the gene responsible for encoding the MsrA efflux protein acting on macrolides; IS-58 endowed with plasmid PT181 carrying the TetK tetracycline efflux protein gene; 1199B strain resistant to hydrophilic fluoroquinolones via NorA efflux protein and the wild-type strain 1199 referring thereto. The minimum inhibitory concentration test of all naturally occurring synthetic substances was carried out using the broth microdilution method. To verify the effect of reducing the MIC of the ethidium bromide and the antibiotic, inoculums obtained from plates incubated in a bacteriological oven for 24 hours at 37°C with the stock peaking were used. After this period inoculums were used in saline solution according to Mcfarland 0.5 corresponding to 10⁵UFC. The results of the tests were done in triplicates and as geometric mean. In the statistical analysis, one-way ANOVA was used, followed by the Tukey hoc post test using GraphPad Prism 5.0. Regarding the minimum inhibitory activity, tannic acid did not present a clinically relevant result with a value $\geq 1024 \mu\text{g} / \text{mL}$. However, according to the results of the present study, tannic acid was able to reduce different efflux systems, equal to or better than known efflux pump inhibitors. Result observed by the action on both the ethidium bromide and on the antibiotics. Among the lipid-soluble vitamins analyzed, menadione, in addition to showing clinically relevant activity against the strains tested, was also able to reduce the efuxo more efficiently than the other vitamins, being mainly against the strains RN4220 and 1199B. It is believed that the tannic acid compound may have its effect on the efflux pumps by binding at sites of interaction of that protein, characterizing a direct action or may also have acted indirectly by the retention of iron required for pump efflux activity. With respect to vitamins

K, it is possible that the inhibition of efflux observed with this lipid soluble vitamin is responsible for membrane destabilization and as a consequence of this effect it will alter the functionality of the efflux pump, since it is a membrane protein.

Keywords: Efflux pump. Gene expression. Fat soluble vitamins. Natural products. Bacterial resistan.

LISTA DE FIGURAS

Referencial Teórico

Figura 1 –	Diferenças morfológicas das bactérias: a) Gram-negativas e b) Gram-positiva25
Figura 2 –	Imagem de microscopia e em meio cultura agar sangue de <i>Staphylococcus aureus</i>28
Figura 3 –	Mecanismos de resistência bacteriana32
Figura 4 –	Sistemas de efluxos eucariotos e procariotos37
Figura 5 –	Estrutura química do cianeto de carbonilo m-cloro-fenil-hidrazona47
Figura 6 –	Estrutura do <i>Phenylalanine Arginyl β-Naphthylamide</i>48
Figura 7 –	Estrutura química do ácido tânico51
Figura 8 –	Visão geral da biossíntese dos isoprenóides53
Figura 9 –	Estrutura molecular plana biologicamente ativas da vitamina K: 1- Filoquinona, 2- Menadiona, 3- Menaquinona53
Figura 10 –	Estrutura molecular plana do 1 – Colecalciferol ou vitamina D3, 2 - Ergocalciferol ou vitamina D255
Figura 11 –	Produção e Metabolismo da vitamina D56
Figura 12 –	Estrutura molecular plana das isoformas dos grupos 1- Tocoferol e 2- Tocotrienóis57
Figura 13 –	Estrutura molecular plana do α – tocoferol (Vitamina E)58
Figura 14 –	Estrutura molecular plana do Colesterol58
Figura 15 –	Estrutura molecular plana do Ergosterol60

Materiais e Métodos

Figura 16 –	Ensaio de concentração inibitória mínima63
Figura 17 –	Placas com rezasurina para a leitura do ensaio de redução do CIM pela bomba de efluxo65

Artigo 1

Figura 1 –	MIC of ethidium bromide alone and in association with the standard inhibitors and tannic acid against the strain <i>S. aureus</i> 1199B wild68
-------------------	--

Figura 2 –	MIC of Norfloxacin alone and in association with the standard inhibitors and tannic acid against the strain <i>S. aureus</i> 1199B wild	68
Figura 3 –	MIC of ethidium bromide alone and in association with the standard inhibitors and tannic acid against the strain <i>S. aureus</i> 1199B expressing the efflux system NorA	68
Figura 4 –	MIC of Norfloxacin alone and in association with the standard inhibitors and tannic acid against the strain <i>S. aureus</i> 1199B	69

Artigo 2

Figura 1 –	MIC of ethidium bromide alone and in association with the standard inhibitors and tannic acid against the strain <i>S. aureus</i> IS-58, expressing the efflux system TetK	75
Figura 2 –	MIC of tetracycline alone and in association with the standard inhibitors and tannic acid against the strain <i>S. aureus</i> IS-58, expressing the efflux system TetK	75
Figura 3 –	MIC of ethidium bromide alone and in association with the standard inhibitors and tannic acid against the strain <i>S. aureus</i> RN4220, expressing the efflux system MsrA	75
Figura 4 –	MIC of erythromycin alone and in association with the standard inhibitors and tannic acid against the strain <i>S. aureus</i> RN4220, expressing the efflux system MsrA	75

Artigo 3

Figura 1 –	MIC of Tetracycline alone and in association with the standard vitamins against the strain <i>S. aureus</i> IS-58, expressing the efflux system TetK	81
Figura 2 –	MIC of Erythromycin alone and in association with the standard vitamins against the strain <i>S. aureus</i> RN4220, expressing the efflux system TetK	81
Figura 3 –	MIC of Norfloxacin alone and in association with the standard vitamins against the strain <i>S. aureus</i> 1199B, expressing the efflux system TetK	82

Figura 4 –	MIC of Norfloxacin alone and in association with the standard vitamins against the strain <i>S. aureus</i> 1199B wild, expressing the efflux system TetK	82
-------------------	--	----

Artigo 4

Figura 1 –	Structure of ergosterol and cholesterol	88
Figura 2 –	Effect of Cholesterol and ergosterol associated with tetracycline against strain <i>S aureus</i> IS-58	89
Figura 3 –	Effect of Cholesterol and ergosterol associated with tetracycline against strain <i>S aureus</i> RN4220	89
Figura 4 –	Effect of Cholesterol and ergosterol associated with tetracycline against strain <i>S aureus</i> 1199B	89
Figura 5 –	Effect of Cholesterol and ergosterol associated with tetracycline against strain <i>S aureus</i> 1199B wild	90

Artigo 5

Figura 1 –	MIC of Tetracycline alone and in association with the menadione against the strain <i>S. aureus</i> IS-58, expressing the efflux system TetK	94
Figura 2 –	MIC of Erytromycin alone and in association with the menadione against the strain <i>S. aureus</i> RN4220, expressing the efflux system MrsA	95
Figura 3 –	MIC of Norfloxacin alone and in association with the menadione against the strain <i>S. aureus</i> 1199B, expressing the efflux system NorA	95
Figura 4 –	MIC of Norfloxacin alone and in association with the menadione against the strain <i>S. aureus</i> 1199 wild	95
Figura 5 –	Effect of menadione on the activity of ethidium bromide against the strain of <i>Staphylococcus aureus</i> IS-58	95
Figura 6 –	Effect of menadione on the activity of ethidium bromide against the strain of <i>Staphylococcus aureus</i> RN4220	96
Figura 7 –	Effect of menadione on the activity of ethidium bromide against the strain of <i>Staphylococcus aureus</i> 1199B	96
Figura 8 –	Effect of menadione on the activity of ethidium bromide against the strain of <i>Staphylococcus aureus</i> 1199 wild	96

LISTA DE TABELAS

Materiais e Métodos

Tabela 1 –	Linhagens utilizadas nos ensaios de efluxo	62
Artigo 1		
Tabela 1 –	MICs of the Ethidium Bromide (EtBr), the tannic acid and standard inhibitors against the <i>S. aureus</i> strains (mg/mL)	69
Artigo 2		
Tabela 1 –	MICs of Ethidium Bromide (EtBr), the tannic acid and standard inhibitors against the <i>S. aureus</i> strains (µg/mL)	74
Artigo 5		
Tabela 1 –	Antibacterial activity test by Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of vitamin menadione in strain with pump efflux expression in µg/mL	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>ATP-binding cassette superfamily</i>
BHI	<i>Breat Heart Infusion</i>
CCCP	<i>Carbonyl Cyanide m-Chlorophenyl-hydrazone</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DHA	<i>drug/H⁺ antiporter</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNP	Dinitrofenol
EUA	Estados Unidos da América
HIA	<i>Heart Infusion Agar</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IBE	Inibidores de bomba de efluxo
MATE	<i>Multidrug and toxic compound extrusion</i>
MDR	<i>Multiple drug resistance</i>
MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MRSA	<i>Methicillin resistant Staphylococcus aureus</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PAβN	<i>Phenylalanine Arginyl β-Naphthylamide</i>
PSMR	<i>Paired SMR proteins</i>
RNA _m	<i>Ribonucleic acid messenger</i>
RND	<i>Resistance-nodulation-cell division</i>
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SMR	<i>Small multidrug resistance</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultraviolet

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO	24
2.1	BACTÉRIAS	24
2.2	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	26
2.3	RESISTÊNCIA BACTERIANA	28
2.3.1	Redução de permeabilidade e efluxo	30
2.3.2	Alterações por mutação nos alvos dos antibióticos	30
2.3.3	Modificação dos antibióticos	31
2.4	SISTEMAS DE EFLUXO DE DROGAS BACTERIANAS	32
2.4.1	Superfamília grande facilitadora (<i>Major facilitator superfamily - MFS</i>)	32
2.4.2	Superfamília ligada a ATP cassette (<i>ATP-binding cassette ABC superfamily</i>)	33
2.4.3	Pequena família de resistência a múltiplos medicamentos (<i>Small multidrug resistance (SMR) family-SMR</i>)	34
2.4.4	Superfamília de Divisão celular de nodulação de Resistência (<i>Resistance nodulation cell division (RND) superfamily</i>)	35
2.4.5	Superfamília de extrusão de multidroga e de compostos tóxicos (<i>Multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family</i>)	36
2.5	FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DAS BOMBAS DE EFLUXO	37
2.6	BOMBAS DE EFLUXO ESPECÍFICAS	38
2.6.1	Bombas de efluxo NorA	38
2.6.2	Bomba de efluxo Tetk	39
2.6.3	Bomba de efluxo MrsA	40
2.7	REGULADORES GLOBAIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DE EFLUXO EM <i>S. AUREUS</i>	40
2.7.1	Regulação específica da bomba de efluxo NorA	43
2.8	INIBIDORES DE EFLUXO	44
2.8.1	Requisitos para um inibidor ideal	45
2.8.2	Estratégias para inibição de bomba de efluxo	45
2.8.3	Tipos de inibidores	46

2.9	SUBSTÂNCIAS DE ORIGEM NATURAL	49
2.9.1	Ácido tânico	49
2.9.2	Vitaminas lipossolúveis	51
2.9.3	Vitamina K	53
2.9.4	Vitamina D	54
2.9.5	Vitamina E	56
2.9.6	Colesterol	58
2.9.7	Ergosterol	59
3	MATERIAIS E MÉTODOS	61
3.1	ORIGEM E PREPARO DO MATERIAL NATURAL	61
3.1.2	Meios de culturas	61
3.1.3	Micro-organismos	61
3.1.4	Origem e preparo dos antibióticos e do brometo de etídio	62
3.1.5	Preparo e padronização dos inóculos	62
3.2	ENSAIOS DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	63
3.3	ENSAIOS DE INIBIÇÃO DE BOMBA DE EFLUXO POR REDUÇÃO DO CIM DO BROMETO DE ETÍDEO	64
3.4	ENSAIOS DE INIBIÇÃO DE BOMBA DE EFLUXO POR REDUÇÃO DO CIM DO ANTIBIÓTICO	64
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS	65
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	66
4.1	ARTIGO 1: EVALUATION OF THE TANNIC ACID INHIBITORY EFFECT AGAINST THE NORA EFFLUX PUMP OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS. PUBLICADO (MICROBIAL PATHOGENESIS). REVISTA B1 BIOTECNOLOGIA (FATOR DE IMPACTO = 2,0)	66
4.2	ARTIGO 2: TANNIC ACID AFFECTING THE RESISTANCE PHENOTYPE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTANT TO TETRACYCLINE AND ERYTHROMYCIN BY INHIBITION OF EFFLUX PUMPS. PUBLICADO (BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY) A2 BIOTECNOLOGIA (FATOR DE IMPACTO = 3,2)	72
4.3	ARTIGO 3: ACTION OF CHOLECALCIFEROL AND ALPHA- TOCOPHEROL ON STAPHYLOCOCCUS AUREUS EFFLUX PUMPS.	

	PUBLICADO (JOURNAL EXPERIMENTAL AND CLINICAL SCIENCES).	
	REVISTA B2 BIOTECNOLOGIA (FATOR DE IMPACTO = 1,4)	77
4.4	ARTIGO 4. CHOLESTEROL AND ERGOSTEROL AFFECT THE ACTIVITY OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS ANTIBIOTIC EFFLUX PUMPS. PUBLICADO (MICROBIAL PATHOGENESIS). REVISTA B1 BIOTECNOLOGIA (FATOR DE IMPACTO = 2,0)	86
4.5	ARTIGO 5: VITAMIN K ENHANCES THE EFFECT OF ANTIBIOTICS INHIBITING THE EFFLUX PUMPS OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS. PUBLICADO (MEDICINAL CHEMISTRY RESEARCH) FATOR DE IMPACTO 1,2 B2 BIOTECNOLOGIA	91
5	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS	100
	APÊNDICE A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA (2015-2018)	114

1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Staphylococcus aureus* é um micro-organismo comensal que é comumente citado como um importante patógeno de infecções hospitalares. Como hospedeiro natural humano, é encontrada nas fossas nasais ou na pele de neonatos, crianças e adultos. A partir desses sítios, esta bactéria pode alcançar as outras regiões da pele e das mucosas. Entretanto, caso as barreiras naturais estejam comprometidas por trauma ou cirurgia, o *S. aureus* pode se alojar no tecido e provocar uma lesão local, caracterizando o processo infeccioso (ROBERT & CHAMBERS, 2005; VELÁZQUEZ-MEZA et al., 2005).

O *S. aureus* é frequentemente isolado de feridas cirúrgicas infectadas, que podem representar focos para desenvolvimento de infecções sistêmicas. Esta bactéria também traz riscos para pacientes que fazem diálise, queimados, diabéticos e HIV-positivos, podendo causar diversos processos infecciosos, que variam desde infecções cutâneas crônicas (relativamente benignas) até infecções sistêmicas (potencialmente fatais). As infecções cutâneas incluem foliculite simples e impetigo, assim como furúnculos e carbúnculos, que afetam o tecido subcutâneo e produzem também efeitos sistêmicos (BALABAN et al., 1998; CAVALCANTI et al., 2005).

Com relação à resistência, *S. aureus* tem a habilidade de adquirir resistência a praticamente todos os antibióticos, tornando-o um motivo de preocupação na saúde pública (GIBBONS, 2004). A resistência do *S. aureus* aos antibióticos tem sido desenvolvida por mutações em seus genes ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie (ou até de outras espécies). Geralmente a resistência bacteriana ocorre por mutação, que resulta em uma alteração no sítio de ação do antibiótico. Também não se pode deixar de mencionar que a resistência pode ocorrer por aquisição de genes frequentemente envolvidos na expressão de proteínas que levam à inativação ou à destruição da droga, sendo estes transmitidos por plasmídeos e elementos móveis de transposição (BERNARD et al., 2004; LIMA et al., 2005).

É importante mencionar que *S. aureus* apresenta a capacidade de liberar sinais químicos no meio em que se encontra; estes sinais são reconhecidos por outras células bacterianas, resultando em um fenômeno denominado de *quorum sensing* (KHAN et al., 2015). Este mecanismo é caracterizado pela transferência de informações intra- ou interespecíficas, fazendo com que as bactérias sincronizem seu comportamento e sobrevivam em condições adversas.

Em *S. aureus* o *quorum sensing* auxilia na manutenção de biofilmes, apresentando influência direta na resistência bacteriana (YARWOOD et al., 2004).

Os mecanismos de resistências presentes em *S. aureus* são vários, incluindo: redução das concentrações de antibióticos dentro da bactéria, sendo que isso ocorre tanto pela fraca penetração como também pelo efluxo promovido por proteínas transmembrana, evitando sua chegada ao alvo; modificação no alvo do antibiótico por mutação genética ou modificação pós-transducional do alvo; e proteção do alvo do antibiótico por inativação do antibiótico por hidrólise ou modificações que o tornam não funcional (BLAIR et al., 2015).

Os mecanismos de efluxo atuam sobre diversas drogas utilizadas no tratamento contra *S. aureus*. O mecanismo de efluxo é mediado por proteínas transmembrana, que apresentam componentes voltados para os ambientes intra- e extracelular, sendo essas proteínas chamadas de bombas de efluxo (PIDDOCK et al., 2006). As bombas de efluxos atuam retirando substâncias nocivas do interior da bactéria (*e.g.* metais pesados, antibióticos, etc.). Algumas bombas de efluxo são específicas para determinados antibióticos ou classe de antibióticos. As bombas de efluxo apresentam dois sistemas de transporte, sistema de co-transporte e o sistema ATPase (BHARDWAJ & MOHANTY, 2012). O sistema de co-transporte do tipo anti-porte é mediado por íons como sódio ou hidrogênio, que devem ser transportados para o interior da bactéria, em troca da retirada de antibióticos do ambiente intracelular. Já o sistema ATPase é dependente da hidrólise de ATP, que promove a quebra de ATP e utiliza a energia para promover a retirada do antibiótico (POOLE, 2007).

As bombas de efluxo fornecem meios para a colonização, invasão e sobrevivência das bactérias em ambientes hostis, sendo também um importante meio de resistência bacteriana em biofilmes. Além disso, as bombas de efluxo podem ter efeito patogênico para o hospedeiro humano (PIDDOCK et al., 2006; BINA et al., 2009). As bombas de efluxo são agrupadas em cinco famílias, que se caracterizam pelas subunidades presentes em sua estrutura. Algumas famílias são divididas em subfamílias, a saber: Superfamília grande facilitadora (*Major facilitator superfamily - MFS*); Superfamília ligada à ATP cassette (*ATP-binding cassette [ABC] superfamily*); Pequena família de resistência a múltiplos medicamentos (*Small multidrug resistance [SMR] family*); Superfamília de divisão celular de nodulação de resistência, (*Resistance-nodulation-cell division [RND] superfamily*); Superfamília de extrusão de multidrogas e de compostos tóxicos (*Multidrug and toxic compound extrusion [MATE] family*) (PIDDOCK et al., 2006).

Os genes de bombas de efluxo podem estar presentes tanto integrados ao genótipo bacteriano, quanto em plasmídeos ou em elementos de transposição. Quando presente no plasmídeo, o gene pode ser perdido, caso o micro-organismo esteja em um ambiente que não necessite da ação da bomba de efluxo para sua sobrevivência. Além disso, a presença dos genes de bomba de efluxo em plasmídeos fornece um meio transferível de resistência, entre a mesma espécie ou entre espécies diferentes (BUTAYE; CLOECKAERT; SCHWARZ, 2003). Alguns genes de bombas de efluxo requerem indução ou mutações nos genes reguladores para a sua expressão, enquanto outros são expressos constitutivamente (FYFE; SUTCLIFFE; GROSSMAN, 2013; BUTAYE; CLOECKAERT; SCHWARZ, 2003). A expressão constitutiva leva a um efluxo basal que contribui para a resistência intrínseca. Apesar dessa última conferir baixo nível de resistência, quando somados aos outros mecanismos, a mesma contribui para multirresistência bacteriana. Acredita-se também que bombas de efluxo com expressão constitutiva e não constitutiva podem estar presentes no mesmo micro-organismo, tendo efeito aditivo para a resistência (LOMOVSKAYA et al., 2001).

Para controlar a resistência bacteriana por meio de bombas de efluxo se tem adotado a associação de antibióticos com substâncias capazes de inibir estas bombas. Existem diversas substâncias de origem natural e sintética que já foram identificadas como inibidores de bombas de efluxo. Substâncias de origem natural com essa propriedade geralmente são oriundas do metabolismo secundário das plantas, tais como terpenos, flavonoides, taninos e alcaloides. Entretanto, a eficiência do uso dessas substâncias, como inibidoras de bomba de efluxo, se torna limitada principalmente devido à toxicidade (STAVRI; PIDDOCK; GIBBONS, 2007; PRASCH & BUCAR, 2015).

Existem alguns quesitos que são considerados ao se produzir um inibidor de bomba de efluxo: devem ser livres de atividade em células eucarióticas; a síntese de inibidores a partir de produtos naturais não deve levar muito tempo; devem ser proteoliticamente estáveis; devem melhorar o índice terapêutico do antibiótico; devem ser desprovidos de atividade antibacteriana e não devem ser tóxicos para seres humano, para que não exista a possibilidade de ocorrer resistência sobre a mesma (BAMBEKE; PAGES; LEE, 2006).

Os diversos meios pelos quais as substâncias podem agir para inibir bombas de efluxo são: como desacopladores de energia; inibição da ligação direta com a bomba de efluxo (peptidomiméticos, quinolonas); indução de modificações químicas nos substratos de bombas de efluxo; quelantes de ferro e análogos de antibióticos. Algumas hipóteses apontam ainda que algumas substâncias podem inibir a expressão gênica da bomba de efluxo, através da interação

com as vias necessárias para a sua síntese (PAGES & AMARAL, 2009). Partindo desse pressuposto, no transcorrer desse estudo foi verificado o efeito que substâncias sintéticas de origem natural, com características químicas diferentes, teve sobre as diferentes bombas de efluxo em *Staphylococcus aureus*, tal análise foi feita por meio da análise *in vitro*.

Portanto o objetivo deste estudo foi a valiar o efeito de substâncias sintéticas de origem natural sobre bombas de efluxo bacterianas com características específicas. Além de determinar a atividade antibacterina, do ácido tânico e das vitaminas lipossolúveis (D, E, K) e compostos esteroidais (Ergosterol e Colesterol), sobre cepas *Staphylococcus aureus* portadoras de diferentes bombas de efluxo; Assim como: Avaliar o efeito de inibição bombas de efluxo do ácido tânico por redução do efluxo de antibióticos e de brometo de etídeo, através do método de redução da concentração inibitória mínima; Verificar o efeito das vitaminas lipossolúveis (D, E, K) e substâncias esteroidais (Ergosterol e Colesterol) sobre a redução de efluxo de antibióticos e de brometo de etídeo, através do método redução da concentração inibitória mínima e Comparar o efeito de inibição da bomba de efluxo por ácido tânico, vitaminas lipossolúveis (D, E, K) e substâncias esteroidais (Ergosterol e Colesterol), com inibidores padrões de bomba de efluxo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BACTÉRIAS

As bactérias são micro-organismos com células procarióticas, que são consideradas células relativamente simples, quando comparadas com as eucarióticas, e apresentam grande diversidade de espécies. Possuem morfologia diversificada apresentada as seguintes características: esférica ou ovalada, bastonetes curtos, e curvada com tamanhos que variam, em média, de 1µm a 2µm por 1µm a 4µm (SARTORI, 2010; CAMARGO, 2010). É importante também ressaltar que existem diversas espécies bacterianas que se caracterizam por apresentar variação de morfologia, composição química da parede celular, necessidades nutricionais, atividades bioquímicas e fonte de energia utilizada (TORTORA; CASE; FUNKE, 2016).

As bactérias apresentam em suas células estruturas consideradas essenciais para as mesmas, presentes em todas as espécies, tais como ribossomos do tipo 70S. Entretanto, existem estruturas celulares que são encontradas apenas em determinadas espécies, tais como grânulos de fósforo (RAMACHANDRAN et al., 2014). Uma estrutura essencial é a membrana citoplasmática, situada próxima à parede celular, que serve como barreira seletiva para muitas substâncias. É composta principalmente por fosfolipídios, proteínas (porina), gliceroglicolipídeos e outros tipos de lipídios. Suas principais funções são: barreira de permeabilidade seletiva; produção de energia por transporte de elétrons; fosforilação oxidativa; auxiliar na duplicação do DNA; auxiliar na biossíntese de componentes; e secreção de enzimas. (STRAHL & ERRINGTON, 2017; WESTFALL & LEVIN, 2017; WHITFIELD & TRENT, 2014).

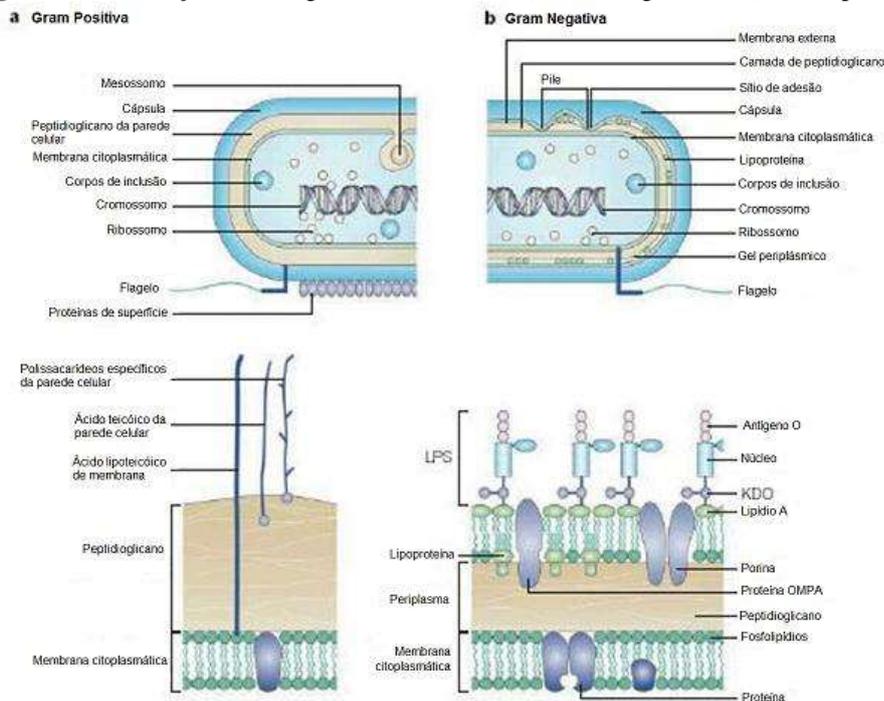
As células bacterianas são envolvidas por uma parede celular, com estrutura complexa e semi-rígida, sendo responsável pela definição da forma da célula bacteriana. A parede celular é composta por um complexo de carboidratos e proteínas chamado de peptidoglicano. A presença dessas moléculas na parede celular confere a manutenção da forma bacteriana e evita a ruptura da célula, além de desempenhar importante papel no processo de divisão celular. Clinicamente, a parede celular é importante, tendo em vista que contribui para a patogenicidade em algumas espécies bacteriana, além de também ser o local de ação de alguns antibióticos (WHITFIELD & TRENT, 2014; TORTORA; CASE; FUNKE, 2016)

A parede celular das bactérias serve como critério de classificação, dividindo-as em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas. Esta classificação tem como base a

composição química e organização da estrutura da parede. Em bactérias Gram-positivas, a parede celular é composta por muitas camadas de peptidoglicana, que impedem a passagem de compostos hidrofóbicos devido à presença de açúcares e aminoácidos, formando uma estrutura espessa e rígida. Possui ainda na sua constituição ácidos teicóicos, que consistem principalmente em um álcool (glicerol ou ribitol) e fosfato (RAMACHANDRAN et al., 2014; TORTORA; CASE; FUNKE, 2016).

Com relação às bactérias Gram-negativas, a composição e estrutura da parede celular consistem de uma ou poucas camadas de peptidoglicana, uma membrana externa e um espaço chamado periplasma. Devido a quantidade reduzida de peptidoglicana, as bactérias Gram-negativas são mais susceptíveis ao rompimento mecânico. A membrana externa dessas bactérias é formada por lipopolissacarídeos, lipoproteínas e fosfolipídios que desempenham várias funções especializadas, atuando como barreira para certos antibióticos (penicilina), enzimas digestivas (lisozima), detergentes, metais pesados, sais biliares e certos corantes (COSTA et al., 2015; TORTORA; CASE; FUNKE, 2016). A membrana externa das bactérias desenvolveu canais especiais, chamados de porinas, que permitem a difusão passiva de compostos hidrofílicos como açúcares, aminoácidos e certos íons (COSTA et al., 2015; TORTORA; CASE; FUNKE, 2016).

Figura 1 – Diferenças morfológicas das bactérias: a) Gram-negativas e b) Gram-positiva.



Disponível em: <<http://essaseoutras.xpg.uol.com.br/bacterias-gram-positiva-e-negativa-resumo-esquema-organelas-funcoes/>>.

Acesso em: 07 de julho de 2016.

2.2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcae, juntamente com os gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. O gênero *Staphylococcus* possui 33 espécies, sendo que 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. Os membros deste gênero comumente fazem parte da microbiota da pele humana normal e de outros locais anatômicos. Neste gênero, destaca-se pela importância a espécie *Staphylococcus aureus*, encontrada principalmente em ambiente nosocomial, estando frequentemente relacionada com diversas infecções em seres humanos. O *S. aureus* foi descrito pela primeira vez em 1880, em pus de abscessos cirúrgicos, pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston, sendo atualmente um dos micro-organismos mais comuns nas infecções piogênicas em todo o mundo (CASSETTARI; STRABELLI; MEDEIROS, 2005; KONEMAN et al., 2001).

A bactéria *Staphylococcus aureus* tem forma esférica e é pertencente ao grupo dos cocos Gram-positivos, sendo frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. A dimensão dos seus cocos varia de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, são imóveis, não-esporeados e geralmente não-encapsulados. Essa bactéria pode se apresentar em várias formas, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agregados irregularmente (com aspecto semelhante a um cacho de uvas), devido a sua replicação celular, que ocorre em três planos perpendiculares (CASSETTARI; STRABELLI; MEDEIROS, 2005; KONEMAN et al., 2001; TRABULSI & ALTHERTHUM, 2001).

Em relação ao seu aspecto de crescimento, as cepas crescem em meios como o caldo ou agar simples, pH = 7, à temperatura ótima de 37°C. As colônias formadas em placa, após 18-24 horas de incubação, apresentam-se arredondadas, lisas e brilhantes. A coloração dessas colônias varia desde o acinzentado até o amarelo-ouro, em que a pigmentação aumenta com o tempo de incubação prolongado, não chegando a ser formada nos casos de crescimento em condições anaeróbicas, ou na cultura em caldo. Em placas contendo o meio de agar sangue, observa-se a formação de um halo em torno das colônias existentes. Outro meio importante para a identificação do *S. aureus* é o Agar manitol-sal, seletivo para a espécie, que consegue fermentar o manitol, produzindo ácido láctico (CASSETTARI; STRABELLI; MEDEIROS, 2005; KONEMAN et al., 2001; TRABULSI & ALTHERTHUM, 2001).

As doenças provocadas pelo *S. aureus* podem ser decorrentes da invasão direta dos tecidos, de bacteremia primária ou decorrentes das toxinas por ele produzidas (BRAUNWALD et al., 2002; SANTOS et al., 2007). Essas infecções podem se localizar em um ou em múltiplos

sítios, e, de acordo com a localização e outras características, recebem diferentes designações, tais como: foliculíte (infecção do folículo piloso); sico (bichodo-pé); carbúnculo; antraz; furúnculos localizados na região cervical posterior; hordeolo (tercol); hidradenite (inflamação das glândulas sudoríparas); e impetigo. Além das piogênicas, o *S. aureus* pode causar outras infecções mesmo durante um processo infeccioso ou não (BRAUNWALD et al., 2002; SANTOS et al., 2007). Esses diferentes mecanismos e patologias fazem com que o *S. aureus* possua várias características que, por vezes, não são encontradas em todas as cepas desse Gram-positivo, surgindo, entretanto, à medida que nele são identificadas novas e diferentes propriedades patogênicas (LUTZ et al., 2003; SANTOS et al., 2007).

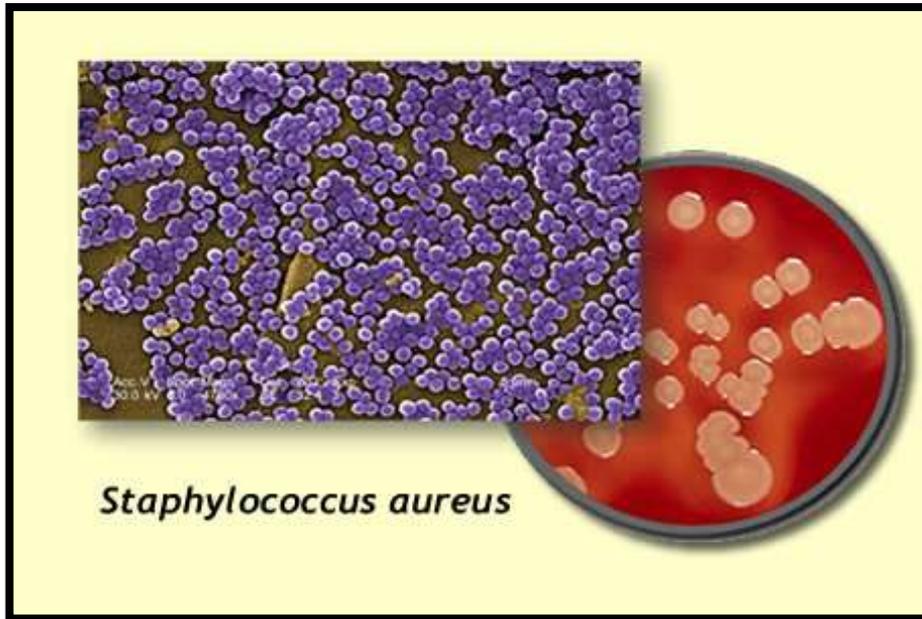
Durante a invasão do organismo, o *S. aureus* adere-se primeiramente à pele ou a mucosa e em seguida, rompe as barreiras do epitélio, comprometendo estruturas de ligações intercelulares, como desmossomos e demais junções de aderência (IWATSUKI et al., 2006). Após a invasão do epitélio, o *S. aureus* utiliza diversas estratégias para permitir a sua sobrevivência e proliferação no organismo hospedeiro. Essas estratégias estão relacionadas com a opsonização do complemento, a neutralização sua fagocitose e a inibição das respostas imunes humorais e celular (SANTOS et al., 2007).

A capacidade de colonização e a patogenicidade do *S. aureus* são, portanto, uma consequência de seus fatores de virulência, os quais têm papel relevante na adesão celular, na captação de nutrientes e na sua evasão da resposta imunológica do hospedeiro. Esses fatores de virulência podem ser classificados, basicamente, em três categorias: a) fatores relacionados com a aderência as células do hospedeiro ou a matriz extracelular, como a produção de moléculas de fibrinogênio, fibronectina, colágeno ou da enzima coagulase; b) fatores relacionados com a evasão da defesa do hospedeiro, como diversas enterotoxinas estafilocócicas (SEs A-E, G-J, K, L, M, O e P), a toxina da síndrome do choque tóxico, a proteína A, lípases e polissacarídeos capsulares; e c) fatores relacionados com a invasão na célula do hospedeiro e a penetração nos tecidos ou adesão de superfícies de cateteres e proteases, os quais incluem as proteínas (toxinas) α , β , δ , γ e δ – hemolisinas (VELÁZQUEZ-MEZA et al., 2005).

O *S. aureus* contém ainda, na estrutura de sua parede celular, polissacarídeos e proteínas antigênicas, bem como outras moléculas importantes, que podem induzir uma resposta imunológica no hospedeiro. Entre essas moléculas podemos citar o ácido tecoico, o glicanopeptídeo, a proteína A, além da presença de cápsula e de adesinas (LUTZ et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2001). Além desses, acredita-se que as bombas de efluxos também são

responsáveis por efeitos patogênicos ocasionados por *S. aureus* (BHARDWAJ & MOHANTY, 2012).

Figura 2 – Imagem de microscopia e em meio cultura agar sangue de *Staphylococcus aureus*.



Disponível em: <http://www.samaritanid.com/staphylococcus_aureus.html>.
Acesso em: 17 de agosto de 2016.

2.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA

Os antibióticos têm apoiado a medicina moderna de tal maneira, que seu uso tem reduzido à mortalidade infantil e aumentado à expectativa de vida, sendo crucial para as cirurgias invasivas e tratamentos de infecções bacterianas. No entanto, o número de infecções causadas por bactérias multirresistentes a antibióticos tem aumentado mundialmente, resultando em um grande espectro de infecções intratáveis. Um estudo recente do *World Economic Forum Global Risks* mostra a resistência aos antibióticos como uma das maiores ameaças para a saúde humana (WALKER & FOWLER, 2011; WEF, 2014).

Estima-se que na Europa 25.000 pessoas morrem a cada ano como resultado de infecções de bactérias multirresistentes, resultando em um custo anual aproximado de 1,5 bilhões de euros. Nos Estados Unidos mais de 2 milhões de pessoas são infectadas por bactérias resistentes a antibióticos, com 23.000 mortes como resultado direto. No Brasil, dados epidemiológicos sobre casos de infecções por bactérias resistentes são mal documentados, não se tendo a certeza do número certo de casos e mortes consequentes, embora se acredite que sejam milhares de mortes por ano. Além do aumento da resistência aos agentes existentes,

observa-se uma falta de novos antibióticos em desenvolvimento (WHO, 2014; HAMPTON et al., 2013).

As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a certos antibióticos, mas também podem adquirir resistência a outros antibióticos através de mutações em genes cromossômicos e da transferência horizontal de genes. A resistência intrínseca de uma espécie bacteriana é definida como sendo a capacidade de resistir à ação deste antibiótico, como resultado inerente das características estruturais ou funcionais do antibiótico. O exemplo mais simples de resistência intrínseca em uma espécie individual tem como resultado a ausência de um alvo susceptível de um antibiótico específico (BLAIR et al., 2015).

Estudos recentes levaram à identificação de muitos genes que são responsáveis pela resistência intrínseca às diferentes classes de antibióticos, incluindo β -lactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Esta identificação só foi possível pela utilização de técnicas como *high-throughput screening of high-density genome* já aplicada em bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (BLAKE & O'NEILL, 2013; LIU et al., 2010).

Compreender a base da genética da resistência bacteriana e, conseqüentemente, o espectro de atividade de um antibiótico, pode orientar o desenvolvimento de novas combinações de agentes antibacterianos, assim como também pode melhorar ou expandir a atividade de agentes contra espécies-alvo. Vários estudos têm identificado efeito sinérgico *in vitro* entre as combinações não convencionais de antibióticos que podem ser utilizados para o tratamento de agentes patogênicos particularmente problemáticos, tais como *Acinetobacter baumannii* e *Neisseria gonorrhoeae* (BARBEE et al., 2014; PRINCIPE et al., 2013). Combinar informações de estudos de sinergia com *screens* genéticos buscando identificar interações entre vias bioquímicas podem estender o arsenal de antibióticos disponíveis e permitir a utilização das drogas existentes contra espécies antes resistentes aos mesmos (BLAIR et al., 2015).

As bactérias podem adquirir ou desenvolver resistência aos antibióticos através de vários mecanismos, que se dividem em três principais grupos: em primeiro lugar, aqueles que minimizam as concentrações intracelulares do antibiótico como um resultado de uma fraca penetração na bactéria ou de efluxo de antibiótico; segundo, aqueles que modificam alvo do antibiótico por mutação genética ou modificação pós-translacional do alvo; em terceiro lugar, aqueles que protegem o alvo da ação do antibiótico através da inativação do antibiótico ocorrida por hidrólise realizada por enzimas (BLAIR et al., 2015).

2.3.1 Redução de permeabilidade e efluxo

Comparado com as espécies Gram-positivas, as bactérias Gram-negativas são intrinsecamente menos permeáveis a muitos antibióticos (KOJIMA & NIKAIDO, 2013; VARGIU & NIKAIDO, 2013). É conhecido que, para exercer sua ação, os antibióticos hidrofílicos atravessam a membrana externa por difusão, através das proteínas da membrana externa chamadas de porinas. Um mecanismo de resistência que envolve a redução da permeabilidade a antibióticos consiste na diminuição de porinas expressas ou substituição das existentes por porinas mais seletivas. Este mecanismo é bem estabelecido para a resistência aos antibióticos em cepas bacterianas Gram-negativas (WOZNIAK & WALDOR, 2010).

As bombas de efluxo são proteínas de membrana ativamente responsáveis pelo transporte de muitos antibióticos para fora da célula. Portanto, contribuem efetivamente para a resistência intrínseca de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas a muitos medicamentos que são utilizados para tratar infecções bacterianas. Contudo, as bombas de efluxo quando expressas podem conferir elevados níveis de resistência a antibióticos, anteriormente úteis na clínica. Algumas bombas de efluxo têm especificidade restrita para o substrato (por exemplo, a bomba TetK às tetraciclinas), mas muitas transportam uma grande variedade de substratos diferentes, sendo conhecidas como bombas de efluxo de resistência a múltiplas drogas (*multiple drug resistance* - MDR) (BLAIR et al., 2015).

As bactérias possuem vários genes que codificam bombas de efluxo de MDR em seus cromossomos; estes genes podem estar presentes exclusivamente em plasmídeos, os quais podem ser transferidos entre as bactérias da mesma espécie ou entre espécies diferentes. A expressão das bombas de efluxo é controlada por fatores ambientais. De fato, o aumento da expressão de bombas de efluxo pode ocorrer como resultado da indução em resposta a sinais ambientais como a presença de antibióticos e em condições em que é necessária à sua função (DOLEJSKA et al., 2013).

2.3.2 Alterações por mutação nos alvos dos antibióticos

A maioria dos antibióticos se liga especificamente aos seus alvos com elevada afinidade, evitando o perfeito funcionamento da célula bacteriana. Entretanto, alterações na estrutura do alvo afetam a afinidade e, conseqüentemente, impedem a ligação eficiente do antibiótico ao mesmo, ocasionado à resistência bacteriana à droga específica. Durante o curso da infecção, há

frequentemente uma grande população de patógenos; a ocorrência de uma única mutação pontual no gene que codifica o alvo de um antibiótico pode ocasionar a resistência à droga, e então esta estirpe mutante pode se proliferar. Os genes que codificam os alvos de alguns antibióticos podem existir em múltiplas cópias, que também podem levar ao efeito de resistência da mesma maneira citada anteriormente. Além da alteração no alvo por mutação, o fenômeno de transformação bacteriana pode ser responsável pela modificação do alvo, através da expressão de novos genes inseridos que substituem os genes selvagens codificadores de alvos de antibióticos. Outro exemplo de uma modificação alvo é aquisição de um gene homólogo ao gene do alvo original, tal como ocorre em *S. aureus* resistente à meticilina (*Methicillin resistant Staphylococcus aureus* - MRSA), que é conferida pela aquisição do elemento de cassete cromossômico *MEC* (*SCCmec*). (UNEMO et al., 2012; SHORE et al., 2011).

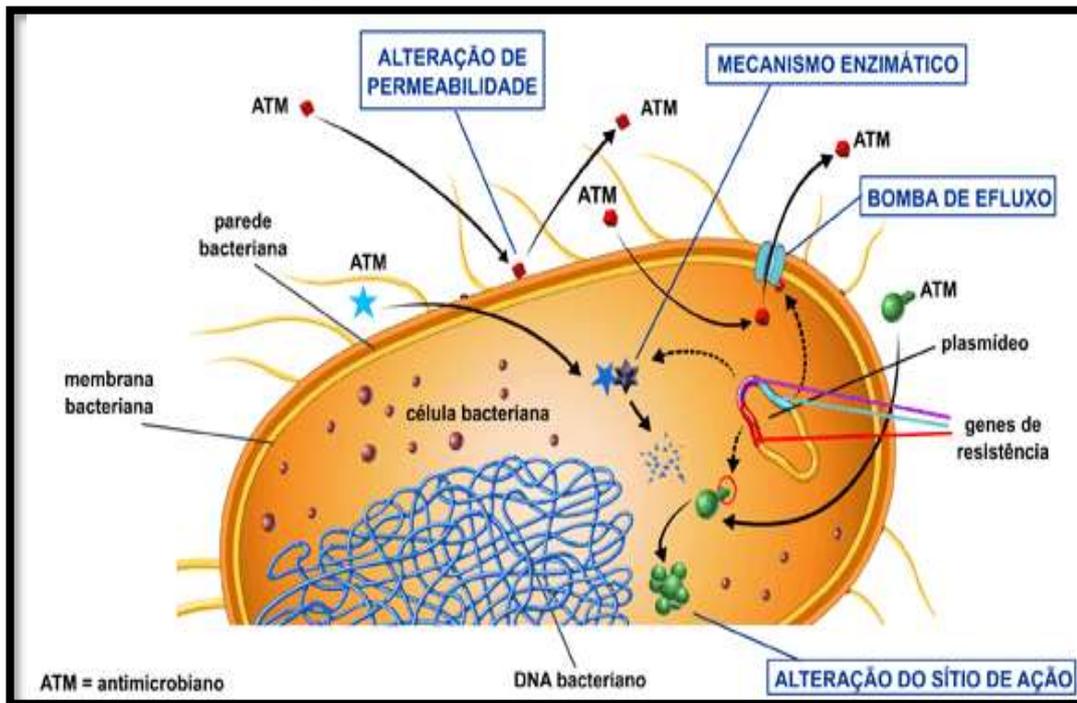
2.3.3 Modificação dos antibióticos

A modificação dos antibióticos é um dos meios mais eficazes de resistência aos antibióticos, ocorrendo através de enzimas produzidas pela célula bacteriana que destroem o antibiótico. Considera-se este como um mecanismo clinicamente relevante de resistência a vários antibióticos importantes. A inativação do alvo realizada por enzimas foi um dos primeiros mecanismos de resistência identificado. Existem milhares de enzimas que podem degradar ou modificar antibióticos de diferentes classes; como exemplo, pode-se mencionar as que atuam sobre os antibióticos das seguintes classes: β -lactâmicos, aminoglicosídeos e macrolídeos. Há também subclasses de enzimas que podem degradar diferentes antibióticos pertencentes a mesma classe. Como exemplo, podem ser citados os antibióticos β -lactâmicos, tais como penicilinas, cefalosporinas e carbapênimicos, monobactâmicos que são hidrolisados por uma gama diversa de enzimas β -lactamases (KUMAR et al., 2014; BLAIR et al., 2015).

A modificação dos antibióticos também pode ocorrer via transferências de grupos químicos. Esses grupos se ligam aos antibióticos evitando sua ação sobre o alvo bacteriano. Vários grupos químicos diferentes podem ser transferidos, incluindo acil, fosfato, e nucleotídeo grupos ribitol. As enzimas que são responsáveis por essa ação formam uma grande e diversificada família de enzimas resistência antibiótica. Os antibióticos aminoglicosídeos são particularmente susceptíveis para esse tipo de modificação, uma vez que tendem a ser grandes moléculas com muitos grupos hidroxilo e amida expostos. Enzimas modificadoras de

aminoglicosídeos conferem elevados níveis de resistência aos antibióticos. Existem três principais classes de enzimas modificadoras aminoglicosídeos: acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferases. Essas classes são evolutivamente diversificadas e variam segundo a parte da molécula de aminoglicosídeos que podem modificar (NORRIS & SERPERSU, 2013; ROMANOWSKA; REUTER; TRYLSKA, 2013).

Figura 3 – Mecanismos de resistência bacteriana.



Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude>>.
Acesso em: 22 de outubro de 2016.

2.4 SISTEMAS DE EFLUXO DE DROGAS BACTERIANAS

2.4.1 Superfamília grande facilitadora (*Major facilitator superfamily* - MFS)

A superfamília “*major facilitator*” (MFS) é grande, antiga, pois é conhecida há mais tempo, e também bastante diversificada, compreende mais de 300 proteínas que, por sua vez, encontram-se reunidas em subfamílias. Membros dessa família apresentam o sistema de catalise uniporte soluto/cátion (H^+ ou Na^+), simporte (soluto/ H^+) ou antiporte (soluto/soluto). São envolvidos no transporte de açúcares, íons e drogas. Estes transportadores funcionam com um único componente, como por exemplo, a bomba de efluxo NorA presente em *Staphylococcus aureus* (YOSHIDA et al., 1990). Entretanto, em algumas bactérias Gram-negativas, MFS

funcionam com a fusão de componentes de membrana externa com o de membrana interna, como por exemplo, a bomba de efluxo EmrAB–TolC de *E. coli* (LOMOVSKAYA & LEWIS, 1992).

As proteínas de membrana pertencentes à superfamília MFS comumente apresentam de 12 a 13 segmentos transmembrânicos. Existem três subfamílias dentro desse grupo, todas são *drug/H⁺ antiporter* (DHA). Na DHA1, por exemplo, existe a bomba Bmr de *Bacillus subtilis*; na DHA2 existe a QacA de *S. aureus* e na DHA3 ocorre a MefA de *Streptococcus pyogenes*. A DH1 e DH2 são presentes tanto em eucariotos como em procariotos, e são responsáveis pelo efluxo de uma ampla variedade distinta de drogas. Membros distintos da subfamília DH1 exportam açúcares, poliaminas, descopladores, monoaminas, acetilcolina, paraquate e metilglioxal. Já os membros da subfamília DHA2 são mais restritos e transportadores de substratos como sais biliares. Membros da subfamília DHA3 são encontrados apenas em procariotos, e são conhecidos pelo efluxo de antibióticos, incluindo macrolídios e tetraciclina. Bombas de efluxo de tetraciclina são as melhores caracterizadas membros de MFS. Essas bombas são encontradas tanto em bactérias Gram-negativas como em Gram-positivas (KUMAR & SCHWEIZER, 2005).

2.4.2 Superfamília ligada a ATP cassette (*ATP-binding cassette ABC superfamily*)

Os transportadores da classe “*ATP-binding cassette superfamily*” (ABC), são complexos multi-proteicos (formando um canal de transporte pela membrana citoplasmática) e proteínas citoplasmáticas com atividade de ATPases. Membros desta superfamília usa a energia derivada da hidrólise de ATP para transportar uma variedade de substâncias, como aminoácidos, açúcares, íons, drogas, polissacarídeos e proteínas. As permeases ABC geralmente contém 6 domínios transmembrana, cada uma associada em pares com domínios homodímeros ou heterodímeros. Duas subunidades de ATPase associadas com permeases na face citoplasmática e no interior da membrana, formam um transportador funcional. Bombas de efluxo de drogas pertencentes à superfamília ABC são raras em bactérias, a bomba de efluxo LmrA de *Lactococcus lactis* é o melhor exemplo. A atual lista de exportadores pertencentes à superfamília ABC inclui 21 sistemas de efluxo em células de procariotos (HIGGINS et al, 1992; FATH & KOLTER, 1993; KUMAR & SCHWEIZER, 2005).

Esta família também apresenta subfamílias que são designadas de A a G com base na sequência e homologia estrutural, e são responsáveis pelo movimento dependente de ATP de

vários xenobióticos (Incluindo drogas), lipídios e produtos metabólicos em todo o plasma e nas membranas intracelulares. Membros da subfamília ABC são predominantes em células do sistema nervoso central, bem como do sistema hematopoiético, e são conhecidos por transportar lipídeos, particularmente lipídeos que trafegam entre compartimentos celulares. Já os membros da ABCB são responsáveis pelo transporte intracelular de peptídeos, incluindo células eucarióticas, tendo um papel essencial no transporte de MHC (Complexo principal de histocompatibilidade) (ALBRECHT & VITURRO, 2007). O ABCC é conhecido como proteína de resistência a múltiplas drogas, contendo o maior número de transportadores de drogas, como também é um regulador de condução (ABCC7). O transportador ABCD é ligado a doenças neurodegenerativas. Membros da subfamília ABCE e ABCF parecem não ter domínios que atravessam a membrana, estando envolvidos na tradução do RNAm (CHEN et al., 2006).

Dentre as superfamílias, apenas os membros da superfamília ABC são conhecidos por funcionar como um canal e tem um essencial papel no efluxo do íon cloreto. Uma característica marcante dessa família é a capacidade de ser responsável pela resistência de células cancerígenas, ao tratamento quimioterápico. Isso ocorre através do efluxo dessas drogas (FLETCHER et al., 2010).

2.4.3 Pequena família de resistência a múltiplos medicamentos (*Small multidrug resistance (SMR) family*-SMR)

A superfamília SMR consiste de transportadores de aproximadamente 110 resíduos de aminoácidos, contém quatro domínios transmembranas e são energizados por força próton motivo. Devido ao seu pequeno tamanho, pensava-se inicialmente, que as proteínas SMR funcionavam como trímeros. Entretanto, estudos mostram que essas proteínas são tetrâmeros (PAULSEN et al., 1996; MA & CHANG, 2004; KUMAR & SCHWEIZER, 2005). Algumas bombas dessa família foram bem caracterizadas, incluindo bomba Smr de *S. aureus* e a bomba EmrE de *E. coli*, que realizam o efluxo tanto de cátions como de drogas (PAULSEN et al., 1996; MA & CHANG, 2004; KUMAR & SCHWEIZER, 2005).

Existem mais de 250 sequências de proteínas da superfamília SMR depositadas no Genbank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Uma vez que, muitas sequências homólogas de SMR foram identificadas em cromossomos, plasmídeos, e integrons, sugere-se que os membros desta família de transportadores têm diversidade estrutural e funcional muito além do que se pensava. Uma anterior caracterização filogenética da

superfamília de proteínas SMR revelou duas subclasses: *Small multidrug pumps* (SMR) e o supressor de proteínas mutação GroEL (SUG). O sequenciamento do genoma permitiu a identificação de um novo grupo de proteínas da subfamília SMR: *Paired SMR proteins* (PSMR). Membros do grupo PSMR são distintos tanto do SMP e SUG, uma vez que, diferentemente dos demais membros dessa subfamília, estes funcionam dentro da membrana como pares de heterodímeros de proteínas SMR (BAY; ROMMENS; TURNER, 2008).

2.4.4 Superfamília de Divisão celular de nodulação de Resistência (*Resistance nodulation cell division* (RND) superfamily)

Bombas de efluxo dessa subfamília eram originalmente encontradas apenas em eubactérias. Entretanto, hoje já foram encontradas também em eucariotos e arqueobactérias. As RND transportadores de drogas são tipicamente codificadas por genes de cromossomos, mas recentemente também foram relatadas em plásmideos. Todos os membros dessa superfamília já foram caracterizados pela presença do efluxo via substrato/H⁺, desempenhando um importante papel na resistência intrínseca e adquirida de bactérias Gram-negativas, para uma variedade de antimicrobianos (KUMAR & SCHWEIZER, 2005; TSENG et al., 1999).

Todas as bombas de efluxo RND funcionam pela formação de complexos consistindo de 12 domínios transmembranas ligados a uma membrana interna e outro a membrana externa, formando subunidades. Sem presença de qualquer um desses complexos a bomba não funciona. Uma característica da topologia da superfamília RND é a presença de dois grandes laços no periplasma entre o primeiro e o segundo domínio transmembrana e entre o sétimo e oitavo. A região N-terminal é homóloga a região C-terminal. Acredita-se que tais proteínas podem ter surgido a partir da duplicação intragênica em tandem, mesmo que ocorra antes da divergência dos membros da superfamília. Entretanto, há um exemplo de RND homólogo de *Mycobacterium jannaschii* que tem apenas seis domínios transmembranas e que não apresenta duplicação interna. É possível que esta proteína funcione como homodímero ou heterodímero, ou por associação com outras proteínas. Os membros mais estudados desse grupo de bomba são os dos sistemas AcrAB–TolC de *E coli* e MexAB–OprM de *P. aeruginosa*. Estes são conhecidos por atuarem no efluxo de antibióticos, metais pesados, corantes, detergentes, solventes e muitos outros substratos (HANSEN et al., 2004; MA et al., 1993).

As bombas desse tipo exportam drogas diretamente para o meio externo e não apenas para o periplasma. Esta é uma enorme vantagem para células bacterianas porque, uma vez

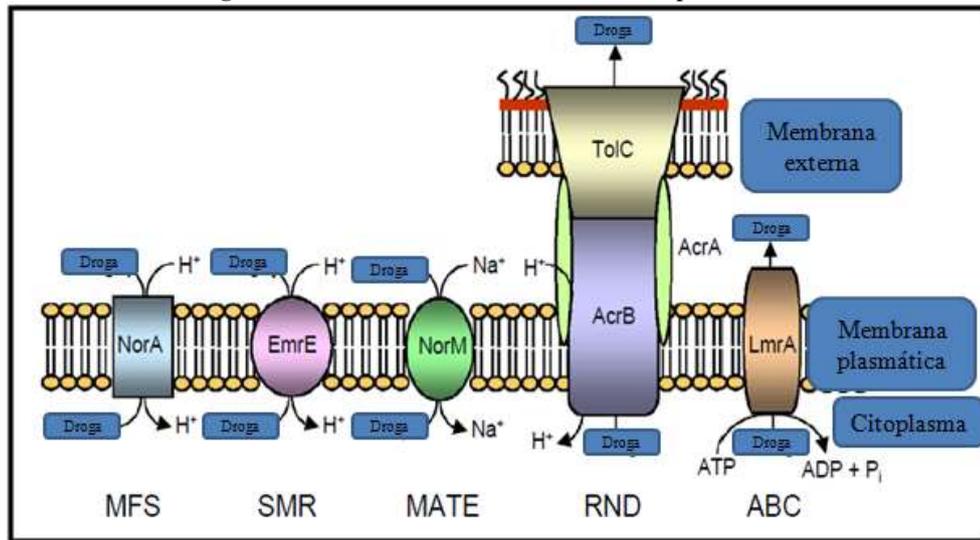
exportados para o espaço externo, as moléculas de droga devem atravessar a barreira de membrana externa para serem reinseridas nas células (NIKAIDO & TAKATSUKA, 2009).

2.4.5 Superfamília de extrusão de multidroga e de compostos tóxicos (*Multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family*)

A superfamília de transportadores MATE é a mais recentemente descrita e, por isso, a menos bem caracterizada; esta situação, no entanto, vem mudando rapidamente, uma vez que esta família tem um papel importante na resistência aos antibióticos em organismos patogênicos clinicamente relevantes. Anteriormente pensava-se que os membros desse grupo eram membros da superfamília MSF. Entretanto hoje as proteínas pertencentes à superfamília MATE são reconhecidas separadamente, como uma família de transportadores, isso por que apesar da homologia da topologia de suas estruturas transmembranas, com característica similar, elas não apresentaram sequências homologas com as proteínas MFS (KUMAR & SCHWEIZER, 2005).

Exemplo de proteínas pertencentes a esta classe incluem NorM de *Vibrio parahaemolyticus* e homólogos de YdhE de *E. coli*. Essas proteínas têm aproximadamente 450 resíduos de aminoácidos, contendo 12 domínios transmembrana. Proteínas pertencentes a esta família usam o gradiente Na^+ como fonte de efluxo de cátion, corante e fluoroquinolonas (MORITA et al., 1998; KUMAR & SCHWEIZER, 2005). O transportador MATE também é encontrado em plantas, sendo responsável pelo transporte no citoplasma e vacúolo. Nas plantas eles transportam xenobióticos, e são responsáveis pela acumulação de metabólitos secundários, incluindo alcaloides, flavonoides, ferro, alumínio e desintoxicantes (TAKANASHI; SHITAN; YAZAKI, 2014).

Figura 4 – Sistemas de efluxos eucariotos e procariotos.



Fonte: Kumar & Schweizer (2005).

2.5 FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DAS BOMBAS DE EFLUXO

As bombas de efluxos são proteínas transmembranas com funções notórias para fisiologia de células eucariotas e procariotas. Quando se refere às bactérias, as bombas de efluxo atuam principalmente promovendo a sobrevivência das bactérias em ambientes hostis, atuando na retirada de diversas substâncias danosas que penetram nas células nesses ambientes. Desse modo, diferentes estudos indicam que as bombas de efluxo em bactérias são capazes de retirar antibióticos, antissépticos (CHUANCHUEN et al., 2001; SANCHEZ; MORENO; MARTINEZ, 2005), metais pesados (SILVER & PHUNG, 1996), solventes (RAMOS et al., 2002) e detergentes (ZGURSKAYA & NIKAIDO, 2000), entre outras moléculas tóxicas, do interior celular. Portanto, quando se considera seu papel fisiológico nas bactérias, é possível concluir que as bombas atuam principalmente funcionando como elementos de desintoxicação.

As funções fisiológicas das bombas de efluxos vão muito além das mencionadas anteriormente. Tal fato pode ser baseado no princípio da existência de bombas de efluxo que são expressas de maneira constitutiva, e não apenas ativadas quando necessário para retirar substâncias nocivas à célula. Além disso, com um olhar mais atento sobre o número e especificidade de substrato das bombas de efluxo de resistências a múltiplas drogas, percebe-se que elas não estão envolvidas apenas na desintoxicação (GERMENDIA; FAJARDO; ALVAREZ-ORTEGA, 2009).

É importante mencionar que as bombas de efluxo são necessárias para manter a homeostase celular. Pode-se mencionar, por exemplo, o caso da bomba de efluxo Mdfa, na qual

a deleção do gene *mdfA* não afeta apenas susceptibilidade a antibióticos, uma vez que a expressão em níveis fisiológicos de MdfA funciona como um antiporte $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$, mantendo o pH intracelular em condições alcalinas e, por conseguinte, a homeostase celular (LEWINSON & BIBI, 2001). Algumas bombas de efluxo também apresentam um papel direto na resposta bacteriana ao quorum-sensing (CHAN et al., 2007). Além disso, as bombas de efluxo de bactérias fitopatógenas possuem papel importante nos passos iniciais da colonização do hospedeiro, bem como na sobrevivência das bactérias no tecido vegetal (ESPINOSA-URGEL; SALIDO; RAMOS, 2000).

Nas células eucarióticas, às bombas de efluxo exercem importante papel na resistência a determinados quimioterápicos; quando se trata de células cancerígenas, elas atuam de modo semelhante ao das bactérias, retirando as drogas do interior da célula (KERR; JONES; GEORGE, 2010).

2.6 BOMBAS DE EFLUXO ESPECÍFICAS

2.6.1 Bombas de efluxo NorA

A bomba de efluxo NorA, presente em *S. aureus*, é sintetizada pela expressão do gene *norA*, localizado no fragmento Smal D do cromossomo de *S. aureus* (NG; TRUCKSIS; HOOPER, 1994), é um membro da grande superfamília facilitadora (MFS). É conhecida por desempenhar um papel importante no desenvolvimento de resistência a quinolona, por reduzir a sua concentração no interior do patógeno alvo. Isto leva a uma diminuição da eficácia da droga e a uma maior chance para o surgimento de alto nível de resistência. Também já foi relatado seu efeito sobre o clorafenicol (PIDDOCK et al., 2006; POOLE, 2007).

A NorA é uma bomba de efluxo bem caracterizada pela presença de 12 segmentos transmembranas (NEYFAKH; BORSCH; KAATZ, 1993; NG; TRUCKSIS; HOOPER, 1994) e está relacionada com a Bmr, uma bomba de efluxo de *Bacillus subtilis* (AHMED et al., 1994; NEYFAKH et al., 1992; ZHELEZNOVA et al., 1999). Têm 388 aminoácidos e uma massa molecular de 42.385 KDa. A NorA protege a célula bacteriana contra compostos lipófilos e monocatiônicos como brometo de etídio, cetrimida, cloreto de benzalcônio, brometo tetrafenilfosfônio, e acriflavina, assim como também contra quinolonas hidrofílicas (HSIEH et al., 1998; KAATZ & SEO, 1995). A função fisiológica da NorA como transportador de múltiplas drogas já foi demonstrada com vesículas de membrana citoplasmática constituída de

proteolipossomos. A regulação da expressão gênica da NorA ainda não é bem conhecida (YU; GRINIUS; HOOPER, 2002). Esse tipo de bomba já foi identificado em cepas de em *S. aureus*: SA-1199B, SA-1199-3, SA-K1904, SA-K2361 e SA-K3092 (SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013).

Existem várias outras bombas de efluxo que são homólogas da NorA, tais como NorB e NorC, que foram descobertas em *S. aureus*, e todas são negativamente reguladas pela MgrA (TRUONG-BOLDUC; STRAHILEVITZ; HOOPER, 2006; LUONG et al., 2006). A expressão de NorA foi observada por conta de uma mutação no promotor do gene *norA* que resultou na incapacidade do regulador da proteína se ligar ao promotor (NG; TRUCKSIS; HOOPER, 1994). O segundo componente com papel de regular a expressão NorA é o ArlSR; sua eliminação em *S. aureus* resultou na expressão constitutiva de NorA (FOURNIER; ARAS; HOOPER, 2000). Já NorB é regulado negativamente por MgrA, e sobre NorG atua regulando positivamente (TRUONG-BOLDUC & HOOPER, 2007), embora a eliminação do gene *norG* não altere a resistência às fluoroquinolonas de *S. aureus* (TRUONG-BOLDUC & HOOPER, 2007).

2.6.2 Bomba de efluxo Tetk

A bomba de efluxo Tet(K) é a principal responsável pela resistência às tetraciclinas. Essa bomba é codificada pelo gene plasmideal *pt181*, que surgiu principalmente a partir de evento de aquisição genética pela célula bacteriana. Esta proteína confere proteção ao ribossomo, ao evitar a ação da tetraciclina sobre o mesmo (CHOPRA et al., 2001). Apesar de existirem outros mecanismos de resistência à tetraciclina, o principal consiste da aquisição desse sistema de efluxo. A exportação da tetraciclina reduz a sua concentração e protege, assim, o ribossomo da ação desta substância. Esse é um mecanismo antiporte acoplado à força de próton motivo, envolvendo a troca próton e tetraciclina. Essa bomba de efluxo é pertencente à família do maior facilitador (*major facilitator superfamily* - MFS). A bomba de efluxo tet(k) tem uma estrutura composta por 13 α -hélices, abrangendo regiões de fora da membrana e na membrana, ajudando na ancoragem da proteína. Esta tem o mesmo número de alfa-hélices C-terminal e N-terminal, tanto voltado para o interior, quando para o exterior da célula (GUAY; KHAN; ROTHSTEIN, 1993). Embora a maioria de sistema de efluxo de tetraciclina seja por meio desta, já foi encontrado em *Corynebacterium striatum* um sistema de efluxo que usa ATP em vez de gradiente de próton (CHOPRA et al., 2001).

Pelo menos 27 genes diferentes de resistência à tetraciclina (*tet*) já foram caracterizados, sendo que 17 deles codificam proteína de MFS. Muitos genes *tet* estão associados com plasmídeos móveis, transposons, transposons conjugativos e integrons. Estes permitiram que os genes *tet* possam se deslocar de espécie para espécie numa vasta gama de gêneros por conjugação. Os genes *tet (A)*, *tet (E)*, *Tet (L)*, *tet (J)*, *Tet (Y)*, *tet (30)* e *tet (31)* são encontrados somente em bactérias Gram-negativas. O gene *Tet(B)* foi encontrado em uma vasta gama de bactérias Gram-negativas. Além disso, outros genes *tet*, já foram identificados em 20 gêneros de bactérias Gram-negativas diferentes. A ocorrência de diferentes classes de genes *tet*, é mais comum em bactérias Gram-negativas do que para Gram-positivas, o motivo para tal fato ainda não é conhecido. Como exemplo de bactérias Gram-positivas portadora desse gene pode citar a *S. aureus*. De modo que o gene *tet(k)* é presente na bactéria *S. aureus*, mais precisamente nas cepas IS-58 e XU212 (CHOPRA et al., 2012; GIBBONS & UDO, 2000).

2.6.3 Bomba de efluxo MrsA

O gene *msrA* contido no plasmídeo pUL5054, codifica a bomba de efluxo MsrA com resistência de 14 a 15 membros de macrolídeos, principalmente eritromicina, esse plasmídeo é geralmente integrado ao DNA cromossomo (GIBBONS; OLUWATUYI; KAATZ, 2003). Esta bomba de efluxo é codificada pelo gene *MsrA*, e a proteína sintetizada a parti desta apresenta 488 aminoácidos com dois motivos de ligação a ATP, a mesma é pertence a superfamília dos transportadores ABC, que é encontrado tanto em eucarioto como em procarioto. Contém dois domínios hidrofóbicos, cada um com 6 a 8 segmentos transmembrânicos. Os domínios podem ser fundidos dentro como polipeptídeo multifuncional, que apresenta variedades de combinações associados ou separados. Entretanto ele pode também, funcionar com somente um domínio. Essa bomba de efluxo é presente principalmente *S aureus*, e foi primeiramente identificada na cepa RN4220 (ROSS et al., 1996).

2.7 REGULADORES GLOBAIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DE EFLUXO EM *S. AUREUS*

O sistema de regulação de bombas de efluxo é um complexo sistema, e envolve mais de um regulador. As espécies apresentam diversos componentes específicos envolvidos. Em *S aureus*, assim como para as demais bactérias, é possível encontrar componentes para cada bomba. Em geral, os reguladores de genes confirmados como transportador de droga bacteriana

pertencem a quatro famílias de proteínas reguladoras (GRKOVIC; BROWN; SKURRAY, 2002). São as famílias AraC, MarR, MerR, e TetR, que estão presentes em diferentes espécies. É importante mencionar que esta classificação, mostra pouca correlação com a classificação das famílias de bomba de fármaco, cuja expressão estes reguladores controlam. No entanto, a atribuição destes reguladores é baseada unicamente, em semelhanças detectadas dentro dos seus domínios de ligação ao DNA, que tipicamente constituem apenas um terço de cada polipeptídeo (PABO & SAUER, 1992).

Semelhante à maioria dos repressores e ativadores de genes bacterianos, os reguladores de genes de transporte de drogas identificados até agora possuem α -hélice-volta-hélice e motivos de ligação ao DNA. Os repressores e ativadores de genes bacterianos são incorporados em domínios de ligação ao DNA, que forma diferentes estruturas envolvidas, os quais contém feixe de três hélices e motivos de hélice. Estes servem para criar uma estrutura tridimensional estável, que enterra as cadeias laterais hidrofóbicas de aminoácidos no interior da região de início de leitura do DNA. Os repressores e ativadores orientam o "reconhecimento" da hélice por meio do motivo estrutural α -hélice-volta-hélice, assim que se encaixam no sulco maior do DNA-B (GAJIWALA & BURLEY, 2000; HUFFMAN & BRENNAN, 2002).

É importante salientar, que quatro reguladores locais destas proteínas de bomba de efluxo, não estão envolvidos na formação de domínios com o DNA. Entretanto essas são capazes de ligar ao substrato de suas bombas. E atuam como sinal para aumentar a síntese de proteínas relevantes de transporte, em resposta à presença de compostos tóxicos. Esta descoberta teve ramificações importantes para o campo de interações proteína-droga, uma vez que, em contraste com proteínas de transporte ligado à membrana, que são notoriamente difícil de purificar e estudar *in vitro*, os reguladores citosólicos solúveis de resistência a medicamentos têm proporcionado os estudos de reconhecimento de drogas e de ligação (GRKOVIC; BROWN; SKURRAY, 2002).

Para os reguladores de proteínas TetR, QacR, e BmrR, detalhes de cristalografia de raio x associados com dados de bioquímicos e estudos de mutações, tem sido altamente valiosos no fornecimento de informações sobre os aspectos moleculares envolvendo a ligação com a droga, e as etapas subquentes que resultam na indução da expressão do gene alvo (HINRICHS et al., 1994; SCHUMACHER, 2001; ZHELEZNOVA & BRENNAN, 2001).

O regulador MgrA, anteriormente nomeado NorR ou Rat, foi o primeiro identificado por ligar a expressão da região promotora de *norA* (FOURNIER; ARAS; HOOPER, 2000). MgrA é altamente homólogo a família de proteínas MarR e em menor extensão a família SarA,

ambos reguladores possuem um motivo hélice-volta- hélice envolvido na ligação ao DNA (LUONG; NEWELL; LEE, 2003; INGAVALE; VAN; CHEUNG, 2003). MgrA é um regulador pleotrópico que usa o mecanismo de sensível a oxidação (CHEN et al., 2005) na regulação por autólise; de genes de virulência; genes de resistência (bomba de efluxo) e outros genes envolvidos no metabolismo de *S. aureus* (INGAVALE et al., 2005; LUONG et al., 2006). Este regulador também foi responsável por modular a expressão de outros reguladores, tais como SarA, que afeta a expressão de determinantes de virulência (CHEUNG et al., 2008) e alternativamente o fator sigma SigB, essencial para a resposta de estresse químico em *S. aureus* (GERTZ et al., 2000; BISCHOFF; DUNMAN; KORMANEC, 2004). Esses resultados sugerem que alguns efeitos de modulação atribuído a MgrA podem ser alcançados de maneira indireta (LUONG et al., 2006).

O regulador MgrA atua sobre três bombas de efluxo de *S. aureus* NorA, NorB e NorC, assim como também atua sobre a bomba de efluxo Tet38 e bomba de efluxo AbcA (TRUONG et al., 2005; TRUONG-BOLDUC et al., 2003; TRUONG-BOLDUC et al., 2005). Em diferentes estudos tem relatado, os efeitos do regulador MgrA sobre a expressão dos genes *norA* e *norB* (KAATZ; THYAGARAJAN; SEO, 2005). Uma análise aprofundada desse sistema genético evidencia que MgrA pode ser fosforilado pós-transcricionalmente pela serina/treonina PknB (TRUONG-BOLDUC; DING; HOOPER, 2008), e que pode ser fosforilada por MgrA-P e desfosforilada por RsbU, alterando a habilidade de MgrA ligar aos promotores *norA* e *NorB*. Um modelo para a modulação de MgrA *norA/B* foi proposto após demonstrar que apenas MgrA foi capaz de ligar ao promotor de *norA* enquanto que ao promotor de *norB* apenas o MgrA-P foi eficaz. De acordo com este modelo, MgrA atua como um repressor de *norA*, e a fosforilação de MgrA-P é realizada no promotor de *norA*, permitindo a transcrição de *norA*. O MgrA-P, por sua vez, liga-se ao promotor *norB*, atuando como um repressor de *norB* (TRUONG-BOLDUC & HOOPER, 2010). A relação entre MgrA e MgrA-P e, portanto, tem o seu efeito sobre a expressão de bomba de efluxo é dependente de PknB e RsbU, que por sua vez são modulados pelo fator SigB alternativo, envolvendo a resposta de estresse em *S. aureus*.

Foi proposto que NorC pode ser alternativamente regulado pelo MgrA e atua de maneira combinada com NorB. No entanto, MgrA não reconhece sítios que foram encontrados na região promotora de *norC*, sugerindo que MgrA pode ter um efeito indireto sobre a expressão de *norC* e que outros fatores podem desempenhar um papel na produção dessa bomba de efluxo (TRUONG-BOLDUC; STRAHILEVITZ; HOOPER, 2006).

O regulador de transcrição NorG, também se mostrou capaz de se ligar ao promotor de *norA* (TRUONG-BOLDUC & HOOPER, 2007). Foi mostrado que NorG foi capaz de ligar especificamente ao promotor dos genes de bomba de efluxo *norA*, *norB*, *norC*, *abcA* bem como o para o seu próprio promotor. A ligação de NorG aos promotores *tet38* ou *mgrA* também já foi detectada (TRUONG-BOLDUC & HOOPER, 2007). Entretanto, o regulador também MgrA pode se ligar ao promotor *norG*, assim afetando a expressão (TRUONG-BOLDUC & HOOPER, 2007). Apesar da ligação de NorG a região dos promotores *norA*, *norB*, *norC* e *abcA* leva a super expressar o *norG* e este foi acompanhado apenas por um ligeiro aumento da expressão de *norB*, sugerindo que NorG é um ativador de *norB* (TRUONG-BOLDUC & HOOPER, 2007). Uma análise do perfil transcricional de NorG confirma seu papel como um ativador de *NorB* e revela que NorG afeta negativamente a expressão de ambos *norC* e *abcA*. Também foi mostrado que NorG afeta negativamente a transcrição de reguladores globais *mgrA*, *arlS* e *sarZ* (TRUONG-BOLDUC et al., 2011).

2.7.1 Regulação específica da bomba de efluxo NorA

A mutação no gene *flaqB*, uma mutação de substituição única de um T por um G anterior a região 5' do gene da *Nor*, tem mostrado aumentar a meia vida do RNA mensageiro do *NorA* de 4 a 8 vezes, resultando na super expressão de *NorA*. Tem sido proposto que o aumento da estabilidade do RNAm é consequência de alterações de sua estrutura secundária, que podem afetar no local de clivagem de RNAase III envolvida na degradação deste transcrito. Uma única mudança de A para T na região promotora de *norA*, parece também resultar na super expressão de *NorA* e subsequente resistência a fluoroquinolona (KAATZ; SEO; FOSTER, 1999). Outras mutações que produzem resistência, mas que estão fora de regiões promotoras de codificação *NorA* ainda não foram caracterizadas (FOURNIER et al., 2001).

Embora a regulação da expressão *NorA* seja pouco compreendida, tem sido demonstrado que uma proteína de 18-kDa tem a capacidade ligar a sequências anteriores a região -35 do promotor da *norA* (FOURNIER; ARAS; HOOPER, 2000). A ligação dessa proteína de 18-kDa é modificada por *ArlS*, que parece funcionar como sensor transmembrana do sistema de dois componentes regulatórios *ArlR-ArlS* (FOURNIER et al., 2001). O primeiro componente desse sistema é tipicamente um sensor transmembrana que sofre autofosforilação após a ligação de uma molécula de sinal presente no ambiente externo. O fosfato é transferido para um segundo componente, um regulador citoplasmático que pode reverter a fosforilação

em um resíduo de aspartato conservado. A atividade de resposta desse regulador é alterada, de modo que ele pode atuar como um estimulador ou repressor do gene alvo (PARKINSON et al., 1993).

Embora a ruptura do gene do sensor ArlS transmembrana resulta na super expressão de NorA, e também altera a fase de regulação do crescimento desse transportador, não é conhecido se o regulador ArlS fosforila a proteína de 18-kDa diretamente ou indiretamente, ou alternativamente atua indiretamente, por exemplo, via ArlR alterando a transcrição do gene envolvido na produção do ligante da proteína 18-kDa. O último cenário que pode ser relatado, consiste na observação que *S. aureus* secreta um composto para o meio externo que tem capacidade de baixar a expressão de *norA* na fase de crescimento logarítmico. Embora ArlR-ArlS também tenha um papel determinante na regulação de determinantes de virulência em *S. aureus*, a expressão de *norA* não parece está ligado a determinantes de virulência. Sugerindo que ArlR-ArlS modula a expressão de NorA em resposta a outras funções fisiológicas (FOURNIER et al., 2001; FOURNIER; ARAS; HOOPER, 2000).

2.8 INIBIDORES DE EFLUXO

A deleção de bombas de efluxo de bactérias tem mostrado aumentar a suscetibilidade de muitas bactérias a antibióticos. Por exemplo, a deleção do gene que codifica MexB em *P. aeruginosa* leva a uma diminuição do CIM de uma ampla variedade de drogas como aminoglicosídeos, clorafenicol etc. Nesses mutantes de *P. aeruginosa* tem sido usando *screening* de inibidores de bomba de efluxo (IBE). Há amplos dados que mostram que bombas de efluxo são envolvidas na determinação do fenótipo de resistência de um patógeno e, portanto, representam uma grande ameaça para o efetivo tratamento de muitas bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e patógenos oportunistas. Isso leva a necessidade do desenvolvimento de inibidores dessas bombas que iriam contornar o problema de resistência causada por esses transportadores, levando a regimes de tratamento bem-sucedidos. Os inibidores até então conhecidos apresentam vantagens e desvantagens (VAN; PAGES; LEE, 2006; ZECHINI & VERSACE, 2009).

2.8.1 Requisitos para um inibidor ideal

Um inibidor de bomba de efluxo deve ser livre de qualquer atividade farmacológica em células eucariotas. A síntese de inibidores de bombas de efluxo oriundos de produtos naturais, não deve ser demorada, cara e difícil, uma vez que esses fatores tornam esses produtos comercialmente inviáveis. Como exemplo problemas com isolamento, purificação, solubilidade e toxicidade. Os inibidores devem ser proteoliticamente estáveis para garantir os níveis séricos e de acumulação celular para o potencial controle de infecções intracelular. Também devem aumentar o índice terapêutico e perfil farmacocinético para garantir o máximo de especificidade e eficácia. Devem ser desprovidos de atividade antibacteriana, porque essas podem levar ao desenvolvimento de mecanismos de resistência contra os inibidores de bombas de efluxo. E como característica principal eles não devem ser tóxicos para humanos, uma vez podem ser utilizados em altas concentrações em determinadas situações (VAN; PAGES; LEE, 2006; PIDDOCK et al., 2006; BHARDWAJ & MOHANTY, 2012).

2.8.2 Estratégias para inibição de bomba de efluxo

Há muitas estratégias para a inibição da bomba de efluxos. Com destaque para: 1) A criação de novos fármacos ou alteração de fármacos já existentes, para que não sejam reconhecidos pelas bombas de efluxo e retirados da célula alvo (CHOPRA et al., 2002). 2) Interferência com a montagem e funcionamento de bombas de efluxo. Isto é especialmente válido para o efluxo de proteínas de bomba como RND encontradas em bactérias Gram-negativas. Nesse caso, para inibir esse tipo de bombas de efluxo, há um bloqueio do canal da membrana externa (YOSHIHARA & INOKO, 2011). 3) Um mecanismo bem conhecido envolve o bloqueio da energia requerida pelas bombas de efluxo para atuarem. Esses são os desacopladores de energia, e atuam como um mecanismo geral para dissipar o gradiente da energia, utilizada pelas bombas de efluxo. 4) A interferência com as etapas de regulação da expressão de genes de bombas de efluxo, também é outro alvo de atuação. Como quando ocorre a alteração da permeabilidade da membrana, que é regulada pelos mesmos mecanismos que incluem complexos regulatórios, ligados tanto à expressão de porinas quanto a expressão de bomba de efluxo. Como exemplo o regulador Mar A de *E. aerogenes*, que controla a permeabilidade de membrana e regula a expressão de porinas e bombas como AcrAB-TolC. Mutações nesse regulador pode causar resistência a muitos antibióticos. A interferência com as

etapas de regulação pode ser utilizada para diminuir a expressão de bombas efluxo, assim restaurando a atividade antibiótica (BORNET et al., 2003).

A última estratégia envolve a formação de inibidores competitivos e não competitivos que podem inibir a bomba. Esses inibidores são benéficos clinicamente de muitas maneiras, de modo que eles não só contornam o problema da resistência bacteriana aos antibióticos através da inibição de bombas efluxo, mas também reverterem a resistência adquirida associada com a super-expressão de bombas de efluxo e suprime o aparecimento de mutações que conduzem a resistência (BORNET et al., 2003; OETHINGER & LEVY, 2002).

2.8.3 Tipos de inibidores

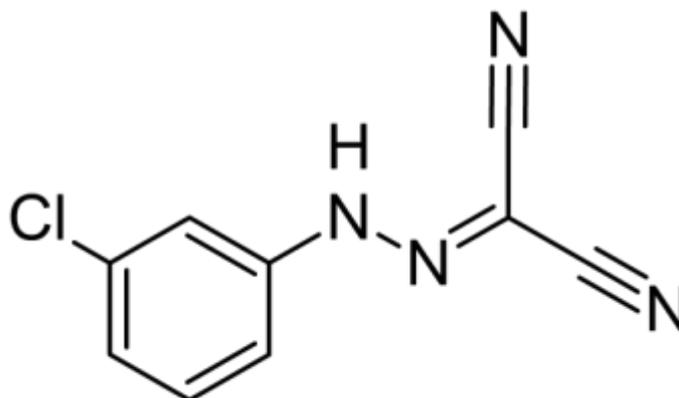
1) Desacopladores de energia: a maioria das bombas utiliza força motriz de prótons como fonte de energia, e qualquer composto que atue como dissipador dessa força pode atuar como inibidor de bomba de efluxo. Entre esses exemplos incluem *Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl-hydrazone* (CCCP) (FIGURA 5), valinomicina e dinitrofenol (DNP). Portanto esses compostos não atuam diretamente na bomba de efluxo, mas causa a sua inibição. Eles atuam por modificação do potencial eletroquímico transmembrana. Esses compostos não devem ser utilizados clinicamente ou patenteado devido a sua toxicidade nos tecidos (MALLEA, 2002; PAGES; MASI; BARBE, 2005).

2) Inibição da ligação direta das bombas de efluxos: Drogas utilizadas desse grupo são utilizadas para outros fins terapêuticos que não são infecções. Como reserpina e verapamil se mostraram capazes de interagir com a bomba Bmr de *Bacillus subtilis* e PgP de mamíferos. A reserpina também já se mostrou capaz de inibir NorA de *S. aureus*, e verapamil também já inibiu bombas abc como Lmra de bactérias. Todos estes IBE desse grupo sofrem com o problema da neurotoxicidade nas concentrações utilizadas para o combate às infecções bacterianas (BRENWALD; GILL; WISE, 1997; LI & NIKAIDO, 2004).

Uma subclasse dentro desse segundo grupo de inibidores são os caracterizados como peptidomiméticos: compostos amidos dipeptídeos INF271 e MC-207,110 (*Phenylalanine Arginyl β -Naphthylamide/PA β N*) (FIGURA 6) se enquadram nesta categoria. Assim como a reserpina, o PA β N não pode ser utilizado com antibióticos para o tratamento a infecções bacterianas, devido a sua toxicidade. Foram feitos diversos *screening de diversos* compostos com estruturas dessa parecida ao do PA β N, e foi verificado efeito de redução da concentração inibitória mínima (CIM) do brometo e de ciprofloxacino com bombas NorA em concentrações

menores que as utilizadas para a reserpina (MARKHAM & NEYFAKH, 1996; MARKHAM et al., 1999). O peptideomimético MC-207,110 foi identificado como um inibidor de bomba Mex. A estrutura cristalizada de bomba AcrB de *E. coli* foi analisado na presença desse inibidor, e verificado que há uma ligação entre a droga e o inibidor de bomba. Este composto também se mostrou capaz de reduzir a resistência de *Pseudomonas aeruginosa* a levofloxacin, através da redução do seu CIM. O MC-207 é um inibidor competitivo de bomba de efluxo e atua por ligação num local mais perto do local de ligação do substrato aos antibióticos. O PA β N parece ser um promissor inibidor para uma ampla variedade de bactéria, bem como um eficaz inibidor de bomba de efluxo. O PA β N apresenta alta toxicidade o que inviabiliza seu uso clínico. Derivados de PA β N foram produzidos por substituições de aminoácidos ou uso de D-aminoácido, visando à redução de toxicidade. Assim foi produzido o MC-04 a partir do MC-207, como menor toxicidade e maior estabilidade (LOMOVSKAYA et al., 2001; COBAN; EKINCI; DURUPINAR, 2004).

Figura 5 – Estrutura química do cianeto de carbonilo m-cloro-fenil-hidrazona.



Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Carbonyl_cyanide_m-chlorophenyl_hydrazone.png>. Acesso em: 24 de setembro de 2017.

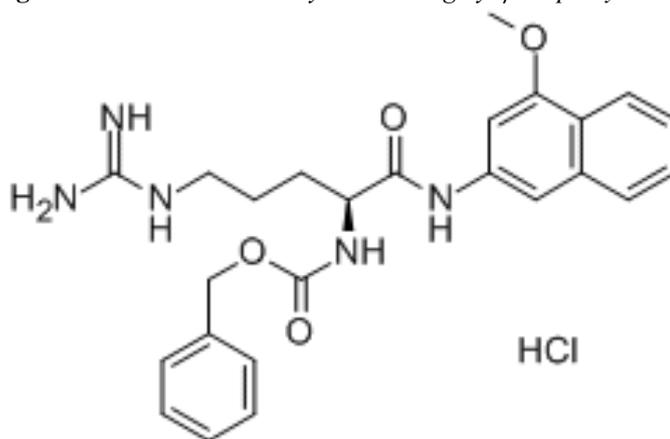
3) Modificações química do substrato: ofloxacin foi modificado por conjugação com o núcleo de bisaryl. Este composto foi capaz de inibir NorA e Mep A de *S aureus* (GERMAN; KAATZ; KERNS, 2008).

4) Queladores de ferro: Vários compostos queladores de ferro mostram-se capaz de inibir a atividade da bomba. Como exemplo pode ser citado a nocardamine que se mostrou capaz de inibir as bombas TetB e TetK de *S. aureus* (ROTHSTEIN et al., 1993).

5) Inibidores de efluxo de células eucarióticas: os melhores representantes dessa classe de moléculas são os derivados de ácido piperidino-carboxílico, que foram usados e patenteados como inibidores de p-glicoproteína MRP-1 de mamíferos e utilizados como adjuvantes no

tratamento de câncer. A vantagem dessas moléculas contra bactérias, é que já foi bem estabelecido sua farmacocinética e seu perfil de toxicidade, facilitando seu uso associado com antibióticos. Os membros desse grupo como: fenóis e epicatequina-galato que reverteram a resistência a tetraciclina em *S. aureus* TetB e TetK. Eles também aumentaram a atividade da norfloxacinina contra cepas que expressão NorA. O GG918, GG918, biricodar (VX-710) e timcodar (VX-853) potencializaram a atividade de fluoroquinolonas contra *E. coli* e bactérias Gram-positivas como *S. aureus*, *S. pneumoniae* (ARMISTEAD et al., 1994).

Figura 6 – Estrutura do *Phenylalanine Arginyl β-Naphthylamide*.



Disponível em: <<https://www.buyersguidechem.com>>.
Acesso em: 24 de setembro de 2017.

6) Análogos de antibióticos: Os compostos desta categoria *ajudam* a contornar o efeito das bombas de efluxo, assim aumentando a suscetibilidade para muitas classes de antibióticos. Análogos de tetraciclina, quinolonas e aminoglicosídeos foram estudados e patenteados. Já foram também identificados análogos de tetraciclina que aumentaram a susceptibilidade de tetraciclina contra *S. aureus*, tais compostos já foram testados contra vários agentes patogênicos e vários antibióticos. Uma vez que estes compostos são estruturalmente semelhantes aos antibióticos, eles sofrem a desvantagem de ter atividade antimicrobiana uma vez que, os torna possível de seleção por outros mecanismos de resistência contra ao mesmo antibiótico. Os análogos de aminoglicosídeos foram utilizados como inibidores de bombas de efluxo contra a bactéria *Haemophilus influenzae*. Estes compostos se mostraram capazes de aumentar a susceptibilidade de estirpes resistentes à gentamicina e a tetraciclina. Os análogos de fluoroquinolona têm se mostrado eficaz em aumentar a potência de antibióticos desta classe em bactérias Gram-positivas, bem como em bactérias Gram-negativas que expressam algumas bombas efluxo. Alguns destes análogos foram capazes de restaurar a atividade de macrólidos

em estreptococos que expressam bombas MEF (MYERS et al., 2010; NELSON & ALEKSHUN, 2004).

7) Oligonucleotídeos antimensageiros e anticorpos: Essa abordagem é baseada na utilização de oligonucleotídeos antimensageiros para inibir a expressão de bomba de efluxo alvo. A bomba de efluxo AcrAB foi inibida usando esta abordagem em *E. coli*. Um recente estudo tem descrito o uso do antimensageiro de oligonucleótido fosforotioato que encapsulado em lipossoma, restaurou a atividade de fluoroquinolonas em *E. coli*. A estratégia para o uso de anticorpos ou de suas partes já foi patenteado, mostrando a inibição da bomba MexAB-OprM em *P. aeruginosa* (YOSHIHARA & INOKO, 2011; OETHINGER & LEVY, 2011).

2.9 SUBSTÂNCIAS DE ORIGEM NATURAL

2.9.1 Ácido tânico

O ácido tânico é um composto oriundo do metabolismo secundário vegetal, e pertencente ao grupo dos compostos fenólicos, por apresentar um anel fenol em sua estrutura, o mesmo é relativamente hidrofóbico (FIGURA 7). É derivado da via do ácido chiquímico. Dentre os metabólitos secundários, o ácido tânico é pertencente ao grupo dos taninos (SIMÕES et al., 2010). O ácido tânico é um tanino hidrolisável que tem diversas aplicações industriais, farmacológicas e também é utilizado como aditivo de alimentos. É também usado como um agente de clarificação para as indústrias de fabricação de cerveja e vinho e como um agente aromatizante em produtos assados, sobremesas lácteas congeladas, doces e produtos à base de carne (KHAN et al., 1998).

Além desse seu uso como alimento, o ácido tânico apresenta propriedades medicinais. É usado como um aditivo em medicamentos, incluindo aqueles usados para o tratamento de queimaduras, diarreia e antídotos químicos em envenenamento e como um adstringente local (CHUNG et al., 1998). Foi visto que, quando aplicado topicamente, injetadas ou adicionado à dieta ou na água potável, o ácido tânico diminui o risco de tumor na pele e outros órgãos (MAJED et al., 2015). É também relatado é um potente poder antioxidante e também possui a capacidade de inibir atividade viral, além de ser: antimutagênica; anticarcinogênico e antimicrobiana (AKIYAMA et al., 2001; CHUNG et al., 1998; KAUR et al., 1998).

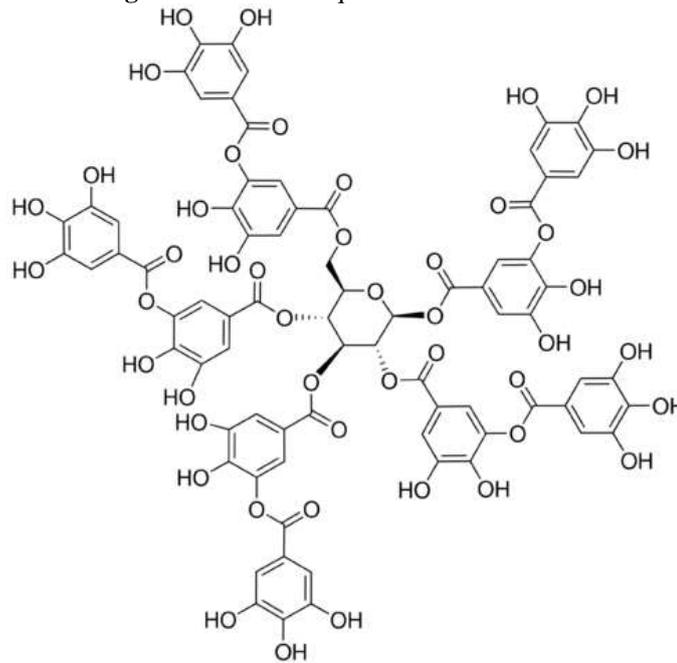
Como um composto antioxidante, o ácido tânico mostrou-se capaz de prevenir a peroxidação lipídica e clivagem de DNA por radicais derivados de oxigênio (BOUKI et al.,

2013). Com relação à atividade antiviral, foi mostrado seu efeito contra HIV e o vírus da gripe (MIZUMO et al., 1992). Assim como, a sua resposta antitumoral em ratos foi através da inibição da ortidina carboxilase, cuja atividade é responsável pela promoção de tumor na pele (GALI; PERCHELLET; PERCHELLET, 1991). Já em relação a sua atividade antimicrobiana o ácido tânico foi capaz de inibir o crescimento de *Aeromonas hydrophila* e *A. sobria*, *Escherichia coli* (CHUNG et al., 1995), *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (CHUNG et al., 1995), *Helicobacter pylori* (FUNATOGAWA et al., 2004), *Cytophaga columnaris* (ZHAO et al., 1997).

O ácido tânico, como foi citado anteriormente é membro do grupo dos taninos, os quais podem agir como antibacterianos pelas seguintes vias: I) Pela propriedade adstringente, que pode induzir a complexação com enzimas ou substratos. Muitas enzimas microbianas em filtrados de cultura brutos ou em formas purificadas, quando inibidas são misturadas com taninos. II) a toxicidade de um tanino contra bactérias pode estar relacionada, com a sua ação nas membranas dos microrganismos. II) complexação de íons metálicos por taninos podem ser responsáveis pela toxicidade de tanino em bactérias (AKIYAMA et al., 2001).

Entretanto, apesar de seu uso medicinal e alimentício citados anteriormente, o ácido tânico é tóxico para animais se injetado na corrente sanguínea ou consumido em grandes quantidades (KHAN; AHMAD; HADI, 2000). E, além disso, foi visto que na dieta de ratos foi responsável pela redução da vitamina A no fígado (SUSCHETET et al., 1975). Foi também mostrado, que em determinadas concentrações o ácido tânico é hepatotóxico (CHUNG et al., 1998). Portanto, para diminuir sua toxicidade em humanos, e ainda tendo em vista que o ácido tânico é adicionado em alimentos, foi estabelecida uma dose de segurança para o consumo, que varia de 10µg a 400µg, esta também varia de acordo com o tipo de alimento em que ele é adicionado (CHUNG et al., 1998).

Figura 7 – Estrutura química do ácido tânico.



Fonte: *Sigma Aldrich* (2018).

2.9.2 Vitaminas lipossolúveis

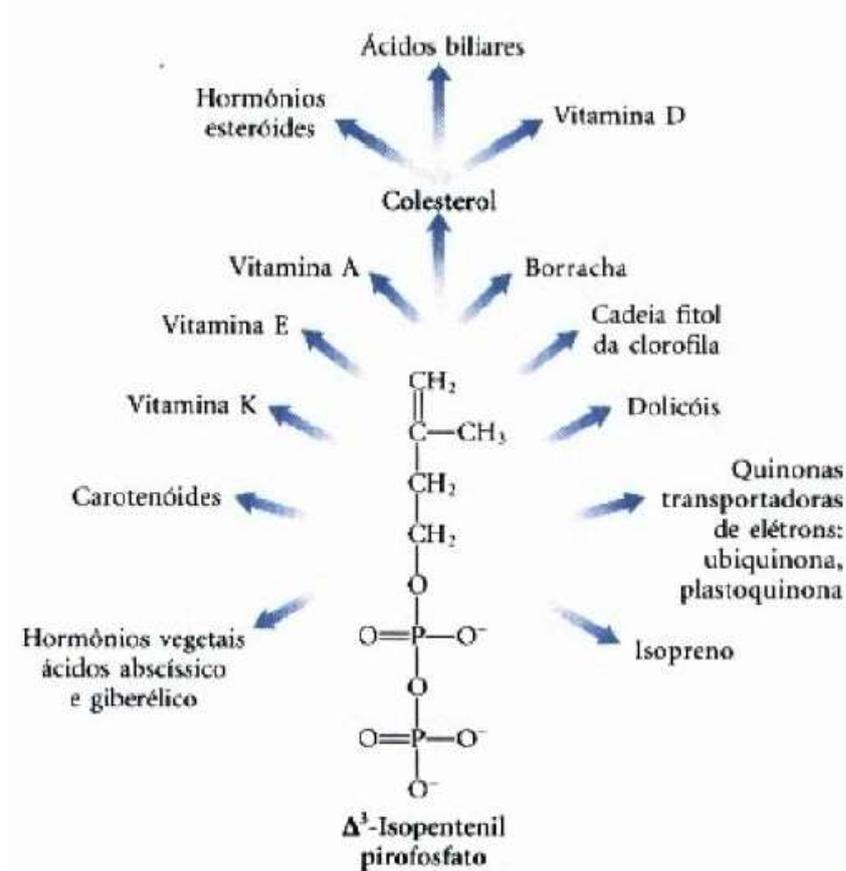
O termo vitamina (vita: vida; amina: grupo de composto nitrogenado) é usado para substâncias de origem orgânica, presentes em muitos alimentos em pouca quantidade, que são necessárias para equilibrar as funções vitais de diversos seres vivos. Elas são distintas das proteínas, dos glicídios e lipídios e são possuem extrema importância para o funcionamento do organismo humano, tendo por função participar de diversas reações metabólicas controladas por enzimas e coenzimas, na forma de co-fatores (CHORILLI; LEONARDI; SALGADO, 2007).

A falta de vitaminas ou defeitos na absorção e utilização imprópria na dieta humana resulta, quase que na maioria das vezes em deficiências no crescimento e desenvolvimento e outras perturbações orgânicas, sendo sua ausência patologicamente característica. Esta ausência também é denominada de avitaminose, que pode ser conjunto específico de reações adversas (MARCUS & COULSTON, 2003; SIERRA et al., 2007). Essas avitaminoses podem ocorrer se as vitaminas não forem consumidas com uma determinada frequência. Isso porque uma grande parte dos organismos animais, não é capaz de sintetizá-las por via anabólica, por esse motivo, as vitaminas necessitam ser incluídas na alimentação. Em geral, as vitaminas são necessárias em pequenas quantidades e a necessidade de consumo varia, em função da idade, sexo, estado fisiológico, metabólico e atividade física do indivíduo. A necessidade é aumentada nos

processos de crescimento, gestação, lactação, condições de esforços intensos e na ocorrência de determinadas doenças (PAIXÃO, STAMFORD, 2004; KLACK & CARVALHO, 2006).

As vitaminas são divididas em hidrossolúveis e lipossolúveis. Estas últimas conferem valor nutritivo aos alimentos, constituindo uma fonte de energia metabólica, sendo divididas em quatro grupos de vitamina, A, D, E e K. Essas se destacam por suas atividades biológicas e o suprimento destes micronutrientes são indispensáveis ao crescimento, desenvolvimento e outras funções biológicas do organismo (CHORILLI; LEONARDI; SALGADO, 2007). As vitaminas lipossolúveis (FIGURA 8) são compostas por unidades de isoprenóides, sendo o isopentenil pirofosfato seu precursor ativo, como também precursor de um grande espectro de biomoléculas como colesterol, possuindo mecanismos de polimerização similar em todas as vias biossintéticas (LEHNINGER, 2006).

Figura 8 – Visão geral da biossíntese dos isoprenóides.



Fonte: Lehninger (2006).

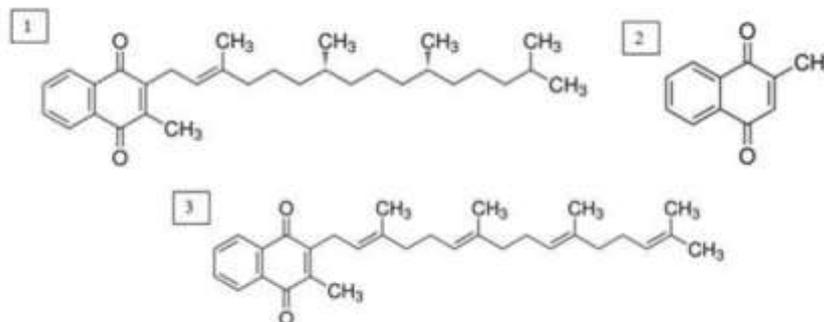
2.9.3 Vitamina K

A vitamina K é conhecida pela sua função de elevada importância para o organismo humano, que é ser um fator anti-hemorrágico. Ela foi descoberta em 1929 por Henrik Dam. Possui um nome genérico que é dado diversos compostos altamente relacionados entre si que atuam como co-fatores da enzima γ -glutamilcarboxilase. Esta denominação conhecida de vitamina K provém da primeira letra da palavra dinamarquesa *koagulation* (MOURÃO et al., 2005; KLACK & CARVALHO, 2006).

Esta vitamina tem ampla distribuição nos alimentos, sendo presente no grupo de vegetais folhosos verde onde se concentra em maior concentração, como, por exemplo, espinafre, brócolis e alguns tipos de alface. As fontes secundárias de vitamina K são disponíveis em alta concentração em óleos e gorduras: óleos de soja, canola, algodão, oliva, amendoim e de milho (FERREIRA et al., 2006). A proporção de vitamina K encontrada nos alimentos é influenciada por um conjunto de fatores como a fertilização e condições do solo, clima, área geográfica, estado de maturação e variação sazonal (DAMON et al., 2005).

As formas mais comuns de vitamina K encontradas (FIGURA 9) são: - Filoquinona (vitamina K1) que é a forma predominante, presente nos vegetais, sendo os óleos vegetais e as hortaliças suas fontes mais significativas. - Menaquinona (vitamina K2), sintetizada por bactérias no trato intestinal de humanos e animais, presente em produtos animais e alimentos fermentados. - Menadiona (vitamina K3) que é um composto sintético a ser convertido em K2 no intestino (KLACK & CARVALHO, 2006; DÔRES; PAIVA; CAMPANA, 2001).

Figura 9 – Estrutura molecular plana biologicamente ativas da vitamina K: 1- Filoquinona, 2- Menadiona, 3- Menaquinona.



Fonte: Andrade (2013).

Uma característica do anel da vitamina K é sofrer um ciclo de oxidação e redução, com o objetivo de produzir a protrombina ativa. Esta proteína é encontrada no plasma sanguíneo,

sendo importante para a formação do coágulo sanguíneo. Ela atua na quebra de determinadas ligações peptídicas do fibrinogênio, para transformá-lo em fibrina, uma proteína fibrosa que é responsável pela estrutura e forma do coágulo sanguíneo (LEHNINGER, 2006). Pode-se afirmar que o ciclo de vitamina K, é considerado uma via de recuperação da vitamina, presente em quantidades nanomolares no fígado e em outros tecidos (OLSON, 1999; DÔRES; PAIVA; CAMPANA, 2001).

As funções da vitamina K são: participar do mecanismo da coagulação sanguínea, sendo essencial para a síntese da protrombina; participa da síntese de proteínas presentes no plasma e rins e a carboxilação da vitamina K está envolvida na homeostase, metabolismo ósseo e crescimento celular (DÔRES; PAIVA; CAMPANA, 2001). Além disso, a vitamina K2 possui efeitos inibitórios do crescimento de várias células cancerígenas, e redução do risco dos eventos mutagênicos na fase de crescimento celular rápida em fetos e recém-nascidos (KLACK & CARVALHO, 2006).

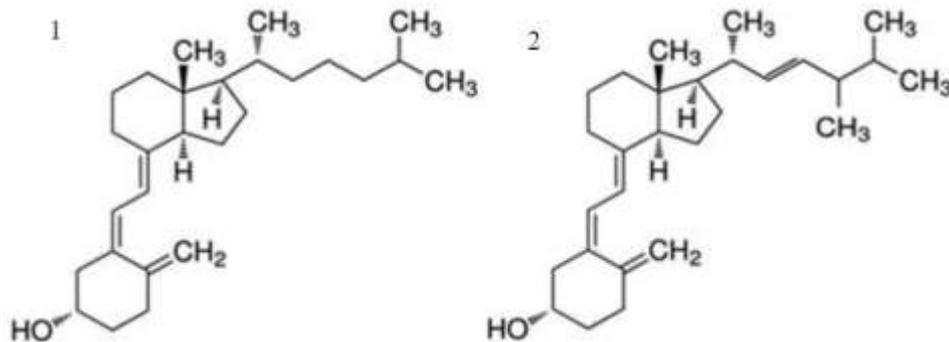
A síntese de proteínas da coagulação dependentes de vitamina K ocorre no fígado, por isso ele é considerado o maior órgão de estoque das vitaminas K. No entanto, o osso cortical possui uma quantidade de vitamina K semelhante ao fígado, levando o mesmo a funcionar como um fornecedor de filoquinona. No plasma do sangue, o espectro das vitaminas K circulantes é bem menor do que os encontrados nos estoques hepáticos (DÔRES; PAIVA; CAMPANA, 2001; KLACK & CARVALHO, 2006).

2.9.4 Vitamina D

A vitamina D é um hormônio esteroide, que interage com ossos, glândulas paratireóides, rins e intestinos, cuja função principal consiste na regulação da homeostase do cálcio, formação e reabsorção óssea (BARRETT & BARRETT, 2003; CARVALHO & BARGE, 2011). Por causa do papel da vitamina D no metabolismo do cálcio, a mesma tem sido amplamente utilizada na prevenção e tratamento da osteoporose e osteomalácia. Portanto, pode-se afirmar que esta é uma vitamina lipossolúvel indispensável a vários processos fisiológicos. Ela pode ocorrer através de duas formas: a vitamina D3 (FIGURA 7), também chamada de colecalciferol, produzida por meio de uma reação fotoquímica, catalisada pela radiação ultravioleta (UV) da luz solar sobre o 7-deidrocolesterol presente na pele. A vitamina D3 tem como característica não ser biologicamente ativa, mas enzimas do fígado e dos rins convertem-na em 1,25-diidroxicolecalciferol, hormônio que regula a absorção do cálcio no intestino e o

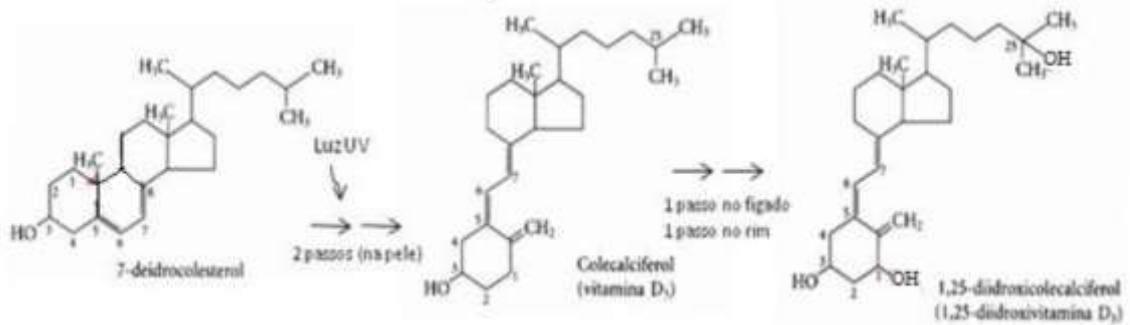
seu nível nos rins e ossos, através da expressão gênica (LEHNINGER, 2006; BARRAL et al., 2007). A vitamina D2, o ergocalciferol (FIGURA 10), é comercializada como um produto sintético obtido a partir da radiação da luz ultravioleta sobre o ergosterol de leveduras. Ela possui semelhanças estruturais com vitamina D3, porém apresenta algumas alterações na cadeia lateral, mas ambas têm os mesmos efeitos biológicos (LEHNINGER, 2006; DANTAS; DUARTE; MARQUES, 2009).

Figura 10 – Estrutura molecular plana do 1 – Colecalciferol ou vitamina D3, 2 - Ergocalciferol ou vitamina D2.



Fonte: Andrade (2013).

A formação endógena nos tecidos cutâneos após a exposição à radiação ultravioleta B é a principal fonte de produção da vitamina D (DANTAS; DUARTE; MARQUES, 2009; MARQUES et al., 2010). Portanto, a maioria dos humanos depende de uma adequada exposição ao sol para satisfazer suas necessidades diárias. Entretanto o processo de síntese da vitamina D é influenciado por diversos fatores, principalmente os que diminuem a sua produção. Dentre este, pode-se citar o caso das pessoas que vivem em latitudes mais ao norte, em locais de maior poluição, de pele morena, que desenvolva atividades em locais fechados, que usam roupas que cobrem quase toda a superfície corporal ou usam protetor solar, visto que a exposição à radiação solar está limitada. Também tem que se levar em consideração o fato que, a síntese desta vitamina está diminuída no inverno e durante a noite (WAGNER & GREER, 2008; CARVALHO & BARGE, 2011). Entretanto, há outra fonte alternativa e menos eficaz de se obter vitamina D, através da dieta, com consumo de produtos com suplementação. Através da alimentação é possível adquirir a partir de fontes vegetais, o ergocalciferol (ou vitamina D2) e, a partir de fontes animais, colecalciferol (ou vitamina D3). São especialmente ricos em vitamina D os peixes gordos, óleo de peixe e gema de ovo (DANTAS; DUARTE; MARQUES, 2009).

Figura 11 – Produção e Metabolismo da vitamina D.

Fonte: Lehninger (2006).

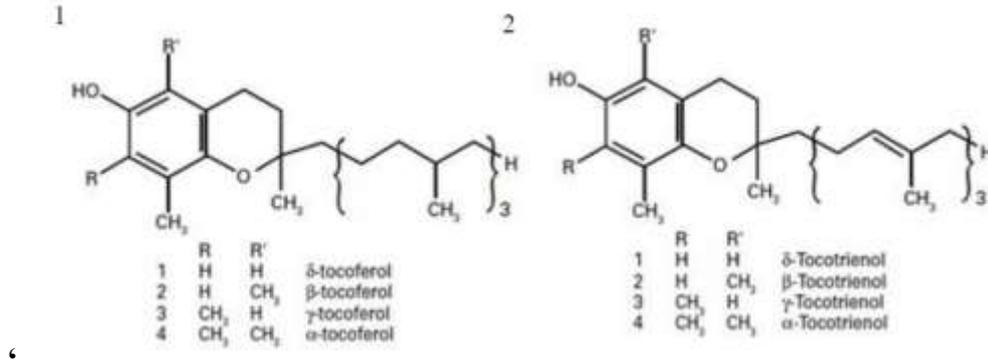
Outra função de relevância para a vitamina D (FIGURA 11) é a homeostase do cálcio, além disso, diversos estudos relatam que a forma ativa da vitamina D apresenta atividade biológica. Os efeitos mais complexos, em relação ao organismo são os que contribuem para a prevenção, tratamento e aumento da imunidade contra algumas doenças, principalmente as autoimunes (MARQUES et al., 2010). Uma das atividades biológicas da vitamina D que vem se destacando é a intensificação da atividade antimicrobiana, mediada por peptídeos endógenos (catelicidina e defensina), em monócitos, neutrófilos e outras linhagens celulares. Como exemplo, pode-se verificar que a vitamina D inibiu o crescimento de *Mycobacterium tuberculosis* por macrófagos humanos através da indução do sistema imune inato, levando à produção de catelicidina (DANTAS; DUARTE; MARQUES, 2009; MARQUES et al., 2010; MARTINEAU; TIMMS; BOTHAMLEY, 2011; MUSZKAT et al., 2010).

2.9.5 Vitamina E

A vitamina E é a principal vitamina encontrada no plasma e na partícula de lipoproteína de baixa densidade. Em fontes naturais ela é encontrada em alimentos de origem vegetal, principalmente nos vegetais verde-escuros, nas sementes oleaginosas. Esta foi isolada pela primeira vez em 1936, a partir do óleo essencial de gérmen de trigo, tendo como característica ser uma substância insolúvel em água. Sua síntese foi realizada posteriormente, em 1938, pelo químico suíço Paul Karrer (CHORILLI; LEONARDI; SALGADO, 2007). Hoje, sabe-se que ela é encontrada na natureza em oito isoformas, todas são lipossolúveis, as quais são divididas em dois grupos: tocoferol e tocotrienóis (BATISTA; COSTA; PINHEIRO-SANT'ANA, 2007). Sendo os grupos tocoferóis (alfa, beta, gama e delta-tocoferol) e tocotrienóis (alfa, beta, gama e delta-tocotrienóis) (FIGURA 11) apresentam uma longa cadeia lateral isoprenóide saturada e insaturada, respectivamente, com anel aromático substituído, que determina o tipo de isoforma

(LEHNINGER, 2006). O processo de metabolização dessas substâncias é diferenciado, embora o método de absorção intestinal seja igual. A diferenciação de ambas as formas ocorre no fígado (GUINAZI, 2004; BATISTA; COSTA; PINHEIRO-SANT'ANA, 2007).

Figura 12 – Estrutura molecular plana das isoformas dos grupos 1- Tocoferol e 2- Tocotrienóis.

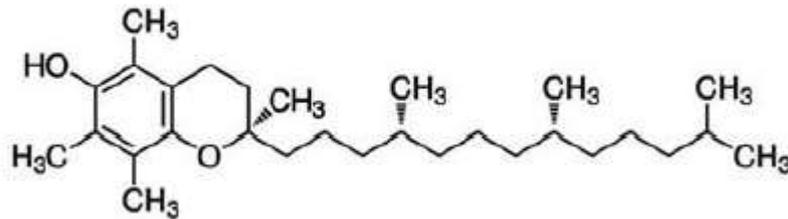


Fonte: Andrade (2013).

A mais abundante isoforma biologicamente ativa da vitamina E e mais potente antioxidante deste micronutriente é o alfa-tocoferol (FIGURA 13), como também esta é a isoforma mais explorada, sendo a única que atende as exigências nutricionais para humanos (MÁRQUEZ et al., 2002; CATANIA; BARROS; FERREIRA, 2009; DIMENSTEIN et al., 2011). Por serem hidrofóbicos, os tocoferóis interagem com a membrana celular, depósitos lipídicos e lipoproteínas do sangue (LEHNINGER, 2006).

Existe um interesse cada vez mais intenso pela vitamina E devido as suas atividades biológicas, especialmente, pelas funções que esta desempenha no organismo como antioxidante biológico, sendo capaz de retardar o envelhecimento e proteger o organismo de doenças crônicas não transmissíveis, como Parkinson, Alzheimer, quadros infecciosos e reumáticos, câncer e enfermidades cardiovasculares. Ela também protege os tecidos adiposos do ataque de radicais livres, sendo capaz de inibir o crescimento das células malignas e atua na modulação da sinalização celular e na transcrição de genes (BATISTA et al., 2007; MÁRQUEZ et al., 2002; CHORILLI; LEONARDI; SALGADO, 2007; BERG, 2010). Com o anel aromático presente na estrutura da vitamina E associa-se com as formas reativas dos radicais de oxigênio e outros radicais livres destruindo-os, isto tem como resultado a proteção de lipídeos da membrana e os ácidos graxos insaturados e contra a oxidação, evitando assim danos oxidativos que geram a fragilidade celular (LEHNINGER, 2006).

Figura 13 – Estrutura molecular plana do α – tocoferol (Vitamina E).

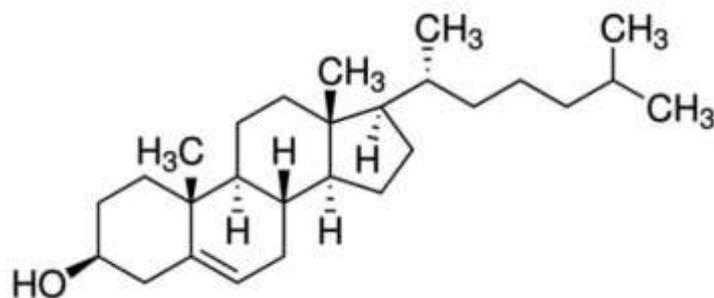


Fonte: Andrade (2013).

2.9.6 Colesterol

O colesterol é uma substância natural, indispensável ao organismo humano, e todas as células são capazes de produzi-lo a partir de um simples precursor, portanto, não é necessária sua ingestão pela dieta. Tem característica química complexa do tipo lipídio-esteróide. Nos animais ela encontra-se em todos os tecidos, mas especialmente concentrado no fígado, nos rins, nas glândulas suprarrenais e no cérebro (BRANDÃO et al., 2005; LEHNINGER, 2006). A estrutura molecular do colesterol (FIGURA 14) é composta por 27 átomos de carbonos que são fornecidos a partir de um único precursor o acetato, e unidades de isoprenóides que é intermediário na via de biossíntese do colesterol. Nos mamíferos a síntese de colesterol está sobre controle hormonal, sendo reguladas pelos hormônios glucagon e insulina e pode ser inibida pela concentração de colesterol intracelular. O colesterol é transportado no plasma sanguíneo como lipoproteínas (LEHNINGER, 2006).

Figura 14 – Estrutura molecular plana do Colesterol.



Fonte: Andrade (2013).

Pode-se afirmar que o colesterol é composto vital para o organismo, porque o mesmo participa de inúmeros processos biológicos, com destaque para a síntese de membranas, de alguns órgãos (glândula adrenal e gônadas), nos tecidos nervosos, desempenha papel isolante,

semelhante ao da capa de fios elétricos, além de ser utilizado como precursor para produção dos hormônios esteroides e da vitamina D (BRANDÃO et al., 2005; LEANÇA et al., 2010). Além disso, é importante relatar, que a fluidez da membrana se relaciona à presença de cadeias insaturadas dos fosfolipídios e do colesterol presentes, e danos desta camada lipídica produzem efeitos dramáticos, tendem a diminuir e/ou aumentar a fluidez da membrana (MAFRA; ABDALLA; COZZOLINO, 1999; HAKOMORI, 2004).

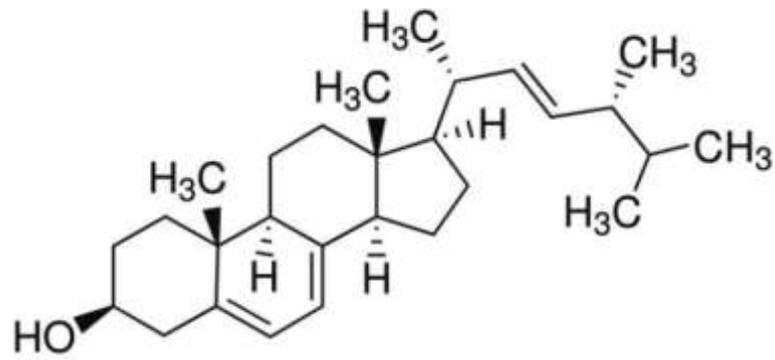
2.9.7 Ergosterol

Além do colesterol, outro esteróide presente nas células animais é o ergosterol. Este é esteroide sintetizado pelos os vegetais, fungos e parasitas, sendo relacionado com o colesterol, o ergosterol. Este utiliza a mesma via biossintética, até o passo do esqualeno. Nessa etapa as vias se modificam ligeiramente e outros esteroides são produzidos, nos vegetais, o estigmasterol e nos fungos o ergosterol (LEHNINGER, 2006).

O ergosterol (FIGURA 15) é uma molécula lipídica de fungos, derivado do colesterol. Este é específico e responsável por várias características físicas importantes para viabilidade celular, tais como estrutura, permeabilidade e alteração da fluidez das membranas, e tem um papel importante na respiração mitocondrial e fosforilação oxidativa (BOSSCHE; ENGELEN; ROCHETTE, 2003; LOGUERCIO-LEITE et al., 2006; ARGENTA, 2008; URBINA, 2009).

Danos causados pela inibição da síntese do ergosterol podem resultar em alterações na permeabilidade da membrana plasmática e inibição da proliferação de todas as fases do ciclo de vida (SANTOS & CARVALHO, 2001; THEVISSSEN et al., 2003; LOGUERCIO-LEITE et al., 2006; URBINA, 2009). Contudo sua ausência também afeta o citocromo C oxidase nas mitocôndrias e aumenta a síntese de quitina, principal componente da parede celular dos fungos, resultando em uma destruição irregular da mesma (MORETTI, 2003; ARGENTA, 2008). A atividade de várias vias metabólicas é alterada conforme os níveis de ergosterol são modificados (ARGENTA, 2008).

Figura 15 – Estrutura molecular plana do Ergosterol.



Fonte: Andrade (2013).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ORIGEM E PREPARO DO MATERIAL NATURAL

O ácido tânico, vitaminas lipossolúveis D (colicalciferol), E (alfa-tocoferol) e K (menadiona), ergosterol, colestol, todas foram obtidas através da SIGMA Chemical Co., St. Louis, E.U.A. Para os ensaios microbiológicos, todas as substâncias foram inicialmente solubilizadas em Dimetilsufóxido (DMSO) e depois diluídas em água, com exceção da vitamina K (menadiona) esta foi diluída apenas em DMSO e sendo posteriormente realizado um controle de DMSO para esta substância. A concentração de DMSO contido nas amostras não é considerada tóxica para as células, abaixo de 10%. Os inibidores de bomba de efluxo utilizados foram: *Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl-hydrazone*, *Phenylalanine Arginyl β -Naphthylamide* e Clopromazina, adquiridas através da SIGMA Chemical Co., St. Louis, E.U.A, solubilizados em água.

3.1.2 Meios de culturas

Os meios de culturas utilizados foram os seguintes: *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco laboratorises Ltda.), *Brain Heart Infusion* (BHI, difco Laboratories Ltda.), e Glicerol.

3.1.3 Micro-organismos

As cepas de *S. aureus* usadas foram: RN4220 portadora do plásmido pUL5054, que transporta o gene que codifica referente a proteína MsrA de efluxo de macrolídeo; IS-58, dotada do plasmídeo PT181 portadora do gene da proteína de efluxo de tetraciclina TetK; 1199B cepa resistente a fluroquinolonas hidrofílicas via proteína de efluxo NorA e a cepa selvagem 1199 referente a mesma (TABELA 1). As cepas foram gentilmente cedidas pela Prof. S. Gibbons (*University of London*). Todas as cepas foram inicialmente mantidas em ágar sangue para comprovar o tipo de cepa (Laboratórios Difco Ltda., Brazil), depois foram transferidas para o estoque. Sendo mantidas em dois estoques: um em *Heart Infusion Agar slants* (HIA, Difco) a 4° C e outro mantido em glicerol em freezer -80 ° C. A cepa portadora de plasmídeo foi mantida e meio de cultura sobre condições sub-inibitória de antibiótico com o objetivo do gene do plasmídeo ser expresso e não ser perdido.

Tabela 1 – Linhagens utilizadas nos ensaios de efluxo.

Linhagem	Gene	Proteína (Antibiótico ou classe)
1199B 1199(Selvagem)	<i>NorA</i> —	NorA (Norfoxacina) —
IS-58	Plasmídeo PT181(<i>Tet(K)</i>)	Tet (K)(Tetraciclina)
RN4220	Plasmídeo Pul5054(<i>MsrA</i>)	MRSA(Eritromicina)

Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

3.1.4 Origem e preparo dos antibióticos e do brometo de etídio

Os antibióticos utilizados foram específicos para as bombas de cada bactéria: Eritromicina para a bomba MrsA contido na cepa RN4220; Tetraciclina para a bomba Tet k contida na cepa IS-58; e Norfloxacin para a bomba NorA contida na cepa 1199B, com também esse antibiótico foi utilizado para a cepa selvagem. Todos os antibióticos foram inicialmente dissolvidos em DMSO a 10 mg/mL e posteriormente diluídos em água, diminuindo a concentração para 1024 µg/mL. O brometo de etídeo foi diluído em água em uma concentração de 1024 µg/mL. Tanto os antibióticos quanto o brometo de etídeo foram obtidas pela da SIGMA Chemical Co. St. Louis, E.U.A.

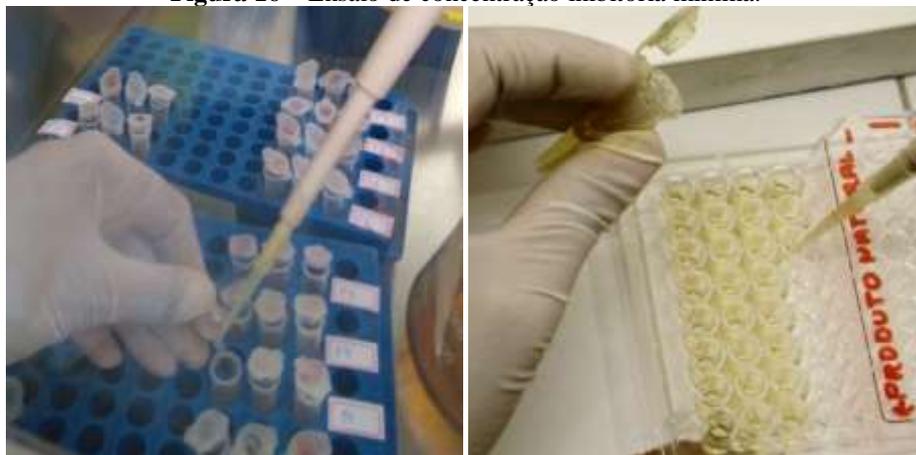
3.1.5 Preparo e padronização dos inóculos

Nos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram preparados inóculos oriundos a partir dos estoques. Desse estoque foi cultivado novamente em meio sólido *Heart Infusion Agar slants* e mantido a 37 °C. A partir desse meio sólido foi feito inóculo utilizando tubos de ensaio contendo solução salina estéril, e esse inóculo teve com base a escala Mcfarland 0.5 que corresponde a 10⁵ UFC (Unidades Formadoras de Colônias). Esse método padrão de inóculo foi utilizado tanto nos ensaios de CIM das substâncias quanto na verificação de inibição de bomba de efluxo.

3.2 ENSAIOS DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Foi realizado o ensaio de concentração inibitória mínima de todas as substâncias de origem natural. Também foi realizado com o brometo de etídeo e com os antibióticos para confirmar o nível de resistência corroborando com a presença da bomba. A partir do estoque em meios sólido HIA foi feita uma repicagem em HIA e mantido em estufa bacteriológica a 37 °C por 24h. Após esse período foi utilizado inóculos em solução salina de acordo com a escala de Mcfarland 0,5 que corresponde a 10^5 UFC (Unidade Formadora de Colônia). Seguindo os ensaios, foi preparado o meio de distribuição em eppendorfs utilizado 100 μ L do inóculo em 900 μ L do meio de cultura líquido BHI. Posteriormente o conteúdo do eppendorf foi transferido para placa de microdiluição de 96 poços, em sentido horizontal. Sendo que foi utilizado 100 μ L em cada poço, perfazendo 10 poços. Após essa etapa, foi realizada a microdiluição das substâncias sendo 100 μ L nesse meio até penúltima cavidade (1:1). Na última cavidade não foi adicionada por ser o controle de crescimento. As concentrações variaram de 1024 μ g/mL a 2 μ g/mL. Após 24h foi realizada a leitura das placas por visualização de mudança de cor do meio caracterizado pela adição de 20 μ L de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido). A leitura desse experimento tem como característica, a mudança de cor do meio de azul para vermelho indicando à presença de crescimento bacteriano e a permanência em azul, a ausência de crescimento. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Figura 16 – Ensaio de concentração inibitória mínima.



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

3.3 ENSAIOS DE INIBIÇÃO DE BOMBA DE EFLUXO POR REDUÇÃO DO CIM DO BROMETO DE ETÍDEO

Para verificar o efeito de redução do CIM do brometo de etídeo, foi utilizado inóculos a partir de placas incubadas em estufa bacteriológica por 24h a 37 °C com o repique do estoque. Após esse período foi utilizado inóculos em solução salina de acordo com Mcfarland 0.5 que corresponde a 10^5 UFC (Unidades Formadoras de Colônias). Como etapa inicial, foi preparado em eppendorfs o meio de distribuição do teste e do controle. No teste foram colocados 150 μ L do inóculo, mais substância em concentração sub-inibitória (CIM/8) e completado o volume do eppendorf até o volume de 1,5 mL. Para o controle foi colocado o mesmo volume de inóculo do teste e completado o volume do eppendorf até 1,5 mL. Em seguida foram transferidos para placas de microdiluição de 96 poços, com distribuição vertical, caracterizada pela adição de 100 μ L do conteúdo do eppendorf em cada poço. Após essa etapa foi realizada a microdiluição do brometo de etídeo, sendo 100 μ L nesse meio até penúltima cavidade (1:1). A solução de brometo de etídeo utilizada neste ensaio foi à citada anteriormente. Na última cavidade não foi adicionada por ser o controle de crescimento. As concentrações variaram de 1024 μ g/mL a 0,5 μ g/mL. Após 24h foi realizado a leitura das placas por visualização de mudança de cor do meio caracterizado pela adição de 20 μ L resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido). Sendo que, a leitura tem como característica a mudança de cor do meio de azul para vermelho indicando à presença de crescimento bacteriano e a permanência em azul a ausência de crescimento. A redução do CIM do brometo de etídeo ou de antibiótico específico, em cepas portadoras de bomba de efluxo, é um indicativo de inibição de bomba de efluxo. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. Esse ensaio com brometo de etídeo foi realizado apenas para o ácido tânico.

3.4 ENSAIOS DE INIBIÇÃO DE BOMBA DE EFLUXO POR REDUÇÃO DO CIM DO ANTIBIÓTICO

Para verificar o efeito de redução do CIM do antibiótico, foi utilizado inóculos a partir de placas incubadas em estufa bacteriológica por 24h a 37 °C com o repique do estoque. Após esse período foi utilizado inóculos em solução salina de acordo com a escala de Mcfarland 0.5 que corresponde a 10^5 UFC. Como etapa inicial foi preparado em eppendorfs o meio de distribuição do teste e do controle. No teste foram colocados 150 μ L do inóculo, mais substância

em concentração sub-inibitória (CIM/8) e completado o volume do eppendorf até o volume de 1,5 mL. Para o controle foi colocado o mesmo volume de inóculo do teste e completado o volume do eppendorf até 1,5 mL. Em seguida foram transferidos para placas de microdiluição de 96 poços, com distribuição vertical, caracterizada pela adição de 100 μ L do conteúdo do eppendorf em cada poço. Após essa etapa foi realizada a microdiluição do antibiótico, sendo 100 μ L nesse meio até penúltima cavidade (1:1). Na última cavidade não foi adicionada por ser o controle de crescimento. As concentrações variaram de 1024 μ g/mL a 0,5 μ g/mL. A solução do antibiótico utilizada foi à preparada anteriormente, sendo que para cada cepa foi utilizado um antibiótico específico para uma bomba de efluxo presente. Após 24h foi realizada a leitura das placas por visualização de mudança de cor do meio caracterizado pela adição de 20 μ L de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido). Sendo que, a leitura tem como característica a mudança de cor do meio de azul para vermelho indicando à presença de crescimento bacteriano e a permanência em azul a ausência de crescimento. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. A redução do CIM do brometo de etídeo ou de antibiótico específico, em cepas portadoras de bomba de efluxo, é um indicativo de inibição de bomba de efluxo.

Figura 17 – Placas com resazurina para a leitura do ensaio de redução do CIM pela bomba de efluxo.



Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

Os resultados dos testes foram feitos em triplicate e expressados em média geométrica. Na análise estatística foi utilizada ANOVA de uma via, seguida do *post hoc* Tukey ou Bonferroni usando GraphPad Prism 5.0. Em algumas análises foi utilizado o teste T.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ARTIGO 1: EVALUATION OF THE TANNIC ACID INHIBITORY EFFECT AGAINST THE NORA EFFLUX PUMP OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*. PUBLICADO (MICROBIAL PATHOGENESIS). REVISTA B1 BIOTECNOLOGIA (FATOR DE IMPACTO = 2,0)



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

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

Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*



Saulo R. Tintino^a, Cícera D.M. Oliveira-Tintino^a, Fábila F. Campina^a, Raimundo L.P. Silva^a, Maria do S. Costa^a, Irwin R.A. Menezes^a, João T. Calixto-Júnior^a, José P. Siqueira-Junior^b, Henrique D.M. Coutinho^{a,*}, Tereza C. Leal-Balbino^c, Valdir Q. Balbino^c

^a Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Department of Biological Chemistry, CCBS, URCA, Brazil

^b Laboratory of Microorganism Genetics (LGM), Department of Molecular Biology, CCEN, UFPE, Brazil

^c Evolutionary Biology and Bioinformatics Laboratory (LABBE), Department of Genetics, CCB, UFPE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 February 2016

Received in revised form

30 March 2016

Accepted 1 April 2016

Available online 4 April 2016

Keywords:

Antibiotic resistance

Efflux pumps

Staphylococcus aureus

Tannic acid

NorA

ABSTRACT

During the early periods of antibiotic usage, bacterial infections were considered tamed. However, widespread antibiotic use has promoted the emergence of antibiotic-resistant pathogens, including multidrug resistant strains. Active efflux is a mechanism for bacterial resistance to inhibitory substances, known simply as drug efflux pumps. The bacterium *Staphylococcus aureus* is an important pathogenic bacterium responsible for an array of infections. The NorA efflux pump has been shown to be responsible for moderate fluoroquinolone resistance of *S. aureus*. The inhibition of the efflux pump was assayed using a sub-inhibitory concentration of standard efflux pump inhibitors and tannic acid (MIC/8), where its capacity to decrease the MIC of Ethidium bromide (EtBr) and antibiotics due to the possible inhibitory effect of these substances was observed. The MICs of EtBr and antibiotics were significantly reduced in the presence of tannic acid, indicating the inhibitory effect of this agent against the efflux pumps of both strains causing a three-fold reduction of the MIC when compared with the control. These results indicate the possible usage of tannic acid as an adjuvant in antibiotic therapy against multidrug resistant bacteria (MDR).

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Bacterial infections are becoming more challenging to treat as a result of the emergence of multi-drug resistant pathogenic bacteria. According to worldwide surveillance studies, multi-drug resistance (MDR) is increasingly prevalent, especially in Gram-positive pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Enterococcus* spp [1].

The discovery and use of antibiotics has been one of the major scientific achievements of the 20th century. During the early periods of antibiotic usage, bacterial infections were considered tamed and antibiotics were being used to cure potentially lethal infections. However, widespread antibiotic use has promoted the

emergence of antibiotic-resistant pathogens, including multidrug resistant strains [2,3]. The general mechanisms responsible for bacterial resistance to antimicrobials include (a) alteration of the targeted drug sites, (b) enzymes that inactivate antibiotics, (c) decreased membrane permeability, and (d) active efflux of antimicrobials [4].

Active efflux is a mechanism for bacterial resistance to inhibitory substances such as toxic compounds and antibiotics, which is mediated by integral membrane transporters, known simply as drug efflux pumps [5]. There are several main categories of active drug efflux pumps that transport drugs against their concentration gradients across the membrane Fig. 1.

The first category of pumps, known as primary active transporters, utilize the energy stored in ATP to catalyze the transport of drugs across the membrane by ATP hydrolysis [6]. The second category of pumps, known as secondary active transporters, are driven by the energy stored in ion gradients generated by respiration, to catalyze the transport of drugs across the membrane [7,8]. The third category of drug pumps, are known as the

* Corresponding author. Universidade Regional do Cariri – URCA, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS, Departamento de Química Biológica – DQB, Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM, Av. Cel. Antonio Luiz, 1161, Pimenta, Crato – CE, CEP:63305-000, Brazil.
E-mail address: hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M. Coutinho).

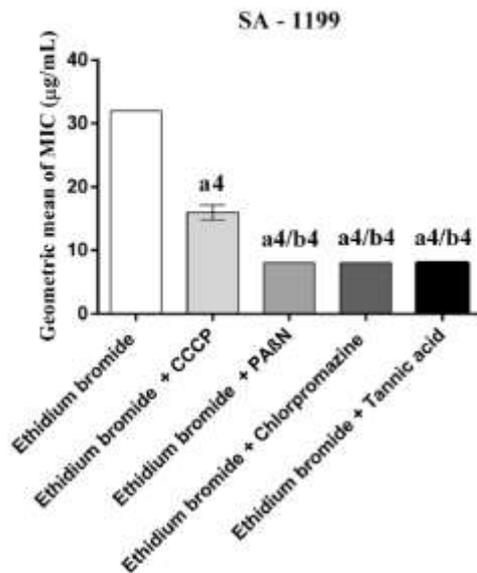


Fig. 1. MIC of ethidium bromide alone and in association with the standard inhibitors and tannic acid against the strain *S. aureus* 1199B wild. One Way ANOVA, followed by the test Bonferroni. ^{a4}*p* < 0.0001 vs Ethidium bromide; ^{b4}*p* < 0.0001 vs Ethidium bromide + CCCP.

phosphotransferase system (PTS), which catalyzes the transport of drugs with a concomitant phosphorylation of the drug, usually for cellular entry of the drug substrate [9,10].

The bacterium *Staphylococcus aureus* is an important pathogenic bacterium responsible for an array of infections ranging from superficial skin infections to serious necrotizing pneumonia, toxic shock syndrome, bacteremia, endocarditis, and surgical wound infections [11]. Additionally, *S. aureus* is a major cause of hospital-acquired infections [12,13]. The efflux pumps characterized in this organism include QacA [14,15], Smr [16] and NorA [17], all of which are major facilitator superfamilies [14–17]. QacA and Smr are examples of plasmid-encoded efflux pumps, while NorA is chromosomally encoded. QacA and NorA have been shown to efflux acriflavine, crystal violet, diamidines, ethidium bromide, and quaternary ammonium compounds [18]. The NorA protein is predicted to have 388 amino acids with a molecular mass of 42,385 Da and is presumed to be localized in the cytoplasmic membrane [19,17].

The NorA efflux pump has been shown to be responsible for the moderate fluoroquinolone resistance of *S. aureus* [17], due to a weakly expressed *norA* gene [20]. This pump is responsible for the resistance of *S. aureus* to hydrophilic fluoroquinolones only and does not extrude lipophilic substrates [21].

Therefore, this work aimed to evaluate the enhancement of the norfloxacin antibiotic activity by tannic acid via inhibition of the *S. aureus* NorA efflux protein, using the ethidium bromide model to compare this effect with a *S. aureus* wild strain Fig. 2.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

The *S. aureus* strains used were: SA-1199B, which overexpresses the *norA* gene encoding the NorA efflux protein, which extrudes hydrophilic fluoroquinolones and other drugs such as DNA-

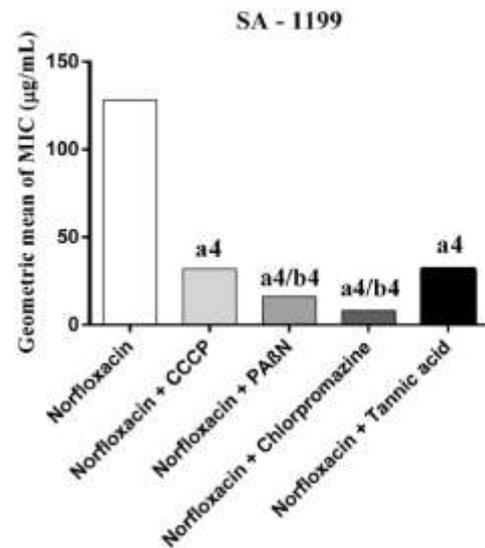


Fig. 2. MIC of Norfloxacin alone and in association with the standard inhibitors and tannic acid against the strain *S. aureus* 1199B wild. One Way ANOVA, followed by the test Bonferroni. ^{a4}*p* < 0.0001 vs Norfloxacin; ^{b4}*p* < 0.0001 vs Norfloxacin + CCCP.

intercalating dyes; and the SA-1199 (wild type) strain. The strains, kindly provided by Prof. S. Gibbons (University of London), were maintained on blood agar base (Laboratorios Difco Ltd., Brazil) slants and, prior to use, the cells were grown overnight at 37 °C in Heart Infusion Agar slants (HIA, Difco) Fig. 3.

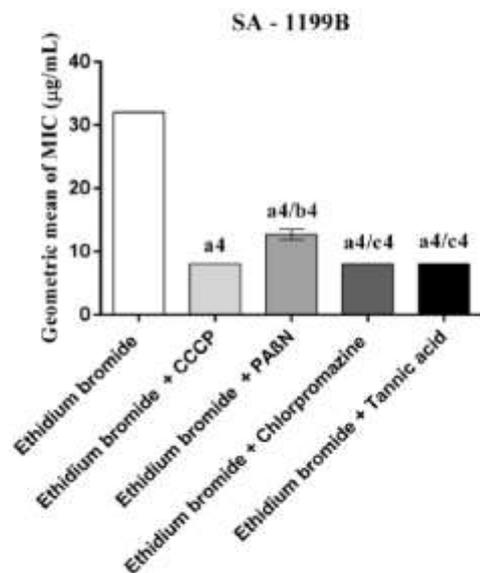


Fig. 3. MIC of ethidium bromide alone and in association with the standard inhibitors and tannic acid against the strain *S. aureus* 1199B expressing the efflux system NorA. One Way ANOVA, followed by the test Bonferroni. ^{a4}*p* < 0.0001 vs Ethidium bromide; ^{b4}*p* < 0.0001 vs Ethidium bromide + CCCP.

2.2. Drugs

The phenylalanyl arginyl- β -naphthylamide (PA β N), chlorpromazine (CPZ), carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP), tannic acid and ethidium bromide were obtained from Sigma Aldrich Co. Ltd. The antibiotic and tannic acid were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and after in sterile water (concentration of 1024 μ g/mL). Norfloxacin was the antibiotic used. PA β N, CPZ and ethidium bromide solutions were dissolved in distilled, sterile water, stored at -20 °C and kept protected from light (concentration of 1024 μ g/mL). The CCCP was dissolved in methanol/water (1:1, v/v) and stored at -20 °C (concentration of 1024 μ g/mL). Table 1.

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

The MIC of the efflux pump inhibitors, ethidium bromide and tannic acid, were determined in a microdilution assay utilizing 100 μ L of each suspended bacterial inoculum in saline solution, corresponding to 0.5 of the McFarland scale, followed by addition of 900 μ L of brain heart infusion (BHI) in eppendorfs. These were then transferred to 96-well microtiter plates and serial dilutions of each substance were performed with concentrations ranging from 0.5 to 512 μ g/mL (1:1). The plates were incubated at 37 °C for 24 h, and bacterial growth was assessed by the use of resazurin. The MIC was defined as the lowest concentration in which no growth can be observed, according to [22]. The antibacterial assays were performed in triplicates and results were expressed as an average of replicates.

2.4. Evaluation of efflux pump inhibition by MIC reduction

To observe whether tannic acid is a potential efflux pump inhibitor, a comparative study between the effects of standard efflux pump inhibitors (EPI) was used, thus assessing the capacity of both in decreasing the MIC of Ethidium bromide (EtBr) and antibiotic. Ethidium bromide (EtBr) is a substrate for many MDR pumps and the unique antibiotic substrates for each efflux pump was used Fig. 4.

The inhibition of the efflux pump was tested using a sub-inhibitory concentration of EPIs and tannic acid (MIC/8). 150 μ L of each suspended bacterial inoculum in saline solution, corresponding to 0.5 of the McFarland scale, were added to eppendorfs together with 1350 μ L of brain heart infusion (BHI) as a control. In tests, 150 μ L of each suspended bacterial inoculum in saline solution, corresponding to 0.5 of the McFarland scale, were added together with EPIs and tannic acid (MIC/8) and completed with brain heart infusion (BHI). These were then transferred to 96-well microtiter plates and 100 μ L of the antimicrobial drug and EtBr serial dilutions were performed (1:1). The plates were incubated at 37 °C for 24 h, and bacterial growth was assessed by the use of

Table 1
MICs of the Ethidium Bromide (EtBr), the tannic acid and standard inhibitors against the *S. aureus* strains (μ g/mL).

Substance/Strain	<i>S. aureus</i> SA1199B	<i>S. aureus</i> SA1199 will
MIC of CCCP	8	2
MIC do P β NA	64	64
MIC of CPZ	32	32
MIC of EtBr	32	8
MIC of tannic acid	≥ 1024	≥ 1024

CCCP – carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone; P β NA – phenylalanyl arginyl- β -naphthylamide; CPZ – chlorpromazine.

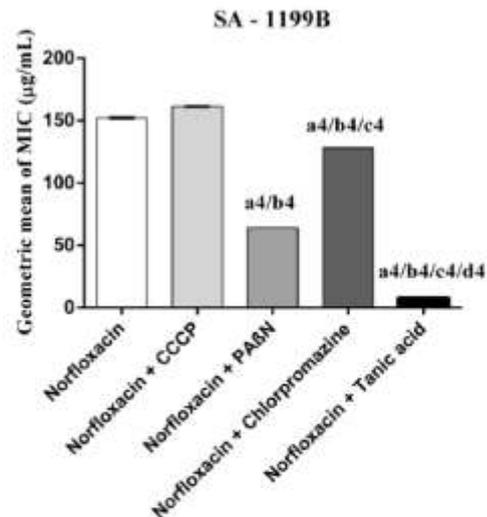


Fig. 4. MIC of Norfloxacin alone and in association with the standard inhibitors and tannic acid against the strain *S. aureus* 1199B. One Way ANOVA, followed by the test Bonferroni. ^{a4}p < 0,0001 vs Norfloxacin; ^{b4}p < 0,0001 vs Norfloxacin + CCCP; ^{c4}p < 0,0001 vs Norfloxacin + PA β N; ^{d4}p < 0,0001 vs Norfloxacin + Chlorpromazine.

resazurin. MIC was defined with the concentrations of antibiotics and EtBr ranging between 0.5 and 512 μ g/mL. The MIC of controls were assessed using the antibiotics and EtBr alone.

2.5. Statistical analysis of microbiological results

Antibacterial assays were performed in triplicates and results were expressed as average of replicates. The results of the tests are expressed as the geometric mean. Statistical hypothesis analysis was applied using a Two-Way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test using GraphPad Prism 5.0 software.

3. Results and discussion

The inhibitors and ethidium bromide alone presented antibacterial activity, conversely tannic acid did not present clinically relevant antibacterial activity with a MIC above ≥ 1024 μ g/mL according to [22].

When tannic acid was associated with norfloxacin or ethidium bromine against the wild type strain, synergistic effects were also observed. However, this strain lacks the efflux pump, and therefore this effect cannot be attributed to this mechanism. The synergic effect caused by the tannic acid in the mutant strain expressing the efflux pump is due to the inhibition of this mechanism, inducing an enhancement of the cytoplasmic concentration of ethidium bromine [23].

The same effect was observed when tannic acid was associated with the efflux pump substrate and the antibiotic norfloxacin, such that these results are concordant with the effect of other pump inhibitors. Few inhibitors were effective in the mutant strain, with tannic acid being better than the other inhibitors. This effect possibly indicates a higher specificity of this inhibitor to this type of efflux pump. A MIC reduction ≥ 3 dilutions, when combined with the inhibitor, is indicative of the bacterial resistance mechanism of the efflux pump [24]. This reduction was also observed in the association of the inhibitors and tannic acid with ethidium bromine

and with norfloxacin in the efflux pump strain.

The MIC reduction also indicates a resistance reduction [22]. There are at least three mechanisms by which *S. aureus* can develop resistance to fluoroquinolones, two of which have been investigated in some detail. The first consists of mutational alteration(s) of the *gyrA* gene, which encodes the A subunit of DNA gyrase, a topoisomerase and an established target of fluoroquinolone action [25–27]. Such mutation(s) can result in the continued function of this essential bacterial enzyme despite the presence of fluoroquinolone concentrations that are lethal to wild-type strains. The second described mechanism of fluoroquinolone resistance in *S. aureus* involves a genetic locus on the *SmaI* A fragment of the chromosome called *flqA* [28].

The third mechanism involves the efflux of hydrophilic fluoroquinolones from the cell, which generally results in a lower level of resistance than that seen in *gyrA* mutants [17,29,30]. In *S. aureus* this type of resistance is mediated by multi-drug transporters such as the NorA protein, which is located in the cytoplasmic membrane and is the product of the *norA* gene. In *S. aureus*, increased quantities of NorA, resulting from either increased transcription of *norA* or an increase in its mRNA stability, confer resistance not only to hydrophilic fluoroquinolones but also to several other structurally diverse substances. These include a number of lipophilic and monocationic compounds such as cetrizime, ethidium bromide, benzalkonium chloride, acriflavine, and others [23].

Several EPIs were discovered as carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl-hydrazone (CCCP), phenylalanyl arginyl- β -naphthylamide (PA β N) and chlorpromazine. CCCP dissipates the proton motive force by modifying the trans-membrane electrochemical potential. Meanwhile, Peptidomimetics (PA β N) and chlorpromazine are competitive inhibitors of the efflux pumps and act by binding to the same pocket or at a site close to the antibiotic substrate binding site [31,32]. However, the problem with using these synthetic inhibitors is the high toxicity observed [32].

Several natural compounds such as the plant alkaloid reserpine, kaempferol rhamnoside, and capsaicin inhibit NorA function [33,34]. The mechanism of inhibition for reserpine, kaempferol and rhamnoside involves direct binding and competitive inhibition of the efflux pump during drug/H⁺ antiport [35], whereas the mechanism for capsaicin-mediated inhibition is unclear.

The antimicrobial mechanisms of tannins can be summarized as follows. (i) The astringent property of tannins may induce complexation with enzymes or substrates. Many microbial enzymes in raw culture filtrates or in purified forms are inhibited when mixed with tannins. (ii) The toxicity of tannins may be related to its action on the membranes of microorganisms. (iii) Complexation of metal ions by tannins may account for tannin toxicity [36].

All these factors possibly induce the NorA efflux pump inhibition and may also induce inhibition of other resistance mechanisms. The inhibition of efflux pumps by iron chelation is also a mechanism of action because iron is required for pump activity. Nocardamine (an iron chelator) has been shown to inhibit TetB and TetK pumps in *S. aureus* [37]. The capacity to make complexes with proteins can be the cause of the inhibition of NorA, this being one of the main characteristic of tannins. In addition, this pump is a transmembrane protein and is susceptible to membrane permeability alterations. The interaction of the tannic acid with the cell membrane can affect its permeability, enhancing the influx of ethidium bromide and norfloxacin, thus being a possible cause of the synergistic effect observed in the *S. aureus* wild strain.

4. Conclusion

The inhibition of bacterial antibiotic resistance mechanisms is a

strategy to control the multi-drug resistant (MDR) strains with high virulence. Besides the high variety of resistance mechanisms, the discovery of substances with the capacity to inhibit them is very important. Due to this fact, new efflux pump inhibitors are promising compounds. Our results indicated that tannic acid has the same properties of the standard efflux pumps inhibitors, thus being a possible adjuvant on new formulations in association with antibiotics, mainly against bacterial infections caused by MDR strains.

References

- [1] A.W. Karchmer, Nosocomial bloodstream infections: organisms, risk factors, and implications, *Clin. Infect. Dis.* 31 (2000) 39–143.
- [2] H.C. Neu, The crisis in antibiotic resistance, *Science* 257 (1992) 1064–1071.
- [3] B.H. Normark, S. Normark, Evolution and spread of antibiotic resistance, *J. Intern. Med.* 252 (2002) 91–106.
- [4] S. Kumar, M.M. Mukherjee, M.F. Varela, Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily, *Inter. J. Bac.* 2013 (2013) (2013) 1–15.
- [5] S.B. Levy, Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance, *Antimicrob. Ag. Chemother.* 36 (1992) 695–703.
- [6] C.F. Higgins, Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters, *Nature* 446 (2007) 749–757.
- [7] P.J. Henderson, Studies of translocation catalysis, *BioSci. Rep.* 11 (1991) 453–477.
- [8] B. Poulmar, W.N. Konings, Secondary solute transport in bacteria, *Biochim. Biophys. Acta* 1183 (1993) 5–39.
- [9] T.R. Parr Jr., M.H. Saier Jr., The bacterial phosphotransferase system as a potential vehicle for the energy of novel antibiotics, *Research Microbiol* 143 (1992) 443–447.
- [10] S. Kumar, K.P. Smith, J.L. Floyd, M.F. Varela, Cloning and molecular analysis of a rhamnitol operon of phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase (PTS) type from *Vibrio cholerae* O395, *Archives Microbiol.* 193 (2011) 201–208.
- [11] M.T. Holden, E.J. Feil, J.A. Lindsay, S.J. Peacock, N.P. Day, M.C. Enright, T.J. Foster, et al., Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 9786–9793.
- [12] C. Carbon, MRSA and MRSE: is there an answer? *Clin. Microbiol. Infect.* 6 (2000) 17–22.
- [13] A. Marchese, G.C. Schito, E.A. Debbia, Evolution of antibiotic resistance in gram-positive pathogens, *J. Chemother.* 12 (2000) 459–462.
- [14] I.T. Paulsen, R.A. Skurray, R. Tam, M.H. Saier, R.J. Turner, J.H. Weisner, et al., The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs, *Mol. Microbiol.* 19 (1996) 1167–1175.
- [15] J.M. Tennent, B.R. Lyon, M. Midgley, I.G. Jones, A.S. Purewal, R.A. Skurray, Physical and biochemical characterization of the *qacA* gene encoding antibiotic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*, *J. Gen. Microbiol.* 135 (1989) 1–10.
- [16] I. Grinias, G. Dreganiene, E.B. Goldberg, C.H. Liao, S.J. Projan, A staphylococcal multidrug resistance gene product is a member of a new protein family, *Plasmid* 27 (1992) 119–129.
- [17] H. Yoshida, M. Bogaki, S. Nakamura, K. Ubukata, M. Konno, Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones, *J. Bacteriol.* 172 (1990) 6942–6949.
- [18] T.G. Littlejohn, I.T. Paulsen, M.T. Gillespie, J.M. Tennent, M. Midgley, I.G. Jones, et al., Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*, *FEMS Microbiol. Lett.* 74 (1992) 259–265.
- [19] I.T. Paulsen, M.H. Brown, R.A. Skurray, Proton-dependent multidrug efflux systems, *Microbiol* 60 (1996) 575–608.
- [20] K. Poole, Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-positive bacteria and the mycobacteria, *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (2000) 2595–2599.
- [21] E.Y. Ng, M. Trucksis, D.C. Hooper, Quinolone resistance mediated by *norA*: physiological characterization and relationship to *flqB*, a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus aureus* chromosome, *Antimicrob. Agents Chemother.* 38 (1994) 1345–1355.
- [22] NCCLS document M100–S9, CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards of Antimicrobial Disk Susceptibility Test: Ninth Informational Supplement, NIH, Wayne, PA, 2006, pp. 120–126.
- [23] G.W. Kaatz, S.M. Seo, Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 (1995) 2650–2655.
- [24] J. Davies, G.D. Wright, Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics, *Trends Microbiol.* 5 (6) (1997) 234–240.
- [25] J.J. Goswitz, K.E. Willard, C.E. Fasching, Peterson LR, Detection of *gyrA* mutations associated with ciprofloxacin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: analysis by polymerase chain reaction and automated direct DNA sequencing, *Antimicrob. Agents Chemother.* 36 (1992) 1166–1169.
- [26] D.C. Hooper, J.S. Wolfson, Mode of action of the new quinolones: new data, *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 10 (1991) 223–231.
- [27] S. Sreedharan, M. Oram, B. Jensen, L.R. Peterson, L.M. Fisher, DNA gyrase *gyrA*

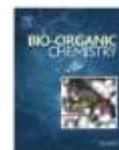
- mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*: close similarity with quinolone resistance mutations in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 172 (1990) 7260–7262.
- [28] M. Trucksis, J.S. Wolfson, D.C. Hooper, A novel locus conferring fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol.* 173 (1991) 5854–5860.
- [29] G.W. Kaatz, S.M. Seo, C.A. Ruble, Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*, *J. Infect. Dis.* 163 (1990) 1080–1086.
- [30] G.W. Kaatz, S.M. Seo, C.A. Ruble, Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993 (37) (1993) 1085–1094.
- [31] J.M. Pages, M. Masi, J. Barbe, Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria, *Trends Mol. Med.* 11 (2005) 382–389.
- [32] M. Mallea, J. Chevalier, A. Eyraud, J.M. Pages, Inhibitors of antibiotic efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293 (2002) 1370–1373.
- [33] N.P. Kalia, P. Mahajan, R. Mehra, R. Mehra, A. Nargotra, J.P. Sharma, S. Soud, I.A. Khan, Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*, *J. Antimicrob. Chemother.* 67 (2012) 2401–2408.
- [34] J.G. Holler, H.C. Skovsted, P. Molgaard, C.E. Olsen, S.B. Christensen, Chalcone inhibitors of the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus* whole cells and enriched everted membrane vesicles, *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 4514–4521.
- [35] J.G. Holler, S.B. Christensen, H.C. Skovsted, et al., Novel inhibitory activity of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump by a kaempferol rhamnoside isolated from *Persea lingue* Nees, *J. Antimicrob. Chemother.* 67 (2012) 1138–1144.
- [36] K.T. Chung, T.Y. Wong, C.I. Wei, V.W. Huang, V. Lin, Tannins and human health: a review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38 (1998) 421–464.
- [37] D.M. Rothstein, M. McGlynn, V. Berman, J. McGahren, J. Zaccardi, N. Gekkeriak, et al., Detection of tetracyclines and efflux pump inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.* 37 (1993) 1624–1629.

4.2 ARTIGO 2: TANNIC ACID AFFECTING THE RESISTANCE PHENOTYPE OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTANT TO TETRACYCLINE AND ERYTHROMYCIN BY INHIBITION OF EFFLUX PUMPS. PUBLICADO (BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY) A2 BIOTECNOLOGIA (FATOR DE IMPACTO = 3,2)



Contents lists available at ScienceDirect

Biorganic Chemistry

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

Tannic acid affects the phenotype of *Staphylococcus aureus* resistant to tetracycline and erythromycin by inhibition of efflux pumps



Saulo R. Tintino^a, Cícera D. Morais-Tintino^a, Fâbia F. Campina^a, Maria do S. Costa^a, Irwin R.A. Menezes^a, Yedda Maria L.S. de Matos^a, João T. Calixto-Júnior^d, Pedro S. Pereira^a, José P. Siqueira-Junior^{b,c}, Teresa C. Leal-Balbino^a, Henrique D.M. Coutinho^{a,*}, Valdir Q. Balbino^c

^aLaboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Department of Biological Chemistry/CCRS/URCA, Brazil

^bLaboratory of Microorganism Genetics (LGM), Department of Molecular Biology/CEN/UFPR, Brazil

^cEvolutionary Biology and Bioinformatics Laboratory (LABRE), Department of Genetics/CCB/UFPE, Brazil

^dJunzeiro do Norte College (JN), Brazil

^eAggeu Magalhães Research Center, CPqAM/Fiocruz, Department of Microbiology, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 April 2017

Revised 7 August 2017

Accepted 11 August 2017

Available online 12 August 2017

Keywords:

Antibiotic resistance

Efflux pumps

Staphylococcus aureus

Tannic acid

ABSTRACT

The widespread use of antibiotics created selective pressure for the emergence of strains that would persist despite antibiotic toxicity. The bacterial resistance mechanisms are several, with efflux pumps being one of the main ones. These pumps are membrane proteins with the function of removing antibiotics from the cell cytoplasm. Due to this importance, the aim of this work was to evaluate the inhibitory effect of tannic acid against efflux pumps expressed by the *Staphylococcus aureus* RN4220 and IS-58 strains. The efflux pump inhibition was assayed using a sub-inhibitory concentration of efflux pump standard inhibitors and tannic acid (MIC/8), observing their capacity to decrease the MIC of Ethidium bromide (EtBr) and antibiotics due to the possible inhibitory effect of these substances. The MICs of EtBr and antibiotics were significantly different in the presence of tannic acid, indicating the inhibitory effect of this product against efflux pumps of both strains. These results indicate the possible usage of tannic acid as an inhibitor and an adjuvant in the antibiotic therapy against multidrug resistant bacteria (MDR).

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In the past century, the discovery of antibiotics has been one of the most influential and impressive achievements in science, since during the early period of antibiotic usage, bacterial infections were considered tamed. Infected cuts and various bacterial diseases, such as syphilis and cholera, were considered on their way to eradication [1]. However, the widespread use of antibiotics created selective pressure for the emergence of strains that would persist despite antibiotic toxicity, thereby promoting the emergence of antibiotic-resistant pathogens, including multidrug resistant strains [2,3]. Antibiotic resistance mechanisms include the alteration or modification of the target site, degradation of the antibiotic molecule, and reduction of effective intracellular antibiotic concentration via changes in membrane permeability and/or

membrane-based efflux pumps. These mechanisms are all specific for a single drug or a single class of drugs [4–7].

Multidrug efflux pumps are integral membrane proteins that utilize cellular energy to actively extrude antibiotics or biocides out of the cell [8,9]. The bacterium *Staphylococcus aureus* is an important pathogenic bacterium responsible for an array of infections ranging from superficial skin infections to serious necrotizing pneumonia, toxic shock syndrome, bacteremia, endocarditis, and surgical wound infections [10].

Efflux pump inhibitors (EPIs), decrease the intrinsic resistance of bacteria to antibiotics, and reverse acquired resistance even in highly resistant strains with multiple target mutations [4]. Over the past decades, many EPIs have been identified. Unfortunately, their clinical application is difficult due to the toxicity, stability, and bioavailability of these molecules [11]. Current methods for the demonstration of an efflux system from a clinical isolate usually involve the assessment of ethidium bromide (EB), a common substrate of bacterial EP [12].

The term tannin is ordinarily used as a synonym for tannic acid. Tannic acid has numerous industrial, pharmacological and food additive applications. Tannic acid is reported to be toxic to animals

* Corresponding author at: Universidade Regional do Cariri – URCA, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS, Departamento de Química Biológica – DQB, Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM, Av. Cel. Antonio Luiz, 1161, Pimenta, Crato, CE CEP:63105-000, Brazil.

E-mail address: hdmcoatinho@gmail.com (H.D.M. Coutinho).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.08.004>

0045-2068/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

if injected into the blood stream or consumed in large amounts. It is also a potent antioxidant and has exhibited anti-mutagenic, anti-carcinogenic and antibacterial activity [13,14].

Due to this information, the aim of this work was to evaluate the inhibitory potential of tannic acid against *Staphylococcus aureus* efflux pumps, a known Multidrug Resistant Bacteria (MDR), comparing this effect with standard inhibitors and using as the substrate Ethidium Bromide (EtBr).

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

The *S. aureus* strains used were: RN4220 harboring plasmid pUL5054, which carries the gene encoding the MsrA macrolide efflux protein; and IS-58, which possesses the TetK tetracycline efflux protein. The strains, kindly provided by Prof. S. Gibbons (University of London), were maintained on blood agar base (Laboratorios Difco Ltda., Brazil) slants and, prior to use, the cells were grown overnight at 37 °C in Heart Infusion Agar slants (HIA, Difco).

2.2. Drugs

The erythromycin, tetracycline, phenylalanyl arginyl- β -naphthylamide (PA β N), chlorpromazine (CPZ), carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP), tannic acid and ethidium bromide were obtained from Sigma Aldrich Co. Ltd. The antibiotics and tannic acid were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and afterwards in sterile water (concentration of 1024 μ g/mL). Erythromycin and tetracycline were the used antibiotics. Solutions of PA β N, CPZ and ethidium bromide were dissolved in distilled, sterile water, stored at –20 °C and kept protected from light (concentration of 1024 μ g/mL). The CCCP was dissolved in methanol/water (1:1, v/v) and stored at –20 °C (concentration of 1024 μ g/mL).

2.3. Antibacterial activity test by minimal inhibitory concentration (MIC)

The MIC of efflux pump inhibitors, ethidium bromide and tannic acid was determined in a microdilution assay utilizing an inoculum of 100 μ L of each strain suspended in saline solution equivalent to 0.5 of the McFarland scale, which was added to brain heart infusion (BHI) in eppendorfs. After, these were transferred to 96-well microtiter plates and serial dilutions of each substance were performed with concentrations ranging from 0.5 to 512 μ g/mL (1:1). The plates were incubated at 37 °C for 24 h, and bacterial growth was assessed by the use of Resazurin. The MIC was defined as the lowest concentration in which no growth can be observed, according to Ref. [15]. Antibacterial assays were performed in triplicate and results were expressed as average of replicates.

2.4. Evaluation of efflux pump inhibition

To observe whether tannic acid would alter the inhibition of efflux pumps, a comparative study between the effect of standard efflux pump inhibitors, in their capacity to decrease the MIC of Ethidium bromide (EtBr) and antibiotics, with the possible tannic acid efflux pump inhibitory effect, across its capacity to decrease the MIC, was used. Ethidium bromide (EtBr) is a substrate for many MDR pumps and antibiotic substrates unique to each efflux pump were used.

Efflux pump inhibition was tested using a sub-inhibitory concentration of standard efflux pump inhibitors and tannic acid (MIC/8). A 100 μ L sample of a solution containing inoculum, was

suspended in saline solution equivalent to 0.5 of the McFarland scale, and was added to brain heart infusion (BHI) in eppendorfs. Afterwards, these were transferred to 96-well microtiter plates and 100 μ L of antimicrobial drug and EtBr serial dilutions were performed (1:1). The plates were incubated at 37 °C for 24 h, and bacterial growth was assessed by the use of Resazurin. The MIC was defined with antibiotic and EtBr concentrations ranging between 0.5 and 512 μ g/mL. Controls were performed using the MIC of antibiotics and EtBr alone. Antibacterial assays were performed in triplicate and results were expressed as an average of replicates.

2.5. Statistical analysis of microbiological results

The results of the tests were performed in triplicate and expressed as the geometric mean. For statistical analysis a two-way ANOVA was applied followed by Bonferroni's post hoc test using the GraphPad Prism 5.0 software.

3. Results and discussion

In Table 1, the MICs of EtBr, standard inhibitors and tannic acid can be observed. All substances demonstrated a clinically relevant MIC, ranging between 1 and 512 μ g/mL. When the antibiotics were assayed in association with the standard inhibitors at sub-inhibitory concentrations (MIC/8), all of them reduced the MIC of the antibiotics and EtBr (Figs. 1–4), indicating an inhibition of the mechanism of resistance to the antibiotic (the efflux pumps). The same effect was observed when the antibiotics were associated with tannic acid.

The usage of EtBr as a substrate for the efflux pumps is well described in the literature and as demonstrated in this work, tannic acid had the same behavior as standard inhibitors, indicating a similar inhibitory mechanism among them against efflux pumps in the assayed strains. The efflux pumps can be considered as potentially effective antibacterial targets and the identification and development of safe and effective bacterial EPIs is needed [16,17]. Such molecules are expected to: decrease the intrinsic resistance of bacteria to antibiotics, reverse acquired resistance even in highly resistant strains with multiple target mutations, and reduce the frequency of emergence of resistant mutant strains [18].

The mechanisms involved in the inhibition of MDR efflux systems are not clearly understood but it has been proposed that the inhibitor binds directly to the pump [19] and therefore blocks it, either in a competitive or a non-competitive manner with the substrates. Inhibitors can also cause a depletion of energy, either by inhibiting ATP-binding or by disturbing the proton gradient.

Several studies indicate the effect of synthetic and natural products against bacterial efflux pumps by different mechanisms [20]. In the case of tannic acid or other tannins, there are no studies indicating any inhibitory effect against the IS-58 (TetK) and RN4220

Table 1
MICs of the Ethidium Bromide (EtBr), the tannic acid and standard inhibitors against the *S. aureus* strains (μ g/mL).

Substance/strain	<i>S. aureus</i> RN4220	<i>S. aureus</i> IS-58
MIC of CCCP	1	2
MIC of PjNA	64	64
MIC of CPZ	64	512
MIC of EtBr	32	32
MIC of tannic acid	512	512

CCCP – carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone; PjNA – phenylalanyl arginyl- β -naphthylamide; CPZ – chlorpromazine.

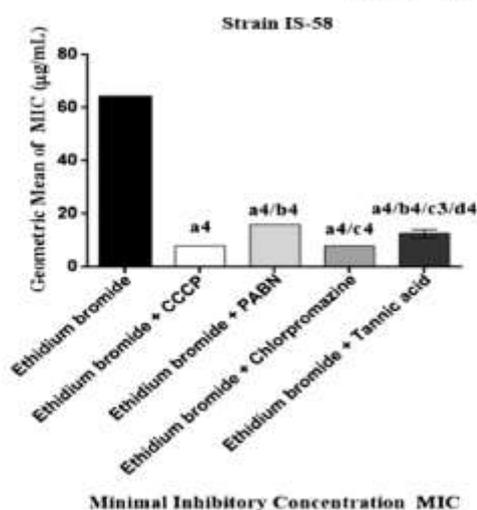


Fig. 1. MIC of ethidium bromide alone and in association with the standard inhibitors and tannic acid against the strain *S. aureus* IS-58, expressing the efflux system TetK. One Way ANOVA, followed by the test Tukey. ^ap < 0.0001 vs Ethidium bromide; ^bp < 0.0001 vs Ethidium bromide + CCCP; ^cp < 0.001 vs Ethidium bromide + PABN; ^dp < 0.0001 vs Ethidium bromide + Chlorpromazine.

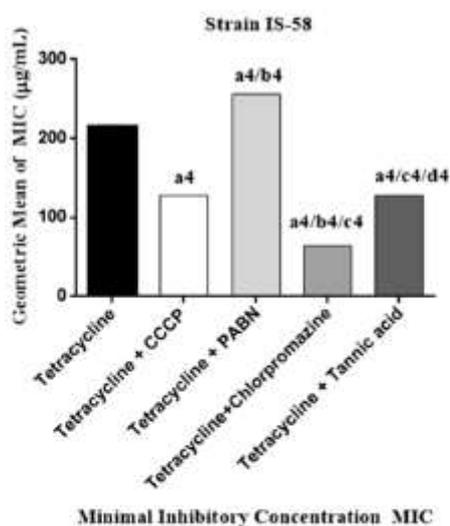


Fig. 2. MIC of tetracycline alone and in association with the standard inhibitors and tannic acid against the strain *S. aureus* IS-58, expressing the efflux system TetK. One Way ANOVA, followed by the test Tukey. ^ap < 0.0001 vs Tetracycline; ^bp < 0.0001 vs Tetracycline + CCCP; ^cp < 0.0001 vs Tetracycline + PABN; ^dp < 0.0001 vs Tetracycline + Chlorpromazine.

(MsrA) pumps in *S. aureus*, this article being the first to report on this activity. However, there are many studies demonstrating the effect of natural products from plants rich in tannins against these strains and these efflux mechanisms [21].

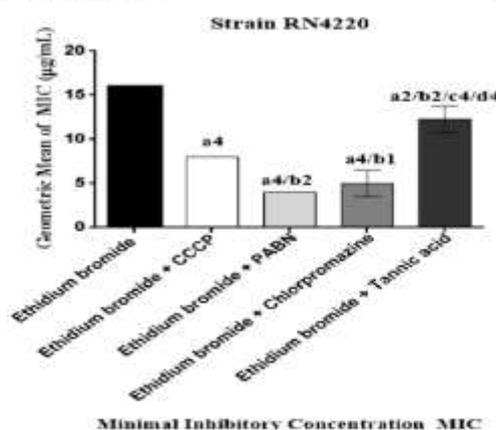


Fig. 3. MIC of ethidium bromide alone and in association with the standard inhibitors and tannic acid against the strain *S. aureus* RN4220, expressing the efflux system MsrA. One Way ANOVA, followed by the test Tukey. ^ap < 0.0001 vs Tetracycline; ^bp < 0.001 vs Tetracycline; ^cp < 0.05 vs Ethidium bromide + CCCP; ^dp < 0.01 vs Ethidium bromide + CCCP; ^ep < 0.0001 vs Ethidium bromide + PABN; ^fp < 0.0001 vs Ethidium bromide + Chlorpromazine.

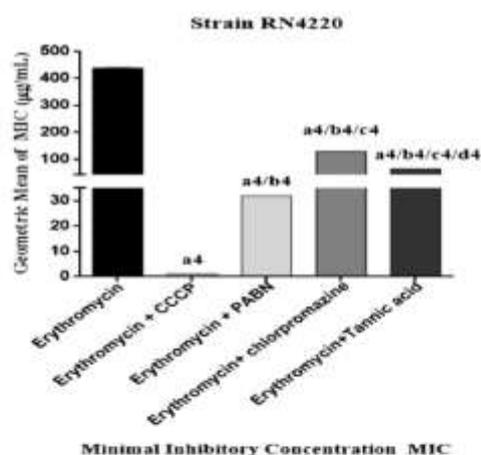


Fig. 4. MIC of erythromycin alone and in association with the standard inhibitors and tannic acid against the strain *S. aureus* RN4220, expressing the efflux system MsrA. One Way ANOVA, followed by the test Tukey. ^ap < 0.0001 vs Erythromycin; ^bp < 0.0001 vs Ethidium bromide + CCCP; ^cp < 0.0001 vs Ethidium bromide + PABN; ^dp < 0.0001 vs Ethidium bromide + Chlorpromazine.

Some authors propose that the antimicrobial effect of tannins could be related with their ability to form complexes with metal ions and/or to precipitate macromolecules in the membrane, such as proteins [22]. Because of this, tannins cause a loss of membrane integrity of target organisms and alterations in the structure and function of membrane-embedded proteins [23]. Therefore, the effects observed in this study may be related to the interaction between tannic acid and the structure of membrane proteins involved in the efflux systems of the strains IS-58 (TetK) and RN4220 (MsrA). Another study demonstrated that iron chelating substances can act as efflux pump inhibitors of the strain IS-58

(TetK) [24]. The TetK pump is a proton motive force (pmf) dependent pump, and the electron transport chain which contains iron as a cofactor is important for maintaining the pmf [24]. Tannic acid and other tannins are known for their iron-chelating properties. Therefore, it is possible that the inhibitory effect demonstrated by tannic acid may be related with its iron-chelating properties [25].

4. Conclusion

The inhibition of bacterial antibiotic mechanisms of resistance is the main strategy to the control of MDR strains with high virulence. Besides the high variety of resistance mechanisms, the discovery of substances with the capacity to inhibit them is very important. Due to this fact, new efflux pump inhibitors are promising compounds. Tannic acid presented bacterial activity against both strains, however lower compared to the inhibitors used in the control. With regard to its efflux pump inhibitory effect, tannic acid was able to reduce efflux by reducing the MIC of both the antibiotic and ethidium bromide, and similar action was obtained with standard inhibitors found on the market.

Conflict of interest

The author have none conflict of interest to disclose.

Funding

No funding.

Ethical approval

No required.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.08.004>.

References

- [1] A. Kumar, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1486–1513.
- [2] H.C. Neu, *Science* 257 (1992) 1064–1073.
- [3] B.H. Normark, S. Normark, *J. Intern. Med.* 252 (2002) 91–106.
- [4] O. Lomovskaya, H.I. Zgurskaya, et al., Bacterial multidrug transporters: molecular and clinical aspects. in: *Transporters as Drug Carriers*, G.F. Ecker, P. Chiba, (Eds.), *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH, 2009.
- [5] H. Nikaïdo, *Microbiol. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67 (2003) 593–656.
- [6] L.J. Piddock, *Nat. Rev. Microbiol.* 4 (2006) 629–636.
- [7] K. Poole, *Ann. Intern. Med.* 39 (2007) 162–176.
- [8] T.G. Littlejohn, I.T. Paulsen, et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 74 (1992) 259–265.
- [9] E. Héry, G. Sundheim, et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 163 (1998) 49–56.
- [10] M.T. Holden, E.J. Feil, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 9786–9789.
- [11] O. Lomovskaya, A. Lee, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (1999) 1340–1346.
- [12] M. Martins, I. Couto, et al., *Antibiotic Resistance Protocols*, Humana Press, 2010.
- [13] S.R. Perumal, P. Gopalakrishnakone, *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 7 (2010) 283–294.
- [14] N. Khan, S.M. Hadi, *Mutagenesis* 13 (1998) 271–274.
- [15] H. Akiyama, K. Fujii, et al., *J. Antimicrob. Chemother.* 48 (2001) 487–491.
- [16] CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards of Antimicrobial Disk Susceptibility Test: Ninth Informational Supplement, NCCLS document M100-S9. NIH, 2006.
- [17] X.Z. Li, H. Nikaïdo, *Drugs* 64 (2004) 159–204.
- [18] T.E. Renau, R.C. Lemaire, *Drug Fut* 26 (2001) 1171–1178.
- [19] M. Ahmed, C.M. Borsch, et al., *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 11086–11089.
- [20] B. Marguez, *Biochimie* 87 (2005) 1137–1147.
- [21] S.M.S.D. Oliveira, V.S. Falcão-Silva, et al., *Rev. Bras. Farmacogn.* 21 (2011) 190–193.
- [22] D.E. Payne, N.R. Martin, et al., *Infect. Immun.* 81 (2013) 496–504.
- [23] K.T. Chung, Z. Lu, et al., *Food Chem. Toxicol.* 36 (1998) 1053–1060.
- [24] D.M. Rothstein, M. McGlynn, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 37 (1993) 1624–1629.
- [25] R.G. Andrade Jr, J.S. Ginani, et al., *Biochimie* 88 (2006) 1287–1296.

4.3 ARTIGO 3: ACTION OF CHOLECALCIFEROL AND ALPHA-TOCOPHEROL ON *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EFFLUX PUMPS. PUBLICADO (JOURNAL EXPERIMENTAL AND CLINICAL SCIENCES). REVISTA B2 BIOTECNOLOGIA (FATOR DE IMPACTO = 1,4)

Original article:

**ACTION OF CHOLECALCIFEROL AND ALPHA-TOCOPHEROL ON
STAPHYLOCOCCUS AUREUS EFFLUX PUMPS**

Saulo R. Tintino¹, Cicera D. Morais-Tintino¹, Fábila F. Campina¹, Raimundo L. Pereira¹,
 Maria do S. Costa¹, Maria Flaviana B.M. Braga¹, Paulo W. Limaverde¹,
 Jacqueline C. Andrade¹, José P. Siqueira-Junior², Henrique D.M. Coutinho^{1*}, Valdir Q.
 Balbino³, Tereza C. Leal-Balbino⁴, Jaime Ribeiro-Filho⁵, Lucindo J. Quintans-Júnior⁶

¹ Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Department of Biological Chemistry/CCBS/URCA, Brazil

² Laboratory of Microorganism Genetics (LGM), Department of Molecular Biology/CCEN/ UFPB, Brazil

³ Laboratory of Bioinformatics and Evolutionary Biology (LABBE), Department of Genetics/ CCB/UFPE, Brazil

⁴ Aggeu Magalhães Research Center, CPqAM/Fiocruz, Department of Microbiology, Brazil

⁵ Leão Sampaio University Center, Brazil

⁶ Department of Physiology/UFS, Brazil

* Corresponding author: Henrique Douglas Melo Coutinho, Universidade Regional do Cariri - URCA, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS, Departamento de Química Biológica – DQB, Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM, Av. Cel. Antonio Luiz, 1161, Pimenta, Crato – CE, Brasil. CEP:63105-000. Phone: +55(88)31021212; Fax: +55(88)31021291; e-mail: hdmcoutinho@gmail.com

<http://dx.doi.org/10.17179/excli2016-277>

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ABSTRACT

Alpha-tocopherol is one of the most abundant and biologically active isoforms of vitamin E. This compound is a potent antioxidant and one of the most studied isoforms of vitamin E. Vitamin D3 (cholecalciferol) is an important nutrient for calcium homeostasis and bone health, that has also been recognized as a potent modulator of the immune response. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is the most important causative agent of both nosocomial and community-acquired infections. The aim of this study was to evaluate the inhibitory effect of alpha-tocopherol and cholecalciferol on both *S. aureus* and multidrug resistant *S. aureus* efflux pumps. The RN4220 strain has the plasmid pUL5054 that is the carrier of gene that encodes the macrolide resistance protein (an efflux pump) MsrA; the IS-58 strain possesses the TetK tetracycline efflux protein in its genome and the 1199B strain resists to hydrophilic fluoroquinolones via a NorA-mediated mechanism. The antibacterial activity was evaluated by determining the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and a possible inhibition of efflux pumps was associated to a reduction of the MIC. In this work we observed that in the presence of the treatments there was a decrease in the MIC for the RN4220 and IS-58 strains, suggesting that the substances presented an inhibitory effect on the efflux pumps of these strains. Significant efforts have been done to identify efflux pump inhibitors (EPIs) from natural sources and, therefore, the antibacterial properties of cholecalciferol and alpha-tocopherol might be attributed to a direct effect on the bacterial cell depending on their amphipathic structure.

Keywords: alpha-tocopherol, cholecalciferol, efflux pumps, *Staphylococcus aureus*

INTRODUCTION

Alpha-tocopherol is one of the most abundant and biologically active isoforms of vitamin E. This compound is a potent antioxidant and one of most studied isoforms of vitamin E (Márquez et al., 2002; Catania et al., 2009). Vitamin E is a liposoluble substance that is able to slow aging and protect organisms from non-transmissible chronic diseases, such as Parkinson's, Alzheimer's, infectious and rheumatic states, cancer and cardiovascular diseases (Catania et al., 2009; Batista et al., 2007; Berg, 2010). Recent findings demonstrated that vitamin E is able to inhibit the growth of malignant cells (Sampaio and Almeida, 2009) and modulate cell signaling and gene transcription (Batista et al., 2007). Vitamin E (Alpha-tocopherol) is naturally present in many products of both plant and animal origin, such as: vegetable oils, wheat germ, oily seeds, dark-red vegetables, egg yolk and in the liver.

Vitamin D3, or cholecalciferol, and vitamin D2, or ergocalciferol, are two different forms of vitamin D obtained by humans. Ergocalciferol is produced by many plants, yeasts and fungi when they are exposed to UVB radiation and cholecalciferol is synthesized in the skin by exposure to UVB radiation (Bikle, 2009). Vitamin D has been recognized as a potent modulator of the immune response and as an important nutrient for calcium homeostasis (Holick, 2004; Heaney, 2005; Miller and Gallo, 2010). The main circulating form of this vitamin in the organism is the 25-hydroxyvitamin D (25[OH]D) (calcidiol), which requires activation by the renal 1 α -hydroxylase to form the metabolically active 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25[OH]2D) (calcitriol) (DeLuca, 2004).

Liposoluble compounds are known as modifiers of the bacterial cell membrane permeability (Pretto et al., 2004; Nicolson et al., 1999). Therefore, alpha-tocopherol and cholecalciferol due to their liposolubility might increase the permeability of the bacterial cell membrane to various

substances, including antibiotics (Andrade et al., 2014).

Beyond the intrinsic resistance properties to certain antibiotics, bacteria can also acquire resistance to antibiotics via horizontal gene transfer and mutations in chromosomal genes. The intrinsic resistance of a bacterial species to a particular antibiotic is its ability to resist to the action of this antibiotic as a result of inherent structural or functional characteristics, resulting on antibiotic inactivation (Blair et al., 2015). Accordingly, there has been increasing concern about bacterial resistance to antibiotics, specially because of the availability and inappropriate use of these drugs (Neuhauser et al., 2003; Sahn et al., 2001). In fact, numerous bacterial strains, especially the methicillin-resistant variety, rapidly became resistant to antibacterial agents after the introduction of antibiotics for treatment of serious infections caused by *S. aureus* (Harnett et al., 1991; Mesak and Davies, 2009).

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is the most important causative agent of both community-acquired and nosocomial bacterial infections. *S. aureus* cause these infections through various virulence factors (Costa et al., 2011; Havaei et al., 2010). MRSA strains present resistance to many antibacterial agents, limiting the treatment of many patients infected with these bacteria (Kurlenda and Grinholc, 2012). There are three different mechanisms of antibiotic resistance to *S. aureus*: inactivation of the antibiotic by hydrolysis or chemical modification; modification of the antibiotic target by genetic mutation or post-translational mechanisms; and reduction of the intracellular concentrations of the antibiotic as a result of deficient penetration into the bacterium or antibiotic efflux by active mechanisms (Blair et al., 2015).

The active efflux of substances that inhibit bacterial growth such as toxic compounds and antibiotics, in *S. aureus*, is mediated by integral membrane transporters,

known as drug efflux pumps (Levy, 1992). There are several categories of active drug efflux pumps that transport drugs against their concentration gradients across the membrane (Levy, 1992). In the *S. aureus* species, the following efflux proteins are found: QacA (Small multidrug resistance protein from the SMR family) (Paulsen et al., 1996; Saier et al., 1994), Smr (SMR family) (Grinius et al., 1992), TetK (Major facilitator superfamily from the MFS family), NorA (MFS family) (Yoshida et al., 1990) and MsrA (MFS family) (Reynolds et al., 2003).

Several studies have demonstrated the development of antibiotic resistance in pathogenic bacteria during the course of antibiotic treatment which involved efflux pumps (Levy, 2005; Neu, 1992; Levy, 2002). Therefore, it is hypothesized that the antibiotic therapy can be effective if: (i) efflux pumps are inhibited, (ii) the expression of efflux pumps is downregulated, or (iii) the antibiotics are redesigned, so that they are no longer suitable to efflux substrates and thus, their clinical efficacy is restored (Kourtesi et al., 2013).

The aim of this study was to evaluate the inhibitory effect of alpha-tocopherol and cholecalciferol on the *Staphylococcus aureus* efflux pumps.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

The following strains of *S. aureus* were used: RN4220, which has the plasmid pUL5054 that is the carrier of gene that encodes the macrolide resistance protein (an efflux pump) MsrA; IS-58, which possesses the TetK tetracycline efflux protein in its genome and 1199B, which resists to hydrophilic fluoroquinolones via a NorA-mediated mechanism. All strains used in this work were kindly provided by Prof. S. Gibbons (University of London). These strains were maintained in blood agar base culture medium slants (Laboratorios Difco Ltda., Brazil) and, before the assays, the cells

were kept grown overnight at 37 °C in Heart Infusion Agar culture medium slants (HIA, Difco) during 24 hours.

Drugs

The antibiotics were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and then, diluted in sterile water to the concentration of 1024 µg/mL. Erythromycin, norfloxacin and tetracycline were used as antibiotics. Alpha-tocopherol and cholecalciferol were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Stock solutions of the vitamins were prepared in 1 mL of DMSO to obtain the concentration of 200 mg/ml and then, this solutions were diluted to 1024 µg/mL in distilled water to reduce the DMSO toxicity.

Antibacterial activity test by Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

The MICs of alpha-tocopherol and cholecalciferol were determined in a microdilution assay utilizing an inoculum of 100 µL of each strain suspended in saline solution at 0.5 of the McFarland scale, was added in brain heart infusion (BHI) in Eppendorfs. Then, each sample was transferred to 96-well microtiter plates and serial dilutions of each substance were performed with concentrations ranging from 0.5 to 512 µg/mL. The plates were incubated at 37 °C during 24 h, and bacterial growth was determined using the sodium Resazurin colorimetric method. The MIC was defined as the lowest concentration in which no bacterial growth was observed, according to CLSI (2013). The antibacterial assays were performed in triplicate and the results were expressed as average of the replicates.

Evaluation of the inhibition of efflux pumps by reduction of MIC

To analyze whether alpha-tocopherol and cholecalciferol might affect the efflux pump activity, we evaluated the potential of these substances to decrease the MIC of the antibiotics. The inhibition of the efflux pump was evaluated using sub-inhibitory concentrations of alpha-tocopherol and

cholecalciferol (MIC/8). A 100 μ L sample of a solution containing inoculums, suspended in saline solution at 0.5 of the McFarland scale was added in brain heart infusion (BHI) in Eppendorfs. Then, each sample was transferred to 96-well microtiter plates and serial dilutions of each substance were performed with concentrations ranging from 0.5 to 512 μ g/mL. The plates were incubated at 37 °C during 24 h, and bacterial growth was determined using the sodium Resazurin colorimetric method. The antibiotic MICs were used as controls. The antibacterial assays were performed in triplicate and the results were expressed as average of the replicates.

Statistical analysis

All experiments were made in triplicate. The data were analyzed using two-way ANOVA and the Tukey's post test using *GraphPad Prism* software 5.0 (GraphPad, San Diego, CA). The values are expressed as geometric means and the differences with $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Cholecalciferol and alpha-tocopherol presented a MIC ≥ 1024 μ g/mL and, as such, they do not exhibit clinically relevant antibacterial activity. However, when associated with antibiotics against resistant strains carrying efflux pumps, cholecalciferol reduced the MIC values of the antibiotics (Figures 1-4).

Substances that reverse bacterial resistance when associated with antibiotics by reducing their MIC are defined as "modifiers of the antibiotic activity", which can alter the bacterial susceptibility to antibiotics by inhibiting microbial efflux pumps (Costa et al., 2008). Thus, if a substance causes a reduction in the MIC ≥ 3 dilutions when combined with the inhibitor, this is an indicative that this substance affects the bacterial resistance by inhibiting the efflux pump activity (Davies and Wright, 1997).

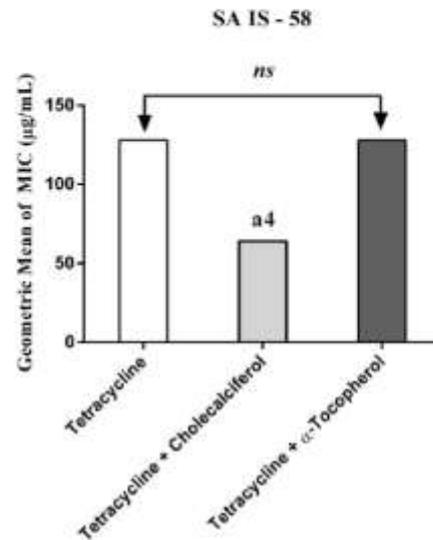


Figure 1: MIC of Tetracycline alone and in association with the standard vitamins against the strain *S. aureus* IS-58, expressing the efflux system TetK. One Way ANOVA, followed by the test Tukey. ^{a4} $p < 0,0001$ vs Tetracycline; ns - not significant

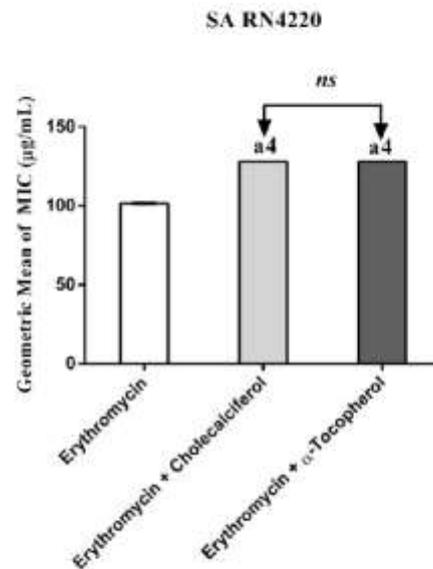


Figure 2: MIC of Erythromycin alone and in association with the standard vitamins against the strain *S. aureus* RN4220, expressing the efflux system TetK. One Way ANOVA, followed by the test Tukey. ^{a4} $p < 0,0001$ vs Erythromycin; ns - not significant

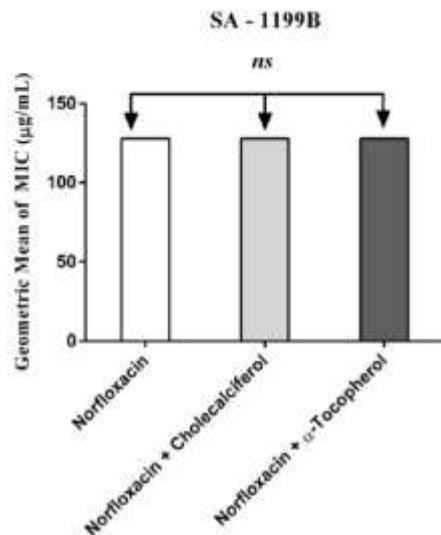


Figure 3: MIC of Norfloxacin alone and in association with the standard vitamins against the strain *S. aureus* 1199B, expressing the efflux system TetK. One Way ANOVA, followed by the test Tukey. *ns* - not significant

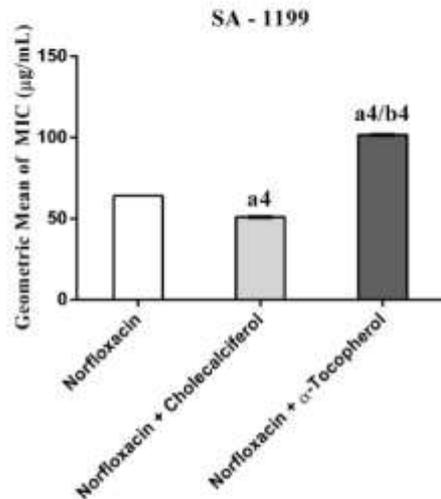


Figure 4: MIC of Norfloxacin alone and in association with the standard vitamins against the strain *S. aureus* 1199B wild, expressing the efflux system TetK. One Way ANOVA, followed by the test Tukey. ^{a4}*p* < 0,0001 vs Norfloxacin; ^{b4}*p* < 0,0001 vs Norfloxacin.

The association of antibiotics with liposoluble vitamins is an interesting alternative to enhance the antimicrobial efficacy of these drugs, because these vitamins are commonly present in the human feed and present no significant toxicity when used at low concentrations (DiPalma and Ritchie, 1977). This is the first study demonstrating the effect of cholecalciferol and α -tocopherol as inhibitors of antibiotic efflux systems. Andrade et al. (2014) were the first researchers to demonstrate the antibiotic modulatory activity against aminoglycosides using a multidrug resistant (MDR) strain of *Staphylococcus aureus*, although several reports previously demonstrated the antibiotic modulator effect of many non-polar compounds against MDR strains.

Falcão-Silva et al. (2009) demonstrated that the amphipathic kaempferol glycoside tiliroside increased the action antibiotics by reducing the concentration needed to inhibit the growth of the RN4220 and IS-58 strains. One of the factors that might be associated to this inhibition is the lipophilicity of the flavon moiety of tiliroside. Lipophilicity is a common feature of several efflux pump inhibitors (EPIs), and this feature, as pointed out by Gibbons (2004), is probably important for EPIs solubility in the bacterial membrane and binding to the efflux pump or efflux pump substrates. Thus, the lipophilicity of a given compound may be determinant on inhibiting the efflux pump in Gram-positive multi-resistant bacteria (Stavri et al., 2007). Accordingly, several reports have demonstrated that lipophilic compounds act as inhibitors of drug efflux pumps in cancer cells (Werle, 2008). Finally, other amphipathic compounds such as piperidine alkaloids (Gibbons, 2005), acylated oligosaccharides from the orizabin series (Pereda-Miranda et al., 2006) and from the murucoidin series, stoloniferin I (Chérigo et al., 2008) and the phenolic diterpene totarol (Smith et al., 2007) have been reported as EPIs against the SA-1199B strain. However, other factors, including special structural fea-

tures may be crucial for the action of drugs on efflux pump inhibition.

In fact, the lipophilicity of some substances, including alpha-tocopherol and cholecalciferol can alter the structure of the bacterial lipoprotein membrane, resulting on damage to components that are essential for the membrane integrity, and therefore, efflux pumps and other membrane transporters may be significantly affected by these substances (Gibbons, 2004). The membrane potential can also be affected leading to loss of ions, cytochrome C, proteins and radicals and finally, collapse of proton pumps system and decrease in the intracellular ATP (Sikkema et al., 1994; Hirayama et al., 2006).

Although the studies demonstrating the effect of the combination of antibiotics with cholecalciferol remain to be developed, a recent study demonstrated the effect of this substance as a modulator of the inflammatory response on bovine mammary epithelial cells (Alva-Murillo et al., 2014). Interestingly, prior to the development of the antibiotics, sunlight (a source of vitamin D), cod liver oil, and pharmacologic doses of liposoluble vitamin D were used to treat tuberculosis (Martineau et al., 2007). This type of treatment fell out of favor following the creation of effective antibiotic therapy. However, the interest in using pharmacologic doses of vitamin D increased recently in view of the finding that this vitamin can stimulate innate immune responses to combat several pathogenic infections *in vitro*. Thus, vitamin D can act as an "antibiotic", in part, by inducing the transcription of human antimicrobial peptide genes (Liu et al., 2006; Gombart et al., 2005; Zasloff, 2006). By this way, the potential use of cholecalciferol in association with antibiotics can represent an important weapon in the war against the MDR bacteria.

CONCLUSION

Cholecalciferol and alpha-tocopherol presented different patterns of antibiotic modulatory activity. Cholecalciferol presented a significant modulatory effect on the tetracycline activity against the IS-58 *S. aureus*

strain, indicating that this vitamin enhanced the antibiotic activity by affecting the bacterial of efflux systems. Together, our data suggest that the vitamins act through specific mechanisms that are dependent on the bacterial strain and the vitamin molecular structure and therefore, cholecalciferol can be used in the development of new drugs to treat infections caused by *S. aureus* resistant strains.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Alva-Murillo N, Téllez-Pérez AD, Medina-Estrada I, Álvarez-Aguilar C, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE. Modulation of the inflammatory response of bovine mammary epithelial cells by cholecalciferol (vitamin D) during *Staphylococcus aureus* internalization. *Microb Pathog.* 2014;77:24-30.
- Andrade JC, Morais-Braga MFB, Guedes GM, Tintino SR, Freitas MA, Menezes IR, et al. Enhancement of the antibiotic activity of aminoglycosides by alpha-tocopherol and other cholesterol derivatives. *Biomed Pharmacol.* 2014;68:1065-9.
- Batista ES, Costa AGV, Pinheiro-Sant'ana HM. Adição da vitamina E aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana. *Rev Nutr.* 2007; 20:525-35.
- Berg GA. Vitamina E: um tema sempre presente, nunca concluído. *Rev Arg Cardiol.* 2010;78:391-2.
- Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:26-34.
- Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13:42-51.
- Catania AS, Barros CR, Ferreira SRG. Vitaminas E minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2009;53:550-9.
- Chérigo L, Pereda-Miranda R, Fragozo-Serrano M, Jacobo-Herrera N, Kaatz GW, Gibbons S. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps from the resin glycosides of *Ipomoea murucoides*. *J Nat Prod.* 2008; 71:1037-45.

- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 23rd Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
- Costa SS, Falcão C, Viveiros M, Machado D, Martins M, Melo-Cristino, et al. Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. BMC Microbiol. 2011;11(1):241.
- Costa VCO, Tavares JF, Agra MF, Falcão-silva VS, Facanali R, Vieira MAR, et al. Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala*. R E Fries Rev Bras Farmacogn. 2008;18:245-8.
- Davies J, Wright GD. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. Trends Microbiol. 1997;5:234-40.
- DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. Am J Clin Nutr. 2004;80:1689-96.
- DiPalma JR, Ritchie DM. Vitamin toxicity. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1977;17:133-48.
- Falcão-Silva VS, Silva DA, Souza Mde V, Siqueira-Junior JP. Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by a kaempferol glycoside from *Herissantia tuboe* (Malvaceae). Phytother Res. 2009;23:1367-70.
- Gibbons S. Anti-staphylococcal plant natural products. Nat Prod Rep. 2004;21:263-77.
- Gibbons S. Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. Phytochem Rev. 2005;4:63-78.
- Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxy-vitamin D3. FASEB J. 2005;19:1067-77.
- Grinius L, Dreguniene G, Goldberg EB, Liao CH, Projan SJ. A staphylococcal multidrug resistance gene product is a member of a new protein family. Plasmid. 1992;27:119-29.
- Hammett N, Brown S, Krishnan C. Emergence of quinolone resistance among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Ontario, Canada. Antimicrob Agents Chemother. 1991;35:1911-3.
- Havaei SA, Moghadam SO, Pourmand MR. Prevalence of genes encoding bi-component leukocidins among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Iran J Publ Health. 2010;39: 8-14.
- Heaney RP. The Vitamin D requirement in health and disease. J Steroid Biochem Mol Biol. 2005;97:13-9.
- Hirayama KB, Speridião PGL, Fagundes neto U. Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa. Elect J Ped Gastroenterol Nutr Liver Dis. 2006;10:1-10.
- Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. Am J Clin Nutr. 2004;80:1678-88.
- Kourtesi C, Ball AR, Huang YY, Jachak SM, Vera DMA, Khondkar P, et al. Microbial efflux systems and inhibitors: approaches to drug discovery and the challenge of clinical implementation. Open Microbiol J. 2013;7:34-52.
- Kurlenda J, Grinholc M. Alternative therapies in *Staphylococcus aureus* diseases. Acta Biochim Pol. 2012;59:171-84.
- Levy SB. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother. 1992;36:695-703.
- Levy SB. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. J Appl Microbiol. 2002;92 Suppl:65S-71S.
- Levy SB. Antibiotic resistance: the problem intensifies. Adv Drug Deliv Rev. 2005;57:1446-50.
- Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. Science. 2006;311(5768):1770-3.
- Márquez M, Yépez CE, Síttil-naranjo R, Rincon M. Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E y A. Invest Clin. 2002;43:191-204.
- Martineau AR, Wilkinson KA, Newton SM, Floto RA, Norman AW, Skolimowska, et al. IFN- γ - and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: the role of cathelicidin LL-37. J Immunol. 2007;178:7190-8.
- Mesak LR, Davies J. Phenotypic changes in ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus*. Res Microbiol. 2009;160:785-91.
- Miller J, Gallo RL. Vitamin D and innate immunity. Dermatol Ther. 2010;23:13-22.

- Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. *Science*. 1992;257(5073):1064-73.
- Neuhauser MM, Weinstein RA, Rydman R, Danziger LH, Karam G, Quinn JP. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. *JAMA*. 2003; 289:885-8.
- Nicolson K, Evans G, Otoole PW. Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. *FEMS Microbiol Lett*. 1999;179:233-9.
- Paulsen IT, Skurray RA, Tam R, Saier MH, Turner RJ, Weiner JH, et al. The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol Microbiol*. 1996;19:1167-75.
- Pereda-Miranda R, Kaatz GW, Gibbons S. Polyacylated oligosaccharides from medicinal Mexican morning glory species as antibacterials and inhibitors of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Nat Prod*. 2006;69:406-9.
- Preto JB, Cechinel filho V, Noldin VF, Sartori MRK, Isaias DEB, Bella CAZ. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (clusiaceae/guttiferae). *Z Naturforsch C*. 2004; 59:657-62.
- Reynolds E, Ross JI, Cove JH. Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: incomplete transporters? *Int J Antimicrob Agents*. 2003;22:228-36.
- Sahm DF, Critchley IA, Kelly LJ, Karlowsky JA, Mayfield DC, Thomsberry C. Evaluation of current activities of fluoroquinolones against gram-negative bacilli using centralized in vitro testing and electronic surveillance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45: 267-74.
- Saier MH Jr, Tam R, Reizer A, Reizer J. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol*. 1994;11:841-7.
- Sampaio LC, Almeida CF. Vitaminas antioxidantes na prevenção do câncer do colo uterino. *Rev Bras Cancerol*. 2009;55:289-96.
- Sikkema J, Bont JAM, Poolman B. Interaction of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem*. 1994;269:8022-6.
- Smith ECJ, Kaatz GW, Seo SM, Wareham N, Williamson EM, Gibbons S. The phenolic diterpene to-tarol inhibits multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:4480-3.
- Stavri M, Piddock LJV, Gibbons S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59:1247-60.
- Werle M. Natural and synthetic polymers as inhibitors of drug efflux pumps. *Pharm Res*. 2008;25:500-11.
- Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S, Ubukata K, Konno M. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* NorA gene, which confers resistance to quinolones. *J Bacteriol*. 1990; 172:6942-9.
- Zaslloff M. Fighting infections with vitamin D. *Nat Med*. 2006;12:388-90.

4.4 ARTIGO 4. CHOLESTEROL AND ERGOSTEROL AFFECT THE ACTIVITY OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ANTIBIOTIC EFFLUX PUMPS. PUBLICADO (MICROBIAL PATHOGENESIS). REVISTA B1 BIOTECNOLOGIA (FATOR DE IMPACTO = 2,0)



Cholesterol and ergosterol affect the activity of *Staphylococcus aureus* antibiotic efflux pumps



S.R. Tintino^a, C.D.M. Oliveira-Tintino^a, F.F. Campina^a, M.S. Costa^a, R.P. Cruz^a,
R.L.S. Pereira^a, J.C. Andrade^a, E.O. Sousa^a, J.P. Siqueira-Junior^b, H.D.M. Coutinho^{a,*},
T.C. Leal-Balbino^d, V.Q. Balbino^c

^a Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Department of Biological Chemistry, CCBS, URCA, Brazil

^b Laboratory of Microorganism Genetics (LGM), Department of Molecular Biology, CCEN, UFPA, Brazil

^c Laboratory of Bioinformatics and Evolutionary Biology (LABBE), Department of Genetics, CCB, UFPA, Brazil

^d Aggeu Magalhães Research Center, CPqAM/Fiocruz, Department of Microbiology, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 December 2016

Received in revised form

6 January 2017

Accepted 10 January 2017

Available online 11 January 2017

Keywords:

Staphylococcus aureus

Cholesterol

Ergosterol

Efflux pumps

ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the effect of ergosterol on steroids and cholesterol efflux pumps in multidrug resistant strains of *S. aureus*. Were used RN4220 harboring plasmid pUL5054, which carries the gene encoding the MsrA macrolide efflux protein; and IS-58, which possesses the TetK tetracycline efflux protein; 1199B resists hydrophilic fluoroquinolones via a NorA-mediated mechanism and wild strain 1199B. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined and the evaluation of possible inhibition of efflux pumps by reduction of MIC. Some of the detrimental effects on bacterial cells can be attributed to the detergent properties of cholesterol and ergosterol on account of their amphipathic structure. Besides the cholesterol did not affect directly the pump structure, a synergism was observed, maybe due the interaction with the cell membrane and interference in the lipid bilayer.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The appearance of multidrug-resistant (MDR) microorganisms is a significant problem for the public health, as it is often associated with prolonged, hospitalization and increased mortality in many countries [1,2]. Moreover, several microorganisms have the capacity to resist the action of antiseptics, antibiotics and disinfectants makes environmental eradication extremely challenging. The *Staphylococcus aureus* is microorganism associated the a wide of community and hospital infections, including bacteremia, skin, pneumonia, bone and joint infections and endocarditis [3]. The emergence of *S. aureus* strains resistant to a wide distribution of antibiotics is a huge worldwide concern in the public health.

The mechanisms of bacterial resistance, while not all common to all of antibiotic, they act on three modes: target mutation; destruction or overproduction enzyme-catalyzed drug inactivation

and reduced intracellular drug concentrations via reduced outer membrane permeability, impaired uptake or energy-dependent efflux pumps [4,5].

With the aim of limit the intracellular concentration of noxious substances, bacteria can reduce entry of toxic compound by developing a barrier of low permeability. The decrease of the intracellular concentration of an antibiotic is due to its extrusion outside the cell via an energy dependent process called active efflux [6], mediated by protein-mediated of efflux pumps. Such pumps are proteins localized in the cytoplasmic membrane of all kind of cells, both eukaryotes as prokaryotes [7]. In eukaryotes they also act removing noxious substances [7]. The efflux pumps operate by limiting the intracellular concentration of antibiotics and have been described in both Gram-positive as well as Gram-negative bacteria. Since the first discovery of the involvement of efflux pumps in determining the bacterial resistance for the tetracycline antibiotic, it has discovered, numerous cases show role the of efflux pumps in extruding each class of antibiotics [8,9].

It has been suggested the involvement of MDR efflux pumps in caused virulence by *S. aureus* and others microorganisms [10,11]. But the problem main caused by the MDR efflux pumps, is that they can handle a wide variety of structurally unrelated compounds [12].

* Corresponding author. Universidade Regional do Cariri – URCA, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS, Departamento de Química Biológica – DQB, Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM, Av. Cel. Antonio Luiz, 1161, Pimenta, Crato, CEP:63105-000, CE, Brazil.
E-mail address: hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M. Coutinho).

They act two ways: (1) primary transporters which hydrolyze ATP as a source of energy; they are also called ATP-binding cassette (ABC) transporters and, (2) secondary transporters which utilize the proton (or sodium) gradient as a source of energy.

The efflux pump inhibitors (EPIs), are substances characterized per decrease the intrinsic resistance of bacteria to antibiotics, and reverse acquired resistance. Also can act even in highly resistant strains with multiple target mutations. Unfortunately, their clinical application became difficult due to the stability, bioavailability and toxicity of these molecules [13].

The cytoplasmic membrane of bacteria does not possess cholesterol or ergosterol. The ergosterol is a derivative of cholesterol and is the lipid component of the membrane in fungi. They were both studied because they are complex substances of the steroid lipid type [14,15], where they can affect the mosaic fluid nature of the bacterial membrane, modifying its fluidity. The sterol, at the same time, modulates physical properties of the membranes such as membrane fluidity, lateral phase segregation, and the propensity to adopt non-bilayer structures such as the inverted hexagonal phase [16]. So, the aim of this work was evaluate the effect of the ergosterol and cholesterol against efflux pumps in multidrug resistant strains (MDR) of *S. aureus*.

2. Material and methods

2.1. Bacterial strains

The strains of *S. aureus* were used: RN4220 harboring plasmid pUL5054, which carries the gene encoding the MsrA macrolide efflux protein; and 15-58, which possesses the TetK tetracycline efflux protein; 1199B resists hydrophilic fluoroquinolones via a NorA-mediated mechanism and wild strain 1199B. The strains, kindly provided by Prof. S. Gibbons (University of London), were maintained on blood agar base (Laboratorios Difco Ltda., Brazil) slants and, prior to use, the cells were grown overnight at 37 °C in Heart Infusion Agar slants (HIA, Difco).

2.2. Drugs

The antibiotics were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and after sterile water (concentration of 1024 µg/mL). Erythromycin, Norfloxacin and tetracycline were used antibiotics. Cholesterol and ergosterol were obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, USA (Fig. 1A and B). Stock solutions were prepared in 1 mL of DMSO in a concentration of 200 mg/mL, after which they were diluted to 1024 µg/mL in distilled water.

2.3. Antibacterial activity test by Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

The MIC of cholesterol and ergosterol was determined in a microdilution assay. The microorganisms were previously cultivated in Heart Infusion Agar (HIA) for 24 h at 37 °C. An inoculum of 100 µL of each suspended bacterial in saline solution 0.5 McFarland, was added in 900 µL of brain heart infusion (BHI) in eppendorfs. After were transferred to 96-well microtiter plates and serial dilutions of each substance were realized with concentrations ranging from 0.5 to 512 µg/mL (1:1), with 100 µL of substances. The plates were incubated at 37 °C for 24 h, and bacterial growth was assessed by the use of resazurin. The MIC was defined as the lowest concentration in which no growth can be observed, according to [17]. Antibacterial assays were performed in triplicate and results were expressed as average of replicates.

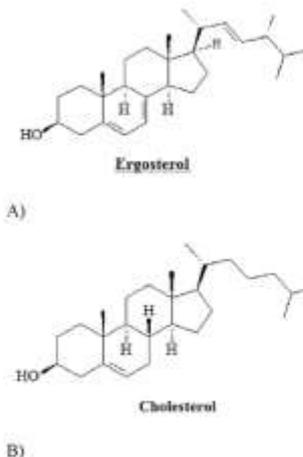


Fig. 1. Structure of ergosterol and cholesterol.

2.4. Evaluation of possible inhibition of efflux pumps by reduction of MIC

To observe whether the cholesterol and ergosterol would alter the inhibition of efflux pump, was used the capacity of decrease the MIC of antibiotics. The microorganisms were previously cultivated in Heart Infusion Agar (HIA) for 24 h at 37 °C. The inhibition of efflux pump was tested using a sub-inhibitory concentration of cholesterol and ergosterol (MIC/8). A solution of 150 µL of each suspended bacterial inoculum in saline solution, corresponding to 0.5 of the McFarland scale, were added to eppendorfs together with 1350 µL of brain heart infusion (BHI) as a control. After were transferred to 96-well microtiter plates and 100 µL of antimicrobial drug serial dilutions were realized (1:1). The plates were incubated at 37 °C for 24 h, and bacterial growth was assessed by the use of resazurin. MIC was defined with concentrations antibiotics. Were realized the controls, using the MIC of antibiotics. Antibacterial assays were performed in triplicate and results were expressed as average of replicates.

2.5. Statistical analysis of microbiological results

The results of the tests were done in triplicate and expressed as geometric mean. Statistical analysis was applied to two-way ANOVA followed by Bonferroni posttests using GraphPad Prism 5.0 software.

3. Results and discussion

The deletion of action of efflux pump in the bacteria has been responsible by increase the susceptibility of these bacteria to many antibiotics. Several data shows that efflux pumps are involved in determining the resistance phenotype of a pathogen and therefore pose a major threat for the effective treatment of many Gram-negative, Gram-positive and opportunistic pathogens. It leads to the need to development of inhibitors for these pumps that would circumvent the transport of substances to produce successful treatment regimens with antibiotics [18]. Several efforts have been directed at identification and production of EPIs from natural sources, present in secondary metabolites of plants. The association of efflux pump inhibitors with antibiotics can produce synergic

effects, reducing the MICs of the antibiotics and reversing the bacterial resistant phenotype [19].

According Figs. 2–4, a synergism was observed only in the wild type strain, that have not efflux system. These results indicate that the steroids interacted with the bacterial cell membrane and enhanced the permeability to the antibiotic. Against the other strains with efflux pumps, only antagonistic effects were observed. These effects are due interactions between the steroids and the antibiotics, chelating the last ones and avoiding the influx to inside the bacterial cell (see Fig. 5).

The work Andrade et al. (2014) [20] demonstrated the modifier-antibiotic activity of cholesterol and ergosterol against MDR strains of *Staphylococcus aureus* when associated with aminoglycosides. Cholesterol and ergosterol are important components of biological membranes of eukarya, but absent in the bacterial cell membrane. They are responsible for maintaining the permeability of membranes. The cell can control its fluidity through the regulation of cholesterol levels or degree of saturation of the hydrocarbon chains of phospholipids [21].

Some of the detrimental effects on bacterial cells can be attributed to the detergent properties of cholesterol and ergosterol on account of their amphipathic structure. This allows them to interact with the cell membrane to create transient or permanent pores of variable size. The amphipathic lipids can affect both production of energy caused by interference with the electron transport chain as the disruption of oxidative phosphorylation [22].

Besides the existence of few studies about the effect of cholesterol against the bacterial cell membrane and about the bacterial efflux pumps, there are many evidences about the inhibition of efflux pumps on cancer cells. In this study show that, the binding affinity of Pgp for ATP and some drugs was altered by the presence of cholesterol. Cholesterol also reduced the affinity of some drugs for binding to Pgp, which is in accordance with its effect on their membrane partitioning, however for other drugs there was little effect of cholesterol on binding [23]. However, about the ergosterol there is none reports about these bacterial effects, with exception to the work of [20]. The effect of the cholesterol affecting the fluidity and permeability of cell membranes is known. This effect is concentrations and temperature dependent [24].

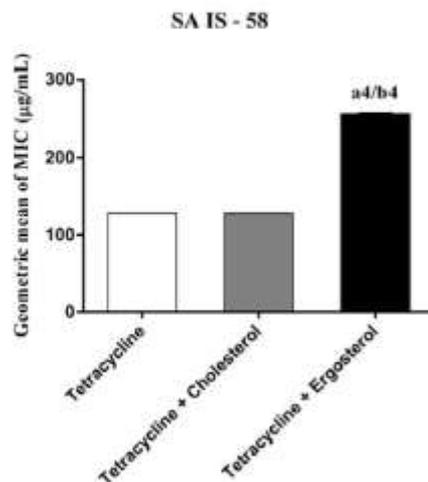


Fig. 2. Effect of Cholesterol and ergosterol associated with tetracycline against strain *S. aureus* IS-58. One Way ANOVA, followed by the test Tukey. ^a $p < 0.0001$ vs Tetracycline; ^b $p < 0.0001$ vs Tetracycline.

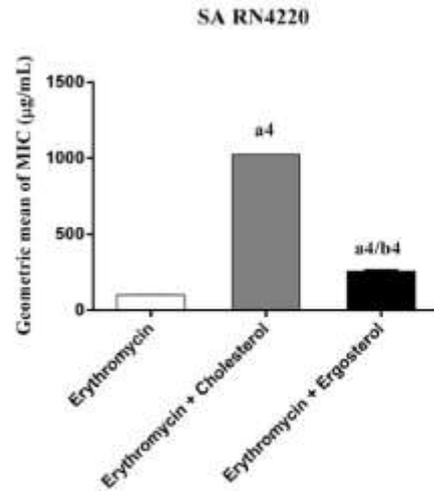


Fig. 3. Effect of Cholesterol and ergosterol associated with tetracycline against strain *S. aureus* RN4220. One Way ANOVA, followed by the test Tukey. ^a $p < 0.0001$ vs Erythromycin; ^b $p < 0.0001$ vs Erythromycin.

4. Conclusion

Besides the cholesterol and ergosterol have not affected the efflux pumps, in the wild type strain a synergism was observed possibly due the membrane alterations. However, the results can be the start point to the usage of the steroids in new drug formulations in association with antibiotics. Besides the high variety of resistance mechanisms, the discovery of substances with the capacity to inhibit them is very important. Due this fact, new inhibitors of efflux pumps are promising compounds.

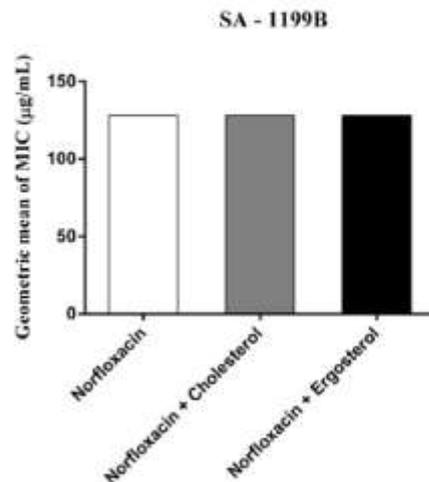


Fig. 4. Effect of Cholesterol and ergosterol associated with tetracycline against strain *S. aureus* 1199B. One Way ANOVA, followed by the test Tukey.

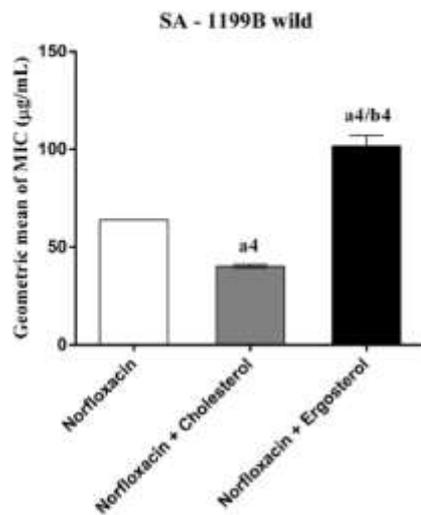


Fig. 5. Effect of Cholesterol and ergosterol associated with tetracycline against strain 5 aurei 1199B wild. One Way ANOVA, followed by the test Tukey. ^{a4}p < 0,0001 vs Norfloxacin; ^{a4/b4}p < 0,0001 vs Norfloxacin.

Conflict of interest

None conflict of interest to disclose.

Acknowledgements

SRT, CDMOT, FFC and MSC performed the experiments with the microorganisms; RPC, RLSP, JCA and EOS constructed the graphs and the chemical structures; JPS-Jr, HDMC and VQB designed the experiment, performed the statistical analysis and wrote the manuscript.

References

- [1] I.T. Paulsen, M.H. Brown, S.J. Dunstan, R.A. Skurray, Molecular characterization of the staphylococcal multidrug resistance export protein QacC, *J. Bacteriol.* 177 (1995) 2827–2833.
- [2] H.W. Boucher, G.H. Talbot, J.S. Bradley, J.E. Edwards, D. Gilbert, L.B. Rice, J. Bartlett, Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! an update from the infectious diseases society of America, *Clin. Infect. Dis.* 48 (2009) 1–12.
- [3] R.M. Klevevis, M.A. Morrison, J. Nadle, S. Petit, K. Gershman, S. Ray, A.S. Craig, Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States, *JAMA* 298 (2007) (2007) 1763–1771.
- [4] K. Poole, Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance, *J. Appl. Microbiol.* (2002) (Suppl) 2002:55–64.
- [5] A.D. Russell, Do biocides select for antibiotic resistance? *J. Pharm. Pharmacol.* 52 (2) (2000) 227–233.
- [6] X.-Z. Li, H. Nikaido, Efflux-mediated drug resistance in bacteria, *Drugs* 64 (2004) 159–204.
- [7] A.-F.V. Bambele, Y. Glupczynski, P. Plesiat, J.C. Pechère, P.M. Tulkens, Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy, *J. Antimicrob. Chemother.* 51 (2003) 1055–1065.
- [8] L.J. Piddock, Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria, *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (2006) 382–402.
- [9] L.J. Piddock, Multidrug-resistance efflux pumps— not just for resistance, *Nat. Rev. Microbiol.* 4 (2006) 629–636.
- [10] N.P. Kalia, P. Mahajan, R. Mehra, A. Nargotra, J.P. Sharma, S. Koul, I.A. Khan, Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*, *J. Antimicrob. Chemother.* 67 (2012) 2401–2408.
- [11] Y. Ding, Y. Onodera, J.C. Lee, D.C. Hooper, NorB, an efflux pump in *Staphylococcus aureus* strain MW2, contributes to bacterial fitness in abscesses, *J. Bacteriol.* 190 (2008) 7123–7129.
- [12] M.A. Webber, L.J.V. Piddock, The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance, *J. Antimicrob. Chemother.* 51 (2003) 9–11.
- [13] H. Ventier, R. Mowla, T. Obene-Agpey, S. Ma, RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition, *Front. Microbi.* (2015) 6.
- [14] A.R. Santos, H.F. Carvalho, *Biomembranas*, in: H.F.E. Carvalho, S.M. Recco-Pimentel (Eds.), *A Célula 2001*, Ed. Manole, Barueri, Brasil, 2001.
- [15] C. Loguercio-leite, C. Groposo, E.R. Dreschler-santos, N.F. Figueiredo, O.S. Godinho, R.L. Abrão, A particularidade de ser um fungo — I. Constituintes celulares, *Biotemas* 19 (2006) 17–27.
- [16] P.L. Yeagle, Cholesterol and the cell membrane, *Biochim. Biophys. Acta* 822 (1985) 267–287.
- [17] CLSI — Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards of Antimicrobial Disk Susceptibility Test: Ninth Informational Supplement, NCCLS Document M100–99, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 2008, pp. 120–126.
- [18] K. Bhardwaj, Ashima, P. Mohanty, Bacterial efflux pumps involved in multi-drug resistance and their inhibitors: rejuvenating the antimicrobial chemotherapy, *Rec. Pat. Anti-Infect. Drug Discov* 71 (2012) 73–89.
- [19] V.S. Falcão-Silva, D.A. Silva, M.D.F.V. Souza, J.P. Siqueira-Junior, Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by a kaempferol glycoside from *Periconia rubra* (Malvaceae), *Phyto. Resear* 23 (2009) 1367–1370.
- [20] J.C. Andrade, M.F.B. Morais-Braga, G.M. Guedes, S.R. Tintino, M.A. Freitas, I.R. Menezes, H.D. Coutinho, Enhancement of the antibiotic activity of aminoglycosides by alpha-tocopherol and other cholesterol derivatives, *Biomed. Pharmacother* 68 (2014) 1065–1069.
- [21] F. Prezant, D.A. Schettini, Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na Quimioterapia a base de antimônio, *Quim Nova* 28 (2005) 11–18.
- [22] A.P. Desbois, V.J. Smith, Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential, *Appl. Microb. Biotech* 85 (2010) 1629–1642.
- [23] P.D. Eckford, F.J. Sharom, Interaction of the P-Glycoprotein multidrug efflux pump with cholesterol: effects on ATPase activity, drug binding and transport, *Biochemistry* 47 (51) (2008) 13686–13698.
- [24] D.S. Papahadjopoulos, Nit, S. Ohki, Permeability properties of phospholipid membranes: effect of cholesterol and temperature, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* (1972) 561–583.

4.5 ARTIGO 5: VITAMIN K ENHANCES THE EFFECT OF ANTIBIOTICS INHIBITING THE EFFLUX PUMPS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS. PUBLICADO (MEDICINAL CHEMISTRY RESEARCH) FATOR DE IMPACTO 1,2 B2 BIOTECNOLOGIA

Vitamin K enhances the effect of antibiotics inhibiting the efflux pumps of *Staphylococcus aureus* strains

Saulo R. Tintino¹ · Cícera D. M. Oliveira-Tintino² · Fábila F. Campina¹ · Paulo Wesley Limaverde¹ · Pedro S. Pereira² · José P. Siqueira-Junior³ · Henrique D. M. Coutinho¹ · Lucindo J. Quintans-Júnior⁴ · Teresinha G. da Silva² · Teresa C. Leal-Balbino⁵ · Valdir Q. Balbino⁶

Received: 13 April 2017 / Accepted: 2 September 2017 / Published online: 14 September 2017
 © Springer Science+Business Media, LLC 2017

Abstract The strain *Staphylococcus aureus* is commonly cited as being a major hospital-acquired pathogen. The emergence of *S. aureus* strains resistant to a wide distribution of antibiotics. The various antibiotic resistance mechanisms include efflux pumps, are ubiquitous proteins localized in the cytoplasmic membrane of all kind of cells. During the last two decades, numerous structurally diverse compounds have been studied and shown to have efflux-inhibitory activity. These include currently available drugs employed for other indications, as well as natural and synthetic molecules. Menadione (vitamin K3), is a fat-soluble vitamin that has long been recognized for its essential role in coagulation and, more recently, has been proposed as a key nutrient in the regulation of soft tissue calcification. Therefore, the aim of this study is to evaluate the effect of menadione efflux pumps in multidrug resistant strains of *S.aureus*. Were used RN4220 harboring plasmid

pUL5054, which carries the gene encoding the MsrA macrolide efflux protein; and IS-58, which possesses the TetK tetracycline efflux protein; 1199B resists hydrophilic fluoroquinolones via a NorA-mediated mechanism and wild strain 1199B. Antibacterial activity test by minimal inhibitory concentration (MIC). Evaluation of possible inhibition of efflux pumps by reduction of MIC of ethidium bromide (EtBr) and antibiotics due the possible inhibitory effect of these substances. Efforts have been directed at identification of EPIs from natural sources. Some of the detrimental effects on bacterial cells can be attributed to the detergent properties of menadione on account of their amphipathic structure. Was observed what in strain 4220 and IS58 it occurred reduction the MIC, indicating possible effect on efflux pump.

Keywords Liposoluble compounds · Efflux pumps · Menadione · *Staphylococcus aureus*

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

¹ Department of Biological Chemistry/CCBS/URCA, Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Crato, Brazil

² Department of Antibiotics, Laboratory of Farmatoxicological Prospecting of Bioactive Products (BIOFARMATOX), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil

³ Department of Molecular Biology/CCEN/UFPE, Laboratory of Microorganism Genetics (LGM), João Pessoa, Brazil

⁴ Physiology Department/UFS, São Cristóvão, SE 49100-000, Brazil

⁵ Department of Microbiology, Aggeu Magalhães Research Center, CPqAM/Fiocruz, Recife, Brazil

⁶ Department of Genetics | CCB | UFPE, Laboratory of Bioinformatics and Evolutionary Biology (LABBE), Recife, Brazil

Introduction

The strain *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) is commonly cited as being a major hospital-acquired pathogen (Perl 1999). Strains of this species that are resistant to β -lactams, notably methicillin-resistant *S. aureus* have been described from clinical sources for over 40 years (Dos Santos et al. 2007). The emergence of *S. aureus* strains resistant to a wide distribution of antibiotics, including aminoglycosides, macrolides, lincosamides, fluoroquinolones, chloramphenicol, sulfonamides, streptomycin, and tetracycline, has become a pandemic problem owing to limited therapeutic options available (Schito 2006). The ability of these

organisms to resist the action of antiseptics and disinfectants makes environmental eradication extremely challenging. The ability of this Gram-positive organism to acquire resistance to practically all useful antibiotics is cause for great concern.

In the past century, the discovery of antibiotics has been one of the most influential and impressive achievements in science. However, the widespread use of antibiotics created selective pressure for the emergence of strains that would persist despite antibiotic toxicity. Indeed, bacterial drug resistance is an increasing problem in the clinic (Fluman and Bibi 2009). The various antibiotic resistance mechanisms include alteration/modification of the target site, degradation of the antibiotic molecule and reduction of effective intracellular antibiotic concentration as a result of decreased permeability and energy-dependent (or active) efflux (Kumar and Schweizer 2005).

A decrease of the intracellular concentration of an antibiotic can also be due to its extrusion outside the cell via an energy dependant process called active efflux (Van Bambeke et al. 2003a, b), mediated by efflux pumps. Such pumps are ubiquitous proteins localized in the cytoplasmic membrane of all kind of cells, from bacteria to eukaryotes (Van Bambeke et al. 2003a, b; Webber and Piddock 2003). Bacterial efflux systems are responsible for the secretion of toxins or antibiotics produced by the cell itself, efflux of toxic compounds encountered in the bacterial environment such as antibiotics. These systems can confer resistance to a given drug or class of drugs: they are specific drug resistance transporters. But the main problem is caused by the so-called multi drug resistant (MDR) efflux pumps that can handle a wide variety of structurally unrelated compounds (Van Bambeke et al. 2003a, b). Most families of antibiotics are subject to resistance by efflux, with the exception of glycopeptides (Webber and Piddock 2003). MDR efflux pumps have also been suggested to be involved in *S. aureus* virulence (Van Bambeke et al. 2000; Kalia et al. 2012). In these instances, strains expressing an MDR efflux pump had improved fitness and survival in murine abscess models or enhanced invasiveness of macrophages.

In the prokaryotic kingdom there are five major families of efflux transporter: major facilitator, multidrug and toxic efflux, resistance-nodulation-division, small multidrug resistance, and ATP binding cassette. All these systems utilize the proton motive force as an energy source, (Ding et al. 2008) apart from the ABC family, which utilizes ATP hydrolysis to drive the export of substrates. Recent advances in DNA technology and the advent of the genomic era have led to the identification of numerous new members of the above families, and the ubiquitous nature of efflux pumps is remarkable. Analysis of various available bacterial genome sequences has shown that known and putative drug efflux transporters constitute from 6 to 18% of all

transporters found in any given bacterial cell (Paulsen et al. 1996).

During the last two decades, numerous structurally diverse compounds have been studied and shown to have efflux-inhibitory activity, including phenylalanyl arginyl- β -naphthylamide, verapamil, phenothiazines (for example: thioridazine, chlorpromazine). These include currently available drugs employed for other indications, as well as natural and synthetic molecules (Stavri et al. 2007).

Menadione (vitamin K3), a naturally occurring metabolite of vitamin K, is also a synthetic form of vitamin K added to animal feed. Menadione (vitamin K3), is a fat-soluble vitamin that has long been recognized for its essential role in coagulation and, more recently, has been proposed as a key nutrient in the regulation of soft tissue calcification. Vitamin K is considered safe at the recommended adequate intake dosages discussed. There is no tolerable upper limit set because there are no known cases of toxicity with vitamin K. Vitamin K deficiency bleeding is a significant public health issue that is of concern in healthy appearing neonates (Truong and Booth 2011).

By this fact, the menadione can be a possible alternative to inhibit one of the most important bacterial mechanisms of resistance against antibiotics, the efflux pumps. So, the aim of this study was evaluate the inhibition of efflux pumps using microdilution assay by the association between menadione and antibiotics in MDR *S. aureus* strains and comparing this effect with the substrate ethidium bromide (EtBr).

Materials and methods

Bacterial strains

The strains of *S. aureus* were used: RN4220 harboring plasmid pUL5054, which carries the gene encoding the MsrA macrolide efflux protein; and IS-58, which possesses the TetK tetracycline efflux protein; 1199B resists hydrophilic fluoroquinolones via a NorA-mediated mechanism and wild strain 1199. The strains, kindly provided by Prof. S. Gibbons (University of London), were maintained on blood agar base (Laboratorios Difco Ltda., Brazil) slants and, prior to use, the cells were grown overnight at 37 °C in Heart Infusion Agar slants (HIA, Difco).

Drugs

The antibiotics were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and after sterile water (concentration of 1024 μ g/mL). Erythromycin, Norfloxacin and tetracycline were used antibiotics. Menadione was obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, USA. Stock solutions were prepared in 2 mL

Table 1 Antibacterial activity test by MIC of vitamin menadione in strain with pump efflux expression in $\mu\text{g/mL}$.

	Strain	Control DMSO	Menadione
Result of CIM	RN4220	128	64
Result of CIM	IS-58	128	64
Result of CIM	1199B	128	64
Result of CIM	1199	128	64

of DMSO/ Tween 80 at a concentration of 200 mg/ml, after which they were diluted to 1024 $\mu\text{g/mL}$ in distilled water. Was performed the control with DMSO. Ethidium bromide was obtained from Sigma Aldrich Co. Ltd. and dissolved in sterile water (concentration of 1024 $\mu\text{g/mL}$).

Antibacterial activity test by minimum inhibitory concentration (MIC)

The minimum inhibitory concentration (MIC) of menadione, were determined in a microdilution assay utilizing 100 μL of each suspended bacterial inoculum in saline solution, corresponding to 0.5 of the McFarland scale, followed by addition of 900 μL of brain heart infusion (BHI) in eppendorfs. These were then transferred to 96-well microtiter plates and serial dilutions of each substance were performed with concentrations ranging from 0.5 to 512 $\mu\text{g/mL}$ (1:1). The plates were incubated at 37 °C for 24 h, and bacterial growth was assessed by the use of resazurin. The MIC was defined as the lowest concentration in which no growth can be observed, according to (CLSI 2008). The antibacterial assays were performed in triplicates and results were expressed as an average of replicates.

Evaluation of efflux pump inhibition by MIC reduction

To observe whether menadione would alter the inhibition of efflux pumps, was performed a comparative study between the capacity to decrease the MIC of EtBr and antibiotics, thus assessing the capacity of both in decreasing the MIC.

Efflux pump inhibition was tested using a sub-inhibitory concentration of menadione (MIC/8). A 100 μL sample of a solution containing inoculum, was suspended in saline solution equivalent to 0.5 of the McFarland scale, and was added to BHI in eppendorfs. After wards, these were transferred to 96-well microtiter plates and 100 μL of antimicrobial drug and EtBr serial dilutions were performed (1:1). The plates were incubated at 37 °C for 24 h, and bacterial growth was assessed by the use of Resazurin. The MIC was defined with antibiotic and EtBr concentrations ranging between 0.5 to 512 $\mu\text{g/mL}$. Controls were performed using the MIC of antibiotics and EtBr alone.

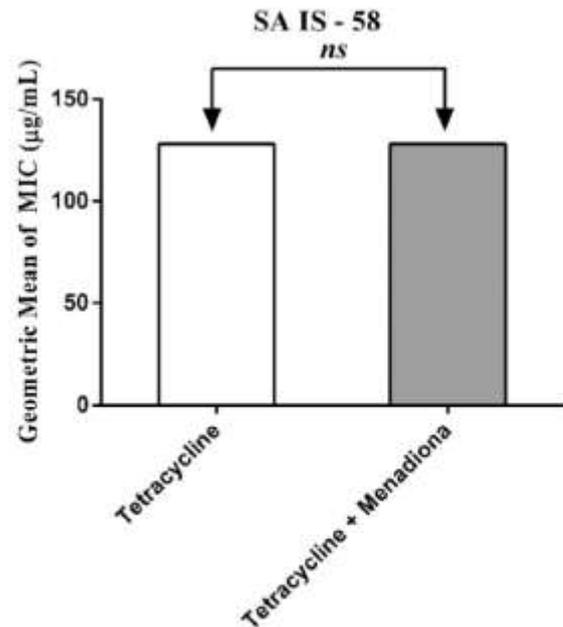


Fig. 1 MIC of Tetracycline alone and in association with the standard vitamins against the strain *S. aureus* IS-58, expressing the efflux system TetK. One Way ANOVA, followed by the test Tukey, *ns* not significant

Antibacterial assays were performed in triplicate and results were expressed as an average of replicates.

Results and discussion

The menadione demonstrated a MIC = 64 $\mu\text{g/mL}$ against RN4220, IS-58 1199B and 1199 being considered a clinically relevant antibacterial activity (Table 1). When the antibiotics and EtBr, were assayed in association with the menadione in sub-inhibitory concentrations (MIC/8), all of them reduced the MIC (Figs. 1–8), indicating an inhibition of the mechanism of resistance to the antibiotic (the efflux pumps). Only when the menadione was associated with the antibiotic against the wild type strain, an antagonistic effect was detected by a reduction of the MIC.

Modifier of antibiotic activity, by reduction of MIC, is a term used for substances that modulate or even reverse bacterial resistance to certain antibiotics, where it can alter the microbial susceptibility to antibiotics by inhibition of efflux pumps (Costa et al. 2008). A MIC reduction ≥ 3 dilutions when combined with the inhibitor is indicative of the resistance mechanism of efflux pump (Davies and Wright 1997). The usage of EtBr as a substrate for the efflux pumps is well described in the literature and as demonstrated in this work (Patel et al. 2010). The MIC of

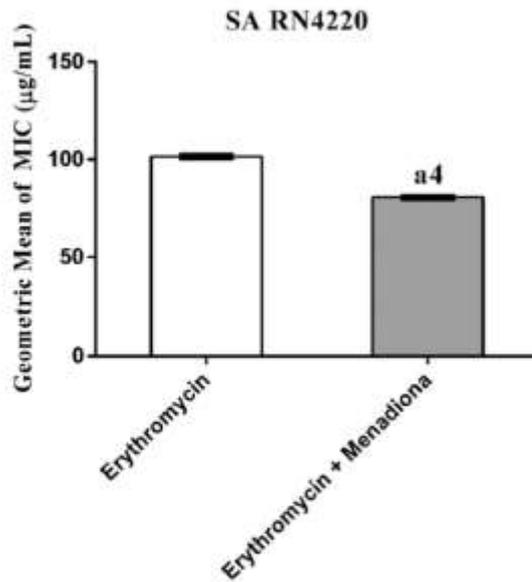


Fig. 2 MIC of Erythromycin alone and in association with the standard vitamins against the strain *S. aureus* RN4220, expressing the efflux system TetK. One Way ANOVA, followed by the test Tukey. a4: $p < 0.0001$ vs. Erythromycin

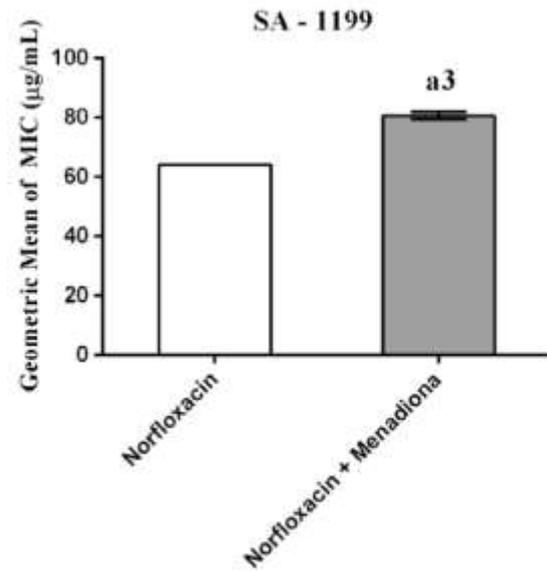


Fig. 4 MIC of Norfloxacin alone and in association with the standard vitamins against the strain *S. aureus* 1199 wild, expressing the efflux system TetK. One Way ANOVA, followed by the test Tukey. a3: $p < 0.001$ vs. Norfloxacin

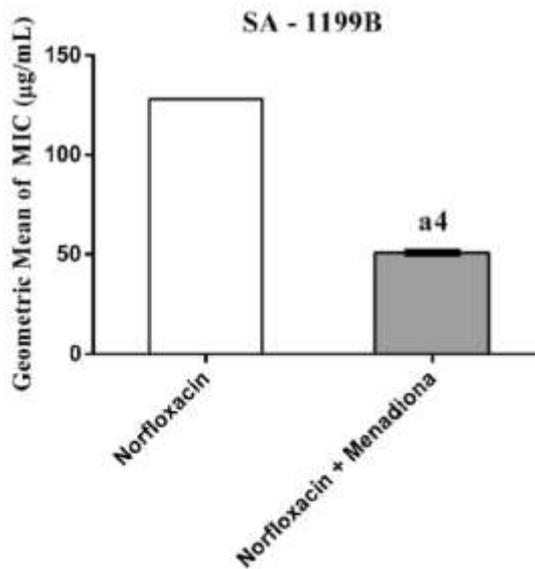


Fig. 3 MIC of Norfloxacin alone and in association with the standard vitamins against the strain *S. aureus* 1199B, expressing the efflux system TetK. One Way ANOVA, followed by the test Tukey. a4: $p < 0.0001$ vs. Norfloxacin

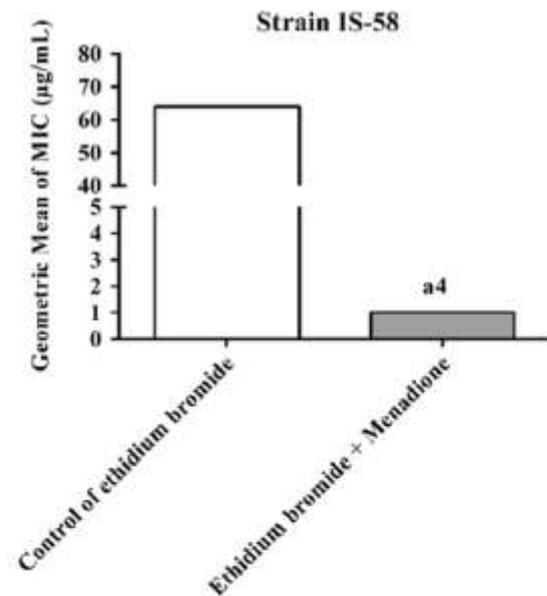


Fig. 5 Effect of menadione on the activity of ethidium bromide (EtBr) against the strain of *Staphylococcus aureus* IS-58. The values represent the geometric mean \pm S.E.M. (Standard Error of the Mean) analyzed through the T-Test. a4: $p < 0.0001$ vs. Control of EtBr

ethidium bromide demonstrated similar action to antibiotics, indicating a similar inhibitory mechanism among them against efflux pumps in the assayed strains.

The use of liposoluble vitamins in association with antibiotics is an interesting alternative to enhance the antibiotic activity of these drugs due their usage in the human

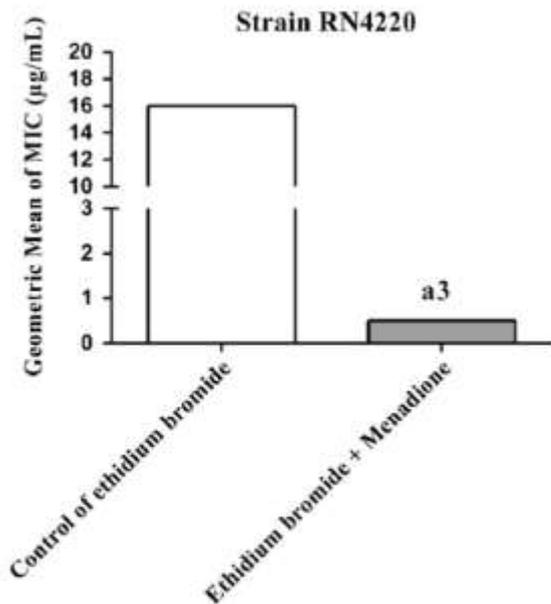


Fig. 6 Effect of menadione on the activity of EtBr against the strain of *Staphylococcus aureus* RN4220. The values represent the geometric mean \pm S.E.M. (standard error of the mean) analyzed through the *T*-Test. a3: $p < 0.001$ vs. Control of EtBr

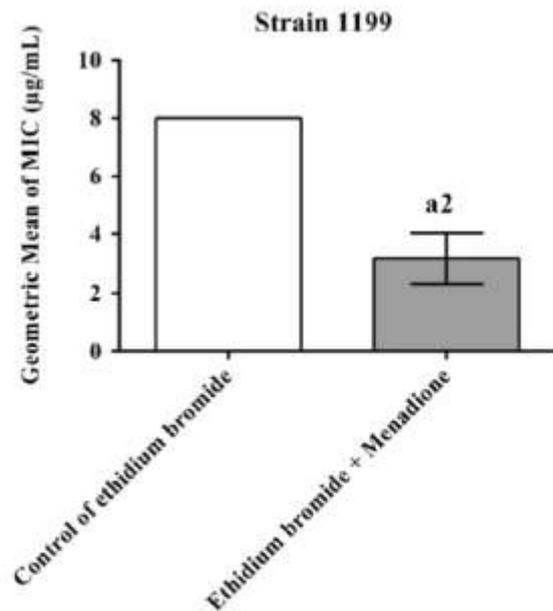


Fig. 8 Effect of menadione on the activity of EtBr against the strain of *Staphylococcus aureus* 1199 wild. The values represent the geometric mean \pm S.E.M. (standard error of the mean) analyzed through the *T*-Test. a2: $p < 0.01$ vs. Control of EtBr

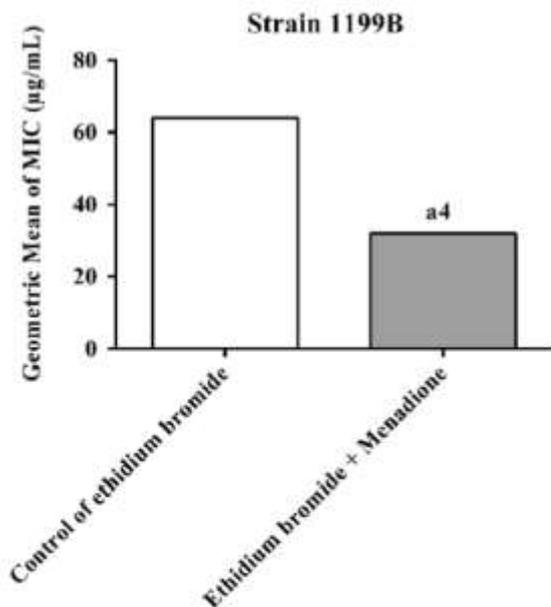


Fig. 7 Effect of menadione on the activity of EtBr against the strain of *Staphylococcus aureus* 1199B. The values represent the geometric mean \pm S.E.M. (standard error of the mean) analyzed through the *T*-Test. a4: $p < 0.0001$ vs. Control of EtBr

feed with low toxicity when used in low concentration (DiPalma and Ritchie 1977). Liposoluble compounds are cited as modifiers of plasma membrane permeability in

bacteria (Pretto 2004; Nicolson et al. 1999). Thus, menadione is compounds with your liposoluble nature can alter the fluidity of the bacterial membrane, making it more susceptible to penetration by various substances, particularly antibiotics (Andrade et al. 2014).

Beyond that, lipophilic substances and menadione cause disturbances in the bacterial membrane, resulting in damage of the fundamental elements needed for membrane integrity, such as reduced membrane potential and loss of ions, cytochrome C, proteins and radicals, followed by the collapse of the proton pump and ATP depletion (Sikkema et al. 1994; Turina et al. 2006; Hirayama et al. 2006). Lipophilicity is a common feature of several putative efflux pump inhibitors, and this quality, as pointed out by Gibbons (Gibbons 2004), is probably important for its solubility in the bacterial membrane and binding to the efflux proteins, or maybe binding to the pump substrates. This effect may be due the fact of the efflux pumps are transmembrane proteins, having its function associated with cell membrane structure and fluidity (Collnot et al. 2007).

This is the first report about the effect of menadione (vitamin K) against the bacterial efflux systems. In the study performed by Andrade et al. (2014), was observed that menadione enhances the antibiotic activity of drugs by cell membrane permeabilization mechanism. In a similar form, we have observed a MIC reduction when the antibiotic was

associated with the menadione. However, previous studies have demonstrated the effect of liposoluble vitamins against the cell membrane and against the efflux systems. In this study was performed by Collnot et al (Collnot et al. 2007) which investigated TPGS interactions with P-gp in its membrane environment. Alterations in membrane fluidity by D- α -tocopheryl polyethylene glycol were observed via electron spin resonance spectroscopy. In the absence and presence of P-gp substrates and ATPase activity was measured using an ATPase assay. This study demonstrated that the interaction of this vitamin with the cell membrane affected the cell membrane fluidity, modified the cell membrane permeability and inhibited the efflux system ATP-dependent in cancer cell lines.

Besides the efflux systems studied on this work be bacterial systems, the effect can be very similar the present in eukaryotic and prokaryotic organisms. Other lipophilic substances have been reported to affect bacterial efflux systems by similar mechanisms. Lipophilic and Amphipathic compounds have been reported as putative efflux pump inhibitors against strain SA-1199B, such as a piperidine alkaloid (Pereda-Miranda et al. 2006), acylated oligosaccharides of the orizabins series (Gibbons 2005) of the murucoidin series and stoloniferin I (Chérigo et al. 2008) and the phenolic diterpene totarol (Smith et al. 2007).

In this study, performed by Silva et al (Silva et al. 2009), analyzed liposoluble compounds triterpenes and phenolic isolated from the aerial parts of *Herissantia tiubae* against RN4220 harboring plasmid pUL5054, which carries the gene encoding the MsrA macrolide efflux protein; and IS-58, which possesses the TetK tetracycline efflux protein.

Conclusion

Observed was with the menadione (vitamin k) enhanced the antibiotic activity by the inhibition of the efflux systems. This fact indicates that the menadione (vitamin k) mechanism of action is specific, according the strain and the menadione (vitamin k) molecular structure. In a general manner, the vitamin interacted with the bacterial cell membrane and affected the pump tertiary structure, as observed in studies with other non-polar compounds. However, new studies are necessary to elucidate what the factors that it favors this interaction and how could occur.

Author's contributions SRT, CDMOT, and FFC performed the MIC assays of antibacterial activity of menadione; PWL and PSP performed the efflux Pump Inhibition by MIC Reduction assay; TGS and LJQJ performed the statistical assays; JPSJ, HDMC, TCLB, and VQB supervised the experimental work, wrote and revised the manuscript

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

References

- Andrade JC, Morais-Braga MFB, Guedes GM, Tintino SR, Freitas MA, Menezes IR et al. (2014) Enhancement of the antibiotic activity of aminoglycosides by alpha-tocopherol and other cholesterol derivatives. *Biomed Pharma* 68:1069–1065
- Chérigo L, Pereda-Miranda R, Fragoso-Serrano M, Jacobo-Herrera N, Kaatz GW, Gibbons S (2008) Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps from the resin glycosides of *Ipomoea murucoides*. *J Nat Prod* 71:1037–1045
- CLSI (2008) Performance standards of antimicrobial disk susceptibility test: Ninth Informational Supplement. NCCLS document M100-S9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, p 120–126
- Collnot EM, Baldes C, Wempe MF, Kappi R, Hüttermann J, Hyatt JA et al. (2007) Mechanism of inhibition of P-glycoprotein mediated efflux by vitamin E TPGS: influence on ATPase activity and membrane fluidity. *Molecular Pharma* 4:465–474
- Costa VCO, Tavares JF, Agra MF, Falcão-silva VS, Facanali R, Vieira MAR et al. (2008) Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R E Fries. *Rev Bras Farmacogn* 18:245–248
- Davies J, Wright GD (1997) Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol* 5:234–240
- Ding Y, Onodera Y, Lee JC, Hooper DC (2008) NorB, an efflux pump in *Staphylococcus aureus* strain MW2, contributes to bacterial fitness in abscesses. *J Bacteriol* 190:7123–7129
- Di Palma JR, Ritchie DM (1977) Vitamin toxicity. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 17:133–148
- Dos Santos A, Santos DO, de Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR et al. (2007) *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Bras Patol. Med Lab* 43:413–423
- Fluman N, Bibi E (2009) Bacterial multidrug transport through the lens of the major facilitator superfamily. *BBA-Prot Proteom* 1794:738–747
- Gibbons S (2004) Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat Prod Rep* 21:263–277
- Gibbons S (2005) Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. *Phytochem Rev* 4:63–78
- Hirayama KB, Speridião PGL, Fagundes NU (2006) Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa. *Electron J Pediatr Gastroenterol Nutr Liver Dis* 10:1–10
- Kalia NP, Mahajan P, Mehra R, Nargotra A, Sharma JP, Koul S et al. (2012) Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 67:2401–2408
- Kumar A, Schweizer HP (2005) Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Delivery Rev* 57:1486–1513
- Nicolson K, Evans G, Otoole PW (1999) Potentiation of methicillin, activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. *FEMS Microbiol Lett* 179:233–239
- Patel D, Kosmidis C, Seo SM, Kaatz GW (2010) Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents and Chemother* 54:5070–5073

- Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA (1996) Protondependent multi-drug efflux systems. *Microbiol Rev* 60:575–608
- Pereda-Miranda R, Kaatz GW, Gibbons S (2006) Polyacylated oligosaccharides from medicinal Mexican morning glory species as antibacterials and inhibitors of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Nat Prod* 69:406–409
- Perl TM (1999) The threat of vancomycin resistance. *Am J Med* 106:26S–37S
- Preto JB, Cechinel filho V, Noldin VF, Sartori MRK, Isaias DEB, Bella CAZ (2004) Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (clusiaceae/guttiferae). *Naturforsch* 59:657–662
- Schito GC (2006) The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 12:3–8
- Sikkema J, Bont JAM, Poolman B (1994) Interaction of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem* 269:8022–8028
- Silva DA, Falcão-Silva VS, Gomes SAY, da Costa DA, Lemos SV, Agra MF et al. (2009) Triterpenes and phenolic compounds isolated from the aerial parts of *Herissantia tiubae* and evaluation of 5, 4'-dihydroxy-3, 6, 7, 8, 3'-pentamethoxyflavone as a modulator of bacterial drug resistance. *Pharma. Biol* 47:279–284
- Smith ECJ, Kaatz GW, Seo SM, Wareham N, Williamson EM, Gibbons S (2007) The phenolic diterpene totarol inhibits multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 51:4480–4483
- Stavri M, Piddock LJ, Gibbons S (2007) Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J Antimicrob Chemother* 59:1247–1260
- Truong JT, Booth SL (2011) Emerging issues in vitamin K research. *J. ECAM* 16:73–79
- Turina AV, Nolan MV, Zygadlo JA, Perillo MA (2006) Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophys Chem* 122:101–113
- Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM (2000) Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol* 60:457–470
- Van Bambeke F, Glupczynski Y, Plésiat P, Pechère JC, Tulkens PM (2003a) Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother* 51:1055–1065
- Van Bambeke F, Michot JM, Tulkens PM (2003b) Antibiotic efflux pumps in eukaryotic cells: occurrence and impact on antibiotic cellular pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicodynamics. *J Antimicrob Chemother* 51:1067–1077
- Webber MA, Piddock LJV (2003) The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 51:9–11

5 CONCLUSÕES

- O ácido tânico mostrou atividade clinicamente relevante, contras todas as cepas testadas. Entretanto o mesmo se mostrou como um composto natural, com a capacidade efetiva de reduzir diferentes sistemas de efluxo, igual ou melhor que inibidores conhecidos de bomba de efluxo.
- Acredita-se que os ácidos tânicos podem ter sua ação direta na proteína de efluxo, assim inibindo sua atividade ou interferindo na expressão gênica através da interação com via de síntese da bomba de efluxo.
- As substâncias esteroidais ergosterol e colesterol apresentaram comportamentos semelhantes contra a maioria das cepas portadoras de efluxo, não reduzindo o efluxo das mesmas, por não ocorrer redução da concentração inibitória mínima. O único efeito sinérgico observado foi com a cepa selvagem, o que não caracteriza a ação por redução do efluxo. E em algumas cepas foram observados efeitos antagônicos.
- Entre as vitaminas lipossolúveis o colicalciferol mostrou capaz de inibir o efluxo, contra a cepa IS-58. A inibição do efluxo não foi observada com alfa-tocoferol em nenhuma cepa.
- A menadiona, além de mostrar atividade clinicamente relevante frente às cepas testadas, apresentou melhor resultado, de redução de efluxo, entre as vitaminas, mas especificamente nas cepas RN4220 e 1199B. Isto poder ser reforçado pelo fato de que na cepa selvagem, onde não há bomba de efluxo a concentração inibitória mínima foi aumentada na presença da menadiona.
- Também é possível que a inibição do efluxo observado com vitaminas lipossolúveis seja responsável por desestabilização de membrana, sendo que esse efeito pode afetar a funcionalidade da bomba de efluxo.

REFERÊNCIAS

- AHMED, M. et al. A protein that activates expression of a multidrug efflux transporter upon binding the transporter substrates. **Journal of Biological Chemistry**, 269, 28506–28513, 1994.
- AKIYAMA, H. et al. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, 48, 487-491, 2001.
- ALBRECHT, C.; VITURRO, E. The ABCA subfamily – gene and protein structures, functions and associated hereditary diseases. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, 453, 581–589, 2007.
- ANDRADE, J. C. **Avaliação in vitro do potencial modulador das vitaminas lipossolúveis colecalciferol, alfatocoferol e menadiona**. (Dissertação). Mestrado em Biorregulação Molecular. Universidade Regional do Cariri, 2013, 174f.
- ARGENTA, J. S. **Atividade in vitro, individual ou em combinação, de voriconazol, itraconazol e tribinafina contra isolados brasileiros de *Pythium insidiosum***. Dissertação 56f. Mestrado em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre – RS.
- ARMISTEAD, D. M. et al. Immunosuppressive compounds. **US19945330993**, 1994.
- BALABAN, N. et al. Auto inducer of virulence as a target for vaccine and therapy against *Staphylococcus aureus*. **Science**, 280, 438-40, 1998.
- BAMBEKE, F. V.; PAGES, J. M.; LEE, V. J. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. **Recent patents on anti-infective drug Discovery**, 1, 157-75, 2006.
- BARBEE, L. H. et al. *In vitro* synergy testing of novel antimicrobial combination therapies against *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 69, 1572–1578, 2014.
- BARRAL, D. et al. Vitamina d: uma abordagem molecular. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, 7, 309-315, 2007.
- BARRETT, E. J.; BARRETT, P. The parathyroid glands and vitamin D. *In*: BORON, F.; BOULPAEP, E. **Medical Physiology**. Philadelphia, PA: Saunders, Elsevier Science; pp. 1086-101, 2003.
- BATISTA, E. C. S.; COSTA, A. G. V.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Adição da vitamina E aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, 20, 525-535, 2007.
- BAY, D. C.; ROMMENS, K. L.; TURNER, R. J. Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, 1778, 1814-1838, 2008.

BERG, G. A. Vitamina E: un tema siempre presente, nunca concluído. **Revista Argentina de Cardiología**, 78, 2010.

BERNARD, L. et al. Comparative analysis and validation of different assays for glycopeptide susceptibility among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of microbiological methods**, 57, 231-239, 2004.

BHARDWAJ, K. A.; MOHANTY, P. Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: rejuvenating the antimicrobial chemotherapy. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, 7, 73-89, 2012.

BINA, X. R. et al. *Vibrio cholerae* RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine. **Infection and immunity**, 76, 3595-605, 2008.

BISCHOFF, M.; DUNMAN, P.; KORMANEC, J. Microarray-based analysis of the analysis of the *Staphylococcus aureus* δ B regulon. **Journal of bacteriology**, 186, 4085-4099, 2004.

BLAIR, J. M. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, 13, 42-51, 2015.

BLAKE, K. L.; O'NEILL, A. J. Transposon library screening for identification of genetic loci participating in intrinsic susceptibility and acquired resistance to antistaphylococcal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 68, 12-16, 2013.

BORNET, C. et al. Imipenem and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*. **Biochemical and biophysical research**, 301, 985-990, 2003.

BOSSCHE, H. V.; ENGELEN, M.; ROCHETTE, F. Antifungal agents of use in animal health – chemical, biochemical and pharmacological aspects. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, 26, 25-29, 2003.

BOUKI, E. et al. Antioxidant and pro-oxidant challenge of tannic acid in mussel hemocytes exposed to cadmium. **Marine environmental research**, 85, 13-20, 2013.

BRANDÃO, P. A. et al. Ácidos graxos e colesterol na alimentação humana. **Agropecuária Técnica**, 26,1, 2005.

BRAUNWALD, E. et al. **Harrison Medicina Interna**. 15. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2002.

BRENWALD, N. P.; GILL, M. J.; WISE, R. The effect of reserpine, an inhibitor of multi-drug efflux pumps, on the *in vitro* susceptibilities of fluoroquinolone-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* to norfloxacin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 40, 458-460, 1997.

BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. **International journal of antimicrobial agents**, 22, 205-210, 2003.

CAMARGO, E. R. **Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos, resíduos aquosos e das frações de acetato de etila de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Erva Mate).** (Dissertação). Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco - Bragança Paulista – SP, 2010, 87f.

CARVALHO, M. C.; BARGE, S. Suplementação com vitamina D em lactentes: que evidência? **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, 27, 302-309, 2011.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 1,70-66, 2005.

CATANIA, A. S.; BARROS, C. R.; FERREIRA, S. R. G. Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 53,5, 550-559, 2009.

CAVALCANTI, S. M. et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 9, 56-63, 2005.

CHAN, Y.Y. et al. Control of quorum sensing by a *Burkholderia pseudomallei* multidrug efflux pump. **Journal of bacteriology**, 189, 4320–4324, 2007.

CHEN, P. R. et al. An oxidation-sensing mechanism is used by the global regulator MgrA in *Staphylococcus aureus*. **Nature chemical biology**, 2,591-595, 2006.

CHEN, Z. Q. et al. The essential vertebrate ABCE1 protein interacts with eukaryotic initiation factors. **Journal of Biological Chemistry**, 281, 7452–7457, 2006.

CHEUNG, A. L. et al. The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. **The international journal of biochemistry & cell biology**, 40, 355-361, 2008.

CHOPRA, I. Glycylcyclines: third-generation tetracycline antibiotics. **Current opinion in pharmacology**, 1, 464–469, 2001.

_____. New developments in tetracycline antibiotics: glycylcyclines and tetracycline efflux pump inhibitors. **Drug Resistance Updates**, 3, 119-125, 2002.

CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R.; SALGADO, H. R. N. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Revista Brasileira de Farmácia**, 88, 3, 113-118, 2007.

CHUANCHUEN, R. et al. Cross-Resistance between Triclosan and Antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* Is Mediated by Multidrug Efflux Pumps: Exposure of a Susceptible Mutant Strain to Triclosan Selects nfxB Mutants Overexpressing MexCD-OprJ. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 45,428-432, 2001.

CHUNG, K. T. et al. Growth inhibition of selected aquatic bacteria by tannic acid and related compounds. **Journal of Aquatic Animal Health**, 7, 46–49, 1995.

CHUNG, K. T. et al. Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds. **Letters in Applied Microbiology**, 17, 29–32, 1993.

CHUNG, K. T. et al. Tannins and human health: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, 6, 421-464, 1998.

COBAN, A. Y.; EKINCI, B.; DURUPINAR, B. A multidrug efflux pump inhibitor reduces fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Chemotherapy**, 50, 22-6, 2004.

COSTA, L. M. **Investigação de atividades biológicas das riparinas A, B, C, D, E e F: Citotoxicidade, atividade antioxidante e potencial antiesquistossoma.** (Monografia). Curso de Graduação em Farmácia Generalista. Universidade Federal do Piauí, 2013.

COSTA, T. R. et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. **Nature reviews. Microbiology**, 13, 6, 343, 2015.

DAMON, M. et al. Plylloquinone (vitamin K1) content of vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, 18, 751-8, 2005.

DANTAS, A. T.; DUARTE, Â. L. B. P.; MARQUES, C. D. L. A vitamina D na artrite reumatóide e no lúpus eritematoso sistêmico. **Temas de Reumatologia Clínica**, 10, 52-59, 2009.

DIMENSTEIN, R. et al. Efeito da suplementação com vitamina E sobre a concentração de alfa-tocoferol no colostro humano. **Revista Panamericana de Salud Pública**, 29, 2011.

DOLEJSKA, M. et al. Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance nodulation cell division/multidrug efflux pump. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 68, 34–39, 2013.

DÔRES, S. M. C.; PAIVA, S. A. R.; CAMPANA, Á. O. Vitamina K: metabolismo e nutrição. **Revista de Nutrição**, 14, 207-218, 2001.

ESPINOSA-URGEL, M.; SALIDO, A.; RAMOS, J. L. Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. **Journal of bacteriology**, 182, 2363-2369, 2000.

FATH, M. J.; KOLTER, R. ABC transporters: bacterial exporters, **Microbiological reviews**, 57, 995– 1017, 1993.

FERREIRA, D. W. et al. Vitamin K contents of grains, cereals, fast-food breakfasts, and baked goods. **Journal of food science**, 71, 66-70, 2006.

FLETCHER, J. I. et al. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. **Nature Reviews Cancer**, 10, 147-156, 2010.

FOURNIER, B.; ARAS, R.; HOOPER, D. C. Expression of the multidrug resistance transporter NorA from *Staphylococcus aureus* is modified by a two-component regulatory system. **Journal of Bacteriology**, 182, 664–671, 2000.

FOURNIER, B. et al. A mutation in the 5'_untranslated region increases stability of *norA* mRNA, encoding a multidrug resistance transporter of *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, 183, 2367–2371, 2001.

FUNATOGAWA, K. et al. Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. **Microbiology and Immunology**, 48, 251–261, 2004.

FYFE, C.; SUTCLIFFE, J. A.; GROSSMAN, T. H. Susceptibility of tetracyclines to Tet (A) resistance is independent of interdomain loop sequence. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 57, 2430–2431, 2013.

GAJIWALA, K. S.; BURLEY, S. K. Winged helix proteins. **Current opinion in structural biology**, 10, 110–116, 2000.

GALI, H. U.; PERCHELLET, E. M.; PERCHELLET, J. P. Inhibition of tumor promoter-inducer ornithine decarboxylase activity by tannic acid and other polyphenols in mouse epidermis *in vivo*. **Cancer research**, 51, 2820–2825, 1991.

GERMAN, N.; KAATZ, G. W.; KERNS, R. J. Synthesis and evaluation of PSSRI-based inhibitors of *Staphylococcus aureus* multidrug efflux pumps. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, 18, 1368–1373, 2008.

GERMENDIA, L.; FAJARDO, A.; ALVAREZ-ORTEGA, C. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. **FEMS Microbiol Rev**, 33, 430–449, 2009.

GERTZ, S. et al. Characterization of the δB regulon in *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, 182, 6983–6991, 2000.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural product reports**, 21, 263–277, 2004.

GIBBONS, S.; OLUWATUYI, M.; KAATZ, G. W. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 1, 13–17, 2003.

GIBBONS, S.; UDO, E. E. The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux pumps, on the *in vitro* activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the tet (K) determinant. **Phytotherapy Research**, 2, 139–140, 2000.

GRKOVIC, S.; BROWN, M. H.; SKURRAY, R. A. Regulation of bacterial drug export systems. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 66, 4, 671–701, 2002.

GUAY, G. G.; KHAN, S. A.; ROTHSTEIN, D. M. The tet (K) gene of plasmid pT181 of *Staphylococcus aureus* encodes an efflux protein that contains 14 transmembrane helices. **Plasmid**, 2, 163–166, 1993.

GUINAZI, M. **Tocoferóis e tocotrienóis em hortaliças, ovos e óleos vegetais utilizados em restaurantes comerciais.** (Tese). Pós-Graduação em Ciência da Nutrição. Universidade Federal de Viçosa, 2004, 90f.

HAKOMORI, S. Glycosynapses: microdomains controlling carbohydrate-dependent cell adhesion and signaling. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 3, 553-572, 2004.

HAMPTON, T. Report reveals scope of US antibiotic resistance threat. **JAMA**, 310, 1661–1663, 2013.

HANSEN, L. H. et al. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*, **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 48 3332–3337, 2004.

HIGGINS, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man, **Annual review of cell biology**, 8, 67–113, 1992.

HINRICHS, W. et al. Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. **Science**, 264, 418–420, 1994.

HSIEH, P. C. et al. Bacteria lacking a multidrug pump: a sensitive tool for drug discovery. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 95, 6602–6606, 1998.

HUFFMAN, J. L.; BRENNAN, R. G. Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. **Current opinion in structural biology**, 12, 98–106, 2002.

INGAVALE, S.; VAN, W. W.; CHEUNG, A. L. Characterization of RAT, an autolysis regulator in *Staphylococcus aureus*. **Molecular microbiology**, 48,1451-1466, 2003.

INGAVALE, S. et al. Rat/MgrA, a regulator of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. **Infection and immunity**, 73, 1423-1431, 2005.

IWATSUKI, K. et al. *Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression.* **Journal of Dermatological Science**, 42, 203-214, 2006.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M.; FOSTER, T. J. Introduction of a *norA* promoter region mutation into the chromosome of a fluoroquinolonesusceptible strain of *Staphylococcus aureus* using plasmid integration. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 43, 2222–2224, 1999.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 39, 2650–2655, 1995.

KAATZ, G. W.; THYAGARAJAN, R. V.; SEO, S. M. Effect of promoter region mutations and *mgrA* overexpression on transcription of *norA*, which encodes a *Staphylococcus aureus* multidrug efflux trans-porter. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 2049, 161-169, 2005.

KAUR, S. et al. Antimutagenicity of hydrolysable tannins from *Terminalia chebula* in *Salmonella typhimurium*. **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 419, 169–179,1998.

KERR, I. D.; JONES, P. M.; GEORGE, A. M. Multidrug efflux pumps: The structures of prokaryotic ATP-binding cassette transporter efflux pumps and implications for our understanding of eukaryotic P-glycoproteins and homologues. **The FEBS journal**, 277, 550-563, 2010.

KHAN, B. A. et al. Investigational therapies targeting quorum-sensing for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections. **Expert opinion on investigational drugs**, 24,5,689-704, 2015.

KHAN, N. S.; AHMAD, A.; HADI, S. M. Anti-oxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. **Chemico-Biological Interactions**, 125, 177-189, 2000.

KHAN, N. S.; HADI, S. M. Structural features of tannic acid important for DNA degradation in the presence of Cu (II). **Mutagenesis**, 3, 271-274, 1998.

KLACK, K.; CARVALHO, J. F. Vitamina K: Metabolismo, Fontes e Interação com o Anticoagulante Varfarina. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 46, 398-406, 2006.

KOJIMA, S.; NIKAIDO, H. Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110, 2629–2634, 2013.

KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico microbiológico**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. **Advanced drug delivery reviews**, 57, 1486-1513, 2005.

KUMAR, N. et al. Crystal structure of the transcriptional regulator Rv1219c of *Mycobacterium tuberculosis*. **Protein Science**, 23, 423–432, 2014.

LEANÇA, C. C. et al. HDL: the yin-yang of cardiovascular disease. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 54, 777-784, 2010.

LEHNINGER, A. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LEWINSON, O.; BIBI, E. Evidence for simultaneous binding of dissimilar substrates by the *Escherichia coli* multidrug transporter MdfA. **Biochemistry**, 40, 12612–12618, 2001.

LI, X. Z.; NIKAIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. **Drugs**, 64, 159-204, 2004.

LIMA, D. C. et al. Snake venom: any clue for antibiotics and cam? **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 1, 39-47, 2005.

LIU, A. et al. Antibiotic sensitivity profiles determined with an *Escherichia coli* gene knockout collection: generating an antibiotic bar code. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 54, 1393–1403, 2010.

LOGUERCIO-LEITE, C. et al. A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares. **Biotemas**, 19,17-27, 2006.

LOMOVSKAYA, O. et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 45, 105-116, 2001.

LOMOVSKAYA, O.; LEWIS, K. Emr, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 89, 8938– 8942, 1992.

LUONG, T. T. et al. Transcription profiling of the *mgrA* regulon in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, 5, 1899–1910, 2006.

LUONG, T. T.; NEWELL, S. W.; LEE, C.Y. *Mgr*, a novel global regulator in *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, 185, 3703-3710, 2003.

LUTZ, L. et al. Clinical failure of vancomycin treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 7, 224-228, 2003.

MA, C.; CHANG, G. Structure of the multidrug resistance efflux transporter EmrE from *Escherichia coli*, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101, 2852–2857, 2004.

MA, D. et al. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, 175, 6299– 6313, 1993.

MAFRA, D.; ABDALLA, D. S. P.; COZZOLINO, S. M. F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. **Revista de Nutrição**, 12, 3,205-212, 1999.

MAJED, F. et al. Tannic acid mitigates the DMBA/croton oil-induced skin cancer progression in mice. **Molecular and cellular biochemistry**, 399, 217-228, 2015.

MALLEA, M. et al. Inhibitors of antibiotic efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains. **Biochemical and biophysical research communications**, 293,1370-1373,2002.

MARCUS, R.; COULSTON, A. M. Vitaminas. In: Goodman & Gilman. As bases farmacológicas de la terapéutica. 10 ed. México, **Mc Graw-Hill Interamericana**, 2, 1765-1772, 2003.

MARKHAM, P. N.; NEYFAKH, A. A. Inhibition of the multidrug transporter NorA prevents emergence of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 40, 2673-2674, 1996.

MARKHAM, P. N. et al. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 43,2404-2408, 1999.

MARQUES, C. D. L. et al. A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 50, 1, 67-80, 2010.

MARTINEAU, A. R.; TIMMS, P. M.; BOTHAMLEY, G. H. High-dose vitamin D3 during intensive-phase antimicrobial treatment of pulmonary tuberculosis: a double-blind randomised controlled trial. **The Lancet**, 6736, 242-250, 2011.

MELO, C. T. V. et al. Anxiolytic-like effects of (Omethyl)- N-2,6 dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 29, 451–454, 2006.

MIZUMO, T. et al. Inhibitory effect of tannic acid sulfate and related sulfates on infectivity, cytopathic effect, and giant cell formation of human immunodeficiency virus. **Planta Medica**, 58, 535–539, 1992.

MORETTI, P. E. **Projeto Microorganismos:** Fungo. Disponível em: <http://www.fam.br/microorganismos/microfun_citologia.htm>. Acesso em: 01 de abril de 2017.

MORITA, Y. et al. NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*, **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 42, 1778– 1782, 1998.

MOURÃO, D. M. et al. Biodisponibilidade de vitaminas lipossolúveis. **Revista Nutrição**, 18,529-39, 2005.

MUSZKAT, P. et al. Evidence-based non-skeletal actions of vitamin D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**,54,110-117, 2010.

MYERS, A. G. et al. Synthesis of tetracyclines and analogues thereof. **US7807842B2**, 2010.

NELSON, M. L.; ALEKSHUN, M. N. Substituted polyamines as inhibitors of bacterial efflux pumps. **WO2004062674A2**, 2004.

NEYFAKH, A. A. The multidrug efflux transporter of *Bacillus subtilis* is a structural and functional homolog of the *Staphylococcus* NorA protein. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 36,484–485, 1992.

NEYFAKH, A. A.; BORSCH, C. M.; KAATZ, G. W. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 37,128–129, 1993.

NG, E. Y.; TRUCKSIS, W. M.; HOOPER, D. C. Quinolone resistance mediated by *norA*: physiologic characterization and relationship to *flqB*, a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus aureus* chromosome. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 38, 1345–1355, 1994.

NIKAIDO, H.; TAKATSUKA, Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, 1794, 769-781, 2009.

NORRIS, A. L.; SERPERSU, E. H. Ligand promiscuity through the eyes of the aminoglycoside N3 acetyltransferase IIa. **Protein Science**, 22, 916–928, 2013.

OETHINGER, M.; LEVY, S. B. Methods of screening for compounds that reduce microbial resistance to fluoroquinolones. **US8012711B2**, 2011.

_____. Methods of reducing microbial resistance to drugs. **US6346391B1**, 2002.

OLIVEIRA, G. A. et al. Avaliação da tolerância à vancomicina em 365 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 37, 239-246, 2001.

OLSON, R. E. Vitamin K. *In*: SHILS, M.E., OLSON, J.A., SHIKE, M., ROSS, A.C. Modern nutrition in health and disease. **Baltimore**, Williams & Wilkins, 363-380,1999.

PABO, C. O.; SAUER, R. T. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. **Annual review of biochemistry**, 61, 1053–1095, 1992.

PAGES, J. M.; AMARAL, L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, 5, 826-833, 2009.

PAGES, J. M.; MASI, M.; BARBE, J. Inhibitors of efflux pumps in Gram negative bacteria. **Trends in molecular medicine**, 11, 382-389, 2005.

PAIXÃO, J. A.; STAMFORD, T. L. M. Vitaminas lipossolúveis em alimentos – uma abordagem analítica. **Química Nova**, 27,1, 96-105, 2004.

PARKINSON, J. S. Signal transduction schemes of bacteria. **Cell**, 73,857–871,1993.

PAULSEN, I. T. et al. The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs, **Molecular microbiology**, 19, 1167– 1175, 1996.

PIDDOCK, L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clinical microbiology reviews**, 19, 382–402, 2006.

_____. Multidrug-resistance efflux pumps-not just for resistance. **Nature Reviews Microbiology**, 4, 629-36, 2006.

POOLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. **Annals of medicine**, 39,162–176, 2007.

PRASCH, S.; BUCAR, F. Plant derived inhibitors of bacterial efflux pumps: an update. **Phytochemistry Reviews**, 14, 961-974, 2015.

PRINCIPE, L. et al. *In vitro* activity of doripenem in combination with various antimicrobials against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: possible options for the treatment of complicated infection. **Microbial Drug Resistance**, 19, 407–414, 2013.

RAMACHANDRAN, G. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: a brief review. **Virulence**, 5, 1, 213-218, 2014.

RAMOS, J. L. et al. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, 56,743-768, 2002.

ROBERT, S.; CHAMBERS, S. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue. **Internal medicine journal**, 35, 97-105, 2005.

ROMANOWSKA, J.; REUTER, N.; TRYLSKA, J. Comparing aminoglycoside binding sites in bacterial ribosomal RNA and aminoglycoside modifying enzymes. **Proteins**, 81, 63–80, 2013.

ROSS, J. I. et al. Minimal functional system required for expression of erythromycin resistance by *msrA* in *Staphylococcus aureus* RN4220. **Gene**, 1,143-148,1996.

ROTHSTEIN, D. M. et al. Detection of tetracyclines and efflux pump inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 37, 1624–1629, 1993.

SANCHEZ, P.; MORENO, E.; MARTINEZ, J. L. The biocide triclosan selects *Stenotrophomonas maltophilia* mutants that overproduce the SmeDEF multidrug efflux pump. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 49, 781-782, 2005.

SANTOS, A. et al. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 43, 413-423, 2007.

SANTOS, A. R.; CARVALHO, H. F. 4. Biomembranas. *In*: Carvalho, H. F. E. & Recco-Pimentel, S. M. (orgs). **A Célula 2001**. Ed. Manole, Barueri, Brasil, 39-56, 2001.

SARTORI, M. R. K. **Atividade antimicrobiana de frações e extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasilensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae)**. (Dissertação) Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Vale do Itajaí, Itajaí – SC, 2005, 81f.

SCHINDLER, B. D.; JACINTO, P.; KAATZ, G. W. Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: current status of potentiating existing antibiotics. **Future microbiology**, 4, 491-507, 2013.

SCHUMACHER, M. A. et al. Structural mechanisms of QacR induction and multidrug recognition. **Science**, 294, 2158–2163,2001.

SHORE, A. C. et al. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 55, 3765–3773, 2011.

SIERRA, N. et al. Validación de una metodología por cromatografía líquida de alta eficiencia para la determinación simultánea de vitaminas A, D3 y E en inyectables de uso veterinário. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**,43, 623-630, 2007.

SILVER, S.; PHUNG, L. T. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. **Annual Reviews in Microbiology**, 50,753-789, 1996.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. Ed. UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2010.

STAVRI, M.; PIDDOCK, L. J.; GIBBONS, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, 59, 1247-1260, 2007.

STRAHL, H.; ERRINGTON, J. Bacterial Membranes: Structure, Domains, and Function. **Annual Review of Microbiology**, 0, 2017.

SUSCHETET, M. Influence of tannic acid on the hepatic content of vitamin A in rats fed a vitamin A containing diet or a vitamin A deficient diet. **C. Real Seances Sociedad Biological Files**, 169, 970, 1975.

TAKANASHI, K.; SHITAN, N.; YAZAKI, K. The multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family in plants. **Plant Biotechnology**, 31, 417-430, 2014.

THEVISSSEN, K. et al. Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. **Peptides**, 24, 11, 1705-1712, 2003.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia-12ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia. Staphylococcus aureus**. São Paulo: Atheneu, 2005.

TRUONG-BOLDUC, Q. C. et al. Transcriptional profiling analysis of the global regulator NorG, a GntR-like protein of *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, 193, 6207-6214, 2011.

TRUONG-BOLDUC, Q. C. et al. MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, 187, 2395-2405, 2005.

TRUONG-BOLDUC, Q. C.; DING, Y.; HOOPER, D. C. Posttranslational modification influences the effects of MgrA on *norA* expression in *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, 190, 7375-7378, 2008.

TRUONG-BOLDUC, Q. C.; HOOPER, D. C. The transcriptional regulators NorG and MgrA modulate resistance to both quinolones and β -lactams in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, 189, 8, 2996-3005, 2007.

_____. Phosphorylation of MgrA and its effect on expression of the NorA and NorB efflux pumps of *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, 192, 2525-2534, 2010.

TRUONG-BOLDUC, Q. C.; STRAHILEVITZ, J.; HOOPER, D. C. NorC: a new efflux pump regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 3, 1104-1107, 2006.

TSENG, T. T. et al. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, 1,107–125, 1999.

UNEMO, M. et al. High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: novel *penA* mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 56, 1273–1280, 2012.

URBINA, J. A Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**,104,311-318, 2009.

VAN, B. F.; PAGES, J. M.; LEE, V. J. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. **Recent patents on anti-infective drug Discovery**, 1,157-175, 2006.

VARGIU, A. V.; NIKAIDO, H. Multidrug Binding Properties of the AcrB Efflux Pump Characterized by Molecular Dynamics Simulations. **Biophysical Journal**, 104(2), 285-286, 2013.

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Pública de México**, 47, 381-387, 2005.

WAGNER, C. L.; GREER, F. R. Section on Breastfeeding and Committee on Nutrition. Prevention of rickets and vitamin D deficiency in infants, children and adolescents. **Pediatrics**,122, 1142-1152, 2008.

WALKER, D.; FOWLER, T. **Annual Report of the Chief Medical Officer: Volume Two, 2011: Infections and the Rise of Antimicrobial Resistance** (Department of Health, 2011).

WEF. World Economic Forum. **Global Risks 2014** - Eighth Edition Disponível em: <<http://www.weforum.org/reports/global-risks-2013-eighth-edition>>. Acesso em: 20 de maio de 2018.

WESTFALL, C. S.; LEVIN, P. A. Bacterial Cell Size: Multifactorial and Multifaceted. **Annual Review of Microbiology**,71, 1, 2017.

WHITFIELD, C.; TRENT, M. S. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. **Annual review of biochemistry**, 83, 99-128, 2014.

WHO. World Health Organization. **Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance** 2014 <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> 2014.

WOZNIAK, R. A.; WALDOR, M. K. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. **Nature Reviews Microbiology**, 552–563, 2010.

YARWOOD, J. M. et al. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. **Journal of bacteriology**, 186,6, 1838-1850, 2004.

YOSHIDA, H. et al. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* norA gene, which confers resistance to quinolones. **Journal of Bacteriology**, 172, 6942–6949, 1990.

YOSHIHARA, E.; INOKO, H. Method or agent for inhibiting the function of efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. **US7985410B2**, 2011.

YU, J. L.; GRINIUS, L.; HOOPER, D. C. NorA functions as a multidrug efflux protein in both cytoplasmic membrane vesicles and reconstituted proteoliposomes. **Journal of bacteriology**, 184, 1370–1377, 2002.

ZECHINI, B.; VERSACE, I. Inhibitors of multidrug resistant efflux systems in bacteria. **Recent patents on anti-infective drug Discovery**, 4, 37-50, 2009.

ZGURSKAYA, H. I.; NIKAIDO, H. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. **Molecular microbiology**, 37, 219–225, 2000.

ZHAO, G. et al. Antibacterial properties of tannic acid and related compounds against the fish pathogen *Cytophaga columnaris*. **Journal of Aquatic Animal Health**, 9, 309–313, 1997.

ZHELEZNOVA, E. E. et al. Structural basis of multidrug recognition by BmrR, a transcription activator of a multidrug transporter. **Cell**, 96, 353–362, 1999.

ZHELEZNOVA, H. E. E.; BRENNAN, R. G. Crystal structure of the transcription activator BmrR bound to DNA and a drug. **Nature**, 409, 378–382, 2001.

APÊNDICE A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA (2015-2018)



Analysis of bioactivities and chemical composition of *Ziziphus joazeiro* Mart. using HPLC-DAD



Sharlene M.O. Brito^a, Henrique D.M. Coutinho^{b,*}, Andre Talvani^c, Cathia Coronel^d,
 Andreza G.R. Barbosa^a, Celeste Vega^d, Fernando G. Figueredo^b, Saulo R. Tintino^b, Luciene F. Lima^b,
 Aline A. Boligon^e, Margareth L. Athayde^c, Irwin R.A. Menezes^{a,*}

^aPharmacology and Medicinal Chemistry Laboratory, Department of Chemical Biology, Regional University of Cariri, Crato, Ceará, Brazil

^bLaboratory of Microbiology and Molecular Biology, Regional University of Cariri, Crato, Brazil

^cLaboratory of Chagas Disease, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil

^dPhysicochemical Research Laboratory, Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

^eCentro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Fundación Miséles Bertoni/Laboratorios Díaz Gil, Asunción, Paraguay

academicJournals

Vol. 9(5), pp. 326-331, 4 February, 2015

DOI: 10.5897/AJMR2014.7039

Article Number: 1B7882D50475

ISSN 1996-0808

Copyright © 2015

Author(s) retain the copyright of this article

<http://www.academicjournals.org/AJMR>

African Journal of Microbiology Research

Full Length Research Paper

Modulatory activity and chemical profile of a hydroalcoholic extract of *Crateva tapia* L.

Daniela L. de V. Cabral¹, Valérium T. N. A. Castro¹, Henrique Douglas Melo Coutinho², Saulo Relison Tintino², Cícero Diego Almino Menezes², Irwin R. A. Menezes²,
 Ulysses Paulino de Albuquerque³ and Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim^{1*}



Research Article

Phytochemical Analysis and Modulation of Antibiotic Activity by *Luehea paniculata* Mart. & Zucc. (Malvaceae) in Multiresistant Clinical Isolates of *Candida* Spp.

João T. Calixto Júnior,^{1,2,3} Selene M. Morais,^{1,2} Clécio G. Martins,¹ Larissa G. Vieira,¹ Maria Flaviana B. Morais-Braga,⁴ Joara N. P. Carneiro,⁴ Antonio J. P. Machado,⁴ Irwin R. A. Menezes,⁵ Saulo R. Tintino,⁴ and Henrique D. M. Coutinho⁴

¹Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Estadual do Ceará (UECE), 60740-000 Fortaleza, CE, Brazil

²Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), 60740-000 Fortaleza, CE, Brazil



Toxicology Research

PAPER



Cite this: *Toxicol. Res.*, 2015, 4, 634

Eugenia uniflora leaves essential oil induces toxicity in *Drosophila melanogaster*: involvement of oxidative stress mechanisms†

Francisco Assis Bezerra da Cunha,^a Gabriel Luz Wallau,^b Antonio Ivanildo Pinho,^a Mauro Eugenio Medina Nunes,^b Nadghia Figueiredo Leite,^a Saulo Relison Tintino,^a Galberto Martins da Costa,^c Margareth Linde Athayde,^b Aline Augusti Boligon,^b Henrique Douglas Melo Coutinho,^a Antonio Batista Pereira,^b Thais Posser^b and Jeferson Luis Franco^{a,b}

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA
DE AMINOGLICOSÍDEOS DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf**

**Evaluación de la Actividad Antibacteriana y Moduladora de
Aminoglicósidos de Aceite Escencial de *Cymbopogon Citratus* (DC.) Stapf**

**Evaluation of Antibacterial Activity of Aminoglycosides and
Modulating the Essential Oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf**

Bruno F. F. LUCENA¹, Saulo R. TINTINO^{1*}, Fernando G. FIGUEREDO^{1,2}, Cícera Datiane DE M. OLIVEIRA³, José J. DOS S. AGUIAR¹, Edmilson DO N. CARDOSO², Pedro E. A. DE AQUINO², Jacqueline C. ANDRADE¹, Henrique D. M. COUTINHO¹, Ednardo F. F. MATIAS¹.

¹ Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri. Rua Cel. Antonio Luis, 1161, Pimenta, 63105-000. Crato, CE, Brasil.

² Laboratorio de Microbiologia, Faculdade Leão Sampaio. Av. Leão Sampaio, Km 3, CEP 63000-000 Juazeiro do Norte, CE, Brasil.

³ Laboratório de Farmacologia e Química Medicinal, Universidade Regional do Cariri. Rua Cel. Antonio Luis, 1161, Pimenta, 63105-000. Crato, CE, Brasil.

*For correspondence. saulorelison@gmail.com

Journal of Food and Nutrition Research, 2015, Vol. 3, No. 8, 540-549

Available online at <http://pubs.sciepub.com/jfnr/3/8/9>

© Science and Education Publishing

DOI:10.12691/jfnr-3-8-9



Obesity and Natural Products

Patrícia Rosane Leite de Figueiredo, Ana Luíza de Albuquerque Siebra, Luiz Jardelino de Lacerda Neto, Larissa Rollin de Oliveira, Andreza Guedes Barbosa Ramos, Gyllyandeson de Araújo Delmondes, Izabel Cristina Santiago Lemos, Cícera Norma Fernandes, Saulo Relison Tintino, Álefe Brito Monteiro, Dayanne Rakelly de Oliveira, Francisco Elizando de Brito Junior, Francisca Valéria Soares de Araújo Pinho, Valter Menezes Barbosa Filho, Francisco Assis Bezerra da Cunha, Alexandre Magno Rodrigues Teixeira, Roseli Barbosa, Diniz Maciel de Sena Junior, Cicero Francisco Bezerra Felipe, José Galberto Martins da Costa, Henrique Douglas Melo Coutinho, Irwin Rose de Alencar Menezes, Marta Regina Kerntopf

Department of Biological Chemistry, University of Region of Cariri – URCA, Av. Cel Antonio Luis, 1161, Crato (CE), Brazil

*Corresponding author: martareginakerntopf@outlook.com

Research Article

In Vitro Antimicrobial and Modulatory Activity of the Natural Products Silymarin and Silibinin

Dayanne Rakelly de Oliveira,¹ Saulo Relison Tintino,²
Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga,² Aline Augusti Boligon,³
Margareth Linde Athayde,³ Henrique Douglas Melo Coutinho,²
Irwin Rose Alencar de Menezes,⁴ and Roselei Fachinetti^{1,5}

ETNOFARMACOLOGIA

DOI 10.5935/2446-4775.20150009

Efeito antibacteriano e anti-inflamatório tópico do extrato metanólico de *Chenopodium ambrosioides* L.

Antibacterial and topical anti-inflammatory effect of methanol extract of *Chenopodium ambrosioides* L.

¹Nara L. F. Pereira; ²Pedro E. A. Aquino; ²Monalisa R. Silva; ³Eloiza M. Nascimento; ³Ana R. S. Grangeiro; ⁴Cícera D. M. Oliveira; ⁴Saulo R. Tintino; ⁴Fernando G. Figueiredo; ⁴Helenicy N. H. Veras; ⁴Irwin R. A. Menezes



ACTA BIOLÓGICA COLOMBIANA

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/index>

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

In vitro EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL AND MODULATORY ACTIVITIES OF CORN AND SOY FIXED OILS

Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana y moduladora de aceites de maíz y soja

Emanuele N. TAVARES¹, Jacqueline C. ANDRADE¹, Cícera Datiane De M. OLIVEIRA¹, Saulo R. TINTINO³, Micheline A. LIMA², Henrique D.M. COUTINHO¹.

¹ Universidade Regional do Cariri-URCA. Av. Cel. Antonio Luiz, 1161. Crato, CE, Brazil.

² Universidade Federal da Paraíba, UFPB. Cidade Universitária, Campus I. Phone: João Pessoa, PB, Brazil.

For correspondence. hdmcoutinho@gmail.com



ACTA BIOLÓGICA COLOMBIANA

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/index>

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN / ORIGINAL RESEARCH PAPER

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E EFEITO COMBINADO SOBRE DROGAS ANTIFÚNGICAS E ANTIBACTERIANAS DO FRUTO DE *Morinda citrifolia* L.

Antimicrobial Activity and Combined Effects on Antifungal and Antibacterial Drugs the Fruit of *Morinda citrifolia* L.

Actividad antimicrobiana y efecto combinado sobre medicamentos antifúngicos y antibacterianos del fruto de *Morinda citrifolia* L.

Saulo R. TINTINO¹, Abel A. de C. NETO², Irwin R. A. MENEZES³, Cícera Datiane de M. OLIVEIRA³, Henrique D. M. COUTINHO¹

¹ Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri. Rua Cel. Antonio Luis, 1161, Pimenta, CEP 63105-000. Crato, CE, Brasil.

² Laboratório de Microbiologia, Faculdade Leão Sampaio. Av. Leão Sampaio, Km 3, CEP 63000-000 Juazeiro do Norte, CE, Brasil.

³ Laboratório de Farmacologia e Química Medicinal, Universidade Regional do Cariri. Rua Cel. Antonio Luis, 1161, Pimenta, CEP 63105-000. Crato, CE, Brasil.

For correspondence. saulorelison@gmail.com

PRODUCTOS NATURALES

Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante, antifúngica e moduladora do extrato etanólico de *Anadenanthera macrocarpa* (BERTH) BRENAN

Chemical characterization and antioxidant, antifungal and modulating activity of the alcohol extract from *Anadenanthera macrocarpa* (Berth) Brenan

Caracterización química y actividad antioxidante, antifúngica y moduladora del extracto alcohólico de *Anadenanthera macrocarpa* (Berth) Brenan

Vivianne Inácio Leite,^I Cícera Datiane de Morais Oliveira,^{II} Jakson Gomes Figueredo,^{III} Pablo Antônio Maia de Farias,^{III} Saulo Relison,^{II} Edinaldo Fagner Ferreira Matias,^I Pedro Everson Alexandre de Aquino,^I Henrique Douglas Melo Coutinho,^{II} João Victor de Alencar Ferreira,^{II} Luciene Ferreira de Lima,^{II} Fernando Gomes Figueredo^{I,III}



ORIGINAL ARTICLE

Phenolic composition and antiparasitic activity of plants from the Brazilian Northeast “Cerrado”



João Tavares Calixto Júnior^a, Selene Maia de Morais^a, Celeste Vega Gomez^b,
 Cathia Coronel Molas^b, Miriam Rolon^b, Aline Augusti Boligon^d,
 Margareth Linde Athayde^d, Cícera Datiane de Morais Oliveira^c,
 Saulo Relison Tintino^c, Henrique Douglas Melo Coutinho^{c,*}

^a Post Graduation Biotechnological Programme – RENORBIO, Laboratory of Natural Products, State University of Ceará, Itaperi Campus, Fortaleza, Ceará, Brazil

1632

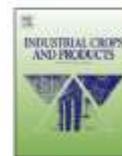
Original Article

CHEMICAL COMPOSITION, ANTIBACTERIAL AND MODULATORY ACTION OF THE ESSENTIAL OIL OF *Croton rhamnifolioides* LEAVES Pax and Hoffman

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, AÇÃO ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE Croton rhamnifolioides Pax and Hoffman

Cinara Soares VIDAL¹; Cícera Datiane Morais OLIVEIRA-TINTINO¹; Saulo Relison TINTINO³; Hericka Bruna Figueiredo GALVAO⁴; José Galberto Martins da COSTA²; Henrique Douglas Melo COUTINHO^{3*}; Irwin Rose Alencar de MENEZES¹

1. Department of Biological Chemistry, Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry, Regional University of Cariri-URCA, Crato-CE, Brazil; 2. Department of Biological Chemistry, Laboratory of Research in Natural Product, Regional University of Cariri - URCA, Crato, CE, Brazil; 3. Department of Biological Chemistry, Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Regional University of Cariri, URCA, Crato-CE, Brazil.; 4. St George's, University of London, Cranmer Terrace, London - SW17 0RE



Short communication

HPLC profile and antibiotic-modifying activity of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae)



Jannyketchuly S. Cristo^a, Edinaldo F.F. Matias^a, Fernando G. Figueredo^a,
 Joycy F.S. Santos^b, Nara L.F. Pereira^a, José G.A.S. Junior^a, Pedro E.A. Aquino^a,
 Maria N.F. Nogueira^a, Jaime Ribeiro-Filho^a, Francisco de A.B. Cunha^c, Maria S. Costa^c,
 Fabia F. Campina^c, Saulo R. Tintino^c, Cristiane C.M. Salgueiro^b,
 Henrique D.M. Coutinho^{c,*}



ISSN 1983-4209 – Volume 12 – Número 03 – 2016

**PRODUÇÃO SINTÉTICA DE NUTRACÊUTICOS X EXTRAÇÃO NATURAL:
 ASPECTOS POSITIVOS DA PRODUÇÃO SINTÉTICA DE VITAMINAS
 LIPOSSOLÚVEIS SOBRE A EXTRAÇÃO ORGÂNICA EM VEGETAIS PARA
 CONSERVAÇÃO DA DIVERSIDADE BIOLÓGICA**

Henrique Coutinho¹, Jacqueline Cosmo Andrade², Saulo Relison Tintino³, Thiago Sampaio Freitas³

Artículos de investigación científica

Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora dos extratos metanólico e hexânico da folha de *Allium cepa*

Evaluation of the Antibacterial and Modulating Activity of Methanolic and Hexanic Extracts of the Allium Cepa Leaf

Evaluación de la Actividad Antibacteriana y Moduladora de los Extractos metanol y Hexano de la Hoja de *Allium cepa*

Ana JF Cruz MD¹, Israel P Brito MD¹, Maria AF Sobral MD¹, Amanda TL Sousa MD¹, Erivaní F Alves MD¹, Raul S Andreza MD¹, Sarah S Ferreira MsC¹, Roberta O Costa MsC¹, Fernando G Figueredo MsC¹, Tássia Tam Guedes MsC¹, Raket O Macêdo MD¹, Tatianne RG Ribeiro PhD¹, Livia MG Leandro MD¹, Cícera DM Oliveira MsC², Saulo R Tintino PhD², Maria S Costa MD², Pedro EA Aquino MsC³

Recibido: 12 de marzo de 2015 • Aceptado: 11 de septiembre de 2015



HPLC-DAD phenolic profile, cytotoxic and anti-kinetoplastidae activity of *Melissa officinalis*

Francisco Cunha, Saulo R. Tintino, Fernando Figueredo, Luiz Barros, Antonia E. Duarte, Maria Celeste Vega Gomez, Cathia Cecilia Coronel, Mirian Rolón, Nadghia Leite, Celestina E. Sobral-Souza, S. V. Brito, Emily Pansera Waczuc, Aline Augusti Boligon, Margareth Athayde, Jean Paul Kamdem, Henrique Douglas Melo Coutinho & Jéferson Franco

Revista Cubana de Plantas Medicinales 2016;21(1):71-82

ARTÍCULO ORIGINAL

Avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora do extrato etanólico de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz

Evaluación de la actividad antimicrobiana y modulatória del extracto etanólico de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz

Evaluation of antimicrobial and modulatory activity of the ethanol extract of *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz

João Victor de Alencar Ferreira,¹ Luciene Ferreira de Lima,¹ Fernando Gomes Figueredo,¹ Edinaldo Fagner Ferreira Matias,¹ Elba Sobral de Souza,¹ Jacqueline Cosmo Andrade,¹ Saulo Relison Tintino,¹ Nadghia Figueiredo Leite,¹ Rosimeire Sabino Albuquerque,¹ Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga,¹ Francisco Assis Bezerra da Cunha,¹ José Galberto Martins da Costa,^{II} Henrique Douglas Melo Coutinho¹

ARTÍCULOS ORIGINALES

Avaliação da atividade anti-Leishmania e anti-Trypanosoma do extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* L.

Evaluation of the anti-leishmania and anti-trypanosoma activity of ethanolic extract from the leaves of *Annona squamosa* L.

Sobreira Dantas Nóbrega de Figueiredo, Francisco Rodolpho¹; de Araújo Delmondes, Gyllyanderson²; Paulo da Cruz, Luzia¹; Amaro do Nascimento, Erika¹; Relison Tintino Saulo³; Santiago Lemos, Izabel Cristina¹; Bezerra da Cunha, Francisco Assis²; Vega Gomez, Maria Celeste²; Coronel, Cathia²; Martins da Costa, José Galberto⁴; Melo Coutinho, Henrique Douglas²; Bezerra Felipe, Cícero Francisco¹; Alencar de Menezes, Irwin Rose¹; Kerntopf, Marta Regina^{1*}

¹Laboratório de Farmacologia e Química Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato-CE. Rua Cel. Antônio Luís, 1161, Pimenta, CEP: 63105-00. Fone: +55 (88) 3102 1212; Fax: +55(88)31021291. ²Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Regional do Cariri, Crato-CE. ³Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Fundación Moisés Bertoní/Laboratorios Diaz Gill, Asunción-Paraguay. ⁴Laboratório de Pesquisa com Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato-CE. *martareginakerntopfm@outlook.com

Hindawi Publishing Corporation
Scientifica
Volume 2016, Article ID 4154265, 5 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/4154265>



Research Article

Cytoprotective Effect of *Lygodium venustum* Sw. (Lygodiaceae) against Mercurium Chloride Toxicity

Fernando G. Figueredo, Luciene F. Lima, Maria Flaviana B. Morais-Braga, Saulo R. Tintino, Pablo A. M. Farias, Edinaldo F. F. Matias, José Galberto M. Costa, Irwin R. A. Menezes, Raimundo L. S. Pereira, and Henrique D. M. Coutinho

Microbial Pathogenesis 99 (2016) 56–61



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

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



Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol



Valéria N. Lima ^a, Cícera D.M. Oliveira-Tintino ^b, Enaide S. Santos ^c, Luís P. Morais ^d, Saulo R. Tintino ^a, Thiago S. Freitas ^a, Yuri S. Geraldo ^c, Raimundo L.S. Pereira ^a, Rafael P. Cruz ^a, Irwin R.A. Menezes ^b, Henrique D.M. Coutinho ^{a,*}

Atividade moduladora sobre antibióticos pelo extrato aquoso das folhas de *Bauhinia unguolata* L.

Actividad modulador acerca de antibióticos por el extracto acuoso de las hojas de *Bauhinia unguolata* l.

Modulatory activity about antibiotics by aqueous extract of the leaves of *Bauhinia unguolata* l.

Giovana Mendes de Lacerda,^I Álefe Brito Monteiro,^I Saulo Relison Tintino,^{II} Gyllyandeson de Araújo Delmondes,^I Cícera Norma Fernandes,^I Izabel Cristina Santiago Lemos,^I Emmily Petícia do Nascimento,^I Tatyelle Bezerra Carvalho,^I Henrique Douglas Melo Coutinho,^{II} Irwin Rose Alencar de Menezes,^{III} Marta Regina Kerntopf,^I

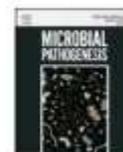
Microbial Pathogenesis 95 (2016) 200–207



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

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



Psidium guajava L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: Chemical composition and anti – *Candida* effect in association with fluconazole



Maria Flaviana B. Morais-Braga ^{a,*}, Débora L. Sales ^b, Joara Nalyda P. Carneiro ^a, Antonio Júdsom T. Machado ^a, Antonia Thassya L. dos Santos ^a, Maria Audilene de Freitas ^b, Gioconda Morais de A. Bezerra Martins ^b, Nadghia Figueiredo Leite ^a, Yedda Maria L.S. de Matos ^a, Saulo R. Tintino ^a, Djair S.L. Souza ^c, Irwin R.A. Menezes ^b, Jaime Ribeiro-Filho ^d, José G.M. Costa ^b, Henrique D.M. Coutinho ^b



Natural Product Research
Formerly Natural Product Letters



ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/ngnpl20>

Additive effect of *Lygodium venustum* SW. in association with gentamicin

Maria F. B. Morais-Braga, Teógenes M. Souza, Karla K. A. Santos, Gláucia M. M. Guedes, Jacqueline C. Andrade, Saulo R. Tintino, Celestina E. Sobral-Souza, José G. M. Costa, Antonio A. F. Saraiva & Henrique D. M. Coutinho

BIOTA
AMAZÔNIA
OPEN JOURNAL SYSTEM



ARTIGO

DOI: <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v6n1p64-69>

Efeito antibacteriano e antifúngico de extratos etanólico, hexânico e metanólico a partir de folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers (Malva corama) contra cepas multi-resistentes a drogas

Paloma de Souza Santana^{1*}, Raul Sousa Andreza¹, Vivianne Inácio Leite¹, Priscila Caracas Vieira de Sousa², Amanda Aragão Alves², Saulo Relison Tintino³, Cícera Datiane Morais de Oliveira⁴, Fernando Gomes Figueredo⁵, Gabriel Gusmão Grisi Rocha⁷, Ana Luiza de Aguiar Rocha Martin⁸, Bruna Suellen Pereira⁹, Roberta Oliveira da Costa⁶, Francisco Adelvane de Paulo Rodrigues¹⁰, Livia Maria Garcia Leandro¹, Pedro Everson Alexandre de Aquino¹¹

Artículos de investigación científica

Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos metanólico e hexânico do caule folhado de *Melissa Officinalis* L.

Evaluation of the Antibacterial Activity of Methanolic and Hexanic Extracts of Puff Pastry Stem, *Melissa Officinalis* L.

Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos metanol y hexano, el tallo rodadura *Melissa Officinalis* L.

Amanda T. L. de Sousa MD¹, Raul de S. Andreza MD¹, Erievania F. Alves MD¹, Ana J. F. Cruz MD¹, Livia M. G. Leandro MD¹, Tássia T. de A. M. Guedes MD¹, Rakele O. de Macêdo MD¹, Luciene F. de Lima MD², Cícera Datiane M. de Oliveira-Tintino MD², Henrique DM Coutinho PhD², Saulo R. Tintino PhD³, Priscila C. V. de Sousa MSc⁴, Pedro E. A. de Aquino MSc⁴

Recibido: 12 de marzo de 2015 • Aceptado: 13 de septiembre de 2015

ARTÍCULO ORIGINAL

Atividade antibacteriana e moduladora *in vitro* de extrato metanólico e hexânico de *beta vulgaris* spp. (Linnaeus)

Actividad antibacteriana y modulación *in vitro* de extractos de metanol y hexano del *beta vulgaris* spp. (Linnaeus)

Antibacterial activity and modulatory *in vitro* methanol and ethanol extracts of *beta vulgaris* spp. (Linnaeus)

Maria Aline Ferreira Sobral,^I Raul de Sousa Andreza,^I Erivanira Ferreira Alves,^I Ana Jessica Furtado Cruz,^I Amanda Talita Lopes de Sousa,^I Cícera Datiane de Morais Oliveira,^{II} Saulo Relison Tintino,^{II} Livia Maria Garcia Leandro,^I Pedro Everson Alexandre de Aquino,^{III} Luciene Ferreira de Lima^{II}



ORIGINAL ARTICLE

Menadione (vitamin K) enhances the antibiotic activity of drugs by cell membrane permeabilization mechanism



Jacqueline C. Andrade^a, Maria Flaviana B. Morais Braga^a,
Gláucia Morgana M. Guedes^a, Saulo R. Tintino^a, Maria A. Freitas^a,
Lucindo J. Quintans Jr.^b, Irwin R.A. Menezes^a, Henrique D.M. Coutinho^{a,*}

Environ Sci Pollut Res
DOI 10.1007/s11356-017-9366-x



PLANT-BORNE COMPOUNDS AND NANOPARTICLES: CHALLENGES FOR MEDICINE, PARASITOLOGY AND ENTOMOLOGY

Toxicity against *Drosophila melanogaster* and antiedematogenic and antimicrobial activities of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae)

Henrique Douglas Melo Coutinho¹ • Cicera Datiane de Morais Oliveira-Tintino² •
Saulo Relison Tintino¹ • Raimundo Luiz Silva Pereira¹ • Thiago Sampaio de Freitas¹ •
Maria Arlene Pessoa da Silva³ • Jeferson Luis Franco⁴ •
Francisco Assis Bezerra da Cunha⁵ • José Galberto Martins da Costa⁶ •
Irwin Rose Alencar de Menezes² • Aline Augusti Boligon⁷ •
João Batista Teixeira da Rocha⁷ • Maria Ivaneide Rocha¹ •
Joyce Francely Sampaio dos Santos⁵

Food and Chemical Toxicology 107 (2017) 572–580



Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening



M.S. Regueira Neto^{a,*}, Saulo Relison Tintino^b, Ana Raquel Pereira da Silva^b,
Maria do Socorro Costa^b, Aline Augusti Boligon^c, Edinardo F.F. Matias^d,
Valdir de Queiroz Balbino^e, Irwin R.A. Menezes^b, Henrique Douglas Melo Coutinho^b

Modulação *in vitro* da atividade antibiótica pelo óleo essencial dos frutos de *Piper tuberculatum* Jacq**Modulación *in vitro* de la actividad antibiótica por el aceite esencial de frutos de *Piper tuberculatum* Jacq*****In vitro* modulation of the antibiotic activity of essential oil from fruits of *Piper tuberculatum* Jacq**

Valterlúcio dos Santos Sales, Emmily Petícia do Nascimento, Álefe Brito Monteiro, Maria Haiele Nogueira da Costa, Gyllyandeson de Araújo Delmondes, Tereza Raquel Carneiro Soares, Saulo Relison Tintino, Francisco Rodolpho Sobreira, Dantas Nóbrega de Figuêiredo, Cristina Kelly de Souza Rodrigues, José Galberto Martins da Costa, Henrique Douglas Melo Coutinho, Cícero Francisco Bezerra Felipe, Irwin Rose Alencar de Menezes, Marta Regina Kerntopf

Industrial Crops & Products 109 (2017) 724–729

Contents lists available at ScienceDirect



Industrial Crops & Products

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

Short communication

Trypanocide, antileishmania and cytotoxic activities of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* L *in vitro*



Pedro S. Pereira^a, Ana J. Maia^b, Saulo R. Tintino^b, Cícera Datiane de M. Oliveira-Tintino^a, Iranir Sâmia de S. Raulino^b, Maria C. Vega^b, Miriam Rolón^b, Cathia Coronel^b, Luiz Marivando Barros^c, Antônia Eliene Duarte^c, Irwin R.A. de Menezes^d, Henrique D.M. Coutinho^{e,*}, Teresinha G. da Silva^a



Stryphnodendron rotundifolium Mart. As an Adjuvant for the Plant Germination and Development Under Toxic Concentrations of HgCl_2 and AlCl_3

Henrique D. M. Coutinho · Gioconda M. A. B. Martins · Maria F. B. Morais-Braga · Irwin R. A. Menezes · Antônio J. T. Machado · Maria A. Freitas · Antônia T. L. Santos · Maria S. Costa · Fábía F. Campina · Ana Raquel P. Silva · Luciene F. Lima · Nadghia F. Leite · Saulo R. Tintino

Food and Chemical Toxicology 109 (2017) 957–961



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

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



Inhibition of the TetK efflux-pump by the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. and α -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58



Paulo W. Limaverde^a, Fábía F. Campina^a, Francisco A.B. da Cunha^a, Francidalva D. Crispim^a, Fernando G. Figueredo^a, Luciene F. Lima^a, Cicera Datiane de M. Oliveira-Tintino^b, Yedda M.L. S. de Matos^a, Maria Flaviana B. Morais-Braga^a, Irwin R.A. Menezes^b, Valdir Q. Balbino^c, Henrique D.M. Coutinho^{a,*}, José P. Siqueira-Júnior^d, Jackson R.G.S. Almeida^e, Saulo R. Tintino^a

Microbial Pathogenesis 115 (2018) 175–178



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

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



Evaluation of antibacterial and modifying action of catechin antibiotics in resistant strains



Fernanda Mateus Silva Gomes^a, Jayze da Cunha Xavier^b, Joycy Francely Sampaio dos Santos^{b,*}, Yedda Maria Lobo Soares de Matos^a, Saulo Relison Tintino^a, Thiago Sampaio de Freitas^a, Henrique Douglas Melo Coutinho^a

^a Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Department of Biological Chemistry/CCBS/URCA, Brazil
^b Laboratory of Semi-Arid Bioprospecting (Lab-Bioprospec), Department of Biological Chemistry/CCBS/URCA, Brazil



King Saud University
Saudi Journal of Biological Sciences

www.ksu.edu.sa
www.sciencedirect.com



ORIGINAL ARTICLE

Potential of antibiotic activity by *Passiflora cincinnata* Mast. front of strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*



Ana Luiza A. Siebra^a, Larissa R. Oliveira^a, Anita O.B.P.B. Martins^a,
David C. Siebra^b, Rosimeire S. Albuquerque^c, Izabel Cristina Santiago Lemos^a,
Gyllyandeson A. Delmondes^a, Saulo R. Tintino^c, Fernando G. Figueredo^c,
Jose Galberto M. da Costa^d, Henrique D.M. Coutinho^c, Irwin R.A. Menezes^a,
Cicero F.B. Felipe^a, Marta R. Kerntopf^{a,*}

^aLaboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry and Laboratory of Pharmacology of Natural Products, Center of Biological Sciences and Health, Regional University of Cariri, Crato, CE, Brazil

^bFederal University of Ceará, Campus Cariri, Barbalha, CE, Brazil

^cLaboratory of Microbiology and Molecular Biology, Regional University of Cariri, Crato, CE, Brazil

^dLaboratory of Research in Natural Products, Center of Biological Sciences and Health, University of the Region of Cariri, Crato, CE, Brazil

Phytomedicine 41 (2018) 62–96



Contents lists available at ScienceDirect

Phytomedicine

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



Original Article

Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the *Croton campestris* A. St.-Hil (Euphorbiaceae) essential oil and the compound β -caryophyllene in *in vivo* models



Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino^{a,b,*}, Renata Torres Pessoa^b,
Mariana Neyze Martins Fernandes^b, Isabel Sousa Alcântara^b, Bruno Anderson Fernandes da Silva^b,
Mariana Rayane Correia de Oliveira^b, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins^a,
Mariana do Socorro da Silva^b, Saulo Relison Tintino^a, Fábio Fernandes Galvão Rodrigues^b,
José Galberto Martins da Costa^b, Sidney Gonçalves de Lima^c, Marta Regina Kerntopf^d

Original Article

Antiparasitic Activity and Essential Oil Chemical Analysis of the *Piper Tuberculatum* Jacq Fruit

Valterlício dos Santos Sales^a, Álefe Brito Monteiro^a, Gyllyandeson de Araújo Delmondes^a, Emmily Peticia do Nascimento^a, Francisco Rodolpho Sobreira Dantas Nóbrega de Figueiredo^a, Cristina Kelly de Souza Rodrigues^a, Josefa Fernanda Evangelista de Lacerda^a, Cicera Norma Fernandes^a, Maysa de Oliveira Barbosa^a, Adamo Xenofonte Brasil^b, Saulo Relison Tintino^a, Maria Celeste Vega Gomez^b, Cathia Coronei^b, Henrique Douglas Melo Coutinho^a, José Galberto Martins da Costa^a, Cicero Francisco Bezerra Felipe^c, Irwin Rose Alencar de Menezes^a and Marta Regina Kemtopf^{a*}

^aDepartment of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, CE, Brazil.
^bCenter for the Development of Scientific Research, Foundation Moisés Beyroni/Laboratories Diaz Gill, Asunción-Paraguay. ^cDepartment of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, Paraíba, PB, Brazil.

Abstract

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 57 (2018) 22-28



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases

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



In vitro e *in silico* evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid



Joycy F.S. dos Santos^a, Saulo R. Tintino^b, Thiago S. de Freitas^b, Fábila F. Campina^b, Irwin R. de A. Menezes^c, José P. Siqueira-Júnior^d, Henrique D.M. Coutinho^{b,c*}, Francisco A.B. Cunha^a

^aLaboratory of Semi-Arid Bioprospecting (Lab-Bioprospec), Department of Biological Chemistry/CCBS/URCA, Ceará, Brazil

^bLaboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Department of Biological Chemistry/CCBS/URCA, Ceará, Brazil

^cLaboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry (LPQM), Department of Biological Chemistry/CCBS/URCA, Ceará, Brazil

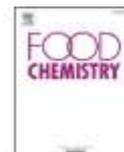
^dLaboratory of Microorganisms Genetics (LGM), Department of Molecular Biology/CCEN/UFPB, Paraíba, Brazil



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Inhibition of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L. and α -terpinene on the NorA efflux-pump of *Staphylococcus aureus*



Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino^{a,*}, Saulo Relison Tintino^a, Paulo W. Limaverde^a, Fernando G. Figueredo^b, Fábila F. Campina^a, Francisco A.B. da Cunha^a, Roger H.S. da Costa^b, Pedro Silvino Pereira^c, Luciene F. Lima^a, Yedda M.L.S. de Matos^a, Henrique Douglas Melo Coutinho^{b,*}, José P. Siqueira-Júnior^d, Valdir Q. Balbino^e, Teresinha Gonçalves da Silva^a

^aLaboratory of Microbiology and Molecular Biology, Department of Chemical Biology, Regional University of Cariri, Crato, Brazil

^bPharmacology and Medicinal Chemistry Laboratory, Department of Chemical Biology, Regional University of Cariri, Crato, Ceará, Brazil

^cEvolutionary Biology and Bioinformatics Laboratory (LABBE), Department of Genetics – CCB, UFPE, Brazil

^dLaboratory of Microorganisms Genetics (LGM), Department of Molecular Biology – CCEN, UFPE, Brazil

^eLaboratory of Pharmaceutical Proprietary of Bioactive Products (BIOFARMATOX), Department of Analytical, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil