

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

HELENA TAINA DINIZ SILVA

**POTENCIAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS COMO ANTIMICROBIANOS E/OU
MODULADORES DA RESISTÊNCIA EM *Staphylococcus aureus***

JOÃO PESSOA-PB

2015

HELENA TAINA DINIZ SILVA

**POTENCIAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS COMO ANTIMICROBIANOS E/OU
MODULADORES DA RESISTÊNCIA EM *Staphylococcus aureus***

**JOÃO PESSOA-PB
2015**

HELENA TAINA DINIZ SILVA

**POTENCIAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS COMO ANTIMICROBIANOS E/OU
MODULADORES DA RESISTÊNCIA EM *Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.
Área de concentração: Análise e controle de qualidade de alimentos.

Orientador: Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

JOÃO PESSOA-PB

2015

S586p Silva, Helena Taina Diniz.
Potencial de compostos fenólicos como antimicrobianos
e/ou moduladores da resistência em *Staphylococcus aureus* /
Helena Taina Diniz Silva.- João Pessoa, 2015.
72f. : il.
Orientador: José Pinto de Siqueira Júnior
Coorientador: Evandro Leite de Souza
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS
1. Nutrição. 2. Alimentos - análise - controle de qualidade.
3. Resistência bacteriana. 4. *Staphylococcus aureus*.
5. Compostos fenólicos.

UFPB/BC

CDU: 612.3(043)

HELENA TAINA DINIZ SILVA

**POTENCIAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS COMO ANTIMICROBIANOS E/OU
MODULADORES DA RESISTÊNCIA EM *Staphylococcus aureus***

Dissertação de Mestrado avaliada em ____ / ____ /2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior - DBM/CCEN/UFPB
Coordenador da Banca Examinadora

Prof. Dr. Evandro Leite de Souza - DN/CCS/UFPB
Coorientador

Prof. Dra. Marciane Magnani - DEA/CT/UFPB
Examinador Interno

Prof. Dra. Vivyanne dos Santos Falcão Silva – DM/FCM
Examinador Externo

Prof. Dra. Cybelle de Oliveira Dantas – CCA/UFPB
Examinador Externo Suplente

*Dedico estas linhas,
a todas as pessoas que amo e que fazem parte da minha vida,
especialmente aos meus pais sem os quais eu nada seria...
...A Deus, que me deu tantos a quem agradecer.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois d'Ele advém todas as coisas.

Aos meus pais por todo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida, por não medirem esforços para que eu alcançasse meus sonhos, e por todo amor e carinho que nunca me faltaram, em especial à minha mãe, por sua força e conselhos nos momentos de dúvida.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior pela oportunidade, paciência e aprendizado durante estes dois anos de convivência.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Evandro Leite de Souza pelas contribuições durante o desenrolar deste trabalho, e fundamental participação na elaboração do artigo aqui apresentado.

Aos membros da banca, professoras Marciane, Cybelle e Vivyanne, pela disponibilidade, atenção e contribuições para este trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Genética de Microrganismos, D. Severina e Seu Bosco, pelo cuidado, carinho, companhia, preocupação e empenho para que nossas atividades sempre fossem realizadas da melhor forma possível.

Aos funcionários do Programa de Pós- Graduação em Ciências da Nutrição (Seu Carlos e Seu Marcos), pela paciência, atenção, disponibilidade, apoio, profissionalismo e dedicação.

Ao meu irmão, Pedro, que mesmo não tendo o hábito nos declara uma ao outro, me faz sentir seu amor e carinho, à minha sobrinha Júlia (Titiaaaa!) que me fez conhecer o amor mais puro e profundo e por alguns momentos me faz voltar a ser criança. E em especial à minha Lua preta (irmã), por seu amor - que por vezes me sufoca... literalmente! Rsrs – e apoio incondicional em todas as horas.

Ao meu namorado (Marcos), por sua paciência e compreensão nestes últimos meses, e por seu amor e carinho sempre presentes. E aos meus sogros que me acolheram como filha, pelo apoio, torcida e orações.

À minha “vó Joanita”, por seu amor e orações, que tenho certeza, fizeram toda diferença nas minhas conquistas.

À minha tia Ozanete por se fazer presente sempre com uma palavra ou um gesto de carinho, meus primos queridos Analine, Bruno, Júnior, Ana Júlia, Rosane, Kelly e Keyla, que sempre torceram pelo meu sucesso.

Aos meus padrinhos Inês e Giuseppe Tosi, por toda carinho, atenção e apoio constantes.

Aos meus amigos irmãos de infância (Anderson, Leon, Marinho, Vanvan, Delan e Lulu) que sempre, de alguma forma e ao seu jeito, se fazem presentes nos diversos momentos da minha vida.

Às minhas amadas amigas de colégio (Roberta, Joanne e Amailza), que independente do rumo que nossas vidas tomaram e de quantos quilômetros nos separam, sempre se fazem presentes e me passam seu amor e incentivo.

À minha “irmã galêga” (Camila), que me acompanha desde o ensino fundamental, e se tornou parte inseparável da minha vida, por sua amizade sincera, amor fraterno, torcida e apoio de sempre.

Às minhas flores do LGM (Isis, Vivy, Ryl e Sú) que me acolheram sem julgamentos, por sua amizade, conselhos, aprendizados, conversas étlicas, carinho e torcida, sem as quais este caminho teria sido tortuoso e sem graça. Em especial à minha cururú (Isis), por me alimentar nos momentos de “fome somaliana”, brincadeiras à parte, pelo companheirismo, amizade sincera e mão sempre estendida sempre que precisei.

Às irmãs que a Nutrição me presenteou (Joana, Morgana, Tássia, Amanda, Cely e Neusa), que mesmo distantes fisicamente, se fazem presentes em todos os momentos e em cada conquista.

À minha amiga de ap. Rayanne (Ray), pelos momentos descontraídos, companheirismo, paciência com minha razinice e pela troca de “conhecimentos nutricionais”.

Às companheiras de mestrado – alimentos – (Carol, Paloma, Vanessa, Isabella e Samara), pelo apoio mútuo durante os infinitos seminários das disciplinas, e palavras de incentivo, as quais quero levar para o resto da vida.

À minha primeira e eterna orientadora, Maria Lúcia, que me deu a primeira oportunidade de ingressar na pesquisa de alimentos, e principal responsável pela minha opção por esta área.

A todos os professores do PPGCN, pelos ensinamentos e exemplos de caminhos a serem seguidos. Contribuindo com a minha formação pessoal e profissional.

Ao professor José Maria Barbosa, por ter cedido alguns compostos para este estudo.

A CAPES, ao CNPq e a FAPESQ-PB, pelo apoio financeiro para elaboração deste trabalho.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia impossível.”*

Charles Chaplin

RESUMO

Os compostos fenólicos constituem uma das principais classes de metabólitos secundários de plantas, sintetizados para a defesa vegetal e adaptação ao estresse ambiental. Estão subdivididos em três grupos: ácidos fenólicos, flavonoides e taninos. Têm sido propostos como tendo uma variedade de efeitos biológicos na saúde humana e sobre microrganismos como *S. aureus*. Casos de infecções provocadas por cepas de *S. aureus* multi droga resistentes (MDR) têm aumentando ao longo dos anos. Dentre as estratégias de combate à resistência de *S. aureus* a antibióticos, está a descoberta dos chamados agentes modificadores da resistência (RMA- *resistance-modifying agents*). Neste estudo, avaliamos o potencial modulador e efeito sinérgico de flavonoides, taninos e ácido fenólicos sobre a atividade antibiótica de norfloxanina (NOR), tetraciclina (TET) e eritromicina (ERI) em linhagens de *S. aureus*. Foram testados seis flavonoides - O-glicosídeo e C-glicosídeo - e seus derivados aglicona, dois taninos (galotanino e elagitanino), ácidos fenólicos (ácido hidroxidifênico e derivados do ácido cinâmico). Os compostos testados não apresentaram atividade antimicrobiana a 128 µg/mL (CIM entre 256 e 512 µg/mL). No teste de modulação, os flavonoides O-glicosilados não apresentaram efeito redutor da CIM dos antibióticos testados, no entanto, seus derivados aglicona reduziram a CIM da NOR em até dezesseis vezes (128 para 8 µg/mL), em contra partida, os flavonoides C-glicosilados, miricetrin e quercetrin, reduziram a CIM da NOR em até quatro vezes (128 para 32 µg/mL) e os seus derivados aglicona não apresentaram efeito redutor da CIM dos antibióticos testados; o ácido hexahidroxidifênico (ácido gálico) não apresentou efeito redutor da CIM dos antibióticos testados; dentre os derivados do ácido cinâmico ensaiados, apenas o ácido 3-metoxicinâmico, ácido 3,4-dimetoxicinâmico e ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico reduziram a CIM da NOR (128 para 64 µg/mL), enquanto o ácido 3-metoxicinâmico, apresentou efeito redutor da CIM da tetraciclina (64 para 32 µg/mL); o elagitanino (ácido elágico) não apresentou efeito redutor da CIM dos antibióticos testados, já o galotanino (ácido tânico – AT) reduziu trinta e duas vezes a CIM da NOR (128 para 4 µg/mL), no teste *checkerboard* o AT apresentou efeito sinérgico quando aplicado em combinação com NOR (ICIF = 0,15) CIM do AT diminuiu de 512 para 64 µg/mL (oito vezes), enquanto a CIM da NOR diminuiu de 128 para 4 µg/mL (trinta e duas vezes). Os resultados obtidos demonstram que compostos fenólicos, possuem um potencial de aplicação como adjuvante de antibióticos, particularmente quando em uso combinado com NOR.

Palavras-chave: resistência bacteriana; *Staphylococcus aureus*; compostos fenólicos.

ABSTRACT

Phenolic compounds are a major class of plant secondary metabolites synthesized for plant and adaptation to environmental stress defense. Are divided into three groups: phenolic acids, flavonoids and tannins. Have been proposed as having a variety of biological effects on human health and microorganisms such as *S. aureus*. Cases of infections caused by strains of *S. aureus* multi drug resistant (MDR) has increased over the years. Among the strategies to combat resistance of *S. aureus* to antibiotics, is the discovery of so-called modifiers resistance (*Resistance-Modifying Agents* - RMA). In this study, we evaluated the potential modulator and synergistic effect of flavonoids, tannins and phenolic acid on antibiotic activity norfloxacin (NOR), tetracycline (TET) and erythromycin (ERI) in strains of *S. aureus*. Six flavonoids have been tested - O-glycoside and C-glycoside - and their aglycone derivatives, two tannins (gallotannin and ellagitannin), phenolic acids (hydroxydiphenic acid and cinnamic acid derivatives). The compounds tested showed no antimicrobial activity at 128 µg/mL (MIC between 256 and 512 µg/mL). In the modulation test, the O-glycosylated flavonoids showed no reducing effect of the MIC of antibiotics tested, however, its aglycone derivatives reduced the MIC in the NOR sixteen fold (8 to 128 µg/mL), in contrast, the C-glycosylated flavonoids, quercetin and myricetin, reduced the MIC in the NOR up to four fold (32 to 128 µg/mL) and their aglycone derivatives showed no reducing effect MIC of the tested antibiotics; the hexahydroxydiphenic acid (gallic acid) showed no reducing effect of MIC of the tested antibiotics; among the cinnamic acid derivatives tested, only 3-methoxycinnamic acid, 3,4-dimethoxycinnamic acid and 3,4,5-trimethoxycinnamic acid reduced the MIC in the NOR (64 to 128 µg/mL), while the 3-methoxycinnamic acid presented reducing effect of tetracycline MIC (64 to 32 µg/mL); the ellagitannin (ellagic acid) showed no reducing effect of MIC of antibiotics tested, already the gallotannin (tannic acid - TA) reduced thirty-two fold the MIC NOR (128 to 4 µg/mL), the test checkerboard TA had effect synergistic when applied in combination with NOR (FICI = 0.15) TA MIC decreased from 512 to 64 µg/mL (eight fold) while the MIC of NOR decreased from 128 to 4 µg/mL (thirty-two fold). The results demonstrate that the phenolic compounds have a potential application as an adjunct to antibiotics, particularly when in combination with NOR.

Keywords: bacterial resistance; *Staphylococcus aureus*; phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura genérica da molécula de flavonoide.	20
Figura 2 -	Exemplos de tanino hidrolisável e não-hidrolisável.	21
Figura 3 -	Exemplos de ácidos (a) hidroxibenzóicos e (b) hidroxicinâmicos.	25
Figura 4 -	Mecanismos de resistência bacteriana.	27
Figura 5A-	Aprovações de antibióticos de 1983 (dados obtidos a partir do relatório do IDSA) em que a maioria desses medicamentos (75%) são de duas classes, b-lactâmicos e quinolonas.	28
Figura 5B-	História de drogas antibacterianas, introduções e aprovação.	29
Figura 6 -	Prováveis meios de atuação de um inibidor de sistema de efluxo	33

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Dissertação

Quadro 1-	Classes de compostos fenólicos em plantas.	18
Quadro 2-	História do desenvolvimento dos agentes antimicrobianos x subsequente aquisição da resistência pelos microrganismos.	31
Quadro 3-	Linhagens de <i>S. aureus</i> ensaiadas.	35
Quadro 4-	Solventes e Diluentes para a Preparação de Soluções Padrão de Agentes Antimicrobianos.	36
Quadro 5-	Compostos fenólicos ensaiados.	36

Artigo

Tabela 1 -	Values of minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics and ethidium bromide in the absence and presence of AT or AG against effluxing strains of <i>S. aureus</i> .	63
Tabela 2 -	Values of minimum inhibitory concentration (MIC) for AT and norfloxacin, and fractional inhibitory concentration index (FICI) of the combined application of both, against effluxing strains of <i>S. aureus</i> .	64

Outros resultados

Tabela 1 -	Concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos fenólicos frente a linhagens de <i>S. aureus</i> que superexpressam genes para proteínas de efluxo.	65
Tabela 2 -	Concentração inibitória mínima (CIM) de norfloxacin na presença e ausência dos flavonoides frente a linhagem de <i>S. aureus</i> SA-1199B.	66
Tabela 3 -	Concentração inibitória mínima (CIM) de norfloxacin na presença e ausência dos taninos frente a linhagem de <i>S. aureus</i> SA-1199B.	67
Tabela 4 -	Concentração inibitória mínima (CIM) de norfloxacin e tetraciclina na presença e ausência dos derivados do ácido cinâmico frente a linhagens de <i>S. aureus</i> IS-58 e SA-1199B.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC - Superfamília “*ATP binding cassette*”

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AF – Ácido ferrúlico

AE – Ácido elágico

AG – Ácido gálico/ GA – Gallic acid

AT – Ácido tânico/ TA – Tannic acid

BAB – Blood Agar Base

BHI – Brain Heart Infusion (caldo infusão cérebro-coração)

BRIC - Brasil, Rússia, Índia e China

BrEt – Brometo de Etídio/ EtBr – Ethidium bromide

CCDEP – Center for Disease Dynamics, Economics & Policy

CIF – Concentração Inibitória Fracionária/ FIC – Fractional Inhibitory Concentration

CIM – Concentração Inibitória Mínima

DMSO – Dimethyl sulfoxide

EPIs – Efflux Pump Inhibitors (inibidores de bomba de efluxo)

ERI – Eritromicina

ET - Elagitanino

FDA – Food and Drug Administration

FQS – Fluoroquinolonas

GT – Galotanino

HHDP – Ácido hexahidroxidifênico

MATE - Multidrug And Toxic Compound Extrusion

MDR - Multiple drug resistance (Resistência múltipla as drogas)

MRSA - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* resistente a meticilina)

MsrA – Macrolide Efflux Protein (proteína de efluxo para macrolídeos)

MSSA - Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* sensível a meticilina)

MFS - “*Major Facilitator Superfamily*”

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards

NOR - Norfloxacin

NorA – Proteína de efluxo para fluoroquinolonas e outras substâncias

TetK – Proteína de efluxo para tetraciclina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 COMPOSTOS FENÓLICOS: CLASSIFICAÇÃO E BIOATIVIDADE	17
2.1.1 Flavonoides	19
2.1.2 Taninos	20
2.1.3 Ácidos fenólicos	23
2.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA	24
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> : ASPECTOS GERAIS E RESISTÊNCIA A DROGAS	24
2.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A DROGAS	26
2.5 SISTEMAS DE EFLUXO	29
2.6 AGENTES MODIFICADORES DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 LINHAGENS DE TESTE E MEIOS DE CULTURA	35
3.2 ANTIBIÓTICOS, BROMETO DE ETÍDIO E CORANTE RESAZURINA	35
COMPOSTOS FENÓLICOS TESTADOS	36
3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	37
3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MODULADORA DA RESISTÊNCIA A DROGAS	37
3.6 ENSAIO CHECKERBOARD	38
REFERÊNCIAS	
APÊNDICES	
Apêndice1 - Tannic acid as potential modulator of norfloxacin-resistance in <i>Staphylococcus aureus</i> over-expressing <i>norA</i> -gene	
4 OUTROS RESULTADOS	65
REFERÊNCIAS	
5 CONCLUSÕES	71

1 INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos constituem uma das principais classes de metabólitos secundários, caracterizados por apresentar um anel aromático, tendo um ou mais substituintes hidroxilo (BRAVO, 1998; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; LI et al., 2014). Podem ser subdivididos em três grupos: ácidos fenólicos, flavonoides e taninos (ROBBINS, 2003; VAQUERO et al, 2010; VAQUERO; FERNANDEZ; NADRA, 2011). Estes compostos têm sido propostos como possuidores de uma variedade de efeitos biológicos sobre a saúde humana, incluindo a atividades anti-inflamatória, antialérgica, antioxidante, vascular, e citotóxica antitumoral (HARBONE; WILLIAMS, 2000; VAQUERO; NADRA, 2008).

Embora a terapia à base de plantas medicinais venha sendo praticada há milhares de anos, a identificação, eficácia e função sinérgica dos constituintes presentes nas plantas e alimentos vegetais ainda é pouco explorado. Dentre os fitoconstituintes que tem sido investigados destacam-se metabólitos secundários, que são sintetizados para a defesa vegetal em resposta de adaptação ao estresse ambiental (MCCLANAHAN, 2012).

Os fitoconstituintes tem sido propostos como uma das estratégias alternativas para conter a resistência bacteriana e aumentar o uso clínico dos antibióticos existentes, sendo aplicados como moduladores da resistência a drogas que inibam determinados mecanismos de resistência, os chamados inibidores de bomba de efluxo (EPI – *Efflux pump inhibitor*) que poderão ser co-administrados com os antibióticos de uso corrente (LYNCH, 2006). Alguns EPIs conhecidos apresentarem toxicidade na concentração desejada. Nesta perspectiva, os compostos obtidos de plantas, relatados na literatura como possuidores de atividade antimicrobiana, vêm sendo avaliados como moduladores da resistência a drogas ou adjuvantes de antibióticos (TEGOS et al., 2002; STAVRI; PIDDOCK; GIBBONS, 2007).

Estima-se que mais de 70% das bactérias patogênicas são resistentes a pelo menos um dos antibióticos disponíveis para uso clínico. Os chamados "superbugs" (organismos que são resistentes a maioria dos antibióticos utilizados clinicamente) ou MDR (Multidrug resistant- multidroga resistente) estão surgindo em ritmo acelerado. Dentre estes, destaca-se a bactéria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) responsável por diversos casos de infecções (LINDSAY; HOLDEN, 2004; DEMAINE; SANCHEZ, 2009). Em 2014 a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou dados sobre a resistência a antibióticos que mostra que a situação se agravou, principalmente, nos países em desenvolvimento, onde ocorre uso excessivo e falta de regulamentação na prescrição e venda destes medicamentos.

Entre os principais mecanismos de resistência bacteriana pode-se citar o sistema de efluxo (RUSSELL, 2000; POOLE, 2002). Estes sistemas são compostos por proteínas hidrofóbicas capazes de exportar classes de medicamentos específicos ou compostos de estruturas químicas diversas ou toxinas, utilizando ATP ou gradientes iônicos como fonte de energia (PUTMAN; VAN VEEN; KONINGS, 2000; SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013).

Considerando as diversas propriedades biológicas dos compostos fenólicos já relatadas na literatura, e o interesse atual para a descoberta de novos RMA, este estudo investigou o efeito de três grupos de compostos fenólicos – flavonoides, taninos e ácidos fenólicos - na modulação de resistência a drogas em linhagens de *S. aureus* multi-resistentes e portadoras de bombas de efluxo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COMPOSTOS FENÓLICOS: CLASSIFICAÇÃO E BIOATIVIDADE

As plantas têm sido fonte de novos produtos químicos e inúmeros estudos clínicos provaram o valor terapêutico de moléculas de origem vegetal, no organismo humano. Na verdade, os produtos de origem vegetal representam cerca de 25 % dos medicamentos em utilização clínica corrente. Das mais de 350000 espécies de plantas superiores reconhecidas atualmente, só 5 a 10% foram investigados. Considerando-se que cada espécie de planta pode conter de 500 a 800 diferentes metabólitos secundários, assim o potencial para a descoberta de novos produtos terapêuticos neste recurso largamente inexplorado é considerável (ABREU; MCBAIN; SIMÕES, 2012).

Os autores acima citados ainda afirmam que alguns destes produtos produzidos por plantas podem combater infecções com sucesso, e que de fato, a raridade relativa de doenças infecciosas em plantas selvagens é uma indicação da eficácia dos seus mecanismos de defesa inatos. Assim, acredita-se que esses fitoquímicos agem sinergicamente com outros produtos intrínsecos (por exemplo, inibidores bomba de efluxo), desempenhando assim um papel contra a infecção no sistema de defesa da planta.

Produtos fenólicos constituem um dos mais numerosos grupos de metabólitos secundário onipresentes em plantas, comumente encontrados em diversos produtos alimentares, principalmente vegetais e frutas (SOOBRAATTEE et al., 2005; VAQUERO; TAPAS; SAKARKAR; KAKDE, 2008; LI et al., 2014). Estes compostos têm um papel importante no crescimento e reprodução, proporcionando proteção contra patógenos e predadores (BRAVO, 1998). Muitos destes produtos são produzidos como um mecanismo de defesa da planta em resposta ao rompimento do tecido ou ataque patogênico. (ABREU; MCBAIN; SIMÕES, 2012).

Ahmad et al. (2012) definem polifenóis como fito-químicos naturais de plantas que possuem atividade antioxidante, quimio-preventiva e propriedades quimioterápicas. Alimentos como maçã, frutas vermelhas, melão, uva, pera, ameixa, brócolis, repolho e cebola são ricos em polifenóis. Alguns polifenóis são conhecidos por bloquear a ação de enzimas e outras substâncias que promovem o crescimento de células cancerosas. Além disso, os efeitos benéficos da dieta rica em polifenóis são, em parte, ligados ao bloqueio da síntese de ATP nas células tumorais conduzindo assim a apoptose. Os polifenóis são também conhecido por ter atividade antimicrobiana através de ações inibidoras em ATP

sintase. Assim, o entendimento do mecanismo de ação dos polifenóis pode levar ao desenvolvimento de melhores estratégias de combate os efeitos de bactérias patogênicas (AHMAD et al., 2012).

Estruturalmente, os compostos fenólicos compreendem um anel aromático, tendo um ou mais substituintes hidroxilo, e uma gama de moléculas fenólicas simples para compostos altamente polimerizados (BRAVO, 1998; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; LI et al., 2014). Apesar desta diversidade estrutural, o grupo de compostos é frequentemente referido como ‘polifenóis’.

Embora o esqueleto básico permaneça o mesmo, a posição e o número de grupos hidroxilo no grupo de fenol são considerados diretamente relacionados com a sua toxicidade relativa para os microrganismos e são as principais características estruturais que influenciam a capacidade antioxidante de fenóis, com a evidência do aumento da toxicidade como resultado da hidroxilação (COWAN, 1999; SAMY; GOPALAKRISHNAKONE, 2010; BORGES et al., 2013). Além disso, alguns autores descobriram que os fenóis mais oxidados têm propriedades antimicrobianas mais elevadas (COWAN, 1999; SCALBERT, 1991; SAMY; GOPALAKRISHNAKONE, 2010).

Compostos fenólicos podem ser categorizados em várias classes, como mostrado no quadro 1 (HARBORNE, 1989; HARBORNE; BAXTE; MOSS, 1999). Destes, os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos são considerados como os principais compostos fenólicos na dieta humana (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; BORGES et al., 2013; KHAN; ZILL-E-HUMA; DANGLES, 2014).

Quadro 1 - Classes de compostos fenólicos em plantas.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C ₆
Ácidos hidroxibenzóicos	C ₆ -C ₁
Acetofenonas, ácidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂
Ácidos hidroxicinâmico, fenilpropanoides (cumarinas, isocumarinas, cromonas, cromenas)	C ₆ -C ₃
Naptoquinonas	C ₆ -C ₄
Xantanas	C ₆ -C ₁ -C ₆
Estilbenas, antraquinonas	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavovonoides, isoflavonoides	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignanas, neolignanas	(C ₆ -C ₃) ₂
Biflavonoides	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Ligninas	(C ₆ -C ₃) _n
Taninos condensados (proantocianidinas)	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

Fonte: Adaptado de BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006.

2.1.1 Flavonoides

Os principais ingredientes nutracêuticos ativos em plantas são flavonoides. Os flavonoides naturais, especialmente seus glicosídeos, são os compostos fenólicos mais abundantes em alimentos e são de grande interesse geral, devido às suas diversas atividades biológicas. Dados epidemiológicos indicam que os flavonoides dietéticos desempenham papéis fundamentais na prevenção e controle de doenças crônicas, tais como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares. Como é típico para os compostos fenólicos, que podem agir como potentes antioxidantes e quelantes de metais. Flavonoides também tem sido desde há muito reconhecidos por possuírem atividades anti-inflamatória, antialérgico, hepato protetora, antitrombótica, antiviral e anticarcinogênica (TAPAS; SAKARKAR; KAKDE, 2008; XIAO; MUZASHVILI; GEORGIEV, 2014). A atividade antimicrobiana de flavonoides é, em grande parte devido à sua capacidade de penetrar membranas biológicas (DAVIDSON; NAIDU, 2000).

Os flavonoides constituem um dos grupos mais ubíquos de todos os compostos fenólicos de plantas, sendo que 8000 variedades de flavonoides já foram identificadas. Aproximadamente 50 anos atrás, informações sobre os mecanismos de ação de flavonoides apresentavam-se como suposições. Em 1930, Szent-Gyorgyi isolou uma nova substância a partir de laranjas e classificou-a como vitamina P, entretanto mais tarde, tornou-se claro que esta substância representava na verdade um flavonoide (HARBORNE et al., 1999; TAPAS; SAKARKAR; KAKDE, 2008; EL ANTRI et al., 2004).

Flavonoides são compostos de baixo peso molecular, consistindo de quinze átomos de carbono, dispostos em uma configuração C6-C3-C6. Essencialmente, a estrutura é composta de dois anéis aromáticos A e B, unidas por uma ponte 3-carbono, geralmente sob a forma de um anel heterocíclico, C (Figura 1). O anel aromático A é derivado do etilo/via malonato, enquanto que o anel B é derivado da fenilalanina através da via do chiquimato. Ocorrem como agliconas, derivados glicosídeos e metilado. Em plantas, flavonóides agliconas (isto é, flavonoides sem açúcar ligado) ocorrem numa variedade de formas estruturais (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; TAPAS; SAKARKAR; KAKDE, 2008).

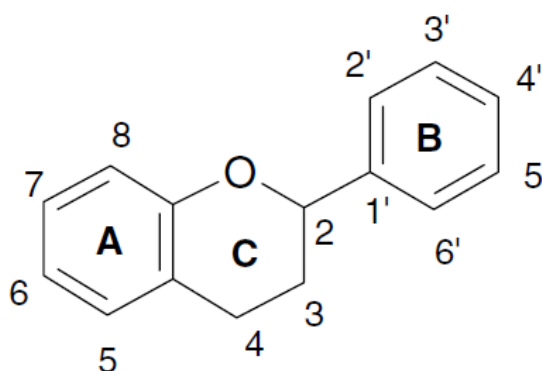


Figura 1 - Estrutura genérica da molécula de flavonoide. Fonte: BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006.

Os flavonoides ocorrem como α ou β glicosídeos, tais como flavonoides glicosídeos, galactosídeos, rhamnosides, arabinósidos e rutinosides (FANG et al, 2013.; PUGLIESE et al, 2013.; TAHERI et al., 2013). Flavonoides que ocorrem naturalmente são como O- ou C-glicosídeos da fração flavonoide, ocorrem principalmente nas posições 3 ou 7 O-glicosídeos, mas podem ocorrer nas posições C-5, 6, 8 e 4. Em algumas frutas, como maçãs, flavonóis são geralmente O-glicosilados na posição C-3 (TIBERTI et al., 2007). Os O-glicosídeos possuem substituintes de açúcar ligado a um grupo hidroxilo da aglicona, considerando que possuem grupos C-glicosídeos de açúcar ligado ao carbono de aglicona geralmente em C-6 ou C-8 através da formação de uma ligação C-C, dando-lhes maior resistência à hidrólise ácida (RIJKE et al, 2006; YEGANG et al, 2010; CHOI et al., 2014). Os flavonoides C-glicosídeos, membros importantes da família dos flavonoides presente nos alimentos e nutracêuticos, foram relatados possuir uma vasta gama de atividades biológicas (CHOI et al., 2014).

2.1.2 Taninos

Taninos são polifenóis solúveis em água, classificados em hidrolisáveis e não-hidrolisáveis (condensáveis) (Figura 2) comumente encontrados em fontes herbáceas e caules de plantas. Tanino é o único grupo de metabólitos fenólicos com peso molecular entre 500 e 30.000 Da, que está amplamente distribuída em quase todos os alimentos de origem vegetal (SALIMEN; KARONEN, 2011; ZHANG et al., 2012).

Taninos hidrolisáveis são ésteres de ácidos fenólicos - quando ácido gálico (AG) origina galotaninos (GTs); quando ácido hexahidroxi difênico (HHDP), origina

elagitaninos (ETs) - e um poliol, normalmente glicose. O ácido hexahidroxiidifênico de elagitaninos sofre lactonização para produzir ácido elágico (AE). (SCALBERT, 1991; AKIYAMA, 2001; SERRANO et al., 2009; ZHANG et al., 2012). Os galotaninos e elagitaninos, são produtos do metabolismo do AG oriundo do metabolismo do shikimato (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico) (HASLAM; CAI, 1994; QUIDEAU et al., 2011) Têm sido reportados como bacteriostáticos ou bactericidas contra *S. aureus* (AKIYAMA, 2001; XU et al., 2015).

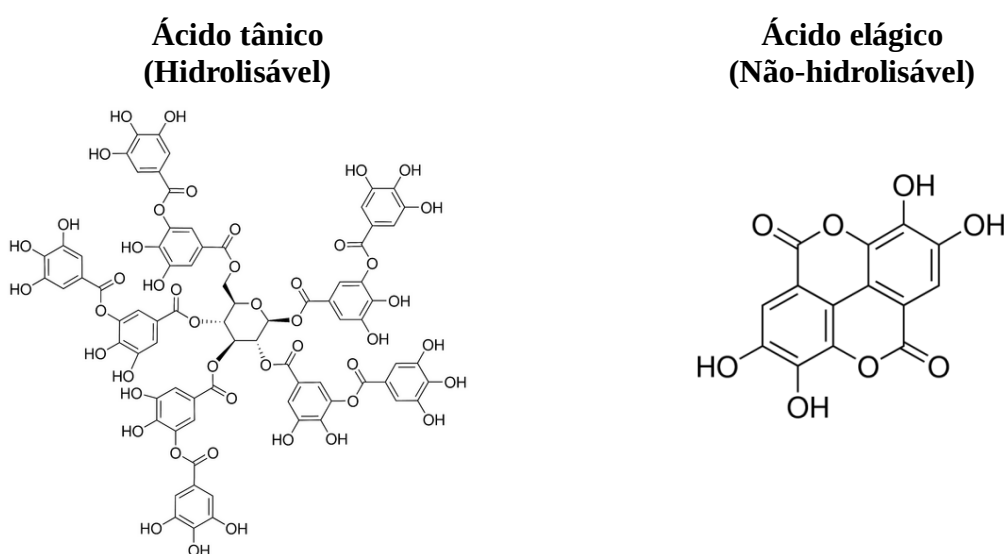


Figura 2. Exemplos de tanino hidrolisável e não-hidrolisável. Fonte: SIGMA-ALDRICH

O ácido tânico (AT) é um importante membro dos galotaninos pertencentes à classe hidrolisável (AKIYAMA et al., 2001). É considerado como Aditivo Reconhecido Geralmente como Seguro (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA) para o uso como um aditivo direto em alguns produtos alimentares (21 CFR184. 1.097, US Code of Federal Regulation, 2006). Ele é tradicionalmente relacionado a um importante fator de defesa da planta contra insetos herbívoros, fungos e bactérias, além de apresentar atividade antioxidante sobre ácidos graxos polinsaturados, além de atividade antiviral (SCALBERT, 1991; MAQSOOD; BENJAKUL, 2010; SALMINEN; KARONEN, 2011; ZANG et al., 2012; XU et al., 2015).

O AT é um éster D-glicose de ácido gálico em que os grupos hidroxilo do hidrato de carbono estão totalmente esterificados com dímeros de ácido gálico. Seus múltiplos grupos fenólicos podem interagir com macromoléculas biológicas. Possui forte poder

adstringente, antioxidante, hemostático, propriedades antibacterianas e aplicações benéficas, pois, além de outros usos nas indústrias têxteis, vinho e madeira, foi descoberto na área médica como uma droga para o tratamento de úlceras cutâneas, queimaduras, feridas e dor de dente (XU et al., 2015). Está presente numa variedade de frutas e vegetais, incluindo chá, cacau, feijão, uva, morango, caqui, especialmente a casca da espécie de carvalho (ZENGIN et al., 2014).

ETs são polifenóis bioativos abundantes em algumas frutas, nozes e sementes, como romãs, framboesas, morangos e amêndoas. O AE e seus derivados complexos são os principais representantes de ETs. Hidrólise de ETs com ácidos ou bases, produz ácido hexahidroxi-difênico. Esta reação tem sido utilizada para a detecção e quantificação de ETs em equivalentes AE após hidrólise ácida de amostras de alimentos (LANDETE, 2011).

O AE é um polifenol encontrado em altas concentrações em frutos comestíveis. Bagas da família *Rosaceae*, em particular, contêm altos níveis de equivalentes AE. É derivado a partir de ácido gálico, em que duas moléculas são ligadas por ligações éster. Tem sido o foco de muitos estudos nos últimos anos, principalmente relacionada às suas atividades antioxidante, anti-proliferativa, anti-estrogênica, anti-inflamatória, antibacteriana e inibidora da proteína quinase CK-2. Relatórios relativos a propriedades inibidoras de biofilme contra *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Pseudomonas putida*, e *Burkholderia cepacia* também surgiram recentemente. Derivados do AE, por outro lado, têm sido relatados como possuidores de atividades antiplasmodica, antibabesial, antioxidantes e antibacteriana (QUAVE et al., 2012).

Taninos exercem atividade antimicrobiana através de ligação à parede celular, perturbando a integridade da membrana. Os mecanismos antimicrobianos dos taninos podem ser resumidos da seguinte maneira: (a) A propriedade adstringente do tanino pode induzir complexação com enzimas ou substratos. Muitas enzimas microbianas em culturas filtradas ou em formas purificadas são inibidas quando misturadas com taninos. (b) A toxicidade tanina pode ser relatada por sua ação nas membranas dos microrganismos. (c) A complexação de íons metálicos por taninos pode ser responsável por toxicidade tanina (AKIYAMA et al., 2001; LI et al., 2013).

2.1.3 Ácidos fenólicos

Ácidos fenólicos (AF) tais como p-cumárico, ferúlico, ou os ácidos cafeico são compostos fenólicos essenciais no reino vegetal, uma vez que eles são constituintes da parede celular vegetal e estão presentes em vacúolos. Eles podem ser liberados pelas plantas durante vias de defesa e por plantas submetidas decomposição (no solo, fermentações de alimentos, e no intestino). Na sua forma livre, ácidos fenólicos são moléculas antimicrobianas para alguns microrganismos (LICANDRO-SERAUT et al., 2013).

Os AFs constituem dois subgrupos, isto é, ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos (Figura 3). Ácidos hidroxibenzóicos incluem o gálico, p-hidroxibenzóico, protocatéquico, ácido vanílico e sirínico, que têm em comum a estrutura C6-C1. Ácidos hidroxicinâmicos, por outro lado, são compostos aromáticos com uma cadeia de três carbonos laterais (C6-C3), como caféico, ferúlico, ácidos p-cumárico e sinápico sendo o mais comum (BRAVO, 1998; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). AF apresentam um ácido carboxílico funcional e são derivados hidroxilados de benzóico (por exemplo, ácidos gálico, protocateico e p - hidroxibenzóico) e ácidos cinâmico (por exemplo, ácidos cafeico, p - cumárico e ferúlico) (ROBBINS, 2003; STALIKAS, 2007; WANG et al., 2011).

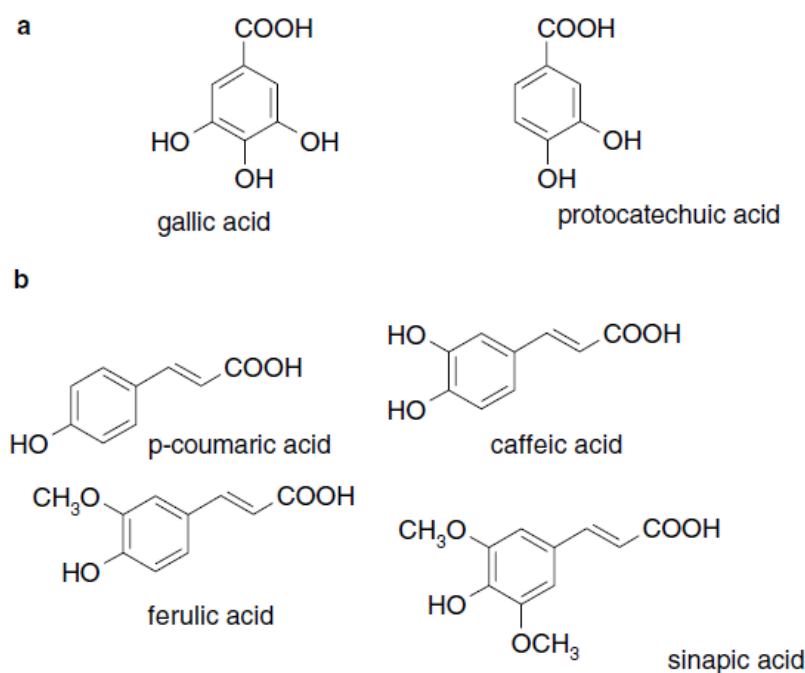


Figura 3. Exemplos de ácidos (a) hidroxibenzóicos e (b) hidroxicinâmicos. Fonte: BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006.

Segundo Sánchez-Maldonado, Schieber e Gänzle (2011) o aumento do número de grupos hidroxilo aumentada a atividade inibidora do crescimento de ambos ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmicos. A substituição de grupos hidroxilo por grupos metoxi aumentou a atividade de ácidos hidroxibenzóicos, mas não de hidroxicinâmicos.

Os ácidos hidroxicinâmicos têm atividade antioxidante significativamente maior do que os ácidos hidroxibenzóico, que pode ser atribuído à presença do grupo $\text{CH} = \text{CH} - \text{COOH}$ dos ácidos hidroxicinâmicos e o grupo COOH nos ácidos hidroxibenzóico. A presença do grupo $\text{CH} = \text{CH} - \text{COOH}$ em ácidos hidroxicinâmicos fornece maior capacidade de doar H e estabilização subsequente do radical que o grupo carboxilato nos ácidos hidroxibenzóicos (BORGES et al., 2013). Uma explicação para a toxicidade ácidos fenólicos é que eles poderiam permeabilizar membrana celular, devido à sua estrutura e seu caráter lipofílico (CAMPOS et al. 2009; LICANDRO-SERAUT et al., 2013).

2.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou em abril de 2014 o relatório intitulado “Antimicrobial Resistance: Global Report on surveillance” no qual descreve a atual situação da problemática da resistência bacteriana no mundo. Segundo o documento, o mundo está prestes a entrar em uma era “pós-antibióticos”, uma vez que em algumas regiões, o uso de antibióticos não é eficaz. Ainda segundo o relatório, o problema também parece ser particularmente agudo nos países de economias emergente, conhecidos como estados do ‘BRIC’: Brasil, Rússia, Índia e China. Países desenvolvidos também são afetados em grande escala por estes microrganismos. No entanto, nos Estados Unidos da América, *S. aureus* resistente à metilina provocou uma taxa de mortalidade maior que os casos de morte por HIV e Hepatite B somados (Center for Disease Dynamics, Economics & Policy – CDDEP, 2010).

Um panorama mundial, a partir da análise de dados oficiais nacionais, mostra que o quadro é preocupante. A começar pela falta de informações dos países sobre a situação de seus territórios, uma vez que apenas 114 dos 194 países forneceram dados nacionais sobre resistência aos antibióticos (OMS, 2014). No Brasil – embora seja o maior país da América Latina e apresente centros médicos de excelência – a resistência bacteriana nos hospitais representa um grande problema e um desafio na terapia das infecções bacterianas (ROSSI, 2011).

O uso de antibióticos na pecuária, o lançamento de águas residuais das indústrias farmacêuticas em rios utilizados pela população, falta de saneamento básico e, principalmente, uso descontrolado de antibióticos, são as prováveis causas para o acelerado aumento da resistência bacteriana. Na China, por exemplo, hospitais e clínicas recebem incentivos financeiros para a prescrição de medicamentos, e os antibióticos são a sua maioria (REARDON, 2014).

As taxas de resistência estão aumentando mundialmente, novos mecanismos de resistência estão surgindo e infecções causadas por bactérias multi-resistentes estão cada vez mais difíceis de tratar. Nosso arsenal atual de antibióticos está constantemente a perder a sua eficácia e há poucos sinais de que será devidamente reposto em um futuro próximo (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014).

O surgimento de cepas de *S. aureus* resistente a uma ampla distribuição de antibióticos – incluindo *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) da classe dos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamidas, fluoroquinolonas (FQS), cloranfenicol, sulfonamidas, estreptomicina e tetraciclina – é uma causa de preocupação crescente em todo mundo e tornou-se um problema de pandemia devido a limitadas opções terapêuticas disponíveis (SCHINDLER et al, 2013; FERREIRA et al., 2014).

Diante deste quadro mundial e da crescente problemática no território brasileiro, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) por meio da resolução – RDC Nº 20, de 5 de maio de 2011 – tornou mais rígida a venda de antibióticos. Esta medida busca reduzir/inibir a automedicação já que, mesmo sendo necessária a apresentação da receita médica, esta nem sempre era solicitada e a venda destes medicamentos acontecia de maneira indiscriminada.

2.3 *Staphylococcus aureus*: ASPECTOS GERAIS E RESISTÊNCIA A DROGAS

S. aureus são cocos Gram-positivos pertencentes a família *Micrococcaceae*. Suas colônias geralmente medem cerca de 1 a 3 mm. São bactérias anaeróbicas facultativas que estão dispostas sozinhas, em pares ou formando grupos irregulares com aspecto de cacho de uva (LINDSAY; HOLDEN, 2004). Este microrganismo é um membro comum da microbiota natural da pele e fossas nasais de humanos (HANSON et al., 2011). O principal reservatório de *S. aureus* em humanos é nas fossas nasais, embora também é encontrada nas mãos. Pode afetar negativamente a saúde humana e animal, causando lesões necróticas graves, abscessos, endocardite e bacteremia (SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013;

FERREIRA et al., 2014). Também é uma das causas mais comum de infecções de feridas pós-operatórias e algumas cepas de *S. aureus* produzem toxinas que causam uma variedade de sintomas específicos, incluindo a síndrome do choque tóxico e intoxicação alimentar (OMS, 2014).

S. aureus e suas várias formas de MDR, tais como *S. aureus* heterogêneo glicopeptídeo – intermediário (hGISA) e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) têm sido relatadas como preocupante pois os agentes patogênicos MDR comprometem a eficácia do tratamento de infecções bacterianas. *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) inclui aquelas estirpes que tenham adquirido um gene dando-lhes resistência à meticilina e, essencialmente, todos os outros antibióticos β -lactâmicos. (FITZGERALD et al., 2001; WEESE et al, 2005).

2.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A DROGAS

O desenvolvimento da resistência é um processo evolutivo normal para os microrganismos, mas é acelerado pela pressão seletiva exercida pela utilização generalizada de agentes antibacterianos. Cepas resistentes são capazes de se propagar onde há descumprimento de medidas de prevenção e controle de infecções (OMS, 2014).

A introdução dos antibióticos na quimioterapia das infecções bacterianas em meados do século XX revolucionou o tratamento médico, ocasionando a redução drástica da mortalidade causada por doenças microbianas. Esses agentes antimicrobianos podem eliminar as bactérias (atividade bactericida) ou evitar o seu crescimento (atividade bacteriostática) atacando principalmente três alvos básicos dos sistemas bacterianos: biossíntese da parede celular, síntese de proteínas, reparo e replicação do DNA (WALSH, 2000).

A forma mais comumente descrita de resistência ocorre por mutação genética ou através da aquisição de nova informação genética que codifica para o elemento da resistência. Os mecanismos conhecidos de resistência (Figura 4) incluem: **1)** inativação da droga catalisada por enzima – por hidrólise ou a formação de derivados inativos; **2)** mutação, destruição ou superprodução do alvo – a molécula alvo pode ser alterada por mutação ou modificação enzimática de tal modo que a afinidade do antibiótico para o alvo está reduzida; **3)** diminuição das concentrações intracelulares de drogas – absorção prejudicada ou bombas de efluxo dependentes de energia que promovem a eliminação de agentes antimicrobianos para o meio extracelular mais rápido que a difusão pela membrana plasmática de maneira que a concentração intracelular do agente se mantém insuficiente para bloquear as funções celulares; **4)** redução da permeabilidade da membrana externa – a droga não consegue

penetrar eficientemente na célula bacteriana (ABREU; MCBAIN; SIMÕES, 2012; SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013).

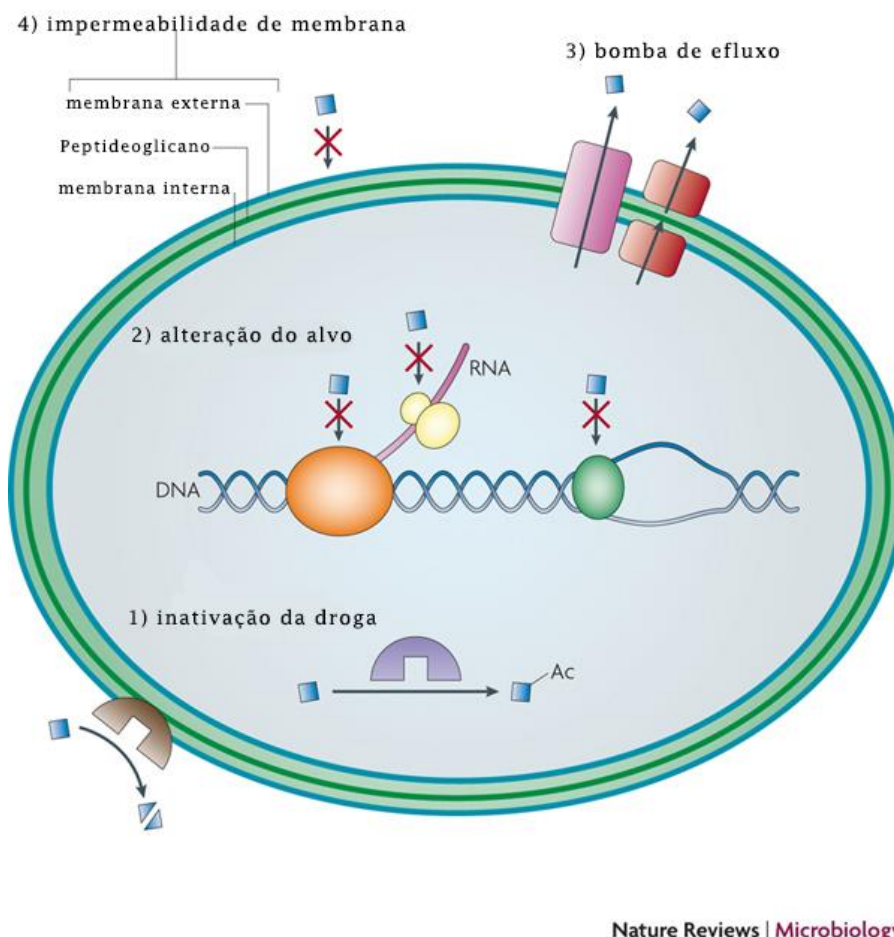


Figura 4 - Mecanismos de resistência bacteriana. Fonte: Adaptado de ALLEN et al. (2010).

Por muitos anos, os antibióticos apresentaram efeito no tratamento de muitas infecções causadas por patógenos, como *S. aureus* (FOURNIER; ARAS; HOOPER, 2000). No entanto, após a difusão do uso clínico das penicilinas, ocorreu o primeiro relato de *S. aureus* resistentes à penicilina em 1940, seguindo-se do aparecimento de estirpes *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (DIARRA et al., 2013), capazes de produzir penicilinase. No fim da década de 50 do século passado, algumas linhagens de *S. aureus* tinham adquirido resistência a praticamente todos os antibióticos de uso parenteral, incluindo a eritromicina e a tetraciclina (CHAMBERS, 1988).

Nos anos seguintes, outras linhas de defesa contra a ameaça do *S. aureus* surgiram, como a descoberta do antibiótico vancomicina – um glicopeptídeo isolado a partir do fungo *Amycolatopsis orientalis* – a qual apresentou um excelente desempenho frente às

linhagens MRSA. Fato que propiciou, ainda que de forma temporária, certa tranquilidade no combate a esses microrganismos, causando inclusive uma desaceleração nos investimentos de empresas farmacêuticas em programas de pesquisa de novos agentes antimicrobianos. Porém, a incidência de *S. aureus* resistentes a vancomicina (VRSA) abalou essa tranquilidade (SILVEIRA et al., 2006).

A busca por novos antimicrobianos para superar os problemas da resistência tem sido uma das prioridades da pesquisa na indústria farmacêutica. No entanto, nos últimos trinta anos, apenas duas novas classes de antibióticos entraram no mercado, os oxazolidinones e os lipopeptídeos cíclicos, os quais são utilizados contra infecções bacterianas Gram-positivas (Figura 5A). A baixa taxa de surgimento de novas classes de drogas desde a década de 1960 é evidente quando se examina a história da *Food and Drug Administration* (FDA) a aprovação de agentes antibacterianos (Figura 5B). Na verdade, apenas seis novos antibióticos foram aprovados ao longo dos últimos nove anos e o sucesso deles foi comprometido devido ao surgimento de resistência (ABREU; MCBAIN; SIMÕES, 2012).

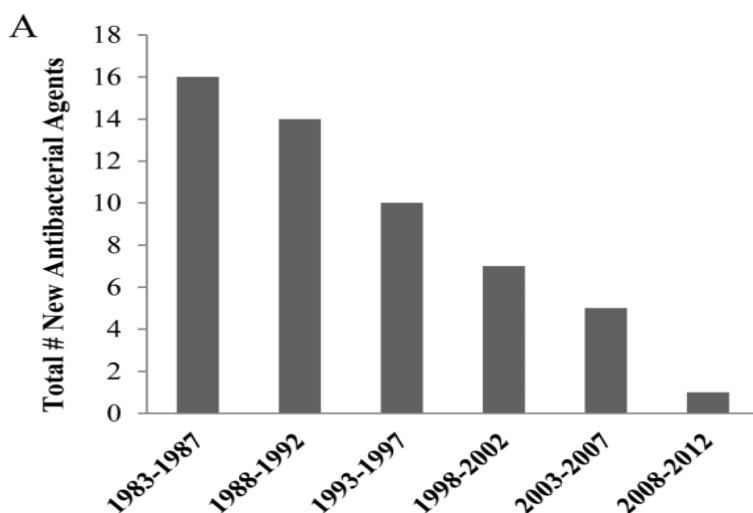


Figura 5A. Aprovações de antibióticos de 1983 (dados obtidos a partir do relatório do IDSA) em que a maioria desses medicamentos (75%) são de duas classes, b-lactâmicos e quinolonas. Fonte: ABREU; MCBAIN; SIMÕES, 2012.

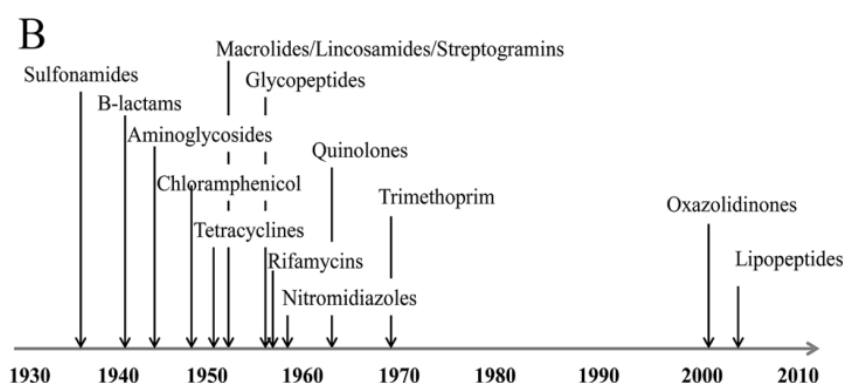


Figura 5B. História de drogas antibacterianas, introduções e aprovação. Fonte: ABREU; MCBAIN; SIMÕES, 2012.

2.5 SISTEMAS DE EFLUXO

A primeira descrição de proteína de efluxo em bactérias ocorreu em 1980, ao se estudar a resistência a tetraciclina em *Escherichia coli* (McMURRY; PETRUCCI; LEVY, 1980). Depois, diversas bombas de efluxo foram identificadas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas resistentes a diferentes classes de antibióticos, incluindo macrolídeos, fluoroquinolonas, β -lactâmicos e mais recentemente os aminoglicosídeos (VAN BAMBEKE et al., 2003; STAVRI; PIDDOCK; GIBBONS, 2007).

A Resistência a antibióticos mediada por efluxo tem sido amplamente descrita na literatura (McCALLUM; BERGER-BACHI; SENN, 2010, SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013). É causada pela expressão aumentada do gene codificador de bombas de efluxo através de uma ação reguladora da proteína, mutações reguladoras, aquisição de plasmídeo ou mutações que potencializam as bombas aumentando o efluxo da droga. São proteínas hidrofóbicas, capazes de exportar classes específicas de drogas ou compostos estruturalmente diversos e toxinas, utilizando ATP ou gradiente de íons como fonte de energia (SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013).

Bombas de efluxo são proteínas transmembrana envolvidas no transporte de substratos tóxicos, incluindo todas as classes de antibióticos clinicamente relevantes, do interior da célula para o ambiente extracelular, diminuindo a concentração intracelular do substrato antimicrobiano (PIDDOCK, 2006). Essas proteínas podem ser específicas a um substrato ou transportar vários compostos estruturalmente não relacionados, como antibióticos de classes diferentes. Neste último caso, tais bombas podem estar associadas a MDR (WEBBER; PIDDOCK, 2003). Os compostos anfipáticos catiônicos são os substratos mais

frequentes de muitas proteínas MDR (LEWIS, 2001). Os genes codificadores das proteínas de efluxo e seus produtos estão presentes em todos os organismos, desde bactérias até fungos e eucariotos superiores (VAN BAMBEKE et al., 2003).

Os sistemas de efluxo são classificados em 5 grandes famílias. De acordo com a energia usada para expulsar o substrato e a similaridade na sequência aminoacídica, são elas: superfamília MFS (*Major facilitator*), superfamília ABC (*ATP binding cassette*), família RND (*resistance nodulation division*), família MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) e família SMR (*small multidrug resistance*) (SANCHEZ, 2003; KUMAR; SCHWEIZER, 2005).

Bombas MFS predominam entre bactérias Gram-positivas, incluindo o *S. aureus* (HASSAN; SKURRAY; BROWN, 2007). Bombas MFS em *S. aureus* incluem o bombas de efluxo MDR LmrS, NorA, NorB, NorC, MdeA, SdrM e QacA/B e os transportadores específicos de tetraciclina Tet38 e TetK (YAMADA et al., 2006; FLOYD et al., 2010; SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013).

Transportadores não-MFS em *S. aureus* incluem MsrA (ABC), Sav1866 (ABC), QacC (pequenas MDR), MepA (MATE) e o transportador SepA (ROSS, 1989; SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013). Os perfis dos substrato destas bombas de MDR variam em magnitude. Ao todo são capazes de transportar compostos, tais como antibióticos (por exemplo, aminoglicósidos, macrolídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina e estreptogramina), biocidas (por exemplo, compostos de amônio quaternário [QAC] e monovalente e cátions divalentes) e corantes intercalantes (por exemplo, brometo de etídio [EtBr], acriflavina e Hoechst 33342) (HASSAN; SKURRAY; BROWN, 2007; LI; NIKAIIDO, 2009).

A proteína de efluxo MDR melhor caracterizada em *S. aureus* é a NorA, encontrada tanto em linhagens MSSA (*Staphylococcus aureus* sensível a Meticilina) como em MRSA (GIBBONS, 2004; PIDDOCK, 2006), bem como, em linhagens clínicas que superexpressam o gene *norA* (KAATZ; SEO; RUBLE, 1993; JONES et al., 2000). O gene *norA* foi primeiro identificado em *S. aureus*, em 1990. Sua proteína (NorA) transporta diversos substratos, tais como: fluoroquinolonas hidrofílicas (norfloxacin, ciprofloxacina, lomefloxacina e ofloxacina), brometo de etídio, acriflavina, rodamina, centrimida, cloreto de benzalcônio, brometo de tetrafenilfosfônio, clorafenicol, além do alcalóide berberina (NEYFAKH; BORSCH; KAATZ, 1993; KAATZ; SEO, 1995; AESCHIMANN; et al., 1999). A inibição da proteína NorA fornece o aumento da susceptibilidade bacteriana de

quatro a oito vezes mais para as fluoroquinolonas (YAMADA et al., 1997; HSIEH et al., 1998).

2.6 AGENTES MODIFICADORES DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

O aparecimento da resistência aos antibióticos tem reduzido o valor terapêutico dos agentes existentes (Quadro 2) criando a necessidade da descoberta de novos agentes antibacterianos cada vez mais eficientes – sejam de origem natural, semi-sintética ou sintética (SILVEIRA et al., 2006; CHOPRA et al., 2002) – sendo também necessários estudos que levem à criação de formas mais ágeis de diagnóstico, que ajudem a entender como os microrganismos se tornam resistentes a medicamentos, e sobre como o comportamento humano influencia essa resistência (OMS, 2014).

Quadro 2. História do desenvolvimento dos agentes antimicrobianos x subsequente aquisição da resistência pelos microrganismos.

Desenvolvimento dos antibióticos	Relatos de resistência bacteriana
Penicilina (1942)	Propagação da Penicilinase (1945)
	Penicilinas transferidas a <i>Gonococcus</i> (1976)
	<i>Enterococcus</i> resistente a penicilina (1983)
Estreptomicina (1947)	Resistência à estreptomicina (1947)
Tetraciclina (1952)	Resistência à tetraciclina (1956)
Vancomicina (1958)	Raramente usada até meados de 1980
	<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina (VRE) (1987)
	<i>S. aureus</i> resistente intermediário à vancomicina (VISA) (1996)
	<i>S. aureus</i> resistente à vancomicina (VRSA) (2002)
Metilina (1959)	<i>S. aureus</i> resistente à metilina (MRSA) (1961)
	MRSA adquirida na comunidade (1999)
Cefalotina (1964)	Resistência à cefalotina: 1ª cefalosporina (1966)
Gentamicina (1967)	Resistência à gentamicina (1970)
Cefatoximina: aprovada pela FDA (1981)	Resistência à cefatoximina (1983)
	1º surto de <i>K. pneumoniae</i> resistente à 3ª geração de cefalosporina (1987)
Imipenem, 1ª carbapenem (1984)	<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente à carbapenem (1998)
Linezolida, 1ª oxazolidinona: FDA aprovada (2000)	<i>S. aureus</i> e VRE resistente à linezolida (2001)

Fonte: Adaptado de HUH; KWON, 2011.

Os problemas trazidos pela resistência bacteriana são agravados pela falta de novas drogas antimicrobianas (em desenvolvimento) e isso é mais do que apenas um problema de oferta futura de antibióticos. Ensaios clínicos das empresas farmacêuticas de

antibióticos constituíam uma valiosa fonte de dados de resistência para os pesquisadores de saúde pública (REARDON, 2014).

Uma importante estratégia potencial para ajudar a combater o problema da resistência envolve a descoberta e desenvolvimento de novos agentes ativos capazes de suprimir parcial ou totalmente o mecanismo de resistência bacteriana. O desenvolvimento dos denominados agentes modificadores da resistência (RMA - *Resistance-Modifying Agents*) representa uma atrativa estratégia para reduzir a disseminação da resistência bacteriana a drogas, uma vez que poderiam facilitar a bem estabelecida reciclagem dos antibióticos, que são muitas vezes mais barato e menos tóxico do que novos antimicrobianos (ABREU; MCBAIN; SIMÕES, 2012).

Os inibidores de resistência, também chamados moduladores da resistência a drogas, modificadores de atividade antibiótica ou adjuvantes de antibióticos, são considerados como a alternativa mais apropriada das novas terapias antibacterianas (VAN BAMBEKE et al, 2006; LYNCH, 2006). Moduladores da resistência a antibióticos são compostos que potencializam atividade antibiótica contra cepas resistentes. Alguns destes agentes atuam como inibidores da bomba de efluxo (EPIs) (MAIA et al., 2011).

A procura por compostos que interagem com os sistemas de efluxo, inibindo-os, foi iniciada nos anos 90, focando principalmente em *S. aureus* (PIDDOCK, 2006). Os mecanismos pelos quais os inibidores de bomba de efluxo podem atuar não estão claramente compreendidos, mas têm sido propostas algumas formas de ação (Figura 3), como: ligar-se diretamente a um ou mais sítios de ligação na proteína de efluxo, de maneira competitiva ou não -competitiva; apresentar afinidade pelo substrato transportado pela bomba, formando um complexo que poderá não ser mais reconhecido pela bomba de efluxo; interferir no gradiente de próton; interagir com a membrana plasmática modificando a conformação da proteína de efluxo ou inibir a expressão do gene de efluxo. Assim, a aplicação desses inibidores em associação com antibióticos convencionais pode aumentar a concentração intracelular desses antibióticos, restaurando sua eficiência e reduzindo o emergente desenvolvimento da resistência bacteriana (MARKHAM et al., 1999; ZLOH; KAATZ; GIBBONS, 2004; LOMOVSKAYA; BOSTIAN, 2006; POOLE; LOMOVSKAYA, 2006;).

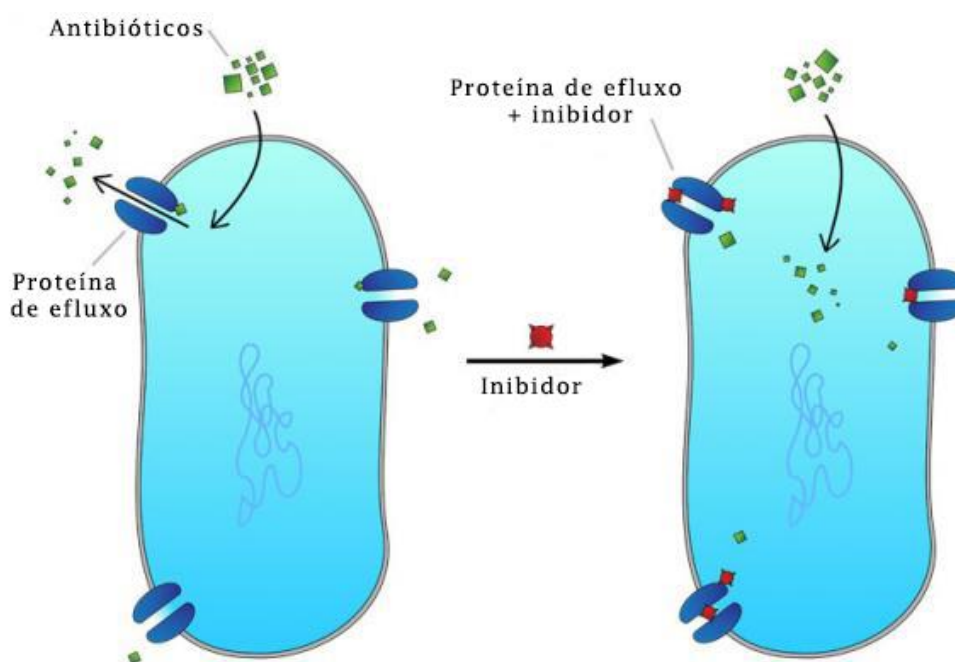


Figura 6. Prováveis meios de atuação de um inibidor de sistema de efluxo.

Fonte: <https://news.brown.edu/articles/2011/11/bacteria>, acesso em 23/03/2015.

Tal tratamento combinado pode reduzir o aparecimento de cepas resistentes aos antibióticos, ampliar espectros de antibacterianos e reduzir a formação de biofilme e resistência (LOMOVSKAYA; BOSTIAN, 2006; KVIST; HANCOCK; KLEMM, 2008; SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013). Independentemente do mecanismo de ação, um EPI clinicamente relevante deve estar ativo em concentração atingível no soro (e/ou no tecido alvo) com toxicidade mínima e agir sinergicamente com os antibióticos, produzindo um efeito combinado que seja superior ao efeito dos agentes isoladamente (DAWSON; LOCHER, 2006). É também desejável que o EPI apresente baixa atividade antibiótica intrínseca para garantir que suas atividades potenciadoras possam ser atribuídas unicamente à inibição da bomba de efluxo alvo (SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013).

A escassez de inibidores de efluxo efetivos na prática clínica leva à constante procura pela identificação e desenvolvimento de novos inibidores, tanto contra os sistemas de efluxo em microrganismos como em células tumorais resistentes a múltiplas drogas (KAATZ et al., 2003; DICKSON et al., 2006). Além disso, EPIs bacterianos podem ser ferramentas muito úteis para o estudo de bombas de efluxo em eucariotos (por exemplo, as células cancerosas com fenótipo MDR), desde bombas bacterianas a eucarióticas têm mostrado características farmacológicas semelhantes, e partilham de inibidores semelhantes (GIBBONS et al., 2003; FALCÃO-SILVA et al., 2009).

Entre os anos 90 e 2010, numerosos compostos estruturalmente diversos têm sido estudados e mostraram ter atividade inibidora de efluxo. Estes incluem medicamentos disponíveis atualmente empregados para outras indicações, bem como moléculas naturais e sintéticas (PIDDOCK et al., 2010; SABATINI et al., 2011). Determinar relações estrutura-atividade (SARS) e desenho racional do mais seguro e potente EPI é feito um desafio pela heterogeneidade estrutural dos EPIs, a compreensão incompleta dos mecanismos de inibição, amplos perfis de substrato de bomba de efluxo MDR e a possibilidade de múltiplas bolsas de ligação dentro um único sítio de ligação (HIGGINS, 2007; GERMAN; KAATZ; KERNS, 2008).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS DE TESTE E MEIOS DE CULTURA

Foram utilizadas linhagens de *S. aureus* fornecidas pelo Dr. Simon Gibbons (The School of Pharmacy, University of London), como mostra o quadro 3. Todas estas linhagens foram mantidas em meio de cultura Ágar sangue (*Blood Agar Base* – BAB, Difco) inclinado. Antes de serem utilizadas, as células foram crescidas em caldo nutritivo de infusão (*Brain Heart Infusion* - BHI, Difco) por 18-24 horas a 37°C.

Quadro 3. Linhagens de *S. aureus* ensaiadas.

Estirpe bacteriana	Gene ou plasmídeo	Proteína expressa	Antibiótico utilizado	Fonte
IS-58	Gene <i>tetK</i> (plasmidial)	TetK	Tetraciclina	GIBBONS; UDO, 2000
RN4220	Plasmídeo pUL5054	MsrA	Eritromicina	ROSS et al, 1989; CHAN et al, 2013
SA-1199B	Gene <i>norA</i>	NorA	Norfloxacin	GIBBONS; UDO, 2000

3.2 ANTIBIÓTICOS, BROMETO DE ETÍDIO E CORANTE RESAZURINA

As soluções estoque de norfloxacin (Nor), tetraciclina (Tet) (e eritromicina (Eri) foram preparadas de acordo com o descrito por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012a) exibidas no quadro 4. A solução estoque de brometo de etídio (BrEt) (12,8 mg/10 mL, p/v) e do corante resazurina (0.01 g/100 mL, p/v) (Inlab, Brasil) foram preparadas em água destilada, enquanto Antibióticos, compostos fenólicos e EtBr foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

Quadro 4. Solventes e Diluentes para a Preparação de Soluções Padrão de Agentes Antimicrobianos.

Agente Antimicrobiano (concentração de 1280µg/mL)	Solvente	Diluyente
Tetraciclina	10 mL Água (100%)	Água
Eritromicina	10 mL Álcool absoluto (P.A) (100%)	Álcool
Norfloxacina	1 mL NAOH 0,1 mol/L (10%)	9 mL Água (90%)

Fonte: Adaptado de CLSI (2012a).

3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS TESTADOS

As soluções mãe dos compostos fenólicos (flavonoides, taninos e ácido fenólicos) foram preparados em DMSO (80%) e água destilada (20%) (3,2 mg/1250 µL, p/v). DMSO a sua concentração mais elevada ensaiada definitiva - após diluição em caldo (4%) - não causou inibição do crescimento bacteriano. Os CF foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

Quadro 5 – Compostos fenólicos ensaiados.

Flavonoides	Código
Hesperetina Sigma-Aldrich®	W431300
Hesperidina Sigma-Aldrich®	H5254
Naringenina Sigma-Aldrich®	W530098
Naringina Sigma-Aldrich®	71162
Diosmetina Sigma-Aldrich®	D7321
Diosmina Sigma-Aldrich®	D3525
Floretina Sigma-Aldrich®	P7912
Floridzina Sigma-Aldrich®	274313
Miricetina Sigma-Aldrich®	M6760
Miricitrina Sigma-Aldrich®	91255
Quercetina Sigma-Aldrich®	1592409
Quercitrina Sigma-Aldrich®	Q4951
Taninos	Código
Ácido elágico Sigma-Aldrich®	E2250

Ácido tânico Sigma-Aldrich®	403040
Ácidos fenólicos	Código
Ácido gálico Sigma-Aldrich®	G7384
Ácido <i>trans</i> -4-Hidroxi-3-metoxicinâmico Sigma-Aldrich®	650765
Ácido cafeico Sigma-Aldrich®	60020
Ácido 2-metoxicinâmico Sigma-Aldrich®	65400
Ácido 3-metoxicinâmico Sigma-Aldrich®	M13602
Ácido ferulico Sigma-Aldrich®	Y0001013
Ácido <i>p</i> -cumárico Sigma-Aldrich®	C9008
Ácido <i>p</i> -metoxicinâmico Sigma-Aldrich®	M13807
Ácido 3,4-dimetoxicinâmico Sigma-Aldrich®	D133809
Ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico Sigma-Aldrich®	T70408

3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Ensaio foram realizados em placa de microtitulação para determinar os valores da concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos, CF e BrEt de acordo com o método padrão descrito por Clinical and Laboratory Standards Institute (WIEGAND et al, 2008;. CLSI, 2012b). As placas de 96 poços foram preparadas dispensando 180 µL de caldo BHI contendo 1,8 µL de suspensão bacteriana (8 unidades formadoras de colônias de log por ml - CFU/ml). Em seguida, 20 µL de soluções de cada antibiótico/CF/BrEt (256-0,25 µg/ml) foram adicionados a cada poço. Cada placa incluindo controles positivos sem antibiótico/CF/BrEt. O sistema foi incubado a 37 °C durante 24 h. Após o período de incubação, uma alíquota da solução aquosa de resazurina (20µL) foi adicionado a cada poço. As mudanças de cor foram então avaliadas visualmente após 20 min a 37 °C. O crescimento bacteriano foi indicado por mudanças de cor em cada poço de púrpura a cor de rosa (ou incolor). Os valores de CIM foram confirmados como sendo a mais baixa concentração capaz de inibir o crescimento de estirpes.

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MODULADORA DA RESISTÊNCIA A DROGAS

Para a avaliação dos CF como agentes modificadores (inibidores da bomba de efluxo) da atividade de antibióticos sintéticos, a CIM dos antibióticos e BrEt foi determinada na ausência e na presença (em 1/4 da CIM, concentração sub-inibitória) dos

compostos fenólicos (GIBBONS et al., 2003; STAVRI; PIDDOCK; GIBBONS, 2007). O sistema foi incubado a 37 °C durante 24 h. Após o período de incubação, uma alíquota da solução aquosa de resazurina (20µL) foi adicionado a cada poço. As mudanças de cor foram então avaliadas visualmente após 20 min a 37 °C. O crescimento bacteriano foi indicado por mudanças de cor em cada poço de púrpura a cor de rosa (ou incolor).

3.6 ENSAIO DE CHECKERBOARD

O método *checkerboard* foi realizado utilizando microdiluição em BHI para obter o Índice Concentração Inibitória Fracional (ICIF) da aplicação combinada do AT e Nor. O ICIF foi calculado da seguinte forma: (CIM do AT em combinação com Nor/CIM do AT sozinho) + (CIM de Nor em combinação com AT/CIM de Nor sozinho). AT e Nor foram ensaiados com CIM, 1/2 CIM, 1/4 CIM, 1/8 CIM, 1/16 CIM e 1/32 CIM em diferentes combinações de cada uma das concentrações diferentes de cada composto testado. A sinergia foi definida como $CIF \leq 0,5$; indiferença (sem interação) foi definido como $CIF > 0,5-4$; e antagonismo foi definida como $CIF > 4$ (MACKAY et al, 2000; HEMAISWARYA et al., 2008).

Os ensaios foram realizados em triplicata, em três experiências separadas. Os resultados foram expressos como valores modais, porque os valores da repetição eram os mesmos.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A.C.; MCBAINB, A.J.; SIMÕES M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. **Natural Product Reports**, v. 29, p. 1007–1021. 2012.
- AESCHLIMANN, J.R.; DRESSER, L.D.; KAATZ, G.W.; RYBAK, M.J. Effects of NorA inhibitors on in vitro antibacterial activities and postantibiotic effects of levofloxacin, ciprofloxacin, and norfloxacin in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 335-340. 1999.
- ALLEN, H.K.; DONATO, J.; WANG HHUIMMI; CLOUD-HANSEN, K.A.; DAVES, J.; HANDELSMAN, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 8, p. 251–259. 2010.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_staphylo.htm> Acesso em agosto de 2014.
- AHMAD, Z.; AHMAD, M.; OKAFOR, F.; JONES, J.; ABUNAMEH, A.; CHENIYA, R.P.; KADY, I.O. Effect of structural modulation of polyphenolic compounds on the inhibition of *Escherichia coli* ATP synthase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 476–86, 1 abr. 2012.
- AKIYAMA, H.; FUJII, K.; YAMASAKI, O.; OONO, T.; IWATSUKI, K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 487-491. 2001.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, jan. 2006.
- BORGES, A.; FERREIRA, C.; SAAVEDRA, M.J.; SIMÕES, M. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v.19, n. 4, p. 256-265. 2013.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317–333. 1998.

CAMPOS, F.M.; COUTO, J.A.; FIGUEIREDO, A.R.; TÓTH, I.V.; RANGEL, A.O.S.S.; HOGG, T.A. Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 2, p. 144–151. 2009.

CDDEP – Center for Disease Dynamics, Economics & Policy. **Resistance Map**: disponível em <<http://www.cddep.org/map>> Acesso em setembro de 2014.

CHAN, B.C. Synergistic effects of baicalein with ciprofloxacin against NorA over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and inhibition of MRSA pyruvate kinase. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 767–773. 2013.

CHAMBERS, H.F. Methicillin-resistant staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v.1, p. 173-186. 1988.

CHOPRA, I.; HESSE, L.; O'NEIL, A. J. Exploiting current understanding of antibiotic action for discovery of new drugs. **Journal of Applied Microbiology, Symposium Supplement**, v. 92, p.4-15. 2002.

CHOI, J.S.; ISLAM, N.; ALI, Y.; JI KIM, E.; MYEONG KIM, Y.; AH JUNG, H. Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 64, p. 27–33. 2014.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012a.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012b.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564–582. 1999.

DAVIDSON, P.M.; NAIDU, A.S. Phyto-phenols. **See Naidu**, p. 265–294. 2000.

DAWSON, R.J.; LOCHER, K.P. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. **Nature**, v. 443, n. 7108, p. 180–185. 2006.

DEMAIN, A.L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of Antibiotics**, v. 62, p. 5–16. 2009.

DIARRA, M.S.; BLOCK, G.; REMPEL, H.; OOMAH, B.D.; HARRISON, J.; MCCALLUM, J.; BOULANGER, S.; BROUILLETTE, E.; GATTUSO, M.; MALOUIN, F. In vitro and in vivo antibacterial activities of cranberry press cake extracts alone or in combination with β -lactams against *Staphylococcus aureus*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 90. 2013.

DICKSON, R.A.; HOUGHTON, P.J.; HYLANDS, P.J.; GIBBONS, S. Antimicrobial, resistance-modifying effects, antioxidant and free radical scavenging activities of *Mezoneuron benthamianum* Baill., *Securinega virosa* Roxb. & Wlld. And *Microglossa pyrifolia* Lam. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 41-45. 2006.

EL ANTRI, A.; MESSOURI, I.; TLEMÇANI, R.C.; BOUKTAIB, M.; EL ALAMI, R.; EL BALI, B.; LACHKAR, M. Flavone Glycosides from *Calycotome Villosa* Subsp. *Intermedia*. **Molecules**, v. 9, p. 568-573. 2004.

FALCÃO-SILVA, V.S.; SILVA, D.A.; SOUZA, M.F.V.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P. Modulation of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus* by a Kaempferol Glycoside from *Herissantia tiubae* (Malvaceae). **Phytotherapy Research.**, v. 23, p. 1367–1370. 2009.

FANG, R.; VEITCH, N.C.; KITE, G.C.; PORTER, E.A.; SIMMONDS, M.S.J. Enhanced profiling of flavonol glycosides in the fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 6, p. 3868-75. 2013.

FERREIRA, J.S.; COSTA, W.L.R.; CERQUEIRA, E.S.; CARVALHO, J.S.; OLIVEIRA, L.C.; ALMEIDA, R.C.C. Food handler-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in public hospitals in Salvador, Brazil. **Food Control**, v. 37, p. 395-400. 2014.

FLOYD J.L.; SMITH, K.P.; KUMAR, S.H.; FLOYD, J.T.; VARELA, M.F. LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5406–5412. 2010.

FITZGERALD, J.R.; STURDEVANT, D. E.; MACKIE, S.M.; GILL, S.R.; MUSSER, J.M. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 15, p. 8821-8826. 2001.

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**, v. 182, p. 664-671. 2000.

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**, v. 18, n. 4, p. 1368–1373. 2008.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**, v. 21, p. 263-277. 2004.

GIBBONS, S. et al. Bacterial resistance modifying agents from *Lycopus europaeus*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 83–87. 2003.

GIBBONS, S.; UDO, E.E. The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux, on the *in vitro* activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the *tet(K)* determinant. **Phytotherapy Research**, v.14, p. 139-140. 2000.

HANSON, B.M.; DRESSLER, A.E.; HARPER, A.L.; SCHEIBEL, R.P.; WARDYN, S.E.; ROBERTS, L.K.; KROEGER, J.S.; SMITH, T.C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on retail meat in Iowa. **Journal of Infection and Public Health**, v. 4, p. 169-174. 2011.

HARBORNE, J.B. General procedures and measurement of total phenolics. In J. B. Harborne (Ed.). **Methods in plant biochemistry: Volume 1 Plant Phenolics** (pp. 1–28). London: Academic Press. 1989.

HARBORNE, J.B.; BAXTER, H.; MOSS, G.P. (Eds.). **Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants** (2nd ed.). London: Taylor & Francis. 1999.

HARBONE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481–504. 2000.

HASLAM, E.; Y. CAI. Plant Polyphenols (Vegetable Tannins*): Gallic Acid Metabolism. **Natural Products Report**, v. 11, p. 41-66. 1994.

HASSAN, K.A.; SKURRAY, R.A.; BROWN, M.H. Active export proteins mediating drug resistance in staphylococci. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 3–4, p. 180–196. 2007.

HEMAISWARYA, S., KRUTHIVENTI, A. K., DOBLE, M., Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, p. 639-652. 2008.

HIGGINS, C.F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. **Nature**, v. 446, n. 7137, p. 749–757. 2007.

HSIEH, P.; SIEGEL, S.A.; ROGERS, B.; DAVIS, D.; LEWIS, K. Bacteria lacking a multidrug pump: A sensitive tool for drug discovery. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States**, v. 95, p. 6602-6606. 1998.

HUH, A. J.; KWON, Y. J.. “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of Controlled Release**, v.156, p. 128-145. 2011.

JONES, M.E. BOENINK, N.M.; VERHOEF, J.; KOHRER, K.; SCHIMITZ, F.J. Multiple mutations conferring ciprofloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* demonstrate the long term stability in an antibiotic free environment. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p. 353-356. 2000.

KAATZ, G.W.; MOUDGAL, V.V.; SEO, S.M.; KRISTIANSEN, J.E. Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 719-726. 2003.

KAATZ, G.W.; SEO, S.M. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 2650-2655. 1995.

KAATZ, G.W.; SEO, S. M.; RUBLE, C.A. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 1086-1094. 1993.

KHAN, M.K.; ZILL-E-HUMA; DANGLES, O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33 p. 85–104. 2014.

KVIST, M.; HANCOCK, V.; KLEMM, P. Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 23, p. 7376–7382. 2008.

KUMAR, A., KHAN. I.A., KOUL, S., KOUL, J.L., TANEJA, S.C, ALI, I., ALI, F., SHARMA, S., MIRZA, Z.M., KUMAR, M., SANGWAN, P.L., GUPTA, P., THOTA, N., QAZI, G.N. Novel structural analogues of piperine as inhibitors of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, p. 1270-1276. 2008.

KUMAR, A.; SCHWEIZER, H.P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1486-1513. 2005.

LANDETE, J.M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about

source, metabolism, functions and health. **Food Research International**, v. 44, p. 1150–1160. 2011.

LEWIS, K. In Search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 3, p. 247-254. 2001.

LI, X.Z.; NIKAIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. **Drugs**, v. 69, p. 1555–1623. 2009.

LI, N.; LOU, M.; FU, Y.; ZU, Y.; WANG, W.; ZHANG, L.; YAO, L.; ZHAO, C.; SUN, Y. Effect of Corilagin on Membrane Permeability of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 1517–1523. 2013.

LI, A.-N. LI, S.; ZHANG, L.; XU, X.; CHEN, Y.; LI, H. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. **Nutrients**, v. 6, p. 6020-6047. 2014.

LICANDRO-SERAUT, H.; ROUSSEL, C.; PERPETUINI, G.; GERVAIS, P.; CAVIN, J. Sensitivity to vinyl phenol derivatives produced by phenolic acid decarboxylase activity in *Escherichia coli* and several food-borne Gram-negative species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 7853–7864. 2013.

LINDSAY, J.A., HOLDEN, M.T.G. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? **Trends in Microbiology**, v. 12, p. 378-385. 2004.

LOMOVSKAYA, O.; BOSTIAN, K.A. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic – a vision for applied use. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 910-918. 2006.

LYNCH, A.S. Efflux systems in bacterial pathogens: an opportunity for therapeutic intervention? An industry view. **Biochemical pharmacology**, v. 71, p. 949-956. 2006.

MAIA, G.L.D.A.; FALCÃO-SILVA, V.S.; AQUINO, P.G.V.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; TAVARES, J.F.; SILVA, M. S.; RODRIGUES, L.C.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.;

BARBOSA-FILHO, J.M. Flavonoids from *Praxelis clematidea* R.M. King and Robinson modulate bacterial drug resistance. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 16, p. 4828–35. 2011.

MAQSOOD, S.; BENJAKUL, S. Synergistic effect of tannic acid and modified atmospheric packaging on the prevention of lipid oxidation and quality losses of refrigerated striped catfish slices. **Food Chemistry**, v. 121, p. 29–38. 2010.

MACKAY, M. L., MILNE, K., GOULD, I. M., Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 15, p. 125-129. 2000.

MARKHAM, P. et al. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 2404-2408. 1999.

MCCLANAHAN, C. Phytochemicals. **Biofililes Sigma-Adrich**, v. 7, p. 4. 2012.

MCCALLUM, N.; BERGER-BACHI, B.; SENN, M.M. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**., v. 300, p. 118–129. 2010.

MCMURRY, L.; JR. PETRUCCI, R.E.; LEVY, S.B. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, p. 3974-3977. 1980.

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**, v. 37, p. 128-129. 1993.

OMS – Organização Mundial de Saúde. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, 2014.

PIDDOCK, L.J.V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacterial. **Clinical Microbiology reviews**, v. 19, p. 382-402. 2006.

PIDDOCK, L.J. et al. Natural and synthetic compounds such as trimethoprim behave as inhibitors of efflux in Gram-negative bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 1215–1223. 2010.

POOLE K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. **Journal Applied Microbiology**, v. 92(Suppl.), p. 55S–64S. 2002.

POOLE, K.; LOMOVSKAYA, O. Can efflux inhibitors really counter resistance? **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 3, p. 145-152. 2006.

PUGLIESE, A.G. Flavonoids, proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of *Theobroma grandiflorum* (Cupuassu) Pulp and Seeds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 61, p. 2720-8. 2013.

PUTMAN, M.; VAN VEEN, H.W.; KONINGS, W.N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. **MMBR**, v. 64(4), p. 672–693. 2000.

QUAVE, C.L.; ESTÉVEZ-CARMONA, M.; COMPADRE, C.M.; HOBBY, G.; HENDRICKSON, H.; BEENKEN, K.E.; SMELTZER, M.S. Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. **PLoS ONE**, v. 7, p. e28737. 2012.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSÉGU, L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, p. 586 – 621. 2011.

REARDON, S. Antibiotic resistance sweeping developing world: Bacteria are increasingly dodging extermination as drug availability outpaces regulation. **Nature: News Infocus**, v. 509, p.141, 2014.

RIJKE, E.D.; OUT, P.; NIESSEN, W.M.A; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U.A.TH. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography**, v. 1112, p. 31–63. 2006.

ROBBINS, R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. V. 51, p. 2866–2887. 2003.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 52, p. 1138–43, 2011.

RUSSELL, A.D. Do biocides select for antibiotic resistance? **Journal of Pharmacy Pharmacology**, v. 52, n. 2, p. 227–233. 2000.

SABATINI, S.; GOSETTO, F.; MANFRONI, G.; TABARRINI, O.; KAATZ, G.W.; PATEL, D. Evolution from a natural flavones nucleus to obtain 2-(4-propoxyphenyl) quinoline derivatives as potent inhibitors of the *S. aureus* NorA efflux pump. **Journal of Medical Chemistry**, v. 54, n. 16, p. 5722–5736. 2011.

SALMINEN, J.-P.; KARONEN, M. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. **Functional Ecology**, v., 25, p. 325–338. 2011.

SAMY, R.P.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, v. 7, p. 283–294. 2010.

SANCHEZ, P.D. Sistemas MDR y resistencia a los antimicrobianos. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 16, p. 172-187. 2003.

SÁNCHEZ-MALDONADO, A.F.; SCHIEBER, A.; GÄNZLE, M.G. Structure-function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. **Journal Applied Microbiology**, v. 111, p. 1176–1184. 2011.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3875–3883. 1991.

SCHINDLER, B.D.; JACINTO, P. E.; KAATZ, G.W. Inhibition of drug efflux pumps in *Satphylococcus aureus*: current status of potentiating existing antibiotics. **Future Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 491–507. 2013.

SERRANO, J.; PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; DAUER, A.; AURA, A.; SAURA-CALIXTO, F. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, p. S310 –S329. 2009.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M.; TERENCE, H. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, p. 844-855. 2006.

SOBRATTEE, M.A.; NEERGHEEN, V.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutation Research**, p. 579:200–213. 2005.

STALIKAS, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal Separation Science**, v. 30, p. 3268–3295. 2007.

STAVRI, M.; PIDDOCK L.J.V.; GIBBONS, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p.1247-1260. 2007.

TAPAS, A.R.; SAKARKAR, D.M.; KAKDE, R.B. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. **Tropical Journal of Pharmacy Research**, v.7 n. 3, p. 1089-1099. 2008.

TAHERI, R.; CONNOLLY, B.A.; BRAND, M.H.; BOLLING, B.W. Underutilized chokeberry (*Aronia melanocarpa*, *Aronia arbutifolia*, *Aronia prunifolia*) accessions are rich sources of anthocyanins, flavonoids, hydroxycinnamic acids, and proanthocyanidins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.61, p. 8581-8. 2013.

TIBERTI, L.A.; YARIWAKE, J.H.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-line LC/UV/MS analysis of flavonols in the three apple varieties most widely cultivated in Brazil. **Journal Brazilian of Chemistry Society**, v. 18, p. 100-5. 2007.

US Code of Federal Regulations, 2006. Tannic acid. 21 CFR 184.1097. 492–493.

VAN BAMBEKE, F.; GLUPCZYNSKI, Y.; PLÉSIAT, P.; PECHÈRE, J.C.; TULKENS, P.M. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 1055–1065. 2003.

VAN BAMBEKE, F., PAGES, J. 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**, v. 1, p. 157-175. 2006.

VAQUERO, M.J. R.; NADRA, M.C.M. Growth Parameter and Viability Modifications of *Escherichia coli* by Phenolic Compounds and Argentine Wine Extracts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, p. 342–352. 2008.

VAQUERO, M.J.R.; AREDES FERNÁNDEZ, P.A.; MANCA DE NADRA, M.C.; STRASSER DE SAAD, A.M. Phenolic compound combinations on *Escherichia coli* viability in a meat system. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 58, p. 6048–6052. 2010.

VAQUERO, M.J.R.; FERNÁNDEZ, P.A.A.; NADRA, M.C.M.. Effect of phenolic compound mixtures on the viability of *Listeria monocytogenes* in meat model. **Food Technology and Biotechnology**, v.49, p. 83–88. 2011.

WANG, B.-N.; LIU, H.F.; ZHENG, J.B.; FAN, M.T.; CAO, W. Distribution of phenolic acids in different tissues of Jujube and their antioxidant activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 59, p. 1288–1292. 2011.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, p. 775-781. 2000.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L.J.V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 9-11. 2003.

WEESE J.S.; ARCHAMBAULT, M.; WILLEY, B.M.; DICK, H.; KREISWIRTH, B.N.; SAID-SALIM, B.; MCGREER, A.; LIKHOSHVAY, Y.; PRESCOTT, J.F.; LOW, D.E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel, 2000-2002. **Emergence Infections Disiese**, v. 11, n. 3, p. 430-435. 2005.

WIEGAND, I., HILPERT, K., HANCOCK, R.E.W., Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, v. 3, p. 163-175. 2008.

WRIGHT, P. M., SEIPLE, I. B., & MYERS, A. G. The Evolving Role of Chemical Synthesis in Antibacterial Drug Discovery. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, p. 8840–8869. 2014.

YAMADA, H.; KUROSE-HAMADA, S.; FUKUDA, Y.; MITSUYAMA, J.; TAKAHATA, M.; MINAMI, S.; WATANABE, Y.; NARITA, H. Quinolone susceptibility of *norA* disrupted *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 2308-2309. 1997.

YAMADA, Y.; HIDEKA, K.; SHIOTA, S.; KORUDA, T.; TSUCHIYA, T. Gene cloning and characterization of SdrM, a chromosomally-encoded multidrug efflux pump, from *Staphylococcus aureus*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 3, p. 554–556. 2006.

YEGANG, D.; CHU, H.; CHU, I.K.; LO, C. CYP93G2 Is a flavanone 2-hydroxylase required for C-glycosylflavone biosynthesis in rice. **Plant Physiology**, v. 154, p. 324–333. 2010.

XIAO, J., MUZASHVILI, T.S., GEORGIEV, M.I. Advances in the biotechnological glycosylation of valuable flavonoids, **Biotechnology Advances**. “In press”, p. 1-52. 2014.

XU, F.; WENG, B.; GILKERSON, R.; MATERON, L.A.; LOZANO, K. Development of tannic acid/chitosan/pullulan composite nanofibers from aqueous solution for potential applications as wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 16–24. 2015.

ZENGİN, A.C.A.; ÇOLAK, S.M.; ZENGİN, G.; KILIÇ, E. Eco-friendly soaking process using tannic acid as an alternative bactericide. **Archives of Environmental Protection**, v. 40, p. 3-12. 2014.

ZHANG, X.-F.; DAI, Y.; ZHONG, W.; TAN, M.; LV, Z.; ZHOU, Y.; JIANG, X. Tannic acid inhibited norovirus binding to HBGA receptors, a study of 50 Chinese medicinal herbs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 1616–1623. 2012.

ZLOH, M.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S. Inhibitors of multidrug resistance (MDR) have affinity for MDR substrates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 881-885. 2004.

ZOU, J.H.; YANG, J.S.; ZHOU, L. Acylated flavone C-glycosides from *Trollius ledebouri*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 664-7. 2004.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

Tannic acid as potential modulator of norfloxacin-resistance in *Staphylococcus aureus* over-expressing *norA*-gene

Manuscrito submetido para avaliação de publicação no periódico:

Phytochemistry

ISSN: 0031-9422

F.I.: 3.350

Qualis CAPES: A1

(Ano base 2013)

Tannic acid as potential modulator of norfloxacin-resistance in *Staphylococcus aureus* over-expressing *norA*-gene

Running title: Antibiotic-resistance modulator effects of tannins

Helena Taina Diniz-Silva^{1*}, Isis Caroline da Silva Cirino¹, Vivyanne dos Santos Falcão-Silva¹, Marciane Magnani², Evandro Leite de Souza³, José P. Siqueira-Júnior¹

¹ *Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil*

² *Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil*

³ *Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil*

Abstract

Tannins have shown antimicrobial activity against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* by antagonizing their resistance mechanisms. The increasing antibiotic-resistance in *S. aureus* is a major public health problem all over the world. Therefore, this study investigated the effects of tannic acid (TA) and gallic acid (GA) as modulators of antibiotic-resistance using a strain of *S. aureus* (*S. aureus* SA-1119) overexpressing the *norA* gene - encoding NorA-efflux protein. The minimum inhibitory concentration (MIC) of norfloxacin (Nor) was determined in absence and presence of TA and GA at subinhibitory concentration. TA and GA showed weak inhibitory effects against *S. aureus* SA-1199B (MIC 512 µg/mL). However, when TA was tested in combination with norfloxacin (Nor), the MIC of Nor was reduced thirty-two fold (128 µg/mL to 4 µg/mL). Still, TA decreased four-fold the MIC of ethidium bromide (32 µg/mL to 8 µg/mL). In checkerboard assay, MIC of TA and Nor in combination reduced of 512 to 64 µg/mL (eight-fold) and 128 to 4 µg/mL (32-fold), respectively. Combination of TA and Nor presented a CIFI of 0.15, indicating a synergistic effect. From this, tannic acid could be an interesting agent able to increase the clinical efficacy of Nor to control *S. aureus*.

Key-words: phenolics; *Staphylococcus*; efflux system; putative efflux-pump inhibitor

1 Introduction

Tannins are water soluble polyphenols, classified into hydrolyzable and non-hydrolyzable (condensable) (Salminen and Karonen, 2011). Hydrolyzable tannins are esters of phenolic acids and a polyol, normally glucose. Gallotannins and ellagitannins are formed when the phenolic acid present in tannin structure is gallic acid (GA) and hexahydroxidifenic acid, respectively (Scalbert, 1991; Serrano et al., 2009). GA - formed via shikimate (3,4,5-trihydroxybenzoic acid) pathway - serves as a fundamental precursor of gallotannins and ellagitannins (Haslam and Cai, 1994; Quideau et al., 2011). Tannins are widely distributed in plant foods and they been reported as inhibitors of *S. aureus*, although these inhibitory effects (bacteriostatic and bactericidal) have been variable (Akiyama et al., 2001; Xu et al., 2015).

The tannic acid (TA) is a major member of hydrolyzable gallotannins class (Akiyama et al., 2001) known as important plant defense factor against herbivorous insects, fungi, bacteria and viruses, besides to have antioxidant-protecting effects on polyunsaturated fatty acids (Scalbert, 1991; Maqsood and Benjakul, 2010; Salminen and Karonen, 2011). TA is already considered as Generally Recognized as Safe (GRAS) by Food and Drug Administration (FDA) and permitted for use as additive in foods (21 CFR184. 1.097, US Code of Federal Regulation, 2006).

Reports of infections caused by multidrug-resistant *S. aureus* (MDRSA) have increased over the last years, especially in developing countries (WHO, 2014). The discovery of alternative agents able to increase the clinical efficacy of existing antibiotics, the so-called modifiers of resistance (resistance-modifying agents - RMA), has been considered as interesting and feasible strategy to combat antibiotic resistance in *S. aureus*. The use of RMA may provide a new and effective tool to control resistant bacteria in clinical practice using a reduced set of classical antibiotics, which have often lower costs when compared to new antibiotics (Abreu et al., 2012).

Considering the well-known biological properties of AT, and the current interest in the search for new RMA, this study investigated the effect of AT and of its precursor molecular constituent AG on modulation of norfloxacin resistance in an *S. aureus* strain overexpressing the *norA* gene.

2 Materials and methods

2.1 Norfloxacin, ethidium bromide and phenolic compounds

The stock solution of norfloxacin (Nor) (in 1M NaOH/distilled water, 1:9) was prepared according to described by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012a). The stock solution of ethidium bromide (EtBr) was prepared in distilled water, while the stock solutions of TA and GA were prepared in DMSO (80%) and distilled water (20%). DMSO at its highest final assayed concentration - after dilution in the broth (4%) - caused no inhibition of bacterial growth. NOR, TA, GA and EtBr were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

2.2 Test strain and growth conditions

Staphylococcus aureus SA-1199B (*S. aureus* SA1199B) that over-express the *norA* gene encoding the NorA efflux protein was used as test. Prior the assays the cells were grown overnight at 37 °C in brain heart infusion broth - BHI (Himedia, India). Stock cultures were kept in BHI broth containing glycerol (15 g/100mL) at – 20 °C.

2.3 Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and assessment of modulatory antibiotic activity

Microtiter plate assays were used to determine the MIC values of TA and GA according to the standard method described by Clinical and Laboratory Standards Institute (Wiegand et al., 2008; CLSI, 2012b). The 96-well plates were prepared by dispensing 180 µL of BHI broth containing 1.8 µL of bacterial suspension (8 log colony forming unit per milliliters - CFU/mL). Then, 20 µL of solutions TA or GA (256-0,25 µL/mL) were added to each well. Each plate included positive controls without the TA and GA. The system was incubated at 37 °C for 24 h. After the incubation period, an aliquot of resazurin aqueous solution (20 µL, 0.01 g/100 mL, w/v) (Inlab, Brazil) was added to each well. Color changes were then visually evaluated after 20 min at 37 °C. The bacterial growth was indicated by color changes in each well from purple to pink (or colorless). The MIC values were confirmed as being the lowest concentration able to inhibit the growth of strains.

For the evaluation of TA as resistance-modifying agents (efflux pump inhibitors) of activity of synthetic antibiotics, the MIC of Nor and EtBr was determined in absence and presence (at 1/4 of MIC; sub-inhibitory concentration) of TA (Gibbons et al., 2003; Stavri et al., 2007). Assays for determination of MIC of Nor and EtBr were performed using the microtiter plate assay as described above.

2.4 Checkerboard assay

The checkerboard method was performed using microdilution in (BHI) broth to obtain the Fractional Inhibitory Concentration index (FICI) for the combined application of TA and Nor. The FICI was calculated as follows: (MIC of TA in combination with Nor/MIC of TA alone) + (MIC of Nor in combination with TA/MIC of Nor alone). TA and Nor were assayed at the MIC, 1/2 MIC, 1/4 MIC, 1/8 MIC, 1/16 MIC and 1/32 MIC in different combinations of each of the different concentrations of each tested compound. Synergy was defined as $FIC \leq 0.5$; indifference (no interaction) was defined as $FIC > 0.5$ to 4; and antagonism was defined as $FIC > 4$ (Mackay et al., 2000; Hemaiswarya et al., 2008).

The assays were performed in triplicate on three separate experiments. The results were expressed as modal values because the values of the repetition were the same.

3 Results and discussion

TA and GA showed low efficacy to inhibit the growth of *S. aureus* SA-1199B, when considering the high MIC values detected (512 $\mu\text{g/mL}$). Even without presenting strong inhibitory activity against *S. aureus* SA-1199B, TA when incorporated into the growth medium at 128 $\mu\text{g/mL}$ (1/4 MIC) or 64 $\mu\text{g/mL}$ (1/8 MIC) was capable to decrease the MIC of Nor (128 to 4 $\mu\text{g/mL}$, thirty-fold decrease) against this strain (Table 1).

Taking into account that only TA presented modulator effect on inhibitory activity of NOR against *S. aureus* SA-1199B, TA was further tested to verify modulator effects on EtBr inhibitory activity. Results of this assays showed decrease in MIC of EtBr (32 $\mu\text{g/mL}$ to 8 $\mu\text{g/mL}$, four-fold) against *S. aureus* SA-1199B (Table 1). The decrease of EtBr MIC indicates that putative modulation of NOR resistance in *S. aureus* SA-1199B occurred via inhibition of efflux pump (Falcão-Silva et al., 2009). EtBr is a well-known substrate for NorA efflux protein and the active efflux is the only resistance mechanism already established for EtBr (Kumar et al., 2008).

The checkerboard assay was performed to determine the kind of interaction between TA and Nor against *S. aureus* SA-1199B. In agreement with results of modulator testing, TA alone was not effective ($\text{MIC} \geq 128 \mu\text{g/mL}$) to inhibit *S. aureus* SA-1199B in checkerboard assay. However, a synergistic effect was detected when TA was assayed in combination with Nor (Table 2). When TA and Nor were assayed in combination, the MIC of TA decreased from 512 to 64 $\mu\text{g/mL}$ (eight-fold), while the MIC of Nor decreased from 128 to 4 $\mu\text{g/mL}$ (32-fold). The FICI value for the combined application of TA and Nor was 0.15, suggesting a synergistic interaction against *S. aureus* SA-1199B.

Previous study reported that TA is capable to inhibit the growth of different pathogenic bacteria, including *S. aureus* (Chung et al., 1993). In the same study, GA showed no inhibitory effect on the tested strains. The authors stated that the inhibitory effects of TA are possibly related with the occurrence of an ester bond between GA and glucose. Thus, this structural feature may have important role to establish the antimicrobial effects TA.

Some authors also propose that antimicrobial effects of tannins could be related with their ability to form complexes with metal ions and/or to precipitate macromolecules in microbial cell membrane, such as proteins and polysaccharides (Akiyama et al., 2001; Serrano et al., 2009; Payne et al., 2013). Because of this ability to precipitate proteins, the TA (as a tannin) provokes loss of membrane integrity of target organisms and alterations in structure and functions of membrane-embedded proteins (Akiyama et al., 2001). Still, it has been reported that TA impairs the function of extracellular microbial enzymes, decreases supply of substrates needed for microbial growth or causes direct disturbance of microbial metabolism via inhibition of oxidative phosphorylation (Xu et al., 2015).

Thus, if TA affects the membrane-embedded proteins, TA may also interfere on functions of proteins forming efflux pumps (e.g. NorA protein) and ultimately on efflux systems. This could explain why *S. aureus* SA1199B showed a sharp decrease in MIC values of Nor in the presence of TA.

4 Conclusions

The results of this study demonstrate that: i) TA presents potential (putative) NorA efflux pump inhibitor effects in *S. aureus*; and ii) TA and Nor present a synergistic interaction against *S. aureus*. Overall, TA could be an interesting adjuvant compound for use in combination with Nor to control infections caused by antibiotic-resistant *S. aureus*.

5 Acknowledgements

The authors would like to thanks Prof. Simon Gibbons (University of London) for his valuable and kind cooperation, CNPq (Brazil) for the financial support and CAPES (Brazil) for a scholarship awarded to the first author (H.T. Diniz-Silva).

References

- ABREU, A.C., MCBAINB, A.J., SIMÕES M., 2012. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Nat. Prod. Rep.* 29, 1007-1021.
- AKIYAMA, H., FUJII, K., YAMASAKI, O., OONO, T., IWATSUKI, K., 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 487-491.
- CLSI. 2012a. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. 2012b. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CHUNG, K.-T., STEVENS, S.E.JR., LIN, W.-F., WEI, C. I., 1993. Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds. *Let. Appl. Microbiol.* 17, 29-32.
- FALCÃO-SILVA, V.S., SILVA, D.A., SOUZA, M.F.V., SIQUEIRA-JUNIOR, J.P., 2009. Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by a kaempferol glycoside. *Phytother. Res.* 23, 1367-1370.
- GIBBONS, S., OLUWATUYI, M., VEITCH, N.C., GRAY, A.I., 2003. Bacterial resistance modifying agents from *Lycopus europaeus*. *Phytochemistry.* 62, 83-87.
- HASLAM, E. and Y. CAI., 1994. Plant Polyphenols (Vegetable Tannins*): Gallic Acid Metabolism. *Nat. Prod. Rep.* 11, 41-66.
- HEMAISWARYA, S., KRUTHIVENTI, A. K., DOBLE, M., 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine.* 15, 639-652.

KAATZ, G.W., SEO, S.M., RUBLE, C.A., 1993. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 1086-1094.

KAATZ, G.W., SEO, S.M., 1995. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2650-2655.

KUMAR, A., KHAN, I.A., KOUL, S., KOUL, J.L., TANEJA, S.C, ALI, I., ALI, F., SHARMA, S., MIRZA, Z.M., KUMAR, M., SANGWAN, P.L., GUPTA, P., THOTA, N., QAZI, G.N., 2008. Novel structural analogues of piperine as inhibitors of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 1270-1276.

MAQSOOD, S. BENJAKUL, S., 2010. Synergistic effect of tannic acid and modified atmospheric packaging on the prevention of lipid oxidation and quality losses of refrigerated striped catfish slices. *Food Chem.* 121, 29-38.

MACKAY, M. L., MILNE, K., GOULD, I. M., 2000. Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 15, 125-129.

PAYNE, D.E., MARTIN, N.R., PARZYCH, K.R., RICKARD, A.H., UNDERWOOD, A., BOLES, B.R., 2013. Tannic acid inhibits *Staphylococcus aureus* surface colonization in an IsaA-dependent manner. *Infect. Immun.* 81, 496-504.

QUIDEAU, S., DEFFIEUX, D., DOUAT-CASASSUS, C., POUYSÉGU, L., 2011. Plant Polyphenols: chemical properties, biological activities and synthesis. *Angew. Chem. Int.* 50, 586-621.

SALMINEN, J-P and KARONEN, M., 2011. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Funct. Ecol.* 25, 325-338.

SCALBERT, A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30, 3875-3883.

SERRANO, J., PUUPPONEN-PIMIÄ, R., DAUER, A., AURA, A.M., SAURA-CALIXTO, F., 2009. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, S310-S329.

STAVRI, M., PIDDOCK, L.J.V., GIBBONS, S., 2007. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 1247-1260.

US Code of Federal Regulations, 2006. Tannic acid. 21 CFR 184.1097. 492–493.

WIEGAND, I., HILPERT, K., HANCOCK, R.E.W., 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* 3, 163-175.

WHO – World Health Organization, 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.

XU, F., WENG, B., GILKERSON, R., MATERON, L.A., LOZANO, K., 2015. Development of tannic acid/chitosan/pullulan composite nanofibers from aqueous solution for potential applications as wound dressing. *Carbohydr. Polym.* 115, 16-24.

Table 1

Values of minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics and ethidium bromide in the absence and presence of AT or AG against effluxing strains of *S. aureus*.

+ Agent	MIC (µg/ml)	
	SA-1199B (NorA)	
	norfloxacin	ethidium bromide
only antibiotic	128	32
+ Tannic acid*	4 (32)**	8 (4)**
+ Gallic acid*	128	-

*tested at 128 µg/ml (1/4 MIC) and 64 µg/ml (1/8 MIC)

** fold reduction in MIC value

Table 2

Values of minimum inhibitory concentration (MIC) for AT and norfloxacin, and fractional inhibitory concentration index (FICI) of the combined application of both, against effluxing strains of *S. aureus*.

<i>S. aureus</i> strain	compound	MIC (µg/ml)		FIC	FIC index
		Alone	Combined*		
SA-1199B	tannic acid	512	64	0.125	0.15
	norfloxacin	128	4	0.031	

* tannic acid + norfloxacin

4 OUTROS RESULTADOS

Não foi observada atividade inibidora frente as linhagens de *S. aureus* para os compostos fenólicos ensaiados a 128 µg/mL, sendo observado valores da concentração inibitória mínima (CIM) entre 512 µg/mL e 256 µg/mL (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos fenólicos frente as linhagens de *S. aureus* que superexpressam genes para proteínas de efluxo.

	CIM (µg/mL)		
	Linhagens*		
Agente	IS-58 (TetK)	RN-4220 (MrsA)	SA-1199B (NorA)
Naringenina	>256	>256	>256
Naringina	>256	>256	>256
Diosmetina	>256	>256	>256
Diosmina	>256	>256	>256
Hesperitina	>256	>256	>256
Hesperidina	>256	>256	>256
Miricetina	256	>256	256
Miricitrina	>256	>256	>256
Quercetina	>256	>256	>256
Quercetrina	>256	>256	>256
Floretina	>256	>256	>256
Floridzina	>256	>256	>256
Ácido elágico	>256	>256	>256
Ácido tânico	256	>256	>256
Ácido Gálico	>256	>256	>256
Ácido 3,4-Dihidroxicinâmico (ácido caféico)	>256	>256	>256
Ácido trans-4-Hidroxi-3-metoxicinâmico	>256	>256	>256
Ácido 2-Metoxicinâmico	>256	>256	>256
Ácido 3-Metoxicinâmico	>256	>256	>256
Ácido 3-Hidroxi-4-metoxicinâmico (ácido ferrúlico)	>256	>256	>256
Ácido <i>p</i> -cumárico	>256	>256	>256
Ácido <i>p</i> -metoxicinâmico	>256	>256	>256
Ácido 3,4-dimetoxicinâmico	>256	>256	>256
Ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico	>256	>256	>256

*Linhagens: IS-58, que possui a proteína de efluxo para tetraciclina (TetK); RN-4220 que possui o plasmídeo pUL5054, o qual, carrega o gene que codifica a proteína para efluxo de macrolídeos (MsrA); SA-1199B, que super expressa o gene *norA* codificador da proteína de efluxo NorA

Nos ensaios de modulação da atividade antibiótica flavonoides possuidores do resíduo O-glicosídeo, naringina, floridzina, diosmina e hesperidina não apresentaram efeito modulador da atividade antibiótica (Tabela 2) sobre as linhagens testadas; por outro lado, os flavonoides aglicona, naringenina, floretina, diosmetina e hesperitina apresentaram efeito modulador da resistência a Nor na linhagem SA-1199B, reduzindo a CIM de 128 µg/mL para 32 µg/mL (redução de 4 vezes) nos ensaios com naringenina, floretina e diosmetina, 128 µg/mL para 8 µg/mL (redução de 16x) nos ensaios com hesperidina.

Diosmetina a aglicona de diosmina, também apresenta atividade antibacteriana contra a *Helicobacter pylori* (BAE et al., 1999) e *Bacillus subtilis* (MENG et al., 2000) com MICs >80 e 50 µg/ml, respectivamente. Em estudo realizado por Chan et al. (2013) o diosmetina apresentou efeito aditivo quando combinado com o antibiótico ciprofloxacina (fluoroquinolona) quando testado contra a linhagem SA- 1199B.

Mandalari et al. (2007) compararam a atividade antimicrobiana do naringenina, hesperetina e erioditiol e seu naringina, neohesperidina e neoeriocitrina di-glicosídeos contra *Listeria innocua* e *S. aureus* FI10139. Os seus resultados sugerem que, se existe uma diferença entre agliconas e di-glicosídeos, os flavonoides agliconas seriam mais ativos. Han e You (1988) constataram que o flavonoide aglicona naringenina foi mais eficaz do que o naringenin (O-glicosídeo) na inibição de bactérias Gram- positivas.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) de norfloxacin na presença e ausência dos flavonoides frente a linhagem de *S. aureus* SA-1199B.

CIM (µg/mL)		
SA-1199B (NorA)		
+ Agente	Norfloxiacina	Brometo de etídio
só antibiótico	128	32
+ Naringenina (128 µg/mL)	32 (4)*	8 (4)*
+Naringina (128 µg/mL)	128	-
+ Floretina (128 µg/mL)	32(4)*	16 (2)*
+Floridzina (128 µg/mL)	128	-
+ Diosmetina (128 µg/mL)	32 (4)*	32

+Diosmina (128 µg/mL)	128	-
+ Hesperitina (128 µg/mL)	8 (16)*	16 (2)*
+Hesperidina (128 µg/mL)	128	-
+Miricetina (128 µg/mL)	32 (4)*	32
+ Miricitrina (128 µg/mL)	32 (4)*	16 (2)*
+Quercetina (128 µg/mL)	128	-
+Quercitrina (128 µg/mL)	64 (2)*	32

* fator de redução do valor da CIM

Os flavonoides com o resíduo C-glicosídeo, quercetrina e miricitrina, apresentaram efeito modulador da atividade antibiótica (Tabela 2) reduzindo a CIM de Nor 128 para 32 µg/mL (redução de 4 vezes) frente a linhagem SA-1199B, e os flavonoides aglicona, quercetina e miricetina, não apresentaram efeito modulador da atividade de Nor.

De acordo com Xiao, Muzashvili e Georgiev (2014) a O-glicosilação reduz a bioatividade dos flavonoides. No entanto, C-glicosilação pode melhorar alguns dos benefícios dos flavonoides sobre a saúde humana, incluindo o seu antioxidante e potencial antidiabético. O que justifica a atividade moduladora dos flavonoides sem a O-glicosilação e a mesma atividade dos flavonoides com a C-glicosilação.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) de norfloxacin na presença e ausência dos taninos frente a linhagem de *S. aureus* SA-1199B.

	CIM (µg/mL)	
	SA-1199B (NorA)	
	Norfloxiacina	Brometo de etídio
+ Agentes		
só antibiótico	128	32
+Ácido Tânico (128 µg/mL)	4(32)*	8(4)*
+Ácido Gálico (128 µg/mL)	128	-
+Ácido elágico (128 µg/mL)	128	-

* fator de redução do valor da CIM.

O ácido elágico e o ácido gálico não apresentaram efeito modulador da atividade antibiótica dos antibióticos contra as linhagens testadas (Tabela 2). Mesmo sem apresentar uma forte atividade inibidora contra *S. aureus* SA-1199B, o ácido tânico (TA), quando incorporado no meio de crescimento a 128 µg/mL (1/4 CIM) foi capaz de diminuir a CIM de Nor (128-4 µg/mL, redução de 32 vezes).

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) de norfloxacin e tetraciclina na presença e ausência dos derivados do ácido cinâmico frente as linhagens de *S. aureus* IS-58 e SA-1199B.

	CIM (µg/mL)		
	IS-58 (TetK)	SA-1199B (NorA)	
+ Agentes	Tetraciclina	Norfloxiacina	Brometo de etídio
só antibiótico	64	128	32
+ Ácido 2-metoxicinâmico (128 µg/mL)	64	128	-
+ Ácido 3-metoxicinâmico (128 µg/mL)	32 (2)*	64 (2)*	32
+ Ácido 3-hidroxi-4-metoxicinâmico (128 µg/mL)	64	128	-
+Ácido p-cumárico (4-hidroxicinâmico) (128 µg/mL)	64	128	-
+Ácido p-metoxicinâmico (4-metoxycinâmico) (128 µg/mL)	32 (2)*	128	-
+Ácido 3,4-dimetoxicinâmico (128 µg/mL)	32 (2)*	64 (2)*	32
+Ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico (128 µg/mL)	32 (2)*	64 (2)*	32
+Ácido trans-4-hidroxi-3 – metoxicinâmico (128 µg/mL)	64	128	-
+Ácido 3,4-dihidroxicinâmico (128 µg/mL)	64	128	-

* fator de redução do valor da CIM.

Dentre os ácidos cinâmicos ensaiados, apenas o ácido 3-metoxicinâmico, ácido 3,4-dimetoxicinâmico e ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico apresentaram atividade aditiva da atividade antibiótica (Tabela 2) sobre a linhagem SA-1199B, reduzindo a CIM de Nor (128 para 64 µg/ml) 2 vezes. Já o ácido 3-metoxicinâmico, apresentou efeito redutor da CIM da tetraciclina (64 para 32 µg/ml). Os ácidos p-metoxicinâmico, 3,4-dimetoxicinâmico e 3,4,5-trimetoxicinâmico apresentaram efeito redutor da CIM da tetraciclina sobre a linhagem IS-58

(32 µg/mL para 64 µg/mL). Na literatura, há poucos relatos de prováveis inibidores do sistema de efluxo TetK em *S. aureus*.

O BrEt que é um corante conhecido como substrato para bomba de efluxo NorA (STAVRI et al., 2007) foi incluído como um controle positivo em caso de redução da CIM do antibiótico (KUMAR et al., 2008). Por terem apresentado efeito modulador da atividade antibiótica de Nor sobre a linhagem *S. aureus* SA-1199B, os flavonoides aglicona - naringenina, floretina, diosmetina, hesperitina - , os flavonoides gliconas C-glicosídeo - miricitrina e quercetrina - , os taninos ácido tânico e ácido gálico, e os derivados do ácido cinâmico - 3-metoxicinâmico, 3,4-dimetoxicinâmico, 3,4,5-trimetoxicinâmico - foram ensaiados para determinação da CIM em combinação com o BrEt.

No teste com naringenina, foi observada redução (32 µg/mL para 8 µg/mL) de quatro vezes da CIM do BrEt, no teste com floretina, hesperitina e miricitrina foi observada redução de (32 µg/mL para 16 µg/mL) duas vezes da CIM do BrEt frente a linhagem *S. aureus* SA-1199B (Tabela 2), já no teste com 3-metoxicinâmico, 3,4-dimetoxicinâmico e 3,4,5-trimetoxicinâmico não foi observada redução da CIM do BrEt, ao passo que o AT reduziu a CIM do BrEt de 32 µg/mL para 8 µg/mL (redução de 4 vezes). O BrEt é um substrato bem conhecido para a proteína de efluxo NorA, sendo que o efluxo ativo é o único mecanismo de resistência conhecido para este intercalante de DNA. Portanto, a utilização de BrEt contra a estirpe SA-1199B indica que a modulação da resistência a Nor em *S. aureus* SA-1199B ocorreu por meio da inibição do sistema de efluxo NorA.

REFERÊNCIAS

- BAE, E.A., HAN, M.J., KIM, D.H. In vitro anti-Helicobacter pylori activity of some flavonoids and their metabolites. **Planta Medica**, v. 65, p. 442–443. 1999.
- CHAN, B.C.L.; IP, M.; GONG, H.; LUI, S.L.; SEE, R.H.; JOLIVALT, C.; FUNG, K.P.; LEUNG, P.C.; REINER, N.E.; LAU, C.B.S. Synergistic effects of diosmetin with erythromycin against ABC transporter over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) RN4220/pUL5054 and inhibition of MRSA pyruvate kinase. **Phytomedicine**, v. 20, p. 611–614. 2013.
- HAN, S.S.; YOU, I.J. Studies on antimicrobial activities and safety of natural naringin in Korea. **Journal of Mycology**, v. 16, p. 33–40. 1988.
- KUMAR, A., KHAN, I.A., KOUL, S., KOUL, J.L., TANEJA, S.C, ALI, I., ALI, F., SHARMA, S., MIRZA, Z.M., KUMAR, M., SANGWAN, P.L., GUPTA, P., THOTA, N., QAZI, G.N., Novel structural analogues of piperine as inhibitors of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 61, p. 1270-1276. 2008.
- MANDALARI, G.; BENNETT, R.N.; BISIGNANO, G.; TROMBETTA, D.; SAIJA, A.; FAULDS, C.B.; GASSON, M.J.; NARBAD, A. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2056–2064. 2007.
- MENG, J.C., ZHU, Q.X., TAN, R.X. New antimicrobial mono- and sesquiterpenes from *Soroseris hookeriana* subsp. *erysimoides*. **Planta Medica**, v. 66, p. 541–544. 2000.
- STAVRI, M., PIDDOCK L.J.V., GIBBONS, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p.1247-1260. 2007.
- XIAO, J., MUZASHVILI, T.S., GEORGIEV, M.I. Advances in the biotechnological glycosylation of valuable flavonoids, **Biotechnology Advances**. Em publicação.

5 CONCLUSÕES

Dentre os inúmeros compostos fenólicos testados, 7 dos 12 flavonoides, 1 dos 3 taninos e 3 dos 10 ácidos fenólicos apresentaram atividade de modulação da norfloxacin frente a linhagem *S. aureus* SA-1199B que superexpressa o gene *norA* codificador da proteína de efluxo NorA, enquanto 4 ácidos fenólicos apresentaram atividade de modulação da tetraciclina frente a linhagem *S. aureus* IS-58 que expressa o gene plasmidial *tetK* codificador da proteína de efluxo TetK.

Ainda pode-se concluir que o ácido tânico se apresenta como uma potencial inibidor de bomba de efluxo NorA em *S. aureus*, bem como que este composto quando aplicado em combinação com norfloxacin apresenta uma interação sinérgica frente a cepa de *S. aureus* que superexpressa o gene codificador da proteína de efluxo NorA. De forma geral, pode-se inferir que o ácido tânico possui um potencial de aplicação como adjuvante de antibióticos, particularmente quando em uso combinado com norfloxacin.