



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

MARIA ANNDRESSA ALVES AGRELES

**REVERSÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA A CEFTAZIDIMA EM
ISOLADOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUTORES DA BOMBA
DE EFLUXO **ACRAB-TOLC** APÓS ASSOCIAÇÃO COM MENADIONA, 4-
TERPINEOL E CANFENO**

Recife
2023

MARIA ANNDRESSA ALVES AGRELES

**REVERSÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA A CEFTAZIDIMA EM
ISOLADOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUTORES DA BOMBA
DE EFLUXO AcrAB-TOLC APÓS ASSOCIAÇÃO COM MENADIONA, 4-
TERPINEOL E CANFENO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Isabella Macário
Ferro Cavalcanti

Coorientador: Prof. Dr. Luís André de
Almeida Campos

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Agreles, Maria Anndressa Alves.

Reversão da resistência bacteriana a ceftazidima em isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores da bomba de efluxo AcrAB-TolC após associação com menadiona, 4-terpineol e canfeno / Maria Anndressa Alves Agreles. - Recife, 2023.

47 p. : il., tab.

Orientador(a): Isabella Macário Ferro Cavalcanti

Coorientador(a): Luís André de Almeida Campos

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

1. Microbiologia. 2. Resistência Bacteriana. 3. Bombas de Efluxo. 4. *Klebsiella pneumoniae*. I. Cavalcanti, Isabella Macário Ferro. (Orientação). II. Campos, Luís André de Almeida. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

MARIA ANNDRESSA ALVES AGRELES

**REVERSÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA A CEFTAZIDIMA EM
ISOLADOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUTORES DA BOMBA
DE EFLUXO AcrAB-TOLC APÓS ASSOCIAÇÃO COM MENADIONA, 4-
TERPINEOL E CANFENO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de
Graduação em Biomedicina da
Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Aprovada em: 20/09/2023

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Coorientador: Prof. Dr. Luís André de Almeida Campos
Faculdade de Escada (FAESC)

Msc. Jaqueline Barbosa Souza
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Profa. Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha orientadora, Profa. Dra. Isabella Macário, que acreditou na minha capacidade mais do que eu mesma e se mostrou sempre disponível a me guiar no que fosse necessário (e além).

Ao Prof. Dr. Luís André, que junto a Profa. Isabella foi meu principal guia no mundo da ciência, ensinando-me com muita paciência e planejando cada experimento comigo, também confiando em mim mais do que eu mesma.

Principalmente, minha profunda gratidão à minha família, que tem sido minha rocha, minha fonte constante de amor e motivação. A dedicação e sacrifícios para me proporcionar as melhores oportunidades não passaram despercebidos, minha, painho e voinho, eu serei eternamente grata por tudo o que fizeram por mim. Obrigada a minha vó; gostaria que a senhora estivesse aqui para testemunhar isso, saudades. A todos da minha rede familiar: amo muito todos vocês, obrigada.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia em Pernambuco (FACEPE), pela bolsa de Iniciação Científica concedida nos últimos três anos.

A toda equipe técnica e acadêmica do iLIKA e as Profas. Ana Catarina e Márcia Vanusa, por tornarem esse trabalho possível.

Aos professores da graduação que me fizeram ter certeza de que tomei a decisão correta de carreira em minha caminhada, muito obrigada por todo conhecimento proporcionado, Prof(a)s. Wheverton, André, Dijanah, Rosângela, Brunessa, Rafael, Kêsia, Eulália e tantos outros. Muito obrigada especial ao Prof. Tiago de Salazar, por suas palavras que demonstravam tanto amor pelo ensino e pela ciência que me fizeram perceber o quanto eu também partilhava do mesmo sentimento.

A minha querida família científica MicroNAT, por todos os dias, desde 2019, contribuírem para o meu crescimento como pesquisadora. Agradeço especialmente àqueles com os quais tive o prazer de dividir não apenas longos experimentos, mas também risadas, memórias e uma amizade valiosa: Maine Virgínia, Azael Francisco, Ana Alice, Mylena Lemos, Jeferson Ricardo, Rhaldney Kaio, Hanne Lazla e Alessandra Araújo.

Agradeço imensamente a minhas queridas, Mariana Costa e Micaela Gomes, por sempre iluminarem o meu dia. Aos amigos Lucas Henrique, Carlos Eduardo, Zion Nascimento, Milena Porfírio, Marco Antônio, Francisco Agenor e Houemakou Rimaud,

sou muito grata por ter tido todos vocês durante o trajeto. Agradeço também aos amigos que tenho comigo há anos: João Vinícius, Rafael Luna, Lucas Leonardo, Lucas Brandão, Luís Paulo, e principalmente a Filipe Matheus, um dos meus maiores impulsionadores. E a Esther, que me faz ter vontade de ser todos os poetas.

Por fim, obrigada a todos os amigos que passaram por minha vida nos últimos 5 anos, nomeados aqui ou não, eu lembro de todos vocês, quero que saibam que foram cruciais.

“I am not brave but sometimes I am made brave by my friends, which is to say I am made brave by love.”

Obrigada.

“Isso é o que acontece quando se dá um passo:
você se aproxima daquilo que quer.”

(Genevieve Valentine)

AGRELES, Maria Anndressa Alves. **Reversão da resistência bacteriana a ceftazidima em isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores da bomba de efluxo AcrAB-TolC após associação com menadiona, 4-terpineol e canfeno.** 2023. 47. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

Nas últimas décadas, o uso irracional de antibióticos estimulou a resistência e a elevada disseminação de genes de resistência entre bactérias. Microrganismos patogênicos de alto risco para a saúde humana compõem o grupo denominado ESKAPE, tendo como um dos membros *Klebsiella pneumoniae*. Algumas cepas dessa bactéria expressam bombas de efluxo como um dos principais mecanismos de resistência. Nesse sentido, a terapia utilizando um inibidor de bombas de efluxo em associação a um antimicrobiano convencional é uma estratégia promissora para reverter quadros de resistência bacteriana. Neste sentido, destacam-se os terpenos, classe ampla de hidrocarbonetos produzidos por uma grande variedade de plantas que já tiveram diversas atividades farmacológicas comprovadas, e as vitaminas lipossolúveis, como a menadiona, reconhecida por seu papel essencial na coagulação sanguínea como potenciais inibidores de bomba de efluxo. Assim, este trabalho teve como objetivo analisar o potencial da menadiona, do 4-terpineol e do canfeno como agentes inibidores de bomba de efluxo em isolados de *K. pneumoniae* resistentes a ceftazidima (CAZ). Inicialmente, através da PCR, foi realizada a identificação dos isolados portadores do gene *acrB*, os quais são capazes de utilizar o complexo AcrAB-TolC para expulsar fármacos. Em seguida, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da CAZ frente aos isolados para verificar o seu perfil de resistência. Posteriormente, foi realizada a determinação da CIM da CAZ combinada com cada um dos compostos na concentração subinibitória (CIM/2). Cinco isolados coletados apresentaram resultados positivos para a presença do gene *acrB*. A CIM da CAZ para os cinco isolados variou entre 16 e 512 µg/mL indicando resistência a CAZ (CIM ≥16 µg/mL para *Enterobacteriales*) de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Na combinação de CAZ com a menadiona ou terpenos foi observada a redução da CIM de CAZ de 4 a 8 vezes, com novos valores de CIM variando de 1 a 4 µg/mL para quatro dos cinco isolados testados, induzindo-os a susceptibilidade a CAZ após a combinação. Assim, a associação de CAZ à menadiona e aos terpenos demonstrou potencial inibitório sobre os sistemas de efluxo bacteriano, se apresentando como agentes que podem ser úteis como uma abordagem alternativa para melhorar a eficácia clínica de antibióticos.

Palavras-chave: Compostos Naturais. Resistência Bacteriana. Sinergismo. Terpenos. Vitamina K3.

AGRELES, Maria Anndressa Alves. **Ceftazidime Resistance Reversal in Clinical Isolates of Efflux Pump-Producing *Klebsiella pneumoniae* After Terpinen-4-ol, Camphene, and Menadione Association.** 2023. 47. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

In recent decades, the irrational use of antibiotics has fueled resistance and the widespread dissemination of resistance genes amongst bacteria. High-risk pathogenic microorganisms for human health belong to the group known as ESKAPE, with *Klebsiella pneumoniae* being one of its members. Some bacterial strains of this species express efflux pumps as one of the main mechanisms of resistance. Therefore, therapy using an efflux pump inhibitor in combination with a conventional antimicrobial is a promising strategy to reverse bacterial resistance. In this scenario, terpenes, a broad class of hydrocarbons produced by a wide variety of plants with proven pharmacological activities, and fat-soluble vitamins like menadione, recognized for its essential role in blood clotting, stand out as potential efflux pump inhibitors. Thus, this study aimed to analyse the potential of menadione, terpinen-4-ol, and camphene as efflux pump inhibitors in ceftazidime (CAZ)-resistant *K. pneumoniae* isolates. Initially, PCR was used to identify isolates carrying the *acrB* gene, which are capable of using the AcrAB-TolC complex to expel drugs. Then, of CAZ Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against the isolates was determined to assess their resistance profile. Subsequently, the MIC of CAZ combined with each compound at a subinhibitory concentration (MIC/2) was determined. Five collected isolates evaluated positive for the presence of the *acrB* gene. The CAZ MIC for the five isolates ranged from 16 to 512 µg/mL, indicating bacterial resistance to CAZ (MIC ≥16 µg/mL for *Enterobacteriales*) according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). In the combination of CAZ with menadione or terpenes, a 4 to 8-fold MIC reduction was observed, with new MIC values ranging from 1 to 4 µg/mL for four of the five isolates evaluated, rendering them susceptible to the antibiotic after the combination. Thus, the association of CAZ with menadione and terpenes demonstrated inhibitory potential on bacterial efflux systems, presenting themselves as agents that could be useful as an alternative approach to enhance the clinical effectiveness of antibiotics.

Keywords: Natural Compounds. Bacterial Resistance. Synergy. Terpenes. Vitamin K3.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismos de ação dos antibióticos.....	16
Figura 2 – Distribuição das bombas de efluxo por famílias.....	21
Figura 3 – Mecanismos de ação dos inibidores de bombas de efluxo.....	23
Figura 4 – Estrutura química de 4-terpineol.....	24
Figura 5 – Estrutura química do canfeno.....	25
Figura 6 – Estrutura química da menadiona.....	26
Figura 7 – Corrida no gel de agarose para verificação da presença do gene <i>acrB</i> nos cinco isolados clínicos de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primer para detecção do gene <i>acrB</i>	28
Tabela 2 – Atividade antibacteriana de ceftazidima, canfeno, 4-terpineol, menadiona e carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona frente a isolados clínicos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtores de bomba de efluxo.....	30
Tabela 3 – Atividade antibacteriana da ceftazidima isolada e em associação com terpenos e carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona frente a isolados clínicos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtores de bomba de efluxo.....	32

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1.1	ANTIBIÓTICOS E RESISTÊNCIA BACTERIANA	15
1.1.1	A Emergência de Infecções Causadas por <i>Klebsiella pneumoniae</i> Multidroga-resistentes.....	18
1.1.2	O Papel das Bombas de Efluxo na Resistência Bacteriana.....	20
1.2	A Inibição das Bombas de Efluxo para Recuperação da Susceptibilidade Bacteriana.....	23
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	OBJETIVO GERAL.....	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1	MATERIAIS.....	28
3.2	METODOLOGIA.....	28
3.2.1	Identificação dos Isolados Bacterianos.....	28
3.2.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	29
3.2.3	Avaliação da Inibição da Bomba de Efluxo AcrAB-TolC por Diminuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Ceftazidima Associada a Menadiona, 4-terpineol e Canfeno.....	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS.....	30
4.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	30
4.3	AValiação da Inibição da Bomba de Efluxo AcrAB-TolC por Diminuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Ceftazidima Associada a Menadiona, 4-terpineol e Canfeno.....	32
5	CONCLUSÃO.....	37
	REFERÊNCIAS.....	38

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o uso irracional de antibióticos na medicina humana, setores de higiene, agricultura, pecuária e produção de alimentos levaram a um elevado surgimento e disseminação de genes de resistência entre bactérias (Alsaeed *et al.*, 2022; Hutchings; Truman; Wilkinson, 2019). Esse quadro é agravado ainda mais pelo escasso interesse no desenvolvimento de antibióticos por parte da indústria farmacêutica. Dessa forma, o manejo de infecções causadas por patógenos bacterianos tem se tornado cada vez mais difícil. Alguns dos mais ameaçadores microrganismos são os membros do grupo denominado ESKAPEE, uma sigla para *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. e *Escherichia coli* (Fair e Tor, 2014; Yu *et al.*, 2020).

Klebsiella pneumoniae é um patógeno oportunista Gram-negativo que atinge pacientes enfermos e imunocomprometidos. Essa bactéria é causa comum de infecções associadas aos cuidados de saúde, incluindo pneumonia, infecções do trato urinário e infecções da corrente sanguínea (Jalil e Al Atbee, 2022; Uzairue *et al.*, 2022; Yan *et al.*, 2022). Além disso, algumas cepas de *Klebsiella pneumoniae* são classificadas como hipervirulentas, sendo capazes de infectar indivíduos imunocompetentes em ambientes comunitários e causar quadros clínicos graves, como abscesso hepático piogênico, endoftalmite e meningite (Chan; Chia; Shelat, 2022; Li, 2022; Martellosio *et al.*, 2023; Martin e Bachman, 2018).

Ao longo dos anos, o tratamento das infecções causadas por essa bactéria vem se tornando cada vez mais difícil, devido ao crescente aumento de cepas resistentes a agentes antimicrobianos. Por isso, *K. pneumoniae* é um importante patógeno hospitalar, com potencial para causar morbidade e mortalidade severa (Alcántar-Curiel *et al.*, 2018; Maurya *et al.*, 2019; Russo *et al.*, 2023).

A expressão de bombas de efluxo é um dos principais mecanismos de resistência em muitas bactérias, inclusive de patógenos Gram-negativos, como *K. pneumoniae*. Bombas de efluxo são proteínas membranares que participam da fisiologia bacteriana na comunicação intercelular pela liberação de moléculas *Quorum-Sensing*, na formação de biofilme, contribuindo para sua patogenicidade e virulência, além da possibilidade de expulsão de substâncias tóxicas do meio intracelular para fora da célula (Reza, Sutton, Rahman, 2019; Lorusso *et al.*, 2022).

O sistema de efluxo mais estudado em *K. pneumoniae*, no que diz respeito à resistência aos antibióticos, é a bomba AcrAB-TolC (BIALEK-DAVENET et al., 2015). O gene *acrB* codifica uma lipoproteína periplasmática, ancorada na membrana interna, a proteína AcrB conecta-se com a proteína "adaptadora" periplasmática AcrA e com TolC, uma proteína de membrana externa, que é essencial para a expulsão de fármacos. Juntas, essas proteínas foram uma estrutura tripartite que permite o efluxo direto de fármacos para o meio externo, e faz AcrAB-TolC e seus homólogos um sistema muito eficiente para manter os níveis crescentes de resistência em bactérias Gram-negativas (TAKATSUKA et al., 2010).

Ademais, já foi relatado que o mecanismo de efluxo de fármacos desempenha um papel fundamental na suscetibilidade de isolados clínicos de *K. pneumoniae* aos β -lactâmicos, aumentando os níveis de resistência desses patógenos (PAGES et al., 2009; MAURYA et al., 2019). Dentre esses fármacos, a ceftazidima, uma cefalosporina de terceira geração, já foi identificada como sendo substrato do sistema de efluxo AcrAB-TolC, tendo sua atividade reduzida quando esse sistema de efluxo é expresso (HASDEMIR et al., 2004; PADILLA et al., 2010; MULLER et al., 2012). Esse fármaco é hidrofóbico e possui grande peso molecular (300-600 Da), sendo assim preferencialmente efluxado em relação à fármacos com outras composições, além de ser capaz de regular positivamente a produção de bombas de efluxo em isolados de *Klebsiella pneumoniae*, aumentando a expressão dessas proteínas (MAURYA et al., 2019).

Dessa forma, a inibição dos sistemas de efluxo se mostra como uma promissora estratégia para aumentar a susceptibilidade bacteriana a antimicrobianos, como a ceftazidima, e reverter quadros de resistência bacteriana. Essa inibição será possível a partir de inibidores de bombas de efluxo, que podem bloquear a expulsão de fármacos ao interagir com essas proteínas extrusivas ou com os substratos das mesmas, aumentando efetivamente sua concentração intracelular dos fármacos (Mahamoud et al., 2007; Aparna et al., 2014; Prasch et al., 2019).

A lipossolubilidade é uma característica comum de muitos inibidores de bombas de efluxo, sendo possivelmente importante para sua solubilidade na membrana bacteriana e ligação com as proteínas efluxo ou ligação com os substratos das mesmas (TINTINO et al., 2018). Menadiona, também conhecida como vitamina K3, é um composto sintético pertencente à classe das vitaminas lipossolúveis, que é convertido em vitamina K2 no intestino (ANDRADE et al., 2017). Esse composto já é

reconhecido por seu papel essencial na coagulação e, mais recentemente, foi proposto como um nutriente-chave no regulamento de calcificação de tecidos (TRUONG; BOOTH, 2011).

Outros compostos estudados como inibidores são os terpenos, uma classe ampla e diversa de hidrocarbonetos produzidos por uma grande variedade de plantas, destacando-se o 4-terpineol devido a sua atividade antibacteriana, além de fazer parte da composição de óleos capazes de inibir sistemas de efluxo, como o óleo de *Thymus riatarum* (Cho et al., 2017; Mondello et al., 2022; Paduch et al., 2007). E o canfeno, outro terpeno que faz parte da composição de óleos que apresentaram atividade inibitória sobre as bombas de efluxo, como o *Artemisia herba-alba* Asso, ou que foram identificados como substratos de bombas de efluxo, como o de *Rosmarinus officinalis*, e poderia atuar na inibição das bombas de efluxo (Daviet e Schalk, 2010; Fadli et al., 2011; Fadli et al., 2014; Fadli et al., 2016; Zhang et al., 2018).

Nesse sentido, avaliar a ação da menadiona, do 4-terpineol e do canfeno sobre a inibição do sistema de efluxo AcrAB-TolC frente a cepas de *K. pneumoniae* que expressam o gene *acrB* torna-se uma alternativa promissora para reversão da resistência bacteriana.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

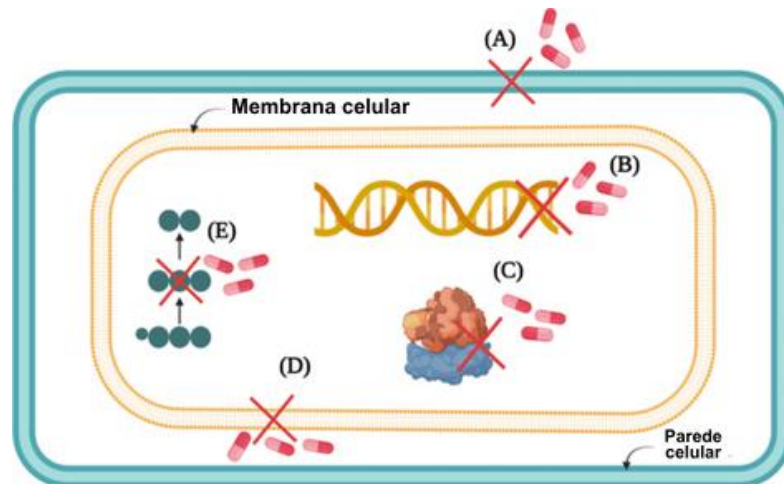
1.1 ANTIBIÓTICOS E A RESISTÊNCIA BACTERIANA

Ao longo da maior parte da trajetória humana, infecções bacterianas representavam uma das principais fontes de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Contudo, um ponto de virada essencial na história da medicina moderna ocorreu em 1928, quando Alexander Fleming descobriu a penicilina. Derivada do fungo *Penicillium notatum*, essa substância possui a capacidade de interferir na síntese da parede celular das bactérias, o que levou a sua implementação como o primeiro antibiótico a ser empregado com êxito no tratamento das infecções bacterianas (Sultan et al., 2018; Uddin et al., 2021).

Um panorama geral do mecanismo de ação dos antibióticos em células bacterianas pode ser visualizado na Figura 1, onde estão elucidados os mecanismos de ação antibacteriana desses fármacos através da (A) inibição da síntese da parede

celular; (B) inibição da síntese de ácidos nucleicos; (C) inibição da síntese proteica; (D) desestabilização da membrana celular; (E) inibição de vias metabólicas bacterianas.

Figura 1 — Mecanismos de ação dos antibióticos.



Fonte: Agreles; Cavalcanti; Cavalcanti, 2022.

Os β -lactâmicos foram antibióticos muito utilizados para erradicar as infecções bacterianas devido ao seu potencial bactericida, uma vez que interferem na síntese da parede celular bacteriana quando interagem com as proteínas de ligação a penicilina (PBPs), assim impedindo a formação de ligações cruzadas transpeptídicas do peptidoglicanos. Esse processo desencadeia na ruptura da camada de peptidoglicano que compõe a parede celular, levando à lise da célula bacteriana.

Contudo, o uso generalizado dos antibióticos acelerou distintivamente o desenvolvimento e a disseminação da resistência bacteriana (AMR) (Aljeldah et al., 2022; Van Duijkeren et al., 2018). Nesse cenário atual, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a AMR torna-se um problema crítico de saúde pública global, sendo responsáveis por pelo menos 700.000 mortes por ano (Morrison; Zembower, 2020, Walsh et al., 2023).

A AMR pode ser classificada como intrínseca, adquirida ou adaptativa (Lee, 2019). A primeira é um fenômeno que ocorre naturalmente no genoma de uma espécie bacteriana ou grupo de bactérias e se refere à resistência exibida por um organismo sem exposição prévia a antibióticos, não envolve transferência genética horizontal e geralmente é mediada por cromossomos (Bassetti et al., 2018; Gil-Gil, Martínez e

Blanco 2020; Gogry *et al.*, 2021; Morrison; Zembower, 2020; Reygaert, 2018).

A AMR adquirida, ou extrínseca, é aquela que pode surgir da mutação de um determinado gene ou aquisição de componentes genéticos móveis, como plasmídeos, de outros microrganismos via transferência horizontal de genes (Gabashvili *et al.*, 2019; Lipszuc; Szuplewska; Bartosik, 2022; Wang *et al.*, 2020).

A transferência de genes horizontal ocorre principalmente por meio de quatro vias principais: (A) conjugação por meio transferência direta de material genético, incluindo plasmídeos, transposons conjugativos e elementos conjugativos integrativos; (B) transformação através da absorção de material genético proveniente do ambiente, muitas vezes oriundo de uma outra célula bacteriana que sofreu lise; (C) transdução pela ação de bacteriófagos, que carregam consigo o DNA de uma célula bacteriana e introduzem esse material genético integrando ao cromossomo da célula receptora; e (D) vesidução pela emissão de vesículas extracelulares contendo DNA e plasmídeos (Jiang *et al.*, 2022; Soler e Forterre, 2020; Virolle *et al.*, 2020).

Através das citadas vias de transferência horizontal genética, uma variedade de mecanismos é observada na resistência adquirida, incluindo a redução da permeabilidade celular, a modificação do local-alvo da droga devido a mutações, a capacidade de induzir ajustes na estrutura do antibiótico e, como mencionado anteriormente, a ativação das bombas de efluxo (Dubey; Indu; Sharma, 2020; Theriault; Tillotson; Sandrock, 2021).

De acordo com o Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC), o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e a Sociedade de Doenças Infecciosas da América (IDSA), a resistência bacteriana adquirida pode ser classificada em três categorias principais: (1) a resistência a múltiplos medicamentos (MDR), que envolve bactérias que são resistentes a pelo menos um agente de três ou mais classes de antibióticos; (2) a resistência a medicamentos de amplo espectro (XDR), que diz respeito a refere-se à resistência a quase todos os antibióticos, exceto um ou dois, de todas as classes antimicrobianas; e (3) a pan-resistência a medicamentos (PDR), indicando que as bactérias são resistentes a todos os agentes antimicrobianos disponíveis comercialmente (Jubair *et al.*, 2021).

A disseminação de microrganismos MDR ocorre principalmente em ambientes clínicos, facilitada por fatores como confinamento e transmissão entre pacientes geralmente imunocomprometidos, comumente associados a infecções hospitalares (Ndlovu *et al.*, 2023). Nesse sentido, a ordem bacteriana *Enterobacterales* produtoras

de beta-lactamase de espectro estendido são uma importante fonte de resistência antimicrobiana, sendo *Klebsiella pneumoniae*, uma das bactérias desta ordem que apresenta maior risco em relação a seu perfil de resistência (Prevel *et al.*, 2023).

1.1.1 A Emergência de Infecções Causadas por *Klebsiella pneumoniae* Multidroga-resistentes

A ameaça crescente representada por espécies multidroga-resistentes (MDR) é amplamente reconhecida por organizações globais e nacionais, incluindo a Organização Mundial da Saúde (OMS), Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças, a Sociedade de Doenças Infecciosas da América e a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) (Bassetti e Garau, 2021, Painuli *et al.*, 2023; Shields, 2023). Dentro do conjunto de microrganismos MDR, a ameaça mais substancial é proveniente do conjunto conhecido como ESKAPE, um acrônimo que engloba *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. resistentes, patógenos classificados como Prioridade Crítica I e II pela OMS (Saha *et al.*, 2023; Yu *et al.*, 2020).

Dentro desse grupo, *K. pneumoniae* assume um papel proeminente como uma das principais causadoras de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), sendo responsável por causar quadros de pneumonia, meningite, infecções sanguíneas e do trato urinário, se destacando como o patógeno MDR e resistente a carbapenêmicos mais prevalente no cenário hospitalar (Mota; Oliveira; Souto, 2018; Zhu *et al.*, 2021, Ndlovu *et al.*, 2023).

Esse patógeno bacteriano demonstra uma notável diversidade genômica, sendo categorizada em cepas oportunistas, hipervirulentas e MDR com base em seus componentes genéticos adicionais (Wang *et al.*, 2020). Em um estudo recente realizado por Elmonir e colaboradores (2021) sobre isolados resistentes obtidos de trabalhadores rurais hospitalizados no Egito, foi possível observar que, dos 37 isolados de *K. pneumoniae* identificados a partir de 272 amostras totais, 20 revelaram-se hipervirulentos e todos exibiam fenótipo MDR.

De forma similar, a alta prevalência de isolados resistentes pode ser vista em trabalhos como o publicado por Yan e colaboradores (2021), que teve como objetivo

avaliar as características epidemiológicas de cepas de *Enterobacteriales* resistentes a carbapenêmicos isolados de pacientes hospitalizados na China, onde a espécie mais comumente identificada foi *K. pneumoniae*. Dos 305 isolados analisados nos estudos, 77% correspondiam a essa espécie bacteriana, e todas as cepas se mostraram MDR.

Nakamura-Silva e colaboradores (2022) descreveram 21 isolados de *K. pneumoniae* obtidos de diferentes pacientes internados em quatro hospitais na região Norte do Brasil. 61,9% desses isolados foram classificados como MDR. Além disso, 23,8% foram classificados como amplamente resistentes a medicamentos (XDR).

Destaca-se, dentre os mecanismos de resistência deste patógeno, a produção de bombas de efluxo (Khan *et al.*, 2020). *K. pneumoniae* possui sistemas de bombas de efluxo RND mais potentes do que outras bactérias, como *E. coli*, e a superexpressão dessas bombas pode ter um papel crucial na manutenção da sua resistência intrínseca quando superexpressas (Ni *et al.*, 2020).

Notavelmente, em um estudo conduzido por Maurya e seus colaboradores em 2019, que investigou a resistência de *K. pneumoniae* aos antibióticos β -lactâmicos, foi revelado que, além das amplamente discutidas enzimas β -lactamases, as bombas de efluxo assumiam um papel de extrema importância na resistência a essa classe de antibióticos. Mais intrigante ainda, essas bombas de efluxo não apenas desempenhavam um papel significativo sozinhas, mas também eram capazes de agir de maneira sinérgica com as β -lactamases, tornando-se uma barreira dupla para a eficácia dos antibióticos.

Dessa forma, a prevalência alarmante de cepas resistentes de *K. pneumoniae*, incluindo variantes amplamente resistentes capazes de expressar bombas de efluxo, destacam a urgente necessidade de abordagens rigorosas de controle e pesquisa contínua para mitigar o impacto crescente dessas cepas patogênicas e a ameaça que representam para a saúde pública.

1.1.2 O Papel das Bombas de Efluxo na Resistência Bacteriana

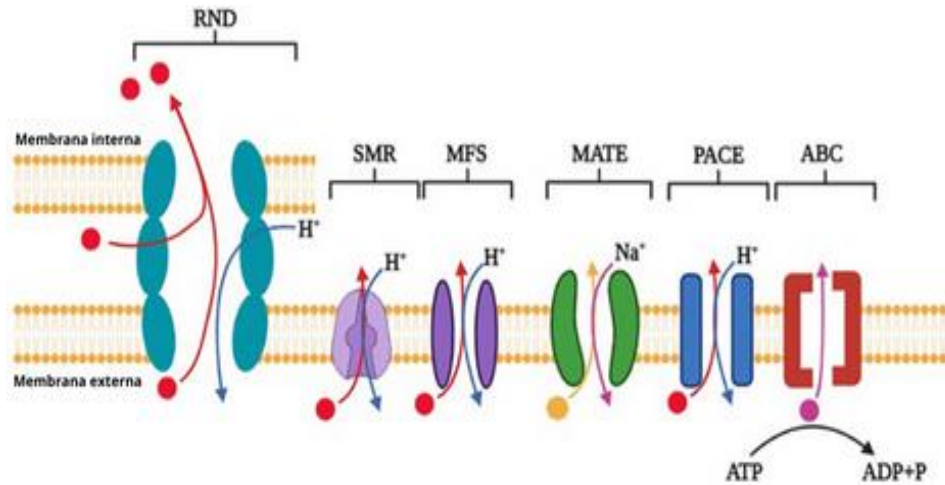
Devido à sua gama de substratos específicos e distribuição generalizada entre diversas espécies bacterianas, as bombas de efluxo têm despertado crescente interesse e se destacado como um elemento fundamental no surgimento da resistência antibiótica (Farhat *et al.*, 2020; Verma; Tiwari; Tiwari., 2021). As bombas

de efluxo são proteínas de transporte localizadas na membrana citoplasmática bacteriana, responsáveis por ativamente mover produtos químicos através da membrana. Além disso, essas proteínas não apenas possibilitam a sobrevivência bacteriana diante de toxinas, biocidas, metais pesados e agentes antimicrobianos, mas também desempenham funções cruciais na adesão, invasão, colonização de células hospedeiras e formação de biofilme, contribuindo para patogenicidade e virulência bacteriana (Ebbensgaard; Løbner-Olesen; Frimodt-Møller, 2020; Gaurav et al., 2023).

Essas proteínas são categorizadas como primárias ou secundárias, dependendo da fonte de energia que utilizam para transportar os substratos através da membrana. As bombas de efluxo primárias são alimentadas pela energia resultante da hidrólise do ATP, permitindo a translocação dos substratos. Por outro lado, as bombas de efluxo secundárias utilizam a energia gerada pelos gradientes eletroquímicos de prótons ou íons (força protônica motriz), mais comumente H^+ , mas também possivelmente Na^+ , para que seus substratos consigam seguir um gradiente de concentração eletroquímica para efetuar o transporte dos substratos (Sharma; Gupta; Pathania, 2019; Gaurav et al., 2023).

Essas bombas podem ser compostas por um ou mais componentes e são classificadas em seis principais famílias com base em suas características estruturais e fontes de energia: a *major facilitator superfamily* (MFS), a família *small multidrug resistance* (SMR), a família *multidrug and toxic compound extrusion* (MATE), a superfamília *resistance-nodulation-division* (RND), a superfamília *ATP-binding cassette* (ABC) e a família *proteobacterial antimicrobial compound efflux* (PACE), como demonstra a figura 2 (Meyer et al., 2022; Kumawat, 2023).

Figura 2 — Distribuição das bombas de efluxo por famílias.



RND: *resistance-nodulation-division*, SMR: *small multidrug resistance*, MFS: *major facilitator superfamily*, MATE: *multidrug and toxic compound extrusion (MATE)*, PACE: *proteobacterial antimicrobial compound efflux*, ABC: *ATP-binding cassette*.

Fonte: Agreles; Cavalcanti; Cavalcanti; 2021.

As bombas de efluxo mais relevantes observadas em isolados clínicos são membros da família RND, a qual dispõe de sistemas complexos compostos por três partes: uma proteína de membrana interna, uma subunidade associada ao periplasma e uma proteína de membrana externa, que englobam as membranas interna e externa das bactérias Gram-negativas (McNeil *et al.*, 2019). A espécie *K. pneumoniae* comumente apresenta uma diversidade de bombas de efluxo pertencentes à família RND, com as bombas AcrAB-TolC e OqxAB-TolC se destacando por suas contribuições ao fenótipo MDR (Xu *et al.*, 2021).

Especificamente, a bomba de efluxo AcrAB-TolC, sistema mais bem caracterizado até o momento, é composto pela proteína da membrana externa TolC, pela proteína adaptadora periplasmática AcrA e pelo transportador da membrana interna AcrB, possuindo a capacidade de transportar uma ampla variedade de substratos, que inclui tanto fármacos como tetraciclina, cloranfenicol, fluoroquinolonas, β -lactâmicos e eritromicina, quanto corantes, detergentes e ácidos (Elkins e Nikaido, 2018; Xu *et al.*, 2021).

O gene *acrB* codifica uma lipoproteína periplasmática, ancorada na membrana interna, a proteína AcrB conecta-se com a proteína adaptadora periplasmática AcrA e com TolC, uma proteína de membrana externa, essencial para a expulsão dos seus substratos. Essas proteínas formam uma estrutura tripartite que permite o efluxo direto

dos substratos para o meio externo, e faz AcrAB-TolC e seus homólogos um sistema muito eficiente para manter os níveis crescentes de resistência em *K. pneumoniae* (Takatsuka; Chen; Nikaido, 2010; Bialek-Davenet *et al.*, 2015; Li; Cross; Dörr, 2022).

A alta associação da MDR com o sistema de efluxo AcrAB-TolC em cepas de *K. pneumoniae* foi descrita através de estudos como aquele realizado em 2021 por Xu e colaboradores, o qual teve foco na atividade das bombas de efluxo RND em cepas de *K. pneumoniae*. Os autores relataram que a resistência a múltiplas drogas em bacilos Gram-negativos é mediada pela superexpressão dos genes *acrAB*, regulados pelo fator global RamA. Observou-se que a deleção de RamA resultou em uma redução significativa, de até 16 vezes, na concentração inibitória mínima (CIM) da tigeciclina, correlacionada a uma diminuição de 4,3 vezes na expressão de *acrB*. Além disso, os pesquisadores identificaram que a eliminação de *acrB* resultou em reduções nas CIMs de substâncias como cefepima, piperacilina/tazobactam, tigeciclina, ciprofloxacina, olaquinox e nitrofurantoína.

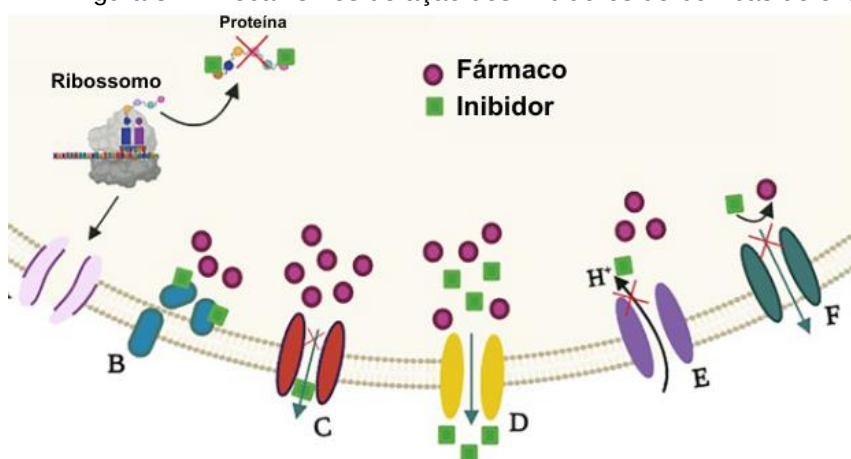
Adicionalmente, no trabalho de Li e colaboradores (2022), observou-se que a superexpressão da bomba de efluxo AcrAB-TolC levou a uma menor sensibilidade aos antibióticos combinados com inibidores de β -lactamases, como piperacilina/tazobactam e ceftolozane/tazobactam, em isolados de *K. pneumoniae* resistentes a tigeciclina. Isso resultou em um aumento de resistência de 4 a 8 vezes para essas combinações. A exclusão do gene *acrB*, por outro lado, resultou em um aumento na sensibilidade de 4 a 16 vezes, indicando que, mesmo na ausência de β -lactamases, as bombas de efluxo individualmente podem desempenhar um papel fundamental na promoção da resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos. Desta forma, a pesquisa dedicada à exploração da expressão de bombas de efluxo em bactérias tem sido fundamental para compreender os mecanismos subjacentes à resistência antimicrobiana, à medida que essa continua sua preocupante escalada (Kumawat, 2023). Torna-se imperativo buscar novas abordagens para inibição das bombas de efluxo, revitalizando a eficácia dos tratamentos através da reversão da resistência aos antimicrobianos (Abdel-Karim *et al.*, 2022; Zheng e Lupoli, 2023).

1.2 A INIBIÇÃO DAS BOMBAS DE EFLUXO PARA RECUPERAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE BACTERIANA

Dado o papel crucial do efluxo na promoção da resistência aos antibióticos, a

inibição dos sistemas de efluxo emerge como uma alternativa promissora para enfrentar o desafio da resistência bacteriana mediada por esse mecanismo, através da utilização dos denominados inibidores de bombas de efluxo (EPIs). Os EPIs representam moléculas com a capacidade de interromper a expulsão de substâncias da célula, podendo exercer sua ação através de diversos mecanismos, como: (A) interrompendo os processos regulatórios que controlam a expressão das bombas de efluxo, (B) bloqueando a montagem funcional da complexa estrutura da bomba, (C) obstruindo o canal na membrana externa, suprimindo a energia do processo de efluxo, (D) competindo com moléculas não antibióticas pelos sítios de afinidade da bomba de efluxo, (E) bloqueando o gradiente eletroquímico utilizado para o transporte ativo dos substratos, ou ainda, F) modificando a estrutura química dos antibióticos para reduzir sua afinidade com os locais de reconhecimento da efluxo e os sítios de ligação, como observado na Figura 3 (Lomovskaya, 2001; Sharma; Gupta; Pathania, 2019).

Figura 3 — Mecanismos de ação dos inibidores de bombas de efluxo.



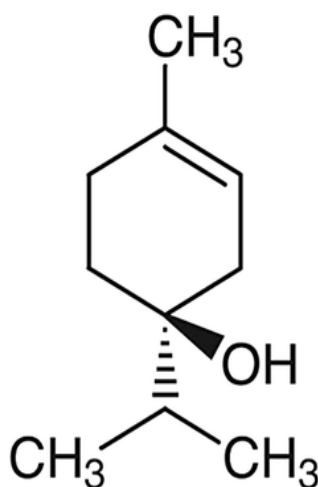
Fonte: Agreles; Cavalcanti; Cavalcanti, 2021.

Até o momento, nenhum dos EPIs identificados na literatura avançou para ensaios clínicos, principalmente devido a preocupações com toxicidade substancial e perfil farmacológico abaixo do desejado. Em vista disso, uma das principais áreas de foco tem sido a busca por novos EPIs que sejam mais eficazes e seguros, destacando-se como uma das principais prioridades na pesquisa atual (Alenazy, 2022; Compagne *et al.*, 2023). Nesse contexto, as plantas surgem como uma alternativa sólida na identificação de novos compostos e moléculas que apresentem efeito inibitório sobre as bombas de efluxo, tais como terpenoides, vitaminas, compostos fenólicos e alcaloides (Seukep *et al.*, 2020).

A utilização de compostos naturais no combate a esse mecanismo de resistência bacteriano no trabalho desenvolvido por Solnier e colaboradores (2020), onde houve a avaliação do perfil modificador de resistência dos flavonoides skullcapflavone II, nobiletina, tangeretina, baicaleína e wogonina, contra as cepas modelo de micobactérias *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium aurum* e *Mycobacterium bovis* BCG. Os autores descreveram que a análise da inibição de bombas de efluxo, por meio do ensaio de acúmulo do corante fluorescente brometo de etídio dentro da célula bacteriana, revelou que os flavonoides nobiteline e baicaleína causaram aumento intracelular do corante nas células de *M. smegmatis* avaliadas, atividade comparável ao do estabelecido inibidor clorpromazina. Em *M. aurum*, os flavonoides skullcapflavone II e tangeretina ultrapassaram a atividade inibitória de clorpromazina.

Além dos flavonóides, os terpenos também se destacam pelas suas promissoras propriedades antibacterianas e anti-efluxo (Dias *et al.*, 2023). Os terpenos são uma classe ampla e diversa de hidrocarbonetos produzidos por uma grande variedade de plantas que possuem diversas atividades farmacológicas comprovadas, como atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e antitumoral (Paduch *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2017). O 4-terpineol (Figura 4), terpeno que pode ser encontrado em mais de 80 tipos de óleos essenciais, possui atividade antibacteriana comprovada, além de fazer parte da composição de óleos capazes de inibir sistemas de efluxo, como o óleo de *Thymus riatarum*.

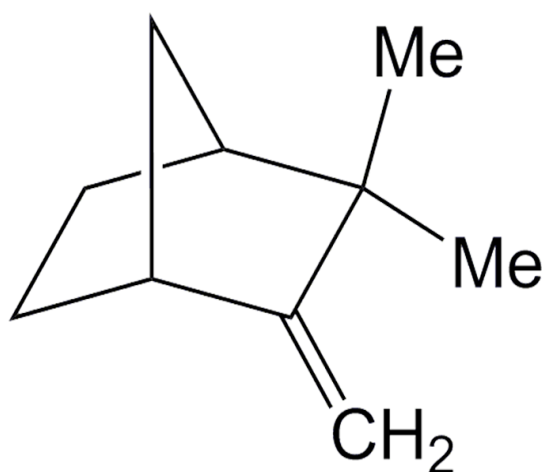
Figura 4 – Estrutura química de 4-terpineol



Fonte: Kumar *et al.*, 2020.

O canfeno (Figura 5) é outro terpeno que faz parte da composição de óleos que apresentaram atividade inibitória sobre as bombas de efluxo, como o *Artemisia herba-alba* Asso, ou que foram identificados como substratos de bombas de efluxo, como o de *Rosmarinus officinalis*, e poderia atuar na inibição das bombas de efluxo (Daviet e Schalk, 2010; Fadli *et al.*, 2011; Fadli *et al.*, 2014; Fadli *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018). Entretanto, apesar desses terpenos se apresentarem como promissores inibidores de bombas de efluxo, essa atividade ainda não foi relatada para esses terpenos isoladamente em nenhum estudo anterior.

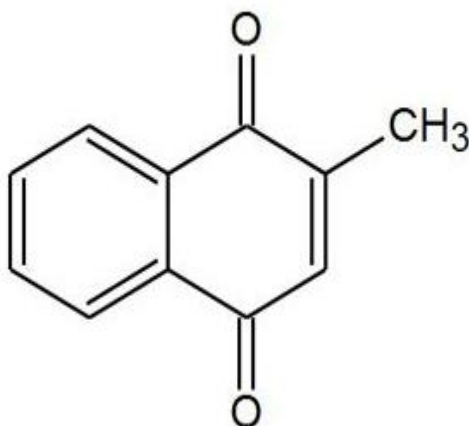
Figura 5 – Estrutura química do canfeno.



Fonte: American Chemical Society, 2012.

Adicionalmente, destacam-se também as vitaminas, as quais têm sido utilizadas como adjuvantes de antibióticos e apresentam sucesso no tratamento de diversas doenças infecciosas (Max *et al.*, 2023). Nessa classe, pode ser encontrada a menadiona, também conhecida como vitamina K3, um composto sintético pertencente à classe das vitaminas lipossolúveis (Andrade *et al.*, 2017). A lipossolubilidade apresentada por essa vitamina é uma característica comum de muitos inibidores de bombas de efluxo, sendo possivelmente importante para sua solubilidade na membrana bacteriana e ligação com as proteínas efluxo ou ligação com os substratos das mesmas (Tintino *et al.*, 2018).

Figura 6 – Estrutura química da menadiona.



Fonte: Menadione, 2018.

Em 2018, Tintino e colaboradores observaram que a menadiona possui atividade inibitória frente a cepas de *Staphylococcus aureus* que expressam a bomba de efluxo NorA e, em 2020, os mesmos autores provaram que a menadiona é capaz de alterar a membrana bacteriana e inibir a expressão do gene da bomba NorA (Tintino *et al.*, 2020), porém sua atividade na bomba de efluxo AcrB ainda não foi relatada.

Dessa forma, fica evidente que a rica diversidade de metabólitos presentes em plantas oferece um vasto reservatório de compostos com potencial terapêutico, capazes não apenas de combater diretamente mecanismos de resistência, mas também de potencializar a eficácia dos tratamentos convencionais (Shriram *et al.*, 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana e a reversão da resistência bacteriana da ceftazidima após associação com a menadiona e os terpenos, canfeno e 4-terpineol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de bombas de efluxo;
2. Avaliar a atividade antibacteriana da ceftazidima, menadiona e dos terpenos canfeno e 4-terpineol;
3. Avaliar a reversão da resistência a ceftazidima através da sua associação com a menadiona e os terpenos, canfeno e 4-terpineol.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Os meios de cultura, ceftazidima, menadiona e outros reagentes foram fornecidos pela Himedia® e Sigma-Aldrich®. Todos os solventes foram fornecidos pela Merck®. Os kits de para a PCR foram obtidos da ThermoFisher Scientific®. Os terpenos sintéticos 4-terpineol e canfeno foram gentilmente fornecidos pela Profa. Márcia Vanusa do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), e isolados clínicos bacterianos de *Klebsiella pneumoniae* produtores de bombas de efluxo (K25-A2, K26-A2, K29-A2, K31-A2 e K32-A2) foram fornecidos pela Profa. Dra. Ana Catarina Lopes, integrante da Área Acadêmica de Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da UFPE, através de uma parceria previamente estabelecida.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Identificação dos Isolados Bacterianos

A verificação da produção de bombas de efluxo pelos isolados clínicos bacterianos de *Klebsiella pneumoniae* foi realizada por PCR. O gene de resistência *acrB* foi investigado com os pares de primers descritos na Tabela 1.

As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µL por tubo, compreendendo: 1µL de DNA genômico a 5 ng/µL, 2,0U da enzima Taq DNA polimerase (Promega), 8 mM de dNTP (Ludwig Biotec), 25 mM de MgCl₂, tampão 5X e 10 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluído um controle negativo. As amplificações do gene *acrB* foram realizadas com desnaturação inicial de 10 minutos a 94 °C seguidas de 30 ciclos, correspondendo cada ciclo a 30 segundos a 94 °C para desnaturação, 1 minuto a 61 °C para o anelamento e 2 minutos a 72 °C para a extensão e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

Tabela 1 – Primer para detecção do gene *acrB*.

Primer	Sequência (5' - 3')	Temperatura	Referência	Gene
<i>acrB</i> F <i>acrB</i> R	TCAAACCAGGTGTGCAGGTA TTAATACCCAGACCGGATGC	61°C	Bratu <i>et al.</i> (2009)	<i>acrB</i>

3.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A atividade antibacteriana foi realizada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), utilizando o método de microdiluição em caldo de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2022). Inicialmente, foi depositado caldo Müller-Hinton em todos os poços das placas de microdiluição. A ceftazidima, menadiona e terpenos foram utilizados na faixa de concentração de 1 a 512 µg/mL, 0,5 a 216 µg/mL e 4 a 2000 µg/mL, respectivamente. O carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) foi utilizado com controle positivo na faixa de concentração de 2 a 216 µg/mL. As suspensões bacterianas foram ajustadas a 0,5 da escala de McFarland e diluídas para obter uma concentração final de 1×10^5 UFC/poço. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24h, e após a incubação houve a leitura por espectrofotometria no comprimento de onda de 620 nm (Multiskan FC, Thermo Scientific, Madrid, Espanha). A CIM foi considerada como a menor concentração capaz de inibir 90% do crescimento bacteriano.

3.2.3 Avaliação da Inibição da Bomba de Efluxo AcrAB-TolC por Diminuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Ceftazidima Associada a Menadiona, ao 4-terpineol e ao canfeno

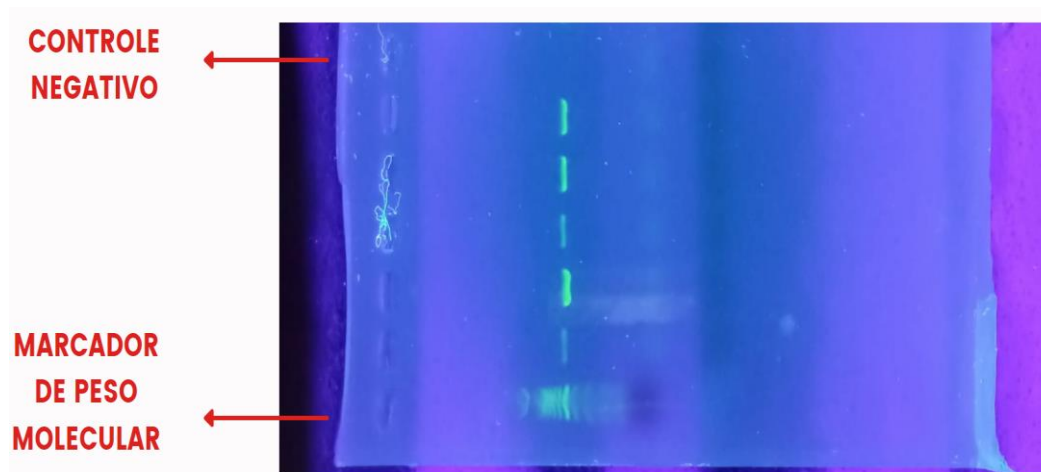
Posteriormente, para a verificação da inibição da bomba de efluxo, todo o experimento acima descrito foi realizado na presença de uma concentração subinibitória (CIM/2) de menadiona, 4-terpineol, canfeno ou CCCP juntamente com a ceftazidima. A redução na CIM correspondente a pelo menos ≥ 3 diluições do fármaco quando em associação com o inibidor de bomba de efluxo é indicativo de reversão da resistência por bombas de efluxo (Davies e Wright, 1997; Tintino *et al.*, 2018).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Após a realização da PCR, foi constatado que todos os cinco isolados eram produtores do gene *acrB*, como mostra a figura 6, onde podemos ver o controle negativo, seguido das amostras das cinco bactérias (K25-A2, K26-A2, K29-A2, K31-A2 e K32-A2) e do marcador de peso molecular.

Figura 7 – Corrida no gel de agarose para verificação da presença do gene *acrB* nos cinco isolados clínicos de *K. pneumoniae*.



Fonte: Elaboração própria.

4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Todos os dados referentes à atividade antibacteriana dos compostos podem ser verificados na Tabela 2. A CIM da ceftazidima variou entre 16 µg/mL e 512 µg/mL. Assim, todos os isolados tiveram sua resistência a ceftazidima comprovada, já que apresentavam os valores superiores ou iguais a 16 µg/mL, equivalentes de resistência determinados pelo CLSI para *Enterobacteriales* (CLSI, 2022).

CCCP, inibidor de bombas de efluxo, apresentou CIM variando de 4 a 32 µg/mL, menadiona de 32 a 64 µg/mL e os terpenos ≥ 2000 µg/mL.

Tabela 2 – Atividade antibacteriana de ceftazidima, canfeno, terpienen-4-ol, menadiona e CCCP frente a isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtores de bomba de efluxo.

CIM (µg/mL)

Isolados clínicos	Ceftazidima	Canfeno	4-terpineol	Menadiona	CCCP
K25-A2	512	>2000	2000	32	8
K26-A2	32	>2000	>2000	64	32
K29-A2	32	2000	2000	64	4
K31-A2	32	2000	2000	32	4
K32-A2	16	2000	>2000	32	8

K25-A2, K26-A2, K29-A2, K31-A2 e K32-A2: isolados clínicos bacterianos de *Klebsiella pneumoniae* produtores de bombas de efluxo; CIM: Concentração Inibitória Mínima; CCCP: Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona.

Fonte: Elaboração própria.

A CAZ foi o antimicrobiano escolhido para os testes, pois os β -lactâmicos são substrato do complexo AcrAB (Hasdemir *et al.*, 2004; Padilla *et al.*, 2010), e no estudo realizado por Scavuzzi *et al.* (2017), estes isolados apresentaram perfil de resistência a CAZ.

A atividade antibacteriana de terpenos vem sendo examinada em diversos estudos, como por exemplo, no trabalho de Guimarães e colaboradores (2019), onde timol, carvacrol e eugenol apresentaram ação antimicrobiana frente as cepas de *S. aureus*, *Salmonella* spp., *E. coli* e *Bacillus cereus*, obtendo atividade mais significativa que o fármaco sulfanilamida.

Nesse contexto, 4-terpineol já demonstrou sua promissora atividade antibacteriana frente a diferentes bactérias, como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Legionella pneumophila*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* (Bordini *et al.*, 2018; Maquera-Huacho *et al.*, 2018; Mondello *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2018). Enquanto o camphene, de forma similar, através de estudos experimentais *in vitro*, se mostra como um potencial agente antimicrobiano contra um amplo espectro de bactérias e fungos, especialmente cepas patogênicas como *K. pneumoniae*, *E. coli* e *S. aureus* (Hachlafi *et al.*, 2021). No presente estudo ao verificar o potencial antibacteriano de 4-terpineol e canfeno, foi observado que esses dois terpenos apresentaram baixa atividade antibacteriana frente aos isolados utilizados neste trabalho (CIM $\geq$ 2000 μ g/mL).

Quanto a menadiona, os valores de CIM variaram entre 32 e 64 μ g/mL, valores que condizem com os descritos por Tintino *et al.* (2018) para *S. aureus* produtoras de bombas de efluxo. Posteriormente, Mone *et al.* (2022) também descreveram o mesmo valor de CIM (64 μ g/mL) para *S. aureus*. O valor de CIM também está de acordo com o que foi relatado por Andrade *et al.* (2017) quando a atividade antibacteriana da

menadiona foi testada frente a *P. aeruginosa* PA03 (CIM = 64 µg/mL). Entretanto, nesse mesmo estudo, também foi possível ver que a menadiona não apresentou atividade antibacteriana para isolados de *K. pneumoniae*, *E. coli* e *S. aureus* (CIM = 128 µg/mL), diferindo dos resultados encontrados no trabalho de Tintino *et al.* (2018) e no presente estudo, o que pode estar relacionado com a expressão dos sistemas de efluxo nos isolados bacterianos.

4.3 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA BOMBA DE EFLUXO POR DIMINUIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DA CEFTAZIDIMA ASSOCIADA A MENADIONA, AO 4-TERPINEOL E AO CANFENO

A influência da ação dos três compostos sobre a atividade bacteriana da ceftazidima pode ser vista na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Atividade antibacteriana da ceftazidima isolada e em associação com terpenos e CCCP frente a isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtores de bomba de efluxo.

Isolados clínicos	CIM (µg/mL)				
	CAZ	CAZ/Canfeno	CAZ/4-terpineol	CAZ/Menadiona	CAZ/CCCP
K25-A2	512	256/500	256/500	128/4	128/1
K26-A2	32	4/7,81	4/7,81	4/0,25	4/0,0125L
K29-A2	32	2/3,90	2/3,90	2/0,12	8/0,01
K31-A2	32	2/3,90	2/3,90	2/0,062	1/0,001
K32-A2	16	1/1,95	1/1,95	1/0,031	1/0,003

K25-A2, K26-A2, K29-A2, K31-A2 e K32-A2: isolados clínicos bacterianos de *Klebsiella pneumoniae* produtores da bombas de efluxo AcrAB-TolC; CIM: Concentração Inibitória Mínima; CAZ: Ceftazidima; CCCP: Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona.

Fonte: Elaboração própria.

Observa-se em nosso estudo que quando associada a menadiona, a CIM da ceftazidima diminuiu de 4 a 8 vezes em todos os isolados (Tabela 3), devolvendo a sensibilidade ao antibiótico a quatro dos cinco isolados testados (CLSI, 2022) e se apresentando como agente anti-efluxo com resultados comparáveis ao inibidor controle CCCP. A menadiona havia sido testada por Tintino *et al.* (2018) frente a isolados de *S. aureus* produtores da bomba de efluxo TetK e NorA, sendo capaz potencializar os efeitos antibacterianos do fármaco norfloxacino e do corante fluorescente brometo de etídio. De forma similar, menaquinona (vitamina K2), também apresentou potencial inibitório sobre bombas de efluxo NorA em isolados de *S. aureus* por diminuir significativamente a expressão dos genes codificadores dessa proteína de efluxo, como relatado por Pasandineh *et al.* (2022). Vale salientar que o presente

trabalho é o primeiro a comprovar a atividade inibitória de menadiona frente a bombas de efluxo AcrB expressas por isolados bacterianos Gram-negativos.

Além disso, outras vitaminas lipossolúveis já tiveram seus efeitos anti-efluxo estudados. Em 2017, Collnot *et al.* observaram que D- α -tocoferil polietilenoglicol afetou a fluidez da membrana celular, modificou a permeabilidade da membrana celular e inibiu o sistema de efluxo dependente de ATP em linhagens de células cancerígenas. Além disso, em outro trabalho de Tintino *et al.* publicado em 2016, o colecalciferol (vitamina D) foi testado frente a isolados de *S. aureus* produtores da bomba TetK e conseguiu modular a CIM da tetraciclina e norfloxacin. Assim, as vitaminas se mostram como uma alternativa promissora para aumentar a eficácia antimicrobiana de medicamentos.

A associação de fitoquímicos com fármacos convencionais se mostra muito eficaz no combate à microrganismos resistentes, uma vez que diversos estudos sugerem que esses compostos podem agir como inibidores de bombas de efluxo (Limaverde *et al.*, 2017; Miladi *et al.*, 2017; Cappiello *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2021).

Diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de avaliar o potencial anti-efluxo desses compostos. No trabalho de No trabalho Coêlho *et al.* (2016), onde os monoterpenos oxigenados nerol e 3,7-dimetil-1-octanol foram associados ao antibiótico norfloxacin frente aos isolados de *S. aureus* 1199B potencializando o efeito do antibiótico pela inibição da bomba de efluxo NorA. Ademais, os monoterpenos α -pinene e limonene também foram capazes de diminuir a CIM do brometo de etídio em cepas de *S. aureus* 1199B, indicando inibição da bomba NorA, conforme corroborado pelas análises de *docking* realizadas no trabalho (Araújo *et al.*, 2021).

No estudo de Miladi *et al.* (2017) foi relatado aumento na susceptibilidade de isolados de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ao ácido nalidíxico após associação com os terpenos carvacrol, timol e eugenol. Os autores destacaram que, devido ao caráter hidrofóbico desses compostos naturais, a membrana bacteriana pode ter se tornado mais permeável e induzido o aumento da susceptibilidade dos isolados ao antibiótico por inibição de bombas de efluxo. Adicionalmente, Miladi *et al.* (2017) também evidenciaram a atividade anti-efluxo desses terpenos, além de outros dois (*p*-cimeno and γ -terpineno), frente a isolados de *S. aureus*. A adição desses fitoquímicos aumentou o acúmulo de brometo de etídio (BrEt), um substrato fluorescente, nas células bacterianas o que indicou a inibição do efluxo do BrEt.

Em outro estudo, realizado por Muniz *et al.* (2021) a associação de terpenos (4-alil-2,6-dimetoxifenol, eugenol e isoeugenol) com norfloxacino frente a cepas de *Staphylococcus aureus* 1199B também causou significativa redução na CIM do fármaco. Além disso, quando associados ao brometo de etídio, os monoterpenos 4-alil-2,6-dimetoxifenol, alilbenzeno e isoeugenol também causaram reduções significativas na CIM desse composto, que é um conhecido substrato de bombas de efluxo. Logo, tais achados evidenciaram que esses terpenos podem apresentar mecanismo potencializador da atividade bacteriana do norfloxacino e do brometo de etídio através da inibição de bombas de efluxo.

O terpeno limoneno também exibiu um notável potencial anti-efluxo em uma pesquisa conduzida por Freitas *et al.* (2022). Este composto mostrou resultados significativos quando o ciprofloxacino, reduzindo seu valor de CIM de 32 µg/mL para 3,17 µg/mL, com atividade superior ao inibidor CCCP, que havia reduzido a CIM desse antibiótico para 10,7 µg/mL. Além disso, a análise *in silico* realizada no trabalho demonstrou que o limoneno pode se encaixar eficazmente na estrutura da bomba de efluxo MepA em *S. aureus*.

No presente estudo, o terpeno 4-terpineol conseguiu diminuir a CIM da ceftazidima pela metade no isolado K25-A2 e de 6-8 vezes nos outros isolados (Tabela 3), deixando em evidência seu potencial inibitório sobre bombas de efluxo. Esse terpeno foi identificado como substrato da bomba de efluxo MexAB-OprM em mutantes de efluxo de *P. aeruginosa* no trabalho de Papadoulos e colaboradores (2008).

Uma vez que inibidores de bombas de efluxo que se apresentam como substratos podem atuar inibindo competitivamente a ligação e o efluxo de fármacos, é possível que o 4-terpineol também seja substrato da bomba AcrB e iniba sua ação através desse mecanismo (Pathania; Sharma; Gupta, 2019). Além disso, 4-terpineol aparece na composição de óleos que demonstraram atividade inibitória em sistemas de efluxo, como no óleo de *Eucalyptus grandis*, testado frente a *K. pneumoniae*, *S. aureus* e *Moraxella catarrhalis* infectantes do trato respiratório (Sewanu *et al.*, 2015) e no óleo de *Thymus riatarum* testado frente a *E. coli* e *Enterobacter aerogenes*, onde o estudo sugeriu que compostos ativos desse óleo poderiam ser substratos da bomba AcrAB-TolC (Fadli *et al.*, 2014).

Também foi relatado que o 4-terpineol é um composto capaz de produzir efeitos inibitórios de moléculas *Quorum Sensing* (QS) via ligação competitiva aos receptores

cognatos do sinal de QS e também regulação negativa da expressão de genes regulados por QS (Bose *et al.*, 2020), mas também há a possibilidade do 4-terpineol interferir na liberação de moléculas QS ao bloquear a ação das bombas de efluxo, uma vez que bombas de efluxo transportam essas moléculas (Reza; Sutton; Rahman, 2019).

O canfeno, por sua vez, reduziu a CIM da ceftazidima pela metade no isolado K25-A2 e de 6 a 8 vezes nos outros isolados (Tabela 3). Esse terpeno também foi identificado em óleos com atividade inibitória, como os óleos de *Eucalyptus grandis* e *Artemisia herba-alba* Asso (Sewanu *et al.*, 2015; Fadli *et al.*, 2016). Além disso, canfeno também representa 5,14% da composição química do óleo de *Rosmarinus officinalis*, que foi identificado como substrato de bombas de efluxo em bactérias Gram-negativas no trabalho de Fadli *et al.* (2011).

Nosso estudo foi o primeiro trabalho a reportar a atividade individual desses terpenos na possível inibição de bombas de efluxo frente à isolados bacterianos de *K. pneumoniae* produtores do sistema AcrAB-TolC. Ademais, como sugerido anteriormente em outros estudos, é possível que, devido ao caráter lipofílico dos terpenos, exista grande facilidade de penetração de prótons e íons na membrana celular, o que pode acarretar modificações na função das proteínas de efluxo de muitos microrganismos (Cruz *et al.*, 2020). O mesmo pode ser dito sobre a menadiona, molécula que também apresenta propriedades lipofílicas (Thijssen *et al.*, 2006).

Esta lipofilicidade faz CCCP, um agente de desacoplamento, ser uma molécula promissora na inibição de sistemas de efluxo. Ele atua destruindo o gradiente eletroquímico transmembrana e reprimindo a fonte de síntese química, sendo usado como modelo para estudar as interações entre os antibióticos e os componentes da membrana plasmática (Baron e Rolain, 2018; Compagne *et al.*, 2023). O CCCP demonstrou um forte efeito inibitório sobre diversas bombas de efluxo das famílias SMR, MFS e, principalmente, da família RND, a qual a bomba de efluxo AcrB pertence (Sekyere e Amoako, 2017; Tang *et al.*, 2020). Quando testada, a CIM da ceftazidima diminuiu significativamente (redução ≥ 4 vezes) na presença desse composto (Tabela 3), comprovando o papel do efluxo na resistência dos isolados bacterianos a esse fármaco (Pakzad *et al.*, 2013, Tintino *et al.*, 2018).

As moléculas e compostos testados neste estudo apresentam-se como potenciais inibidores de bombas de efluxo. Estas bombas em bactérias Gram-negativas exercem efeito na resistência adquirida aos antibióticos devido ao efeito

combinado do chamado efluxo transenvolpe, no qual um composto é capturado no periplasma e efluxado diretamente para o meio externo, além da absorção reduzida através da membrana bacteriana externa (McNeil *et al.*, 2019).

Especialmente, a superexpressão de bombas de fluxo da família RND tem papel chave na resistência a múltiplos fármacos em patógenos Gram-negativos (Opperman *et al.*, 2013; Sjuts *et al.*, 2016). Por isso, as bombas de efluxo podem ser usadas como alvos através da utilização de um inibidor, pois a ação conjunta desse composto inibidor de bombas de efluxo com um fármaco pode exibir potência aumentada, espectro de atividade aprimorado e propensão reduzida para resistência adquirida (Lomovskaya e Bostian, 2006; Bhardwaj e Mohanty, 2012; Wang; Venter; Ma, 2016; Frei *et al.*, 2020).

5 CONCLUSÃO

A terapia adjuvante é uma estratégia promissora para reverter a resistência de isolados bacterianos e assim recuperar a atividade de antigos antibióticos. No presente estudo, foi observado significativo aumento da atividade antibacteriana do antibiótico ceftazidima após associação com menadiona e terpenos 4-terpineol e canfeno, com resultados comparáveis àqueles obtidos pela utilização do já estabelecido inibidor CCCP, sugerindo que os três compostos possuem atividade inibitória sobre os sistemas de efluxo AcrAB-TolC das cepas K25-A2, K26-A2, K29-A2, K31-A2 e K32-A2 *Klebsiella pneumoniae*. Os compostos foram capazes de devolver a sensibilidade ao antibiótico a isolados bacterianos resistentes, exceto pelo K25-A2, o qual pode dispor de outros mecanismos de resistência ao fármaco, mas que também se tornou mais suscetível a sua ação. Assim, a estratégia terapêutica de associação da ceftazidima a menadiona e aos terpenos apresenta-se como promissora para o futuro tratamento de infecções clínicas causadas por *Klebsiella pneumoniae*.

REFERÊNCIAS

- AGRELES, M. A. A.; CAVALCANTI, I. D. L.; CAVALCANTI, I. M. F. The Role of Essential Oils in the Inhibition of Efflux Pumps and Reversion of Bacterial Resistance to Antimicrobials. **Current Microbiology**, v. 78, n. 10, p. 3609–3619, out. 2021.
- AGRELES, M. A. A.; CAVALCANTI, I. D. L.; CAVALCANTI, I. M. F. Synergism between metallic nanoparticles and antibiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 11, p. 3973–3984, jun. 2022.
- ALCÁNTAR-CURIEL, M. D. *et al.* Association of antibiotic resistance, cell adherence, and biofilm production with the endemicity of nosocomial *Klebsiella pneumoniae*. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.
- ALENAZY, R. Drug Efflux Pump Inhibitors: A Promising Approach to Counter Multidrug Resistance in Gram-Negative Pathogens by Targeting AcrB Protein from AcrAB-TolC Multidrug Efflux Pump from *Escherichia coli*. **Biology**, v. 11, n. 9, p. 1328, set. 2022.
- ALJELDAH, M. M. Antimicrobial Resistance and Its Spread Is a Global Threat. **Antibiotics**, v. 11, n. 8, p. 1082, ago. 2022. ANDRADE, J.C. *et al.* Menadione (vitamin K) enhances the antibiotic activity of drugs by cell membrane permeabilization mechanism. **Saudi journal of biological sciences**, v. 24, n. 1, p. 59-64, 2017.
- APARNA, V *et al.* Identification of natural compound inhibitors for multidrug efflux pumps of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* using in silico high-throughput virtual screening and in vitro validation. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e101840, 2014.
- ARAÚJO, A. C. J. *et al.* In Vitro and In Silico Inhibition of *Staphylococcus aureus* Efflux Pump NorA by α -Pinene and Limonene. **Current Microbiology**, 16 jul. 2021.
- BASSETTI, M. *et al.* How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Drugs in context**, v. 7, p. 1–18, 29 maio 2018.
- BASSETTI, M.; GARAU, J. Current and future perspectives in the treatment of multidrug-resistant Gram-negative infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 76, n. Supplement_4, p. iv23–iv37, 1 nov. 2021.
- BHARDWAJ, A. K.; MOHANTY, P. Bacterial Efflux Pumps Involved in Multidrug Resistance and their Inhibitors: Rejuvenating the Antimicrobial Chemotherapy. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 7, n. 1, p. 73–89, 2012.
- BIALEK-DAVENET, S. *et al.* Differential contribution of AcrAB and OqxAB efflux pumps to multidrug resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 1, p. 81-88, 2015.

BORDINI, E. A. F. *et al.* Antimicrobial effects of terpinen-4-ol against oral pathogens and its capacity for the modulation of gene expression. **Biofouling**, v. 34, n. 7, p. 815–825, 9 ago. 2018.

BOSE, S. K. *et al.* Terpinen-4-ol attenuates quorum sensing regulated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Future Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 127–142, jan. 2020.

CAMPHENE. **American Chemical Society**, 2012. Disponível em: <<https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/c/camphene.html>>. Acesso em: 9 set. 2023.

CAPPIELLO, F. *et al.* The Revaluation of Plant-Derived Terpenes to Fight Antibiotic-Resistant Infections. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 325, 13 jun. 2020.

CHAN, K. S.; CHIA, C. T. W.; SHELAT, V. G. Demographics, Radiological Findings, and Clinical Outcomes of *Klebsiella pneumonia* vs. Non-*Klebsiella pneumoniae* Pyogenic Liver Abscess: A Systematic Review and Meta-Analysis with Trial Sequential Analysis. **Pathogens**, v. 11, n. 9, p. 976, set. 2022.

CHO, K. S. *et al.* Terpenes from forests and human health. **Toxicological research**, v. 33, p. 97-106, 2017.

CLSI M100-ED32:2022. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**, 32nd Edition.

COÊLHO, M. L. *et al.* Inhibition of the NorA multi-drug transporter by oxygenated monoterpenes. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 173–177, out. 2016.

COLLNOT, E. M. *et al.* Mechanism of Inhibition of P-Glycoprotein Mediated Efflux by Vitamin E TPGS: Influence on ATPase Activity and Membrane Fluidity. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 3, p. 465–474, 17 mar. 2007. Acesso em: 14 dez. 2020.

COMPAGNE, N. *et al.* Update on the Discovery of Efflux Pump Inhibitors against Critical Priority Gram-Negative Bacteria. **Antibiotics**, v. 12, n. 1, p. 180, jan. 2023.

COSTA, R. H. S. *et al.* Evaluation of antibacterial activity and reversal of the NorA and MepA efflux pump of estragole against *Staphylococcus aureus* bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 6, p. 3551–3555, 3 maio 2021.

CRUZ, R. P. *et al.* Effect of α -Bisabolol and Its β -Cyclodextrin Complex as TetK and NorA Efflux Pump Inhibitors in *Staphylococcus aureus* Strains. **Antibiotics**, v. 9, n. 1, p. 28, 1 jan. 2020.

DAVIES, J.; WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. **Trends in Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 234–240, jun. 1997.

DAVIET, L.; SCHALK, M. Biotechnology in plant essential oil production: progress and perspective in metabolic engineering of the terpene pathway. **Flavour Fragr J**, v. 25, n. 3, p. 123-127, 2010.

DUBEY, K.; INDU; SHARMA, M. Reprogramming of antibiotics to combat antimicrobial resistance. **Archiv Der Pharmazie**, v. 353, n. 11, p. 2000168–2000168, 10 ago. 2020.

EBBENSGAARD, A. E.; LØBNER-OLESEN, A.; FRIMODT-MØLLER, J. The Role of Efflux Pumps in the Transition from Low-Level to Clinical Antibiotic Resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 12, p. 855, dez. 2020.

ELKINS, C. A.; NIKAIDO, H. Substrate Specificity of the RND-Type Multidrug Efflux Pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* Is Determined Predominately by Two Large Periplasmic Loops. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 23, p. 6490–6498, dez. 2002.

ELMONIR *et al.* Emergence of Colistin and Carbapenem Resistance in Extended-Spectrum β -Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Chickens and Humans in Egypt. **Biology**, v. 10, n. 5, p. 373–373, 26 abr. 2021.

FADLI, M. *et al.* Essential oils from Moroccan plants as potential chemosensitisers restoring antibiotic activity in resistant Gram-negative bacteria. **International journal of antimicrobial agents**, v. 38, n. 4, p. 325-330, 2011.

FADLI, M. *et al.* First evidence of antibacterial and synergistic effects of *Thymus riatarum* essential oil with conventional antibiotics. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 370-376, 2014.

FADLI, M. *et al.* *Artemisia herba-alba* Asso and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf essential oils and their capability to restore antibiotics efficacy. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 399-404, 2016.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. Perspectives in medicinal chemistry, v. 6, p. **PMC**. S14459, 2014.

FARHAT, N. *et al.* Efflux pumps as interventions to control infection caused by drug-resistance bacteria. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 12, p. 2307–2316, 1 dez. 2020.

FREI, A. *et al.* Metal complexes as a promising source for new antibiotics. **Chemical Science**, v. 11, n. 10, p. 2627–2639, 11 mar. 2020.

FREITAS, P. R. *et al.* Inhibition of the MepA efflux pump by limonene demonstrated by *in vitro* and *in silico* methods. **Folia Microbiologica**, v. 67, n. 1, p. 15–20, 1 fev. 2022.

GABASHVILI, E *et al.* Phage Transduction is Involved in the Intergeneric Spread of Antibiotic Resistance-Associated blaCTX-M, mel, and tetM Loci in Natural Populations of Some Human and Animal Bacterial Pathogens. **Current Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 185–193, 21 nov. 2019.

GAURAV, A *et al.* Role of bacterial efflux pumps in antibiotic resistance, virulence, and strategies to discover novel efflux pump inhibitors. **Microbiology**, v. 169, n. 5, 24 maio 2023.

GIL-GIL, T.; MARTÍNEZ, J. L.; BLANCO, P. Mechanisms of antimicrobial resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: a review of current knowledge. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 18, n. 4, p. 335–347, 2 abr. 2020.

GUIMARÃES, A. C. *et al.* Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 2471, 5 jul. 2019.

HACHLAFI, N. E. L., *et al.* In vitro and in vivo biological investigations of camphene and its mechanism insights: A review. **Food Reviews International**, v.1, n. 1, p. 1-28, 2021.

HASDEMIR, Ufuk Over *et al.* Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2701-2706, 2004.

HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current opinion in microbiology**, v. 51, p. 72-80, 2019.

JALIL, M. B.; AL ATBEE, M. Y. N. The prevalence of multiple drug resistance *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with urinary tract infections. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 36, n. 9, p. e24619, set. 2022.

JIANG, Q. *et al.* Effects and relevant mechanisms of non-antibiotic factors on the horizontal transfer of antibiotic resistance genes in water environments: A review. **Science of The Total Environment**, v. 806, p. 150568–150568, 1 fev. 2022.

JUBAIR, N. *et al.* Review on the Antibacterial Mechanism of Plant-Derived Compounds against Multidrug-Resistant Bacteria (MDR). Evidence-Based **Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, p. e3663315, 17 ago. 2021.

KHAN, S. *et al.* Inhibition of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae*: Nanoparticles induced photoinactivation in presence of efflux pump inhibitor. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 157, p. 165–174, 1 dez. 2020.

KUMAWAT, M. *et al.* Role of bacterial efflux pump proteins in antibiotic resistance across microbial species. **Microbial Pathogenesis**, v. 181, p. 106182–106182, 1 ago. 2023.

LEE, J.-H. Perspectives towards antibiotic resistance: from molecules to population. **Journal of Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 181–184, 26 fev. 2019.

LI, F. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* liver abscess with purulent meningitis and endogenous endophthalmitis: A case report. **Frontiers in Surgery**, v. 9, 2022.

LI, J. *et al.* Efflux Pump AcrAB Confers Decreased Susceptibility to Piperacillin–Tazobactam and Ceftolozane–Tazobactam in Tigecycline-Non-Susceptible *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 13, p. 4309–4319, nov. 2020.

LI, Y.; CROSS, T. S.; DÖRR, T. Analysis of AcrB in *Klebsiella pneumoniae* reveals natural variants promoting enhanced multidrug resistance. **Research in Microbiology**, v. 173, n. 3, p. 103901, 1 mar. 2022.

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

LIPSZYC, A.; SZUPLEWSKA, M.; BARTOSIK, D. How Do Transposable Elements Activate Expression of Transcriptionally Silent Antibiotic Resistance Genes? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8063–8063, 22 jul. 2022.

LIU, Y. et al. Antibiotic adjuvants: an alternative approach to overcome multi-drug resistant Gram-negative bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 301–314, 4 maio 2019.

LOMOVSKAYA, O. et al. Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents for Combination Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 105–116, jan. 2001.

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, n. 7, p. 910–918, mar. 2006.

LORUSSO, A. B. et al. Role of efflux pumps on antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, p. 15779, 2022.

MAHAMOUD, A. et al. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 1223–1229, 2007.

MAQUERA-HUACHO, P. M. et al. In vitro antibacterial and cytotoxic activities of carvacrol and terpinen-4-ol against biofilm formation on titanium implant surfaces. **Biofouling**, v. 34, n. 6, p. 699–709, 3 jul. 2018.

MARTELLOSIO, J.P. et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, an Emerging Cause of Endogenous Endophthalmitis in A French Center: A Comparative Cohort Study. **Ocular Immunology and Inflammation**, v. 31, n. 5, p. 905–913, 28 maio 2023.

MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 4, 2018.

MAURYA, N. et al. Alliance of Efflux Pumps with β -Lactamases in Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 8, p. 1155–1163, out. 2019.

MAX, B. L. *et al.* The dawn of repurposing vitamins as potential novel antimicrobial agents: A call for global emergency response amidst AMR crisis. **Health Science Reports**, v. 6, n. 5, p. e1276, maio 2023.

MCNEIL, H. E. *et al.* Identification of binding residues between periplasmic adapter protein (PAP) and RND efflux pumps explains PAP-pump promiscuity and roles in antimicrobial resistance. **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 12, p. e1008101–e1008101, 26 dez. 2019.

MEYER, C. *et al.* Contribution of RND-Type Efflux Pumps in Reduced Susceptibility to Biocides in *Acinetobacter baumannii*. **Antibiotics**, v. 11, n. 11, p. 1635–1635, 16 nov. 2022.

MILADI, H. *et al.* Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to nalidixic acid. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 56–63, mar. 2017.

MILADI, H. *et al.* Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and γ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 112, p. 156–163, nov. 2017.

MONDELLO, F. *et al.* Terpinen-4-ol, the Main Bioactive Component of Tea Tree Oil, as an Innovative Antimicrobial Agent against *Legionella pneumophila*. **Pathogens**, v. 11, n. 6, p. 682, jun. 2022.

MONE, N. S. *et al.* Antibacterial and Antibiofilm Potency of Menadione Against Multidrug-Resistant *S. aureus*. **Current Microbiology**, v. 79, n. 9, p. 282, 8 ago. 2022.

MOTA, F. S. D.; OLIVEIRA, H. A. D.; SOUTO, R. C. F. Profile and prevalence of antimicrobial resistance of negative-Gram bacteria isolated from intensive care patients. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, 2018.

MULLER, A. E.; PUNT, N.; MOUTON, J. W. Optimal exposures of ceftazidime predict the probability of microbiological and clinical outcome in the treatment of nosocomial pneumonia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 4, p. 900-906, 2013.

MUNIZ, D. F. *et al.* In vitro and in silico inhibitory effects of synthetic and natural eugenol derivatives against the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus*. **Food Chemistry**, v. 337, p. 127776, fev. 2021.

NDLOVU, T. *et al.* Evaluation of Potential Factors Influencing the Dissemination of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and Alternative Treatment Strategies. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 8, p. 381, ago. 2023.

NI, R. T. *et al.* The role of RND-type efflux pumps in multidrug-resistant mutants of *Klebsiella pneumoniae*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 10876, 2 jul. 2020.

NIELSEN, T. B. *et al.* Sustainable Discovery and Development of Antibiotics — Is a Nonprofit Approach the Future? **The New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 6, p. 503–505, 8 ago. 2019.

- OPPERMAN, T. J. *et al.* Characterization of a Novel Pyranopyridine Inhibitor of the AcrAB Efflux Pump of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 722–733, 18 nov. 2013.
- PADILLA, E. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 177-183, 2010.
- PADUCH, R. *et al.* Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 55, p. 315-327, 2007.
- PAGES, J. *et al.* Efflux pump, the masked side of β -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **PloS one**, v. 4, n. 3, p. e4817, 2009.
- PAINULI, S. *et al.* Superbugs or multidrug resistant microbes: A new threat to the society. **Health Science Reports**, v. 6, n. 8, p. e1480, 2 ago. 2023.
- PAKZAD, I. *et al.* Contribution of AcrAB efflux pump to ciprofloxacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from burn patients. **GMS Hygiene and Infection Control**, v. 8, n. 2, 6 nov. 2013.
- PAPADOPOULOS, C. J. *et al.* Role of the MexAB-OprM Efflux Pump of *Pseudomonas aeruginosa* in Tolerance to Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Oil and Its Monoterpene Components Terpinen-4-ol, 1,8-Cineole, and -Terpineol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 6, p. 1932–1935, 11 jan. 2008.
- PASANDIDEH, N. K. *et al.* Inhibitory activities of vitamins K2 against clinical isolates of quinolone-resistant and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (QR-MRSA) with different multi-locus sequence types (MLST), SCCmec, and spa types. **European Journal of Medical Research**, v. 27, n. 1, p. 295, 17 dez. 2022.
- PATHANIA, R.; SHARMA, A.; GUPTA, V. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. **Indian Journal of Medical Research**, v. 149, n. 2, p. 129, 2019.
- PRASCH, S. *et al.* Resistance modulatory and efflux-inhibitory activities of capsaicinoids and capsinoids. **Bioorganic Chemistry**, v. 82, p. 378-384, 2019.
- REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482–501, 26 jun. 2018.
- REZA, A.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Effectiveness of efflux pump inhibitors as biofilm disruptors and resistance breakers in gram-negative (ESKAPEE) bacteria. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, p. 229, 2019.
- RUSSO, A. *et al.* New advances in management and treatment of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 21, n. 1, p. 41–55, 2 jan. 2023.
- SCAVUZZI, A. M. L. *et al.* Occurrence of qnrB1 and qnrB12 genes, mutation in gyrA and ramR, and expression of efflux pumps in isolates of *Klebsiella pneumoniae*

carriers of bla KPC-2. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 477–484, 1 abr. 2017.

SENCZYNA, F. *et al.* Comparative genomics of *Enterobacter cloacae* complex before and after acquired clinical resistance to Ceftazidime-Avibactam. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 101, n. 4, p. 115–119, 1 dez. 2021.

SEKYERE, J. O.; AMOAKO, D. G. Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazine (CCCP) Reverses Resistance to Colistin, but Not to Carbapenems and Tigecycline in Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 14 fev. 2017.

SEUKEP, A. J. *et al.* Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n. 4, p. 277–290, 1 ago. 2020.

SEWANU, S. O. *et al.* Antimicrobial and efflux pumps inhibitory activities of Eucalyptus grandis essential oil against respiratory tract infectious bacteria. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 10, p. 343–348, 10 mar. 2015.

SHARMA, A.; GUPTA, V. K.; PATHANIA, R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. **Indian Journal of Medical Research**, v. 149, n. 2, p. 129–129, 1 jan. 2019.

SHIELDS, R. K. Progress and New Challenges in Combatting the Threat of Antimicrobial Resistance: Perspective From an Infectious Diseases Pharmacist. **The Journal of Infectious Diseases**, p. jiad250, 24 jul. 2023.

SJUTS, H. *et al.* Molecular basis for inhibition of AcrB multidrug efflux pump by novel and powerful pyranopyridine derivatives. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 13, p. 3509–3514, 14 mar. 2016.

SOLER, N.; FORTERRE, P. Vesiduction: the fourth way of HGT. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 7, p. 2457–2460, 14 jun. 2020.

SOLNIER, J. *et al.* Flavonoids as Novel Efflux Pump Inhibitors and Antimicrobials Against Both Environmental and Pathogenic Intracellular Mycobacterial Species. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 734–734, 7 fev. 2020.

STURGE, C. R. *et al.* AcrAB–TolC Inhibition by Peptide-Conjugated Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers Restores Antibiotic Activity *in Vitro* and *in Vivo*. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, n. 8, p. 1446–1455, 9 ago. 2019.

SULTAN, Insha *et al.* Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective, **Frontiers in Microbiology**, v. 9, set. 2018.

TAKATSUKA, Y.; CHEN, C.; NIKAIDO, H. Mechanism of recognition of compounds of diverse structures by the multidrug efflux pump AcrB of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 15, p. 6559–6565, 2010.

THERIAULT, N.; TILLOTSON, G.; SANDROCK, C. E. Global travel and Gram-negative bacterial resistance; implications on clinical management. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 19, n. 2, p. 181–196, 1 fev. 2021.

TILLOTSON, G. S. Trojan Horse Antibiotics—A Novel Way to Circumvent Gram-Negative Bacterial Resistance? **Infectious Diseases: Research and Treatment**, v. 9, p. IDRT.S31567, jan. 2016.

TINTINO, S. R. *et al.* Action of cholecalciferol and alpha-tocopherol on *Staphylococcus aureus* efflux pumps. **EXCLI Journal**, v. 15, p. 315–322, 29 abr. 2016.

TINTINO, S. R. *et al.* Vitamin K enhances the effect of antibiotics inhibiting the efflux pumps of *Staphylococcus aureus* strains. **Medicinal Chemistry Research**, v. 27, p. 261-267, 2018.

TINTINO, S. R. *et al.* Effect of vitamin K3 inhibiting the function of NorA efflux pump and its gene expression on *Staphylococcus aureus*. **Membranes**, v. 10, n. 6, p. 130, 2020.

TANG, M. *et al.* The role and relationship with efflux pump of biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Microbial Pathogenesis**, v. 147, p. 104244, out. 2020.

THIJSSSEN, H. H. W. *et al.* Menadione is a metabolite of oral vitamin K. **British Journal of Nutrition**, v. 95, n. 2, p. 260–266, fev. 2006.

UDDIN, T. M. *et al.* Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, n. 12, p. 1750–1766, dez. 2021.

UZAIRUE, L. I. *et al.* Global Prevalence of Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* from Bloodstream Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Pathogens**, v. 11, n. 10, p. 1092, out. 2022.

VAN DUIJKEREN, E. *et al.* Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 2, p. 6.2.14, 6 abr. 2018.

VERMA, P.; TIWARI, M.; TIWARI, V. Efflux pumps in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: Current status and challenges in the discovery of efflux pumps inhibitors. **Microbial Pathogenesis**, v. 152, p. 104766, 1 mar. 2021.

VIROLLE, C. *et al.* Plasmid Transfer by Conjugation in Gram-Negative Bacteria: From the Cellular to the Community Level. **Genes**, v. 11, n. 11, p. 1239–1239, 22 out. 2020.

WALSH, T. R. *et al.* Antimicrobial Resistance: Addressing a Global Threat to Humanity. **PLOS Medicine**, v. 20, n. 7, p. e1004264, 7 mar. 2023.

WANG, Y. *et al.* Non-antibiotic pharmaceuticals enhance the transmission of exogenous antibiotic resistance genes through bacterial transformation. **The ISME Journal**, v. 14, n. 8, p. 2179–2196, 18 maio 2020.

WANG, Y.; VENTER, H.; MA, S. Efflux Pump Inhibitors: A Novel Approach to Combat Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. **Current Drug Targets**, v. 17, n. 6, p. 702–719, 24 mar. 2016.

XU, C. *et al.* Bactericidal, anti-biofilm, and anti-virulence activity of vitamin C against carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **iScience**, v. 25, n. 3, p. 103894, mar. 2022.

XU, Q. *et al.* RamA upregulates multidrug resistance efflux pumps AcrAB and OqxAB in *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 57, n. 2, p. 106251–106251, 1 fev. 2021.

YAN, K. *et al.* Synergistic effect of low-frequency ultrasound and antibiotics on the treatment of *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in mice. **Microbial Biotechnology**, v. 15, n. 11, p. 2819–2830, nov. 2022.

YAN, W. *et al.* Molecular characterization of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and emergence of tigecycline non-susceptible strains in the Henan province in China: a multicentre study. **Journal of Medical Microbiology**, v. 70, n. 3, 1 mar. 2021.

YU, Z. *et al.* The alarming antimicrobial resistance in ESKAPEE pathogens: Can essential oils come to the rescue? **Fitoterapia**, v. 140, p. 104433–104433, 1 jan. 2020.

ZHANG, Y. *et al.* The Antibacterial Mechanism of Terpinen-4-ol Against *Streptococcus agalactiae*. **Current Microbiology**, v. 75, n. 9, p. 1214–1220, 26 maio 2018.

ZHENG, M.; LUPOLI, T. J. Counteracting antibiotic resistance enzymes and efflux pumps. **Current Opinion in Microbiology**, v. 75, p. 102334–102334, 1 out. 2023.

ZHU, J. *et al.* Virulence Factors in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 8 abr. 2021.