

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão"



EFEITO DO 4-ALILANISOL SOBRE A CEPA K4100 DE *Staphylococcus aureus* PORTADORA DO MECANISMO DE EFLUXO ATIVO QacC

Antonio Henrique Bezerra¹, Suieny Rodrigues Bezerra², Nair Silva Mecêdo³, Jessyca Nayara Mascarenhas Lima⁴, Alisson Justino Alves da Silva⁵, Thiago Sampaio de Freitas⁶, Francisco Assis Bezerra da Cunha⁷

Resumo: O uso inadequado de antibióticos é uma das principais causas para a seleção de bactérias com mecanismos de resistência que diminuem a eficácia dos mesmos, sendo este um grande problema de saúde pública. Com isso, a busca por novos antibióticos e/ou substâncias capazes de potencializar ação dos antibióticos já existentes vem crescendo. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação antibacteriana do 4-Alilanol e sua associação à Oxacilina e ao Brometo de Etídio para avaliar a ação inibidora de Bomba de Efluxo QacC expressa na cepa K4100 de *Staphylococcus aureus*. Para determinar a Concentração Inibitória Mínima foi utilizado o método de microdiluição em caldo, enquanto para avaliar a inibição de bomba de efluxo foi utilizada uma concentração sub-inibitória de (CIM/8) do 4-Alilanol associada ao Brometo de Etídio (EtBr). De acordo com os testes o 4-Alilanol não apresentou atividade antibacteriana sobre a cepa K4100 de *S. aureus*, já quando associado à Oxacilina também não foi verificado efeito de modificação da atividade antibiótica e quando associado ao EtBr apresentou antagonismo demonstrando não possuir efeito inibidor de bomba de efluxo.

Palavras-chave: QacC. Bomba de Efluxo. *Staphylococcus aureus*. Resistência bacteriana.

Introdução

Staphylococcus aureus é conhecida pelas bacteremias causadas em humanos devido ao seu rápido processo infeccioso, sendo geralmente encontrada na pele e mucosa nasal sem causar danos, vindo a ser um problema devido aos seus mecanismos de resistência (JENUL; HORSWILL, 2019; KWIATKOWSKI *et al.*, 2019).

O uso inadequado e a automedicação com terapias antibióticas tornou-se uma das principais causas para a seleção de bactérias com mecanismos de resistência que diminuem a eficácia dos antibióticos. Dentre esses mecanismos está as Bombas de Efluxos, as quais são responsáveis por extrudir antibióticos e/ou outras substâncias nocivas de dentro da célula bacteriana para o meio

1 Universidade Regional do Cariri, email: henriquebezerra.urca@gmail.com

2 Universidade Regional do Cariri, email: suieny.urca@gmail.com

3 Universidade Federal de Pernambuco, email: naiirmacedo@gmail.com

4 Universidade Regional do Cariri, email: jessyca.lima@urca.br

5 Universidade Regional do Cariri, email: alisson12justino@gmail.com

6 Universidade Regional do Cariri, email: thiagocrato@hotmail.com

7 Universidade Regional do Cariri, email: cunha.urca@gmail.com

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão"



extracelular (ABDI *et al.*, 2020; BLASKOVICH; BUTLER; COOPER, 2017; ESPINOZA *et al.*, 2019; JENUL; HORSWILL, 2019).

Diante disso, a busca por novos antibióticos capazes de inibir esse mecanismo de resistência, ou que combinados com os antimicrobianos já existentes possam potencializá-los de modo a controlar e/ou minimizar os números de infecções por *S. aureus* e outras bactérias, sendo os terpenos encontrados em compostos naturais como constituintes majoritários de óleos essenciais, conhecidos por suas atividades antibacteriana direta ou associada (AUEZOVA *et al.*, 2020; CHEESMAN *et al.*, 2017; EBADOLLAHI, 2020; ESPINOZA *et al.*, 2019; MAHIZAN *et al.*, 2019).

1. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana do 4-Alilanol (1-methoxy-4-prop-2-enyl-benzene) bem como, avaliar o efeito do 4-Alilanol sobre a CIM do antibiótico e do Brometo de Etídio em cepas de *Staphylococcus aureus* portadoras do mecanismo de bomba de efluxo QacC.

2. Metodologia

3.1. Cepas Bacterianas e Meios de Cultura

A cepa de *S. aureus* utilizada foi K4100, que expressa a proteína de efluxo QacC que expõe antibióticos e outras drogas.

Para realização dos testes microbiológicos foram utilizados os meios de cultura: *Brain Heart Infusion (BHI)-Agar* (BHI, Acumedia Manufacturers Inc.) preparado de acordo com o fabricante e *Brain Heart Infusion (BHI, Acumedia Manufacturers Inc.)* preparado na concentração de 10 %.

3.2. Substâncias

O antibiótico Oxacilina, bem como 4-Alilanol, foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) e em água estéril. A proporção de DMSO utilizada foi inferior a 5 %. A Clorpromazina (CPZ) e o Brometo de Etídio foram dissolvidos em água destilada estéril, enquanto o Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) foi dissolvido em metanol/água (1:3, v/v). Todas as substâncias foram diluídas a concentração padrão de 1024 µg/mL.

3.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada para o composto isolado 4-Alilanol de acordo com o método de microdiluição em caldo proposto por (CLSI, 2015) com adaptações. Os inóculos foram preparados 24 horas após a semeadura das cepas. Posteriormente os eppendorfs foram preenchidos com 1440 µL de BHI e 160 µL do inóculo. As placas foram então preenchidas com 100 µL da solução final. A microdiluição foi realizada com 100 µL em diluições seriadas até a última cavidade (1:1), a penúltima fileira da placa foi utilizada como controle de crescimento e a última com controle de esterilidade. As concentrações dos compostos variaram de 512 µg/mL até 0,25 µg/mL. Após 24 h de incubação, as leituras foram realizadas pela adição de Resazurina (7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-ona). Os testes foram realizados em triplicata.

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão"



3.4. Avaliação da Inibição da Bomba de Efluxo por Modificação da CIM do Antibiótico Oxacilina e do Brometo de Etídio

Para observar se 4-Alilanol atua como potencial inibidor da bomba de efluxo QacC, um estudo comparativo entre os efeitos dos inibidores padrão da bomba de efluxo foi utilizado, avaliando a capacidade de ambos na diminuição da CIM do Brometo de Etídio e do antibiótico Oxacilina. Os EPIs padrões CCCP e o CPZ, foram utilizados para comprovar a expressão da bomba QacC pelas cepas testadas. A inibição da bomba de efluxo foi testada usando uma concentração sub-inibitória (CIM/8) dos EPIs e do 4-Alilanol. Nos testes, 160 μL de cada inóculo bacteriano suspenso em solução salina, correspondente a 0.5 da escala de *McFarland*, foram adicionados juntamente com EPIs e 4-Alilanol (CIM/8) e completados com BHI. Estes foram então transferidos para placas de microdiluição de 96 poços, a qual foram adicionados 100 μL do antibiótico ou do EtBr em diluições seriadas (1:1) que variaram de 512 a 0.25 $\mu\text{g/mL}$. A penúltima fileira da placa foi utilizada como controle de crescimento e a última com controle de esterilidade. Por fim, as placas foram incubadas a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 24 h e o crescimento bacteriano foi avaliado pelo uso da resazurina (7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one). A CIM foi definida como a menor concentração em que houve inibição do crescimento bacteriano, tanto com Oxacilina como com Brometo de Etídio. A CIM dos controles foi avaliada utilizando apenas antibiótico Oxacilina e o Brometo de Etídio.

3.5. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média geométrica. A análise de hipótese estatística foi aplicada usando *Two-Way* ANOVA, seguido do teste *post hoc* de Bonferroni, usando o software GraphPad Prism 7.0.

3. Resultados

Segundo os testes microbiológicos o 4-Alilanol não apresenta atividade antibacteriana direta clinicamente relevante sobre a cepa K4100 de *S. aureus* por conferir CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$, resultados semelhantes foram observados em outro trabalho onde foram testados terpenos, dentre eles o 4-Alilanol sobre as cepas 1199 e 1199B de *S. aureus* apresentando CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ (MUNIZ *et al.*, 2021).

Quando associado ao antibiótico padrão Oxacilina, o 4-Alilanol não modificou a CIM do antibiótico, permanecendo o mesmo valor do controle de 512 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1), não havendo sinergismo ou antagonismo entre as substâncias, o que mostra que o 4-Alilanol não possui efeito modificador da ação antibiótica da Oxacilina para a cepa testada (Figura 1).

Já quando associado ao Brometo de Etídio, os testes demonstraram um efeito antagônico notado pela elevação da CIM do Brometo de Etídio de 64 para 203,2 $\mu\text{g/mL}$, indicando que este terpeno não possui efeito inibidor da bomba de efluxo QacC expressa por SA K4100. Esse efeito antagônico do 4-Alilanol sobre o brometo de etídio também foi encontrado para outras cepas de *S. aureus* como a RN4220 (bomba de efluxo MsrA) e 1199B (bomba de efluxo NorA) (BEZERRA *et al.*, 2020; COELHO *et al.*, 2016).

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão"

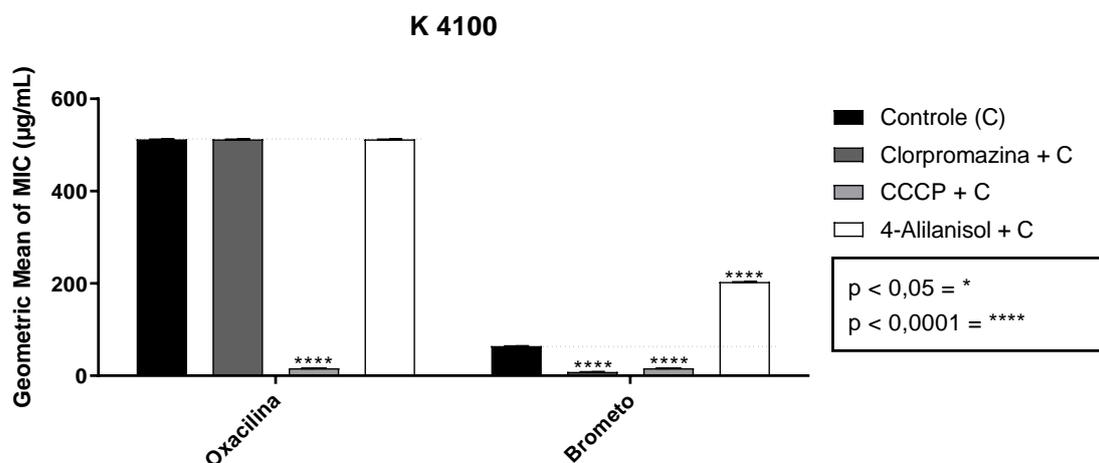


Tabela 1. Valor de CIM da Oxacilina e da associação entre Oxacilina e 4-Alilanol

CIM da Oxacilina	CIM do 4-Alilanol
512 µg/mL	1024 µg/mL

Legenda. Os valores de CIM foram expressos em µg/mL.

Figura 1. Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do 4-Alilanol associado ao antibiótico Oxacilina e ao Brometo de Etídio.



Legenda. Cianeto de Carbonila m-Clorofenil (CCCP). -**** = p<0,0001.

4. Conclusão

O 4-Alilanol não apresenta atividade antibacteriana para K4100 de *S. aureus*. 4-Alilanol não se mostrou eficaz contra o mecanismo de bomba de efluxo QacC de SA K4100, levando em consideração os valores das CIMs nas associações com o antibiótico e com o Brometo de Etídio.

5. Financiamento:

Este estudo foi financiado pela Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico — FUNCAP - Projeto BPI (BP3-0139-00077.01.00/18).

5.1. Agradecimentos:

Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular –LMBM
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

6. Referências

ABDI, S. N. et al. Acinetobacter baumannii Efflux Pumps and Antibiotic Resistance. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 13, p. 423–434, fev. 2020.

AUEZOVA, L. et al. Antibacterial activity of free or encapsulated selected

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão"



phenylpropanoids against *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 3, p. 710–720, 8 mar. 2020.

BEZERRA, A. H. et al. Effect of estragole over the RN4220 *Staphylococcus aureus* strain and its toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Life Sciences**, n. September, p. 118675, out. 2020.

BLASKOVICH, M. A. T.; BUTLER, M. S.; COOPER, M. A. Polishing the tarnished silver bullet: the quest for new antibiotics. **Essays in Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 103–114, 3 mar. 2017.

CHEESMAN, M. et al. Developing new antimicrobial therapies: Are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? **Pharmacognosy Reviews**, v. 11, n. 22, p. 57, 2017.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement Clinical and Laboratory Standards Institute**. [s.l: s.n.]. v. 32

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

EBADOLLAHI, A. Estragole-rich essential oil of summer savory (*Satureja hortensis* L.) as an eco-friendly alternative to the synthetic insecticides in management of two stored-products insect pests. **Acta agriculturae Slovenica**, v. 115, n. 2, p. 307, 22 jun. 2020.

ESPINOZA, J. et al. Essential Oil, Extracts, and Sesquiterpenes Obtained From the Heartwood of *Pilgerodendron uviferum* Act as Potential Inhibitors of the *Staphylococcus aureus* NorA Multidrug Efflux Pump. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. FEB, p. 1–15, 26 fev. 2019.

JENUL, C.; HORSWILL, A. R. HHS Public Access. v. 6, n. 1, p. 3–31, 2019.

KWIATKOWSKI, P. et al. The effect of fennel essential oil and trans -anethole on antibacterial activity of mupirocin against *Staphylococcus aureus* isolated from asymptomatic carriers. p. 308–314, 2019.

MAHIZAN, N. A. et al. Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 21, 19 jul. 2019.

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, n. July 2020, p. 127776, fev. 2021.