

**VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV**  
**Semana**  
**de Iniciação Científica da URCA**  
**e VIII Semana de Extensão da URCA**

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



**EFEITO DO VALENCENO COMO INIBIDOR DE BOMBAS DE EFLUXO EM**  
***Staphylococcus aureus***

**Gustavo Miguel Siqueira<sup>1</sup>, Cícera Laura Roque Paulo<sup>1</sup>, Daniel Sampaio Silva<sup>1</sup>, Sheila Alves Gonçalves<sup>1</sup>, Cícera Datiane De Moraes Oliveira-Tintino<sup>2</sup>, Ana Carolina Justino De Araújo<sup>3</sup>, Raimundo Luiz Silva Pereira<sup>3</sup>, Isaac Moura Araújo<sup>4</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>5</sup>**

**Resumo:**

A resistência bacteriana é considerada um problema de saúde pública, visto que o aumento das infecções bacterianas é causado principalmente pelo uso indiscriminado de antibióticos que faz com que o aumento da resistência seja adquirido, visto que mutações aleatórias acabam selecionando as bactérias mais resistentes. Existem mecanismos de resistência que podem ser eficazes para esse projeto, por exemplo, a bomba de efluxo que participa do transporte e extrusão desse substrato. Nesse estudo avaliaremos a sua atividade de inibição de bombas de efluxo em *Staphylococcus aureus* pelo sesquiterpeno valenceno. Serão utilizados os antibióticos norfloxaxina (para bomba de efluxo NorA) e ciprofloxacina (para bomba de efluxo MepA), o inibidor padrão de bomba Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl-hydrazone (CCCP), o valenceno e o brometo de etídio. Serão utilizadas cepas de *S. aureus* que são portadoras das bombas de efluxo. E espera-se obter valores promissores e estatisticamente significantes em relação a substância Valenceno frente as bombas de efluxo NorA e MepA presentes em *S. aureus*.

**Palavras-chave:** Antibacteriano. Bombas de efluxo. Sesquiterpeno.

**1. Introdução**

A bactéria Gram-positiva, *Staphylococcus aureus*, que está presente na microbiota humana sobretudo da pele, pode tornar patogênica quando ocorre o rompimento da barreira cutânea ou em imunossuprimidos, especialmente quando essa bactéria apresenta mecanismos de resistência(MENEGUIN;

---

1 Graduando em Ciências Biológicas da Universidade Regional do Cariri, email: [gustavo.miguelsiqueira@urca.br](mailto:gustavo.miguelsiqueira@urca.br)

5 Docente do Departamento de Química Biológica da Universidade Regional do Cariri, email: [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com)

# VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV

## Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



TORRES; POLLO, 2020). A resistência bacteriana torna-se uma problemática de cada vez mais relevância na saúde pública, sejam em cepas de resistência intrínseca ou adquirida(SOUSA; FERNANDES; ORSSATTO, 2022).

Em todo o mundo as infecções bacterianas são manuseadas pelo uso indiscriminado de antibióticos, isso seleciona bactérias adaptadas e resistentes que já adquiram essas mutações genéticas de forma aleatória para resistência (OLIVEIRA-TINTINO et al., 2021)

O tratamento utilizando antibióticos que antes representavam o fim das infecções, já não são tão eficazes, devido ao surgimento dessas cepas resistentes(PEREIRA; TACIANO; CARDOSO, 2018). Dentre esses mecanismos de resistência estão as bombas de efluxo. Essas proteínas participam do transporte e extrusão do substrato, do interior da célula para meio o extracelular. Estes substratos podem ser antibióticos, desinfetante ou metais tóxicos(DU et al., 2018)

Para controlar a resistência bacteriana causada por bombas de efluxo é válido a associação de antibióticos por meio de substâncias que são capazes que inibir essas proteínas. Existem substâncias de origem natural identificadas como inibidores de bombas de efluxo. Estas substâncias são derivadas do metabolismo secundário das plantas, por exemplos os flavonoides, terpenos, sesquiterpenos, taninos e alcaloides (TINTINO, 2018). Durante as últimas décadas, vários compostos derivados de planta juntos de seu princípio ativo foram analisados, apresentando atividade fitoquímica e antibacteriana significativa (SHARMA; GUPTA; PATHANIA, 2019).

Dentre os compostos existentes nas plantas com potencial de estudo, pode-se citar o valenceno(SOLER; DELLACASSA; MOYNA, 1986). Essa substância é um sesquiterpeno pode ser encontrado em vários óleos essenciais de diversas espécies, sendo responsável diversas atividades biológicas (ALCÂNTARA, 2010). A bioatividade promissora do valenceno pode ser indicativo para a presença de atividade antibacteriana e sinérgica com antibióticos para esse composto, estimulando a realização de estudos que esclareçam seus efeitos e seu mecanismo de ação.

## 2. Objetivo

Pretende-se com o presente trabalho, avaliar a atividade antibacteriana e inibição de bombas de efluxo em *Staphylococcus aureus* pelo sesquiterpeno valenceno.

## 3. Metodologia

Serão utilizados os antibióticos norfloxacin (para bomba de efluxo NorA) e ciprofloxacina (para bomba de efluxo MepA), o inibidor padrão de bomba *Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl-hydrazone* (CCCP), o valenceno e o brometo de etídio. Os antibióticos e o valenceno serão inicialmente diluídos em 1 mL de

# VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV

## Semana

### de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



dimetilsulfóxido (DMSO) e depois em 8.765  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril, atingindo a concentração de 1024  $\mu\text{g/mL}$ . O brometo de etídio será diluído em água destilada estéril, e o CCCP diluído em água destilada estéril e metanol (1:1) até atingir concentração de 1024  $\mu\text{g/mL}$  para ambas as substâncias.

Serão utilizadas as cepas de *S. aureus* portadoras de bomba de efluxo demonstradas na Tabela 1. As cepas estão armazenadas no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM/URCA. Todas as cepas estão mantidas em ágar sangue para comprovar o tipo de cepa (Laboratorios Difco Ltda., Brazil), depois transferidas para o estoque. Sendo mantidas em dois estoques: um em *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco) a 4<sup>o</sup> C outro mantido em glicerol em freezer -80 °C.

**Tabela 1.** Cepas de *S. aureus* portadoras de bomba de efluxo utilizadas

Linagem	Proteína (Classe ou Antibiótico)
1199B	NorA (resistente à Norfloxacin)
1199 (Selvagem)	
K2068	MepA (resistente à Ciprofloxacina)

A partir das colônias bacterianas cultivadas e crescidas, após o período determinado, serão preparados os respectivos inóculos, colocando-se as bactérias em tubos de ensaio contendo 5 ml de solução salina estéril (0,9% NaCl). Os tubos contendo as suspensões terão a turbidez comparada à escala de McFarland, que corresponde a  $1,5 \times 10^8$  bactérias por mL.

Os ensaios para a determinação da CIM serão realizados em série 1:1 através da técnica de microdiluição em caldo utilizando placas esterilizadas com 96 poços (NCCLS, 2003). Será preparado o meio de distribuição em *ependorfs* utilizando 100  $\mu\text{L}$  dos respectivos inóculos e 900  $\mu\text{L}$  do meio de cultura líquido BHI. O conteúdo do *ependorf* será transferido para placa de microdiluição. A próxima etapa será a realização da microdiluição das substâncias (valenceno e CCCP), com concentração de 1024  $\mu\text{g/mL}$ , sendo 100  $\mu\text{L}$  nesse meio até penúltima cavidade. Como a última cavidade trata-se do controle de crescimento, não será adicionada. As concentrações finais das amostras no meio de cultura irão variar entre 512 a 8  $\mu\text{g/mL}$ . Os testes serão realizados em triplicata e as placas serão incubadas a  $35 \pm 2$  °C, durante 24h. Após esse período, as placas serão reveladas com corante resazurina. A coloração rosa indicará presença de

# VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV

## Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



crescimento bacteriano e a coloração azul ausência de crescimento (SALVAT et al., 2001)

Para a realização da avaliação de inibição de bombas de efluxo NorA e MepA foram utilizadas as soluções de valenceno e CCCP em concentração sub-inibitória (CIM/8). Serão realizados os ensaios de forma semelhante ao descrito no parágrafo anterior, exceto que as substâncias em teste serão distribuídas por toda a placa e a microdiluição será realizada, com 100 µl do antibiótico específico e com o brometo de etídio. Ao final as concentrações irão variar entre 512 a 0,5 µg/ml. A leitura será realizada como mencionando anteriormente (COUTINHO et al., 2008). A redução do CIM do brometo de etídio ou de antibiótico específico, em cepas portadoras de bomba de efluxo, é um indicativo de inibição de bomba de efluxo.

A análise estatística dos resultados será realizada utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.0. As médias geométricas serão analisadas por ANOVA de duas vias seguida por teste post-hoc de Bonferroni (onde  $p < 0,05$  e  $p < 0,0001$  serão consideradas significativos e  $p > 0,05$  demonstrando significância).

### Resultados

Em relação aos resultados como o projeto está em desenvolvimento, espera-se obter valores promissores e estatisticamente significantes em relação a substância Valenceno frente as bombas de efluxo NorA e MepA presentes em *S. aureus*.

### Conclusão

Portanto conclui-se que as atividades biológicas já comprovadas são um indicativo do efeito bioativo positivo do Valenceno na atividade antibacteriana.

### Agradecimentos

Agradeço ao laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) e ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### 4. Referências

ALCÂNTARA, J. M. Y. K. K. L. S. J. R. D. A. J. V. F. D. V. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae). *Acta Amazônica*, v. 40, n. 3, p. 567–572, 2010.

**VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV**  
**Semana**  
**de Iniciação Científica da URCA**  
**e VIII Semana de Extensão da URCA**

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



COUTINHO, H. D. M. et al. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 328–330, ago. 2008.

DU, D. et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. **Nature Reviews Microbiology** 2018 16:9, v. 16, n. 9, p. 523–539, 12 jul. 2018.

MENEGUIN, S.; TORRES, E. A.; POLLO, C. F. Fatores associados à infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina em unidade de terapia intensiva. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 73, n. 6, p. e20190483, 7 set. 2020.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically**. 6ª ed. Wayne, PA: NCCLS Approved Standard M7-A6, p. 50-62, 2003.

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. DE M. et al. Chemical synthesis, molecular docking and MepA efflux pump inhibitory effect by 1,8-naphthyridines sulfonamides. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 160, p. 105753, 1 maio 2021.

PEREIRA, R.; TACIANO, B. & CARDOSO, R. Psicologia e Saúde em Debate. **Psicologia e Saúde em debate**, v. 4, n. Suppl1, p. 60–60, 12 dez. 2018.

SALVAT et al. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 293–297, 31 maio 2001.

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

SOLER, E.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Composition of *Aloysia gratissima* flower essential oil. **Planta Medica**, v. No. 6, n. 06, p. 488–490, 1986.

SOUSA, T. M.; FERNANDES, B. DA S.; ORSSATTO, C. DOS S. EFEITO ANTIMICROBIANO DO CINAMALDEÍDO, PRINCIPAL COMPONENTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DA CANELA: UMA REVISÃO DA LITERATURA. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 13, n. edespnaidc, 25 abr. 2022.

TINTINO, S. R. Avaliação da inibição de bombas de efluxos em linhagens de *Staphylococcus aureus* por substâncias sintéticas de origem natural. Tese (doutorado) - Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Recife, 2018.