



AValiação DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO EM *Staphylococcus aureus* DO SESQUITERPENO NOOTKATONA

Cicera Laura Roque Paulo¹, Gustavo Miguel Siqueira¹, Daniel Sampaio Alves¹, Sheila Alves Gonçalves¹, Priscilla Ramos Freitas², Raimundo Luiz Silva Pereira², Cicera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino³, Maria do Socorro Costa⁴, Henrique Douglas Melo Coutinho⁵

Resumo:

A resistência bacteriana é uma problemática crescente e contínua a nível global. Assim, a combinação de antibioticoterapia a terapias alternativas aliados a produtos naturais, tem se apresentado como uma alternativa promissora. Objetiva-se avaliar a atividade antibacteriana e inibição de bombas de efluxo em *Staphylococcus aureus* do sesquiterpeno Nootkatona. Na avaliação da atividade antibacteriana do Nootkatona será utilizado o método de microdiluição em caldo utilizando as cepas de *Staphylococcus aureus* 10, 1199, 1199B e K2068. Para análise do potencial modificador da ação antibiótica será utilizado o produto em concentração sub-inibitória (CIM/8) associado à norfloxacina e ciprofloxacina. 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), nootkatona e o brometo de etídio. Serão utilizadas cepas de *S. aureus* que são portadoras das bombas de efluxo. Espera-se obter valores promissores e estatisticamente relevantes da substância Nootkatona frente as bombas de efluxo NorA e MepA presentes em *S. aureus*.

Palavras-chave: Bombas de efluxo. Resistência bacteriana. Sesquiterpeno.

1. Introdução

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

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



A resistência dos microrganismos aos antibióticos é considerada uma problemática crescente e contínua. Os antimicrobianos são medicamentos utilizados no combate dos mesmos. A resistência aos antibióticos se desenvolve como uma consequência da habilidade do microrganismo de se adaptar (RODRIGUES, 2018). A exposição da bactéria a esses agentes contribui a aquisição desses mecanismos de resistência. Cepas multirresistentes como *Staphylococcus aureus*, está comumente associada a infecções em âmbito hospitalar, sendo também responsável por elevados índices de mortalidade (DE SOUZA, 2022; REIRES, 2022).

A utilização de produtos naturais associados a antibióticos tem se tornado um meio alternativo com resultados promissores (ARAÚJO *et al.*, 2020). A nootkatona é um sesquiterpeno, essa substância é encontrada em vários óleos essenciais, possuindo atividades comprovadas cientificamente como anti-inflamatória e antifúngica (ALCÂNTARA *et al.*, 2010).

2. Objetivo

Avaliar a atividade antibacteriana e inibição de bombas de efluxo em *Staphylococcus aureus* do sesquiterpeno Nootkatona.

3. Metodologia

Serão utilizados os antibióticos norfloxacin (para bomba NorA) e ciprofloxacina (para bomba MepA), o inibidor padrão Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl-hydrazone (CCCP), a Nootkatona e o brometo de etídio, obtidos da SIGMA Chemical Co., St. Louis, E.U.A. Um total de 10 mg dos antibióticos e da Nootkatona serão inicialmente diluídos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e depois em 8.765 µL de água destilada estéril, atingindo a concentração de 1024 µg/mL. O brometo de etídio (10 mg) será diluído apenas em água destilada estéril até atingir concentração de 1024 µg/mL, e o CCCP (10 mg) será diluído em uma solução de água destilada estéril e metanol (1:1) até atingir a mesma concentração dos outros produtos.

Serão utilizadas as cepas de *S. aureus* portadoras de bomba de efluxo demonstradas na Tabela 1. As cepas foram gentilmente cedidas pelo Prof. S. Gibbons (University of London) e serão armazenadas no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM/URCA. Todas as cepas serão inicialmente 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 4º C outro mantido em glicerol em freezer -80 ºC.

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

Linhagem	Proteína (Classe ou Antibiótico)
----------	----------------------------------

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”



1199B	NorA (resistente à Norfloxacin)
1199 (Selvagem)	
K2068	MepA (resistente à Ciprofloxacina)

Os ensaios 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 eppendorfs utilizando 100 µL dos respectivos inóculos e 900 µL do meio de cultura líquido BHI. O conteúdo do eppendorf será transferido para placa de microdiluição. A próxima etapa será a realização da microdiluição das substâncias (Nootkatona e CCCP), com concentração de 1024 µg/mL, sendo 100 µL 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 serão de 512 a 8 µg/mL. Os testes serão realizados em triplicata e as placas serão incubadas a 35 ± 2 °C, durante 24h. Após esse período, as placas serão reveladas com corante específico, a resazurina. Considera-se positivo para os poços que não apresentaram crescimento microbiano, ou seja, permaneceram com a coloração azul e negativa os que obtiveram coloração vermelha (SALVAT et al, 2001).

Para a realização desse teste, em cada tubo eppendorf será utilizado caldo BHI a 10%, 150 µl do inóculo de cada cepa e um volume de cada composto (Nootkatona e CCCP) correspondente à concentração sub-inibitória (CIM/8). Os controles de modulação serão preparados utilizando-se apenas 1350 µl do meio BHI 10% e 150 µl do inóculo. O conteúdo dos tubos serão distribuídos em placas de microdiluição de 96 poços, 100 µl em cada poço, em sentido numérico. A microdiluição será realizada, separadamente, com 100 µl do antibiótico correspondente à bomba de efluxo específica e com o brometo de etídio, até o penúltimo poço, de modo que a concentração varia de 1024 a 0,5 µg/ml. Os testes serão realizados em triplicata e as placas incubadas em estufa por 24h a 37 °C, após esse período será realizada a leitura com a resazurina (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 dos testes 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 considerados significativos e $p > 0,05$ não demonstrando significância).

4. Resultados

Como o projeto encontra-se em desenvolvimento, ainda não foram obtidos dados estatísticos para adição no presente resumo. Como este projeto pertence à bolsa de iniciação científica CNPq, foi orientado a ser submetido na VII Semana Universitária da URCA- XXV de Iniciação Científica da URCA.

Mesmo em desenvolvimento do projeto, é evidente que a resistência

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”



bacteriana aos fármacos é um dos problemas crescentes de saúde pública, diante disso, a busca por métodos alternativos de substâncias para controlar o avanço dessa resistência é constante. Os futuros resultados dessa pesquisa podem fornecer dados importantes sobre o papel bioativo da substância testada, tanto na atividade antibacteriana como potencializadora de antibióticos, em cepas bacterianas multirresistentes. Portanto, esse projeto contribuirá para um avanço na área de Microbiologia, no combate à resistência bacteriana por bombas de efluxo, apresentando novas substâncias. Assim como também cooperar com o Programa de Pós-graduação Química Biológica da Universidade Regional do Cariri, contribuindo, assim, para o desenvolvimento científico da universidade.

Conclusão

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

5. Agradecimentos

Ao Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

6. Referências

- ALCÂNTARA, J. M. et al. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán(Lauraceae). **Revista Acta Amazonica**, v. 40, n. 3, p, 567-572, 2010.
- ARAÚJO, A. C. J. et al. GC-MS-FID characterization and antibacterial activity of the *Mikania cordifolia* essential. **Food and chemical toxicology**, vol 136, 2020.
- 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, 2008.
- DE SOUZA AQUINO, Madson; DA SILVA, Claudinei Mesquita. *Staphylococcus Aureus* e sua importância no âmbito das infecções hospitalares: revisão da literatura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 14, p. e519111436568-e519111436568, 2022.
- REIRES, MS.; RODRIGUES JÚNIOR, OM . Resistência bacteriana ao uso indiscriminado de azitromicina versus Covid-19: uma revisão integrativa. **Investigação, Sociedade e Desenvolvimento** , [S. l.] , v. 11, n. 1, pág. e31611125035, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i1.25035. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/25035>. Acesso em: 23 nov. 2022.
- RODRIGUES, Tatyane Silva et al. Resistência bacteriana a antibióticos na Unidade de Terapia Intensiva: revisão integrativa. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 4, 2018.

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"



SALVAT, A. et al. Screening of some plants from North Argentin for their antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 293-297, 2001.