

VIII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVI Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 09 de dezembro de 2023

Tema: "INTERIORIZAÇÃO DA CIÊNCIA E REDUÇÃO DE ASSIMETRIAS: O PAPEL DOS PIBIC'S COMO EXPERIÊNCIA DE ARTICULAÇÃO DA PESQUISA NA GRADUAÇÃO E NA PÓS GRADUAÇÃO"



SESQUITERPENO NOOTKATONA: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E INIBIDORA DE BOMBAS DE EFLUXO EM CEPAS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES

Gabriel Gonçalves Alencar¹, Gustavo Miguel Siqueira², Daniel Sampaio Alves³, Simone Galdino de Sousa⁴, Sheila Alves Gonçalves⁵, Cícera Datiane de Moraes Oliveira Tintino⁵, Henrique Douglas Melo Coutinho⁶

Resumo: Os fármacos antibacterianos vêm apresentando baixa eficácia no tratamento de doenças infecciosas bacterianas, mediante o uso indiscriminado desses fármacos, levando a seleção de bactérias resistentes. Mecanismos de resistências aos antibióticos são considerados um dos principais desafios no combate às bactérias, dentre esses mecanismos estão as bombas de efluxo. Nesse contexto, avaliou-se a Nootkatona na atividade antibacteriana e inibidora de bombas de efluxo NorA e MepA em cepas de *Staphylococcus aureus* 1199 e K2068. Foi aplicado o método de microdiluição em caldo, utilizando a substância na concentração sub-inibitória (CIM/8), os antibióticos específicos para as bombas de efluxo, inibidor padrão de bombas e o brometo de etídio todos na concentração de 1024 µg/mL. A Nootkatona demonstrou atividade antibacteriana direta com CIM de 256 µg/mL e 203 µg/mL para as cepas de *S. aureus* 1199 e K2068, respectivamente. Frente a *S. aureus* 1199 a Nootkatona reduziu a CIM do EtBr em 60,2%. O sesquiterpeno também reduziu a CIM da ciprofloxacina e do EtBr em 92,1% e 87,5% respectivamente, frente *S. aureus* K2068. Diante disso, mais estudos são necessários para melhor elucidação da Nootkatona e mecanismos da ação antibacteriana e inibidora de bombas de efluxo.

Palavras-chave: Bombas de efluxo. Nootkatona. Resistência bacteriana. *Staphylococcus aureus*.

1. Introdução

Mundialmente, os medicamentos antibióticos revolucionaram o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias e reduziram a taxa de morbidade e mortalidade relacionados às infecções bacterianas. No entanto, a exposição e

¹ Universidade Regional do Cariri, email: gabriel.goncalves101@urca.br

² Universidade Regional do Cariri, email: gustavo.miguelsiqueira@urca.br

³ Universidade Regional do Cariri, email: daniel.sampaio10@urca.br

⁴ Universidade Regional do Cariri, email: simone.galdino@urca.br

⁵ Universidade Regional do Cariri, email: sheila.alves@urca.br

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

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

VIII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVI Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 09 de dezembro de 2023

Tema: "INTERIORIZAÇÃO DA CIÊNCIA E REDUÇÃO DE ASSIMETRIAS: O PAPEL DOS PIBIC'S COMO EXPERIÊNCIA DE ARTICULAÇÃO DA PESQUISA NA GRADUAÇÃO E NA PÓS GRADUAÇÃO"



o uso inadequado dos antibióticos permite às bactérias adquirirem resistências a esses fármacos, sendo considerado um problema crescente e contínuo (FREIRES; RODRIGUES JUNIOR, 2022; RODRIGUES et al., 2018). Por apresentar interesse médico, *Staphylococcus aureus* é um dos principais causadores de infecções hospitalares e expressam bombas de efluxo como um dos mecanismos de resistência aos antibióticos (OLIVEIRA-TINTINO, 2021).

Bombas de efluxo é um sistema transmembranar bacteriano que tem como substratos os antibióticos, biocidas, detergentes, corantes e antissépticos. Nesse sentido, as bactérias expulsam esses substratos considerados nocivos a célula diminuindo o acúmulo intracelular e impedindo sua ação (ABDI et al., 2020).

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas há muito tempo para o tratamento de diversas doenças. Pesquisas com produtos naturais demonstraram o potencial de moléculas de origem natural contra bactérias multirresistentes (SABIA et al., 2022; DIAS et al., 2022). A Nootkatona é um sesquiterpeno presente na toranja e além de apresentar propriedades aromatizantes em bebidas e alimentos, demonstra atividade anti-inflamatória, anticancerígena e antimicrobiana comprovada (OLIVEIRA-TINTINO et al., 2023).

2. Objetivo

Pretende-se com este estudo avaliar a atividade antibacteriana e inibição de bombas de efluxo NorA e MepA de *Staphylococcus aureus* pelo sesquiterpeno Nootkatona.

3. Metodologia

Foram utilizados os antibióticos norfloxacina (contra a cepa *S. aureus* 1199) e ciprofloxacina (contra a cepa *S. aureus* K2068), o inibidor padrão Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl-hydrazone (CCCP), a Nootkatona e o brometo de etídio (EtBr), todos obtidos da Sigma-Aldrich (Co., St. Louis, E.U.A.) Os antibióticos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada estéril, atingindo a concentração de 1024 µg/mL. O brometo de etídio foi diluído apenas em água destilada estéril atingindo a concentração de 1024 µg/mL. O CCCP foi diluído em uma solução de água destilada estéril e metanol (em proporção 1:1) atingindo a mesma concentração dos outros produtos.

Foram utilizadas as cepas de *S. aureus* portadoras de bombas de efluxo demonstradas na Tabela 1. As cepas foram gentilmente cedidas pelo Prof. S. Gibbons (University of London) e foram armazenadas no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM/URCA). Todas as cepas foram mantidas em dois estoques: um em *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco) a 4º C e outro mantido em glicerol em freezer -80 °C.

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

VIII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVI Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 09 de dezembro de 2023

Tema: "INTERIORIZAÇÃO DA CIÊNCIA E REDUÇÃO DE ASSIMETRIAS: O PAPEL DOS PIBIC'S COMO EXPERIÊNCIA DE ARTICULAÇÃO DA PESQUISA NA GRADUAÇÃO E NA PÓS GRADUAÇÃO"



| Linhagens | Proteína (Antibiótico substrato) |
|-----------|------------------------------------|
| 1199 | NorA (Resistente a Norfloxacina) |
| K2068 | MepA (Resistente a Ciprofloxacina) |

A partir das colônias bacterianas cultivadas e crescidas, após o período determinado, foram preparados os respectivos inóculos, suspendendo as bactérias em solução salina estéril (0,9% NaCl). O inóculo foi preparado até obter turbidez correspondente à escala de 0,5 McFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC (Unidades Formadoras de Colônias).

Para avaliação da atividade antibacteriana direta foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Nootkatona, através da técnica de microdiluição em caldo, utilizando placas estéreis com 96 poços (NCCLS, 2003). Foi preparado o meio de distribuição em *ependorfs* utilizando 100 μ L dos respectivos inóculos e 900 μ L do meio de cultura líquido BHI. O conteúdo do *ependorf* foi transferido para placa de microdiluição. Posteriormente, foi realizada a microdiluição com a Nootkatona em concentração inicial de 1024 μ g/mL, com microdiluição até penúltima cavidade. A última cavidade foi destinada ao controle de crescimento. As concentrações finais da Nootkatona variaram entre 512 a 8 μ g/mL. Os testes foram realizados em triplicata e as placas foram incubadas na estufa a 35 ± 2 °C, durante 24 horas. Após esse período, as placas foram reveladas com adição de corante resazurina. Poço com coloração azul após adição de resazurina indicou não crescimento, enquanto coloração vermelha indicou crescimento bacteriano (SALVAT et al, 2001).

Para os testes de avaliação da inibição de bombas de efluxo, Nootkatona concentração sub-inibitória (CIM/8) foi associada aos antibióticos norfloxacina e ciprofloxacina ao EtBr. O CCCP atuou como controle positivo. Para o ensaio e leitura foi utilizada mesma técnica descrita anteriormente com a microdiluição seriada com antibióticos ou EtBr, com concentrações finais variando de 512 a 0,5 μ g/mL ao longo da placa. Os testes foram realizados em triplicata e as placas foram incubadas em estufa por 24h a 35 ± 2 °C (COUTINHO et al., 2008). A redução da CIM do brometo de etídio ou de antibiótico específico, em cepas portadoras de bomba de efluxo, demonstrou indicativo de inibição de bomba de efluxo pela Nootkatona.

A análise estatística dos resultados foi realizada com o programa estatístico GraphPad Prism 5.0. As médias geométricas foram analisadas por ANOVA de duas vias seguida por teste post-hoc de Bonferroni, sendo considerados significativos valores $p < 0,05$.

4. Resultados

VIII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVI Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 09 de dezembro de 2023

Tema: "INTERIORIZAÇÃO DA CIÊNCIA E REDUÇÃO DE ASSIMETRIAS: O PAPEL DOS PIBIC'S COMO EXPERIÊNCIA DE ARTICULAÇÃO DA PESQUISA NA GRADUAÇÃO E NA PÓS GRADUAÇÃO"



A Nootkatona apresentou atividade antibacteriana direta clinicamente relevante apresentando uma CIM de 256 µg/mL e 203 µg/mL para as cepas de *S. aureus* 1199 e K2068, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração inibitória mínima da Nootkatona frente *S. aureus* 1199 e K2068.

| | <i>S. aureus</i> 1199 | <i>S. aureus</i> K2068 |
|------------|-----------------------|------------------------|
| Nootkatona | 256 µg/ml | 203 µg/ml |

Na avaliação da inibição de bombas de efluxo, frente a cepa *S. aureus* 1199, a Nootkatona associada com a norfloxacin não demonstrou redução significativa da CIM. Porém a Nootkatona causou redução da CIM do EtBr em 60,2% quando associado a este. Esses resultados indicam que houve inibição da bomba de efluxo NorA pela Nootkatona devido a redução da CIM da norfloxacin e EtBr, visto que ambos são substratos de NorA (LEAL et al., 2021).

Frente a *S. aureus* K2068 a Nootkatona associado tanto com a ciprofloxacina como o inibidor CCCP reduziu a CIM em 92,1%. Quando associado ao EtBr reduziu a CIM deste para 87,5%. Em ambas as cepas houve redução significativa da CIM dos antibióticos e do EtBr na associação com CCCP indicando reprodutibilidade do experimento e indicando que as cepas expressaram bombas de efluxo. Esses resultados indicam que houve inibição da bomba de efluxo MepA devido a redução da CIM da ciprofloxacina e EtBr, visto que ambos são substratos dessa proteína de efluxo (MARTIN et al., 2023).

5. Conclusão

Os estudos demonstraram que, a Nootkatona apresenta ação antibacteriana direta e possivelmente age inibindo as bombas de efluxo NorA e MepA expressas pelas respectivas cepas *S. aureus* 1199 e K2068. Diante os resultados, mais estudos são necessários para melhor clareza do possível potencial da Nootkatona na ação antibacteriana.

6. Agradecimentos

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

7. Referências

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

VIII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVI Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 09 de dezembro de 2023

Tema: "INTERIORIZAÇÃO DA CIÊNCIA E REDUÇÃO DE ASSIMETRIAS: O PAPEL DOS PIBIC'S COMO EXPERIÊNCIA DE ARTICULAÇÃO DA PESQUISA NA GRADUAÇÃO E NA PÓS GRADUAÇÃO"



ALVES BORGES LEAL, A. L. et al. Potentiating activity of Norfloxacin by synthetic chalcones against NorA overproducing *Staphylococcus aureus*. **Microbial pathogenesis**, v. 155, n. 104894, p. 104894, 2021.

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.

DIAS, K. J. S. D. O. et al. Terpenes as bacterial efflux pump inhibitors: A systematic review. **Frontiers in pharmacology**, v. 13, 2022.

FREIRES, M. S.; RODRIGUES JUNIOR, O. M. Resistência bacteriana pelo uso indiscriminado da azitromicina frente a Covid-19: uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e31611125035, 2022.

MARTIN, A. L. A. R. et al. In vitro and in silico evidences about the inhibition of MepA efflux pump by coumarin derivatives. **Microbial pathogenesis**, v. 182, n. 106246, p. 106246, 2023.

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

RODRIGUES, T. S. et al. RESISTÊNCIA BACTERIANA À ANTIBIÓTICOS NA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA: REVISÃO INTEGRATIVA. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 4, 2018.

SABOIA, C. DA S. et al. Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato bruto do capim limão (*Cymbopogon citratus*). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, p. e37611730064, 2022.

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.

OLIVEIRA-TINTINO, Cícera Datiane de Moraes. **Avaliação da atividade antibacteriana e inibidora de bombas de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus* por 1,8-Naftiridinas sulfonamídicas: abordagem em Vitro e in Silico**. 2021. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021.

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. DE M. et al. Valencene, nootkatone and their liposomal nanoformulations as potential inhibitors of NorA, Tet(K), MsrA, and MepA efflux pumps in *Staphylococcus aureus* strains. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 10, p. 2400, 2023.