

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"



AÇÃO DO VALENCENO NA INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO NorA E MepA EM *Staphylococcus aureus*

Gustavo Miguel Siqueira¹, Gabriel Gonçalves Alencar², Daniel Sampaio Alves³, Cícera Datiane De Moraes Oliveira-Tintino⁴, Ewerton Yago de Sousa Rodrigues⁵, Sheila Alves Gonçalves⁶, Yedda Maria Lobo Soares de Matos⁷, Talysson Felismino Moura⁸, Henrique Douglas Melo Coutinho⁹

Resumo: A resistência bacteriana é considerada uma grave problemática de saúde pública, devido ao uso indiscriminado de antibióticos, fazendo com que ocorra mutações de forma aleatória que acaba por selecionar as bactérias mais resistentes. A bomba de efluxo é considerado um dos mecanismos de resistência bastante eficaz, que participa do transporte e extrusão desse substrato do meio intracelular para o meio extracelular, dentre eles os antibióticos. Diante disso, avaliou-se o sesquiterpeno, Valenceno na atividade de inibição de bombas de efluxo em *Staphylococcus aureus* 1199 e K2068. Foi utilizado o método de microdiluição utilizados os antibióticos norfloxaxina (para bomba de efluxo NorA) e ciprofloxacina (para bomba de efluxo MepA), o inibidor padrão de bomba, o Valenceno e o brometo de etídio. O Valenceno demonstrou ação antibacteriana direta com uma CIM (Concentração Inibitória mínima) de 512 µg/mL para S.

-
- 1 Universidade Regional do Cariri, email: gustavo.miguelsiqueira@urca.br
 - 2 Universidade Regional do Cariri, email: gabriel.goncalves101@urca.br
 - 3 Universidade Regional do Cariri, email: daniel.sampaio10@urca.br
 - 4 Universidade Regional do Cariri, email: datianemorais@hotmail.com
 - 5 Universidade Regional do Cariri, email: ewerton.sousarodrigues@urca.br
 - 6 Universidade Regional do Cariri, email: sheila.alves@urca.br
 - 7 Universidade Regional do Cariri, email: yedda.lobo@urca.br
 - 8 Universidade Regional do Cariri, email: talysson.f.moura@urca.br
 - 9 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"



aureus 1199 e 322.5 µg/mL para *S. aureus* K2068. Dessa forma, conclui-se que mais estudos são necessários para verificar os mecanismos envolvidos na potencialização de antibióticos e inibição de bombas de efluxo.

Palavras-chave: Bombas de efluxo. Sesquiterpeno. *Staphylococcus aureus*.

1. Introdução

A *Staphylococcus aureus*, é um microrganismo patogênico, sendo comumente encontrada em ambientes hospitalares e também na microbiota humana, essa bactéria Gram-positiva é causadora de diversos tipos de doenças infecciosas simples como o impetigo, furúnculos e em casos mais graves endocardite, osteomielite e septicemias (GUO et al., 2020). Gradualmente, a *S. aureus* demonstrou apresentar um mecanismo de resistência.

Com o avanço desses mecanismos de resistência, as bactérias multirresistentes se, mostraram ineficazes para tratamentos feito por antibióticos, à falta de informação e conseqüentemente o uso indiscriminado dos antibacterianos, resultou selecionando as bactérias altamente resistentes e adaptadas através de mutações genéticas a resposta desses fármacos. (OLIVEIRA-TINTINO et al., 2021)

A resistência antimicrobiana tem sido uma problemática em diversos fatores, um deles é uma redução na penetração dos antibióticos pela bomba de efluxo, que é uma proteína capaz de realizar a extrusão para o meio de extracelular de substratos como detergentes, antibióticos e tudo que a célula considera toxico. (ALMATAR et al., 2020).

O sesquiterpeno, Valenceno, é encontrado em plantas cítricas em baixas concentrações (ZHANG et al., 2022). Esse sesquiterpeno é um composto aromático que ao alcançar altos níveis de insaturação podendo apresentaram atividades biológicas positivas como antioxidante, antibacteriano, antifúngico (OLIVEIRA-TINTINO, 2023).

2. Objetivo

Pretende-se avaliar a atividade antibacteriana e inibição de bombas de efluxo NorA e MepA em *Staphylococcus aureus* pelo sesquiterpeno Valenceno.

3. Metodologia

Foram utilizados os antibióticos norfloxacin (contra a cepa *S. aureus* 1199) e ciprofloxacina (contra a cepa *S. aureus* K2068), o inibidor padrão de bomba *Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl-hydrazone* (CCCP), o Valenceno e o brometo de etídio (BrEt). Os antibióticos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada estéril, até atingir a concentração de 1024µg/mL. O brometo de etídio foi diluído apenas em água destilada estéril atingindo a

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"



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.

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. Todas as cepas foram mantidas em dois estoques: um em *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco) a 4° 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)
1199	NorA (resistente à Norfloxacin)
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.

Para avaliação da atividade antibacteriana direta foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Valenceno, através da técnica de microdiluição em caldo, utilizando placas estéreis 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* é transferido para placa de microdiluição. A próxima etapa é a realização da microdiluição das substâncias (Valenceno 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 irão variar entre 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 resazurina. A coloração rosa indicará presença de crescimento bacteriano e a coloração azul ausência de crescimento (SALVAT et al., 2001)

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"



Na 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 realizada, com 100 µl do antibiótico específico e com o BrEt. 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 BrEt 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 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

Verificou-se que o Valenceno apresentou ação antibacteriana direta com uma MIC de 512 µg/mL para *S. aureus* 1199 e 322.5 µg/mL para *S. aureus* K2068.

Frente a cepa *S. aureus* 1199 na associação com a norfloxacin Valenceno reduziu a MIC da norfloxacin em 50 %. Na associação com o BrEt observou-se redução da MIC em 50%. Esse resultado indica que possivelmente a Valenceno está inibindo a bomba de efluxo NorA.

Frente a cepa *S. aureus* K2068 na associação com a ciprofloxacina reduziu a CIM em 92.1%. Associação com o BrEt observou-se redução da MIC em 87.5%. Esse resultado indica que possivelmente a Valenceno está inibindo a bomba de efluxo MepA.

5. Conclusão

Os estudos mostraram que, o Valenceno apresenta ação antibacteriana direta que possivelmente age inibindo as bombas de efluxo NorA e MepA expressas pelas cepas *S. aureus* 1199 e K2068 respectivamente. Frente aos resultados, mais estudos são consideráveis para esclarecer o possível potencial do Valenceno na ação antibacteriana.

6. Agradecimentos

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

7. Referências

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"



ALMATAR, M. et al. Efflux pump inhibitors: new updates. **Pharmacological reports: PR**, v. 73, n. 1, p. 1–16, 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, ago. 2008.

GUO, Y. et al. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, 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: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 160, n. 105753, p. 105753, 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.

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.

ZHANG, L.-L. et al. Production, function, and applications of the sesquiterpenes valencene and nootkatone: A comprehensive review. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 71, n. 1, p. 121–142, 2023.