

IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024

Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"



AVALIAÇÃO FLUORIMÉTRICA DA NOOTKATONA COMO POTENCIAL INIBIDOR DE BOMBA DE EFLUXO EM CEPA DE *Staphylococcus aureus*

Gabriel Gonçalves Alencar¹, Gustavo Miguel Siqueira², Talysson Felismino Moura³, Daniel Sampaio Alves⁴, Sheila Alves Gonçalves⁵, Simone Galdino de Sousa⁶, Andressa Guilhermino dos Santos⁷, Cícera Datiane de Moraes Oliveira Tintino⁸ e Henrique Douglas Melo Coutinho⁹

Resumo: *Staphylococcus aureus* é uma bacteriana de interesse clínico por demonstrar mecanismos de resistência como as bombas de efluxo, as quais atuam na expulsão de fármacos antibacterianos do meio intra para o meio extracelular. Estudos com produtos naturais têm avançado na busca de substâncias com potenciais agentes antibacterianos no combate às bactérias multirresistentes. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a nootkatona como potencial inibidor da bomba de efluxo NorA expressa por *S. aureus* 1199 por fluorimetria. Inicialmente, a cepa *S. aureus* 1199 foi semeada em meio BHI Agar e incubada na estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas antes do experimento. O inóculo foi realizado em PBS e comparado a turbidez à escala de 0,5 de MacFarland. Foram testados os seguintes grupos: branco, controle negativo, controle positivo e o grupo teste. A nootkatona e o controle positivo foram capazes de aumentaram significativamente a fluorescência quando comparada ao controle negativo, assim, atestando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados. Em suma, a nootkatona atuou como potencial inibidor de bomba de efluxo, contudo, estudos moleculares são essenciais.

Palavras-chave: Bactéria MDR. óleo essencial. proteína NorA. resistência bacteriana.

1. Introdução

As bactérias resistentes aos antimicrobianos são um dos principais desafios à saúde pública, visto a insensibilidade desses microrganismos ao tratamento com antibióticos. Esse fenômeno pode ocorrer de forma natural ou através do excessivo uso na saúde, agricultura e no meio ambiente. Até 2050, cerca de 10 milhões de mortes por ano podem ser provocadas mediante à resistência antimicrobiana (El-Kafrawy *et al.*, 2023; Xuan *et al.*, 2023). Diante disso, pode-se destacar a espécie *Staphylococcus aureus*.

S. aureus é uma bactéria Gram-positiva, comensal e patogênica oportunista, por comporta-se com um microrganismo de interesse clínico,

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

⁹ Universidade Regional do Cariri, email: hdmcoutinho@gmail.com

IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024



Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"

destaca-se por ser um dos mais importantes causadores de infecções bacterianas no âmbito nosocomial. Dentre os principais mecanismos de resistência aos antibióticos expressos por *S. aureus*, notabiliza as bombas de efluxo (Oliveira-Tintino *et al.*, 2022; Oliveira-Tintino *et al.*, 2023).

As bombas de efluxo são proteínas transmembranas, as quais atuam tanto com importância fisiológica quanto na resistência a múltiplas drogas, por conseguinte, realizando a expulsão de antibióticos, antissépticos, biocidas e entre outros, do meio intracelular para o meio extracelular bacteriano, assim, diminuindo a concentração intracelular e impedindo sua ação. Dessa maneira, acerca das famílias de efluxo existentes, pode-se destacar a família MFS (superfamília facilitadora principal) que expressa a proteína NorA (Guo *et al.*, 2020; Oliveira-Tintino *et al.*, 2022; Gaurav *et al.*, 2023).

Os produtos naturais presentes em plantas medicinais vêm sendo amplamente estudados na perspectiva de combater os microrganismos multirresistentes. Nesse contexto, pode-se destacar o sesquiterpeno nootkatona. Esse sesquiterpeno é encontrado em óleos essenciais presente em frutas cítricas e é utilizado amplamente na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e agrícola. Além disso, na literatura já são descritas diversas atividades biológicas como anti-inflamatória, antioxidante e entre outras (Li *et al.*, 2021; Oliveira-Tintino *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2022).

2. Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o sesquiterpeno nootkatona como potencial inibidor da bomba de efluxo NorA expressa pela cepa de *S. aureus* 1199 através do ensaio de fluorimetria.

3. Metodologia

Utilizou-se a cepa bacteriana de *S. aureus* 1199 (tipo selvagem que expressa a proteína NorA). Essa cepa foi cedida pelo Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Regional do Cariri, sendo mantidas em estoque em meio de cultura Heart Infusion Agar (HIA, Difco) a 4 °C. Antes dos experimentos, essas cepas foram cultivadas em HIA e incubadas a 37 °C por 24 horas.

Foram utilizados a nootkatona, o brometo de etídio (EtBr), o inibidor padrão de bomba de efluxo *Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl-hydrazine* (CCCP) e o *Phosphate Buffered Saline* (PBS), todos obtidos da *Sigma-Aldrich* (Co., St. Louis, E.U.A.). Inicialmente, foram pesados 10mg de cada substância e realizado as suas respectivas diluições. A nootkatona foi diluída em

IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024



Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"

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 das substâncias anteriores. O PBS foi dissolvido uma cápsula em cada 200 mL de água destilada estéril.

Para avaliar a inibição da bomba de efluxo NorA, utilizou-se o ensaio de fluorimetria. Para o desenvolvimento deste experimento, foi utilizada a cepa de *S. aureus* 1199 e antes do ensaio, foi semeada em meio BHI Agar e mantida em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. A preparação do inóculo foi realizado em PBS até obter inóculo correspondente a escala 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Foi testado o sesquiterpeno nootkatona nas concentrações de 128 µg/mL e 64 µg/mL. Para o ensaio foram preparados os grupos: branco contendo apenas o PBS com EtBr (2 µg/mL); controle negativo contendo inóculo bacteriano com EtBr (2 µg/mL); controle positivo foi preparado com CCCP (128 µg/mL e 64 µg/mL) + EtBr + inóculo. Para verificação da inibição da bomba de efluxo pela nootkatona foi preparada a solução teste que consistiu em nootkatona (128 µg/mL e 64 µg/mL) + EtBr + inóculo bacteriano. Após preparação das substâncias e do inóculo, foi adicionado 100 µL do inóculo na placa black (SPL Culture Plate 96 wells) de 96 poços, em seguida adicionou-se 100 µL da nootkatona, CCCP ou PBS. A placa foi incubada por 1,5 hora em estufa bacteriológica a 37 °C. Em seguida foi adicionado 100 µL de EtBr em cada poço e as placas foram incubadas por 1 hora. A leitura foi realizada com leitor de microplaca de fluorescência Cytation 1, BioTek® (Winooski, VT, USA) e Software Gen5™ 3.11. Aplicando-se uma excitação de 530 nm e emissão comprimento de onda 590 nm (Oliveira-Tintino *et al.*, 2023).

A análise estatística aplicada foi One-way ANOVA, seguido do teste post hoc de Bonferroni. Foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$.

4. Resultados

A partir do ensaio da avaliação da emissão de fluorescência da nootkatona frente a cepa de *S. aureus* 1199, pôde-se observar que as concentrações de 64 µg/mL e 128 µg/mL testadas da nootkatona quando comparada ao controle negativo (bactéria e EtBr), a nootkatona foi possível aumentaram significativamente a fluorescência em 20,8% e 23,6%, respectivamente. Além do mais, pode-se observar um aumento significativo na fluorescência pelo controle positivo (CCCP + EtBr) comparado ao controle

IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

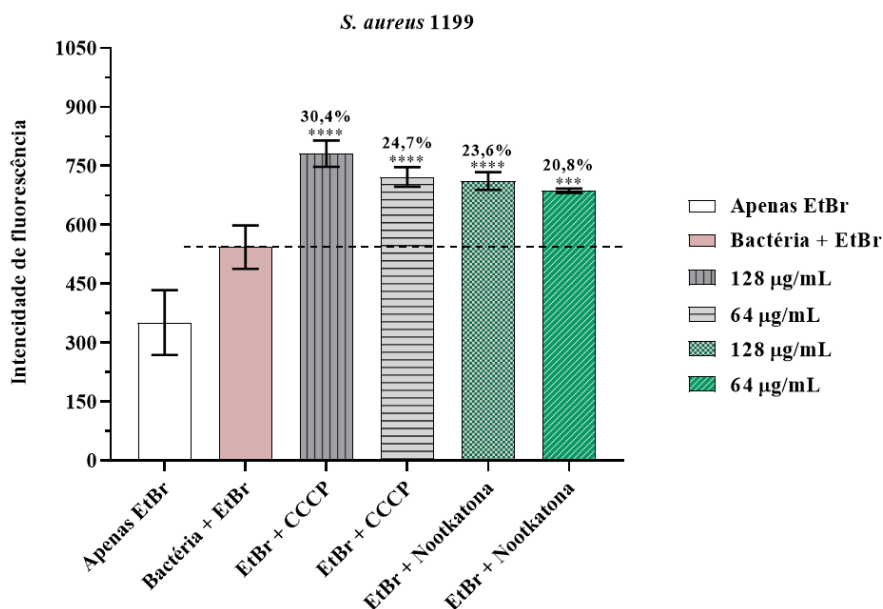
04 a 08 de NOVEMBRO de 2024

Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"



negativo, atestando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (Figura 1).

Figura 1 - Nootkatona na avaliação da inibição da bomba de efluxo NorA mediada pela emissão de fluorescência.



Avaliado por emissão de fluorescência frente à cepa de *S. aureus* 1199 que expressa a bomba de efluxo NorA. CCCP = *Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone*; EtBr = brometo de etídio; **** = $p < 0.0001$ vs bactéria + EtBr; *** = $p < 0.001$ vs bactéria + EtBr, foi determinado por ANOVA One-way seguida por *post hoc* de Bonferroni.

5. Conclusão

Diante do exposto, o estudo mostrou que a nootkatona está possivelmente inibindo a bomba de efluxo NorA expressa pela cepa de *S. aureus* 1199, mediante da observação do aumento da fluorescência. São necessários mais estudos para melhor elucidação do possível potencial da nootkatona na ação inibidora de efluxo bacteriano.

6. Agradecimentos

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

7. Referências

IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024



Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M. *et al.* NorA, Tet(K), MepA, and MsrA Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*, their Inhibitors and 1,8-Naphthyridine Sulfonamides. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 323–355, 2022.

EL-KAFRAWY, S. A. *et al.* IgY antibodies: The promising potential to overcome antibiotic resistance. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 14, p. 1065353, 2023.

GAURAV, A. *et al.* Role of bacterial efflux pumps in antibiotic resistance, virulence, and strategies to discover novel efflux pump inhibitors. **Microbiology (United Kingdom)**, [s. l.], v. 169, n. 5, p. 001333, 2023.

GUO, Y. *et al.* Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 10, p. 511382, 2020.

LI, X. *et al.* Advances on (+)-nootkatone microbial biosynthesis and its related enzymes. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, [s. l.], v. 48, n. 7–8, 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** 2023, Vol. 15, Page 2400, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 2400, 2023.

WANG, Y.-B. *et al.* (+)-Nootkatone: Progresses in Synthesis, Structural Modifications, Pharmacology and Ecology Uses. **Current Chinese Science**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 129–142, 2022.

XUAN, J. *et al.* Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections. **Drug Resistance Updates**, [s. l.], v. 68, p. 100954, 2023.