

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 INIBIDORA DO VALENCENO FRENTE A BOMBA DE EFLUXO NorA DE *Staphylococcus aureus* POR FLUORIMETRIA

Gustavo Miguel Siqueira¹, Gabriel Gonçalves Alencar², Daniel Sampaio Alves³, Cícera Datiane De Moraes Oliveira-Tintino⁴, José Weverton Almeida Bezerra⁵, Sheila Alves Gonçalves⁶, Gildênia Alves de Araújo⁷, Ewerton Yago de Sousa Rodrigues⁸, Henrique Douglas Melo Coutinho⁹

Resumo: A resistência bacteriana é um desafio significativo para a saúde pública, em sua grande maioria devido ao uso indiscriminado de antibióticos, o que favorece a seleção de cepas bacterianas mais resistentes por meio de mutações aleatórias. Entre esses mecanismos mais eficazes de resistência está a bomba de efluxo, que facilita a extrusão de substâncias intracelulares para o meio extracelular, incluindo os antibióticos. As bombas de efluxo reduzem a concentração intracelular de antimicrobianos, diminuindo a sua eficiência. Este estudo avaliou o efeito do sesquiterpeno Valenceno na inibição de bombas de efluxo em *Staphylococcus aureus* 1199 e a avaliação da fluorescência utilizando o brometo de etídio como marcador, caso o EtBr acumule nas células bacterianas indica que a inibição da bomba de efluxo. Os resultados obtidos sugerem que o Valenceno pode atuar como modulador eficaz de resistência bacteriana, inibindo as atividades das bombas de efluxo e aumentando a eficácia de agentes antimicrobianos.

-
- 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: datianemoraes@hotmail.com
 - 5 Universidade Regional do Cariri, email: weverton.almeida@urca.br
 - 6 Universidade Regional do Cariri, email: sheila.alves@urca.br
 - 7 Universidade Regional do Cariri, email: gildenia.araujo@urca.br
 - 8 Universidade Regional do Cariri, email: ewerton.sousarodrigues@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"

Palavras-chave: Bombas de Efluxo. Sesquiterpeno. *Staphylococcus aureus*. Fluorimetria.

1. Introdução

Staphylococcus aureus é um patógeno bacteriano amplamente conhecido por causar uma variedade de infecções, sendo usualmente encontrado na microbiota da pele e mucosas em humanos. Ao entrar em contato com a corrente sanguínea, pode ocasionar infecções mais graves. Esse microrganismo é responsável por inúmeras infecções, desde as consideradas leves, como infecções cutâneas, infecções mais severas, como infecções no trato respiratório e cardiovascular, podendo causar pneumonia, septicemia e endocardite. Progressivamente, a *S. aureus* tem demonstrado apresentar mecanismos de resistência. (CHEUNG, G.; BAE, J.; OTTO, M. 2021; HOWDEN, 2023)

O desenvolvimento de resistência bacteriana tem sido impulsionado devido ao uso inadequado de antibióticos, resultando na seleção de microrganismos altamente resistentes e capazes de se adaptar por meio de mutações genéticas favoráveis frente a esses fármacos (OLIVEIRA-TINTINO et al., 2021). Dessa forma, a resistência antimicrobiana acontece quando as bactérias se tornam insensíveis a determinados antibióticos, o que pode ser mensurado pela concentração inibitória mínima (CIM), que define a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano. A redução da eficácia dos antibióticos está frequentemente relacionada à ação das bombas de efluxo, que são proteínas que promovem a extrusão de substâncias, como antibióticos, detergentes e metais tóxicos, para o meio extracelular (THAKUR, V.; UNİYAL, A.; TIWARI, V., 2021; ALMATAR, M. et al. 2020).

A associação de substâncias aos antibióticos para o controle da resistência bacteriana é eficaz na inibição da proteína da bomba de efluxo. Substâncias de origem natural encontradas a princípio em metabolitos secundários das plantas podem apresentar propriedades antibacterianas e auxiliando assim, os antibióticos, entre esses compostos estão os flavonoides, taninos terpenos, sesquiterpeno como por exemplo que são utilizadas na inibição dessas bombas de efluxo (TINTINO, 2018).

O Valenceno, um sesquiterpeno presente em frutas de aroma cítrico, como a laranja, toranja e a tangerina (SONG, Y. et al., 2024), é um composto aromático, com comprovadas atividades biológicas, incluindo propriedades antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes (OLIVEIRA-TINTINO, 2023).

2. Objetivo

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"

Avaliar a atividade inibitória da bomba de efluxo NorA em *Staphylococcus aureus* 1199 pelo sesquiterpeno valenceno por meio da emissão de fluorescência.

3. Metodologia

Foi utilizado 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 o Valenceno, 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.).

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

Na avaliação da inibição da bomba de efluxo NorA, utilizou-se o ensaio de fluorimetria. Para realização deste experimento, foi utilizada a cepa de *S. aureus* 1199, semeada em meio BHI Agar e mantido em 37 °C em estufa bacteriológica por 24 horas antes do ensaio. A preparação do inóculo foi realizado em PBS até obter inóculo correspondente a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Foi testado o sesquiterpeno Valenceno 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 pelo Valenceno foi preparada a solução teste que consistiu em Valenceno (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 Valenceno, 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

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"

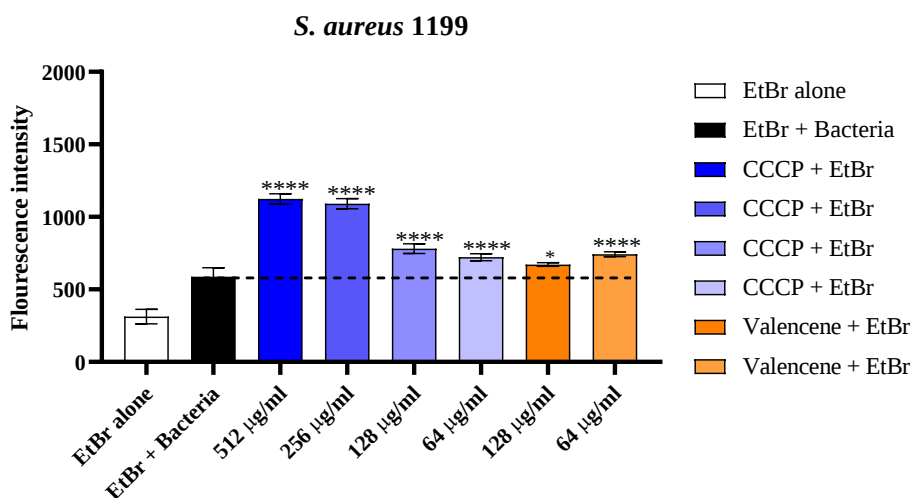
excitação de 530 nm e emissão comprimento de onda 590 nm (Oliveira-Tintino et al., 2023).

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

Na avaliação da emissão de fluorescência na cepa *S. aureus* 1199, foi observado que nas concentrações de 128 $\mu\text{g/mL}$ e 64 $\mu\text{g/mL}$, um aumento na intensidade de fluorescência em comparação com o controle negativo (bactéria+EtBr). Também pode-se observar que no controle positivo (CCCP+EtBr) causou um aumento significativo da fluorescência. Demonstrando que houve a inibição da bomba de efluxo.

Figura 1 – Avaliação do Valenceno na inibição da bomba de efluxo NorA por fluorescência



5. Conclusão

A fluorimetria foi fundamental para quantificar a retenção intracelular de EtBr, que é diretamente afetado pela atividade das bombas de efluxo bacterianas. Os resultados indicam que o sesquiterpeno Valenceno possui um efeito inibitório sobre as bombas de efluxo *Staphylococcus aureus* 1199, aumentando a retenção de EtBr nas células bacterianas. A inibição significativa observada nas diferentes concentrações testadas sugere que o Valenceno tem potencial para

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"

ser usado com um modulador de resistência bacteriana, auxiliando na eficácia de agentes antimicrobianos ao limitar a expulsão de drogas pelas bactérias. Portanto, o Valenceno mostra potencial como um modulador de resistência bacteriana, mas estudos adicionais são necessários para explorar suas aplicações terapêuticas e otimizar sua eficácia.

6. Agradecimentos

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

7. Referências

ALMATAR, M. et al. Efflux pump inhibitors: new updates. **Pharmacological reports: PR**, v. 73, n. 1, p. 1–16, 2021.

CHEUNG, G.; BAE, J.; OTTO, M. Patogenicidade e virulência de *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547–569, 2021.

COUTINHO, H. D. M. Aumento da atividade antibiótica contra *Escherichia coli* multirresistente por *Mentha arvensis* L. e clorpromazina. **Chemotherapy**, p. 328–330, 2008.

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.

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.

SONG, Y. et al. Aplicação de valenceno e perspectivas para sua produção em microrganismos projetados. **Frontiers in Microbiology**, n. 15, 2024.

THAKUR, V.; UNİYAL, A.; TIWARI, V. Uma revisão abrangente sobre farmacologia de bombas de efluxo e seus inibidores na resistência a antibióticos. **European Journal of Pharmacology**, 2021.

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.