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"

ISSN 1983-8174

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E INIBIDORA DE BOMBA DE EFLUXO DA CHALCONA (*E*)-1-(3-aminophenyl)-3-(4ethoxyphenyl)prop-2-em-1-one (C. MAETOX) FRENTE A CEPA DE *Staphylococcus aureus* multirresistente.

Nathaly Mendonça de Morais[1], Larissa da Silva[2], Hélcio Silva dos Santos[3] Francisco Assis Bezerra da Cunha [4], Lígia Cláudia Castro de Oliveira[5]

Resumo: A resistência bacteriana tornou-se uma preocupação de saúde pública mundial, uma vez que infecções causadas por espécies como *Staphylococcus aureus* não respondem mais a tratamentos convencionais, exigindo por parte da ciência a investigação de novas estratégias terapêuticas. Objetivou-se com esse trabalho investigar o potencial antibacteriano de uma chalcona sobre cepas de *S. aureus* multirresistentes. Os ensaios microbiológicos foram realizados utilizando o método de microdiluição em caldo com a cepa K2068 de *S. aureus* portadora da bomba de efluxo MepA. Os resultados demonstram que a chalcona não apresenta atividade antibacteriana direta, expressando uma Concentração Inibitória Mínima – CIM de ≥1024 µg/mL. Porém, excelentes resultados foram obtidos nos ensaios de associação da chalcona com o antibiótico Ciprofloxacino e com o Brometo de Etídio (BrEt), sugerindo que a chalcona apresenta efeito potencializador de antibiótico e possível efeito inibidor de bomba de efluxo. Estudos complementares podem ser realizados para afirmar a inibição de MepA por chalcona.

Palavras-chave: Chalconas. Drogas antibacterianas. *Staphylococcus aureus.*

1. Introdução.

1 Universidade Regional do Cariri, email: nathaly.mendonca@urca.br
2 Universidade Federal do Cariri, email: lariihsilva1205@gmail.com
3 Universidade Vale do Acaraú, email: helcio.silva@uece.br
4 Universidade Regional do Cariri, email: cunha.urca@gmail.com
5 Universidade Regional do Cariri, email: ligia.castro@urca.br

ISSN 1983-8174

Chalconas são moléculas multifuncionais pertencentes à classe dos flavonoides, caracterizadas por uma estrutura química que consiste em um esqueleto de dois anéis aromáticos (A e B) ligados por uma cadeia de três carbonos, que contém uma ligação dupla (C=C) (Kumar; Pandey, 2013).

A resistência aos antibióticos se desenvolve como uma natural consequência da habilidade da população bacteriana de se adaptar. *Staphylococcus aureus* multirresistente, ou MRSA, é uma cepa de bactéria que desenvolveu resistência a vários antibióticos, isso torna o tratamento de infecções mais desafiador, pois muitos medicamentos comuns podem não ser eficazes, esse problema se torna ainda maior quando o desenvolvimento de novos fármacos não acompanha a velocidade em que cepas bacterianas multirresistentes (Li; Webster, 2018).

O desenvolvimento do mecanismo de bomba de efluxo, faz com que se torne urgente a investigação de moléculas capazes de reverter a resistência de *Staphylococcus aureus* através da inibição desse mecanismo ou pela potencialização antibiótica (Silva *et al.,* 2023).

As chalconas emergem como alternativas promissoras no combate a infecções bacterianas, uma vez que já foi relatado o seu potencial antibacteriano, especialmente contra cepas de *S. aureus* portadoras de bombas de efluxo (Da Silva *et al.,* 2023).

2. Objetivo

Avaliar a atividade antibacteriana da chalcona C. MAETOX sobre a cepa K2068 de *S. aureus*, analisando sua capacidade modificadora de antibiótico e inibidor de bomba de efluxo.

3. Metodologia

3.1 Ensaios microbiológicos.

3.1.1 Cepa, substâncias e meios de cultura.

A cepa utilizada foi a K2068 de *S. aureus* portadora de MepA. Os meios de cultura foram BHI- Agar e BHI – Caldos preparados de acordo com as instruções do fabricante. O antibiótico ciprofloxacino e a chalcona (*E*)-1-(3-aminophenyl)-3-(4ethoxyphenyl)prop-2-em-1-one (C. MAETOX) foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e água estéril. A clorpromazina e o EtBr foram dissolvidos em água destilada estéril. Todas as substâncias foram diluídas para uma concentração padrão de 1024 µg mL.

3.2.1 Ensaios de concentração inibitória mínima (CIM).

A CIM foi determinada pelo método de microdiluição em caldo proposto por Javadpour *et al.* (1996). A cepa foi inoculada 24 horas antes dos testes. O

ISSN 1983-8174

inóculo bacteriano foi ajustado para 0,5 na escala de *McFarland*. O *Eppendorf*® foi preenchido com a solução final em diluições seriadas de 512 µg/mL a 0,5 µg/mL. O controle negativo foi considerado os poços que continham apenas meio de cultura e inóculo. Após 24 horas, foi adicionado 20 µL de resazurina (10-óxido de 7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona), para a leitura. A CIM foi definida como a menor concentração na qual o crescimento bacteriano foi observado (Andrews, 2001) Os testes foram realizados em triplicata.

3.2.3 Avaliação da inibição da bomba de efluxo modificando a CIM do antibiótico e do Brometo de Etídio (BrEt)

Foi realizado um estudo comparativo entre os efeitos de um inibidor padrão, avaliando a capacidade de reduzir a MIC da ciprofloxacina e do EtBr. O inibidor padrão de bomba de efluxo CPZ foi usado para validar a expressão da bomba MepA pela cepa K2068. Concentração subinibitória (MIC/8) do inibidor e dos compostos avaliados foram usados. Nos ensaios, cada inóculo bacteriano foi suspenso em solução salina, juntamente com o inibidor CPZ e a chalcona e completado com BHI. Nas placas de microdiluição, 100 µL de antibiótico ou BrEt foram adicionados em diluições seriadas.

A concentração da chalcona e do inibidor permaneceu constante durante todo o experimento, enquanto os substratos foram diluídos em série com e sem o produto de teste para a determinação da MIC. Após 24 h, adicionou-se resazurina para a leitura e a CIM dos controles foi determinada usando apenas placas de antibiótico e Brometo de Etídio, e os testes foram realizados em triplicata.

3.3 Análise estatística

Os dados centrais e desvios padrões foram obtidos de acordo com a metodologia de Freitas *et al.* (2021). Os testes *ANOVA* de uma via com teste *Post Hoc* de *Tukey* foi realizado para dados com distribuição normal, e avaliação de significância estatística através do teste de *Kruskal-Walis*, seguido por um teste de múltiplas comparações de *Dunn*, para dados com distribuição anormal. Os dados foram analisados com o programa estatístico *GraphPad Prisma* 6.01, considerando $p < 0,05$ como significativo e $p > 0,05$ não significativo.

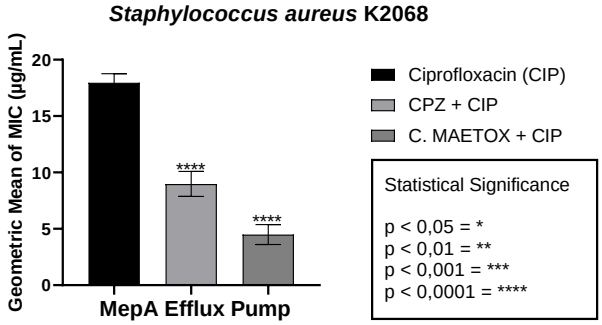
4 Resultados

A chalcona demonstrou-se inativa para atividade antibacteriana direta, expressando uma CIM de ≥1024 µg/mL (Houghton *et al.,* 2007) As CIMs da ciprofloxacino, clorpromazina (CPZ) e BrEt foram respectivamente: 17,96 µg/mL, 90,51 µg/mL e 80,63 µg/mL.

ISSN 1983-8174

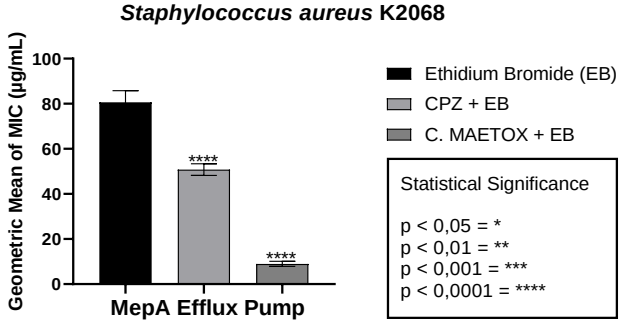
Em relação aos resultados da associação da chalcona com o antibiótico, foi observado uma redução da MIC do ciprofloxacino de 17,96 µg/mL para 4,49 µg/mL, indicando que C. MAETOX potencializa a eficácia do antibiótico, figura 1.

Figura 1 – Avaliação da atividade modificadora de antibiótico da Chalcona C. MAETOX



Os dados obtidos do possível efeito inibitório da chalcona sobre a bomba de efluxo MepA, mostrou uma redução da MIC do BrEt em 10 vezes (80,63 µg/mL para 8, 98 µg/mL). A expressão da bomba de efluxo foi confirmada pela redução da CIM do CPZ (80,63 µg/mL para 50,80 µg/mL). Os dados apresentados sugerem uma possível inibição do sistema de efluxo presente na cepa, uma vez que os ensaios de CIM com o EtBr é um método eficaz para identificar cepas que apresentam bombas de efluxo e fornecem uma previsão necessária em um curto período (Patel *et al.* 2010).

Figura 2 – Avaliação da capacidade de modificação da CIM do BbrEt por associação com C. MAETOX



5 Conclusão.

A Chalcona não apresentou atividade antibacteriana direta sobre a cepa K2068 de *S. aureus*, porém potencializou a ciprofloxacina, além de atuar na possível inibição de MepA, o que foi evidenciado pelos valores de CIM. Torna-

ISSN 1983-8174

se necessário a elucidação sobre os mecanismos de ação que levam a possível inibição dessa bomba, mostrando a interação do produto testado com o alvo bacteriano. Essa elucidação pode ser realizada através dos ensaios de docking e dinâmica molecular, conjuntura que permeia as perspectivas futuras deste trabalho.

6 Agradecimentos.

Universidade Regional do Cariri, LEQBA – Laboratório de Espectroanalítica Química Biológica e Ambiental, ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, a FUNCAP – Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico, projeto de pesquisa FUNCAP Universal – UNI-0210-00773.01.00/23 e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico BP5-0197-00174.01.00/22 EDITAL/CHAMADA: BOLSA DE PRODUTIVIDADE EM PESQUISA, ESTÍMULO À INTERIORIZAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA – BPI 04/2022.

7 Referências

ANDREWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **J Ant Chemother** 48:5–16.(2001). https:// doi. org/ 10. 1093/jac/ 48. suppl_1.5.

Da Silva L, Donato IA, Gonçalves CAC, Scherf JR, Dos Santos HS, Mori E, Coutinho HDM, da Cunha FAB. Antibacterial potential of chalcones and its derivatives against *Staphylococcus aureus*. **3 Biotech**. 2023 Jan;13(1):1. doi: 10.1007/s13205-022-03398-7. Epub 2022 Dec 1. PMID: 36466769; PMCID: PMC9712905.

Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **ScientificWorldJournal**. 2013 Dec 29;2013:162750. doi: 10.1155/2013/162750. PMID: 24470791; PMCID: PMC3891543.

LI, B.; WEBSTER, T.J. Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant-associated orthopedic infections. **Journal of Orthopaedic** Research®, v. 36, n. 1, p. 22-32, 2018.