

## **AVALIAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO NA REVERSÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA POR INIBIÇÃO DE BOMBA DE EFLUXO EM *Staphylococcus aureus***

Nair Silva Macêdo<sup>1\*</sup>, Joycy Francely Sampaio dos Santos<sup>2</sup>, Zildene de Sousa Silveira<sup>1</sup>, Saulo Relison Tintino<sup>3</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>3</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>4</sup>, Ana Raquel Pereira da Silva<sup>3</sup>, Francisco Asis Bezerra da Cunha<sup>5</sup>

1. Graduanda em Ciências Biológicas – PIBIC - URCA
2. Mestranda Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular - URCA
3. Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM - URCA
4. Laboratório de Farmacologia e Química Molecular – LFQM - URCA
5. Departamento de Química Biológica LabBioprospec-URCA / Orientador

### **Resumo:**

As bombas de efluxo são mecanismos de resistência de bactérias patogênicas, elas atuam na retirada de multidrogas para fora da célula bacteriana. Os compostos fenólicos tem grande revelância na reversão da resistência bacteriana por possuírem atividades farmacológicas. O ácido gálico é um polifenol encontrado em vários produtos naturais, o qual tem apresentado atividade antimicrobiana. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade do ácido gálico na reversão da resistência bacteriana de *Staphylococcus aureus* por inibição de bomba de efluxo. A inibição da bomba de efluxo foi ensaiada utilizando uma concentração sub-inibitória padrão e ácido gálico (CIM/8) para todas as cepas testadas e o possível efeito inibitório desta substância foi observado. Os resultados obtidos com o ácido gálico mostram que esse composto fenólico pode vir a se tornar uma estratégia de associação com antibióticos e sendo assim uma possível alternativa para o tratamento de infecções bacterianas.

**Palavras-chave:** Bomba de efluxo; Compostos fenólicos; Resistência bacteriana.

**Apoio financeiro:** Programa Institucional de Iniciação Científica da Universidade Regional do Cariri – PIBIC/URCA.

### **Introdução:**

A resistência de bactérias patogênicas está associada principalmente ao uso incorreto de fármacos. Esse fato conseqüentemente proporciona o surgimento de mecanismos de resistências. As bombas de efluxo são um desses mecanismos, elas atuam na retirada de multidrogas para fora da célula bacteriana (BHASKAR et al., 2016).

Os compostos fenólicos tem grande revelância na reversão da resistência bacteriana por possuírem atividades farmacológicas. O ácido gálico é um polifenol encontrado em vários produtos naturais, o qual tem apresentado atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, antimutagênica e forte ação antioxidante, consistindo em um importante composto (LIMA, 2014; ROSSI, 2014).

Diversos trabalhos vêm sendo realizados com o propósito de investigar a ação de compostos fenólicos sobre o mecanismo de resistência causado por bombas de efluxo e assim proporcionar o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para controlar esse mecanismo (TINTINO et al., 2017).

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade do ácido gálico na reversão de *Staphylococcus aureus* por inibição de bomba de efluxo.

### **Metodologia:**

**Microrganismos:** foram usadas diferentes linhagens da bactéria *S. aureus*, respectivamente: RN4220 (Cepa 1) portadora do plasmídeo pUL5054, que transporta o gene que codifica referente a proteína MsrA de efluxo de macrolídeo (ROSS, 1989); IS-58 (Cepa 2), que possui o plasmídeo PT181 portador do gene da proteína de efluxo de

tetraciclina TetK (GIBBONS & UDO, 2000); 1199B (Cepa 3) resistente a fluoroquinolonas hidrofílicas via proteína de efluxo NorA e a cepa selvagem 1199 (Cepa 4) referente a mesma.

Preparo dos antibióticos: para as bombas de cada bactéria foram usados antibióticos específicos como: Eritromicina, Tetraciclina e Norfloxacin. Todos os antibióticos foram inicialmente diluídos em DMSO com 10 mg/mL e posteriormente diluídos em água destilada diminuindo a concentração para 1024 µg/mL.

Preparo e padronização dos inóculos: nos ensaios foram utilizados microrganismos do estoque, os quais foram cultivados em meio sólido *Heart Infusion Agar Sants* e mantido em 37 °C. A partir deste meio sólido foi feito inóculo em salina estéril, com base na escala Mcfarland 0.5 que corresponde a 10<sup>5</sup> UFC.

Ensaio da CIM: nos ensaios, foram preparados os meios de distribuição em *ependorfs* utilizando 100 µL do inóculo em 900 µL do meio de cultura líquido BHI. Posteriormente o conteúdo do *ependorf* foi transferido para placa de microdiluição de 96 poços, em sentido horizontal. Sendo utilizado 100 µL em cada poço, perfazendo 10 poços. Após esta etapa foi realizada a microdiluição da substância (ácido gálico) sendo 100 µL neste meio até penúltima cavidade (1:1). Com concentrações que variaram de 1024 µg/mL a 2 µg/mL. Após 24h foi realizada a leitura pela adição de resazurina. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Ensaio de inibição de bomba de efluxo por redução da CIM do antibiótico: para verificar o efeito de redução da CIM do antibiótico foi preparado em *ependorfs* o meio de distribuição do teste e do controle. No teste foram colocados 150 µL do inóculo, mais a substância (ácido gálico) em concentração sub-inibitória (CIM/8) e completado o volume do *ependorf* até o volume de 1,5 mL. Para o controle foi colocado o mesmo volume de inóculo do teste e completando o volume do *ependorf* até 1,5 mL. Em seguida foram transferidos para placas de microdiluição de 96 poços, com distribuição vertical, caracterizada pela adição de 100 µL do conteúdo do *ependorf* em cada poço. Após essa etapa foi realizada a microdiluição do antibiótico, sendo 100 µL nesse meio até penúltima cavidade (1:1). As concentrações variaram de 1024 µg/mL a 0,5 µg/mL. A solução do antibiótico utilizada foi preparada anteriormente. Após 24h foi realizado a leitura pela adição de resazurina. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

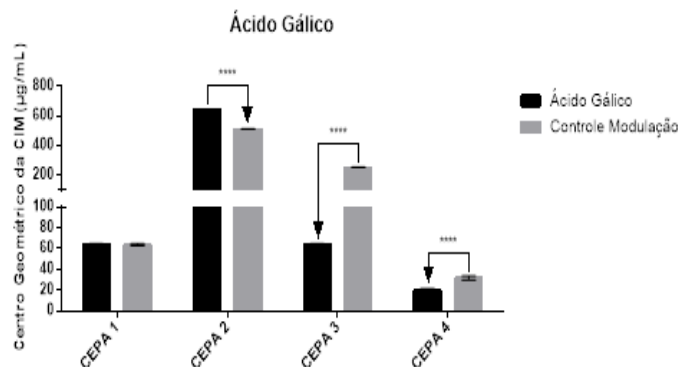
Análise estatística: os resultados dos

testes foram feitos em triplicata e expressados como média geométrica. Na análise estatística foi utilizada ANOVA de uma via, seguida do *post hoc* Tukey usando GraphPad Prism 5.0.

## Resultados e Discussão:

Os valores da Concentração Inibitória Mínima - CIM encontrados neste experimento foram elevados, apresentando um valor de  $\geq 1024$  µg/mL, para todas as cepas ensaiadas, o que demonstra que o ácido gálico, pela metodologia testada não apresenta atividade antibacteriana clinicamente relevante. Todavia, este resultado pode ser considerado relevante para este composto, pois possui propriedades para serem utilizadas como inibidor de bomba de efluxo. O inibidor ideal deve ser livre de qualquer atividade bacteriana para não ser possível o desenvolvimento de resistência (BAMBEKE et al., 2006).

Para os testes de inibição de bomba de efluxo a cepa 1 não apresentou resultados estatisticamente relevante. Já para a cepa 2 o ácido gálico mostrou antagonismo, sendo necessário uma concentração maior do antibiótico para inibir o crescimento bacteriano. Os resultados para a cepa 3 mostraram sinergismo para inibição da bomba de efluxo, uma vez que foi necessário uma concentração menor do antibiótico para inibir o crescimento das bactérias. A cepa 4 também apresentou sinergismo. Porém este resultado não pode ser associado a mecanismo de boma de efluxo por ser uma linhagem selvagem. Estes dados estão representados no Gráfico 1. As propriedades biológicas do ácido gálico têm sido extensivamente estudadas e seus derivados são amplamente utilizados na indústria farmacêutica (LIMA, 2016).



**Gráfico 1:** Atividade do ácido gálico na reversão de *S. aureus* por inibição de bomba de efluxo.

Resultados semelhantes foram obtidos

por Tintino e colaboradores (2016) usando também um ácido fenólico que apresentou as mesmas propriedades dos inibidores padrões das bombas de efluxo. Podendo ser um possível componente em novas formulações em associação com antibióticos, principalmente contra infecções bacterianas. Os polifenóis são amplamente distribuídos na natureza estando presentes em muitas plantas e alimentos, possuindo diversas bioatividades, sendo uma delas bastante relevante que está associado ao seu efeito inibidor sobre bombas de efluxo (DINIZ-SILVA et al., 2016).

### Conclusões:

Os resultados obtidos com o ácido gálico mostram que esse composto fenólico pode vir a se tornar uma estratégia de associação com antibióticos e sendo assim uma alternativa para o tratamento de infecções bacterianas. Então são necessários novos estudos para averiguar os seus mecanismos de ação.

### Referências bibliográficas

BAMBEKE, F. V.; PAGES, J. M.; LEE, V. J. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. **Recent patents on anti-infective drug Discovery**, v.1, p.157-175, 2006.

BHASKAR, B. V.; BABU, T. M. C.; REDDY, N. V.; RAJENDARA, W. Homology modeling, molecular dynamics, and virtual screening of NorA efflux pump inhibitors of *Staphylococcus aureus*. **Drug design, development and therapy**, v.10, p.3237-3252, 2016.

DINIZ-SILVA, H. T.; MAGNANI, M.; SIQUEIRA, S.; SOUZA, E. L.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P. Fruit flavonoids as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that overexpresses *norA*. **LWT - Food Science and Technology**, p. 1-3, 2016.

GIBBONS, S.; UDO E. E. The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux pumps, on the in vitro activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the tet(K) determinant. **Phytotherapy Research**, v.14, n.2, p. 139-140, 2000.

LIMA, K. G. Avaliação do efeito do ácido gálico no tratamento de células de hepatocarcinoma

HEPG2. **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**, 57 p. 2014.

LIMA, V. N.; OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M.; SANTOS, E. S.; MORAIS, L. P.; TINTINO, S. R.; FREITAS, T. S.; GERALDO, Y. S.; PEREIRA, R. L. S.; CRUZ, R. P.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. **Microbial Pathogenesis**, v.99, p.56-61, 2016.

ROSS, J. I.; FARRELL, A. M.; EADY, E. A.; COVE, J. H.; CUNLIFFE, W. J. Characterisation and molecular cloning of the novel macrolide-streptogramin B resistance determinant from staphylococcus epidermidis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.24, n.6, p. 851-862, 1989.

ROSSI, S. A. Estudo dos mecanismos de resistência e virulência de isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* e quantificação de genes de bomba de efluxo pós tratamento com Galatos de Alquila. **Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara**. 127 p. 2014.

TINTINO, S. R.; OLIVEIRA-TINTINO C. D. M.; CAMPINA, F. F.; COSTA, M. S.; CRUZ, R. P.; PEREIRA, R. L. S.; ANDRADE, J. C.; SOUSA, E. O.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; COUTINHO, H. D. M. Cholesterol and ergosterol affect the activity of *Staphylococcus aureus* antibiotic efflux pumps. **Microbial Pathogenesis**, v.104, p.133-136, 2017.

TINTINO, S. R.; OLIVEIRA-TINTINO C. D. M.; CAMPINA, F. F.; SILVA, R. L. P.; COSTA, M. S.; MENEZES, I. R. A.; CALIXTO-JUNIOR, J. T.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; COUTINHO, H. D. M.; LEAL-BALBINO, T. C.; BALBINO, V. Q. Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v.97, p. 9-13, 2016.