

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

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

1. Graduanda em Ciências Biológicas - PIBIC-URCA
2. 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:

Diante do crescente aparecimento de mecanismos de resistência bacteriana aos diversos fármacos, as infecções por elas causadas têm se tornado um importante desafio. O efluxo ativo é um mecanismo de resistência bacteriana a substâncias inibitórias. Na bactéria *Staphylococcus aureus* o principal mecanismo de resistência, para as bombas de efluxo, é a proteína *NorA*, que proporciona o surgimento de resistência a vários fármacos, como as fluoroquinolonas. O presente estudo visou a avaliar a atividade do ácido cafeico na reversão da resistência de *S. aureus* por inibição de bomba de efluxo. A inibição da bomba de efluxo foi ensaiada utilizando uma concentração sub-inibitória (MIC/8) de inibidores de bomba de efluxo padrão e do ácido cafeico, onde a capacidade inibitória deste polifenol foi observada. Os resultados expressos indicam a possível utilização de ácido cafeico como adjuvante na reversão da bomba de efluxo contra bactérias resistentes a múltiplos fármacos (MDR).

**Palavras-chave:** Resistência a antibióticos; Bombas de efluxo; Ácido cafeico.

**Apoio financeiro:** Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC - URCA)

### Introdução:

O crescente aparecimento de mecanismos de resistência de bactérias patogênicas a múltiplos fármacos e as infecções por elas causadas têm se tornado um importante desafio clínico (TINTINO et al., 2016). A resistência aos agentes antimicrobianos ocorre principalmente por sistemas de efluxos, os quais estão relacionados à atividade de proteínas de efluxo localizadas na base da membrana (RUSSELL, 2000; SCHINDLER & KAATZ, 2016).

A bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* tem vários mecanismos de resistência, com destaque para as bombas de efluxo, podendo-se dar ênfase a proteína *NorA*, que proporciona o surgimento de resistência a vários fármacos, como as fluoroquinolonas (NEYFAKH, BORSCH et al., 1993).

O ácido Cafeico (ácido 3,4-dihidroxi cinâmico) é um composto fenólico que está presente naturalmente em frutas, legumes e no azeite (GÜLÇİN, 2006). Este ácido fenólico simples possui propriedades biológicas importantes como antioxidantes e antibacterianas (PINHO et al., 2015; LIMA et al., 2016).

O presente estudo visou a avaliar a atividade do ácido cafeico na reversão da resistência de *S. aureus* por inibição de bomba de efluxo.

### Metodologia:

Microrganismos: as bactérias *S. aureus* usadas são respectivamente: RN4220 (Cepa1), portadora do plasmídeo pUL5054, que transporta o gene que codifica referente a proteína MsrA de efluxo de macrolídio (ROSS et al., 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 micro-organismos do estoque, sendo que foram cultivados em meio sólido *Heart Infusion Agar slants* e mantido em 37 °C. A partir desse 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* utilizado 100 µL do inóculo em 900 µL do meio de cultura líquido BHI. Posteriormente o conteúdo do *ependorf* foi transferido para placas de microdiluição de 96 poços, em sentido horizontal. Sendo que foi utilizado 100 µL em cada poço, perfazendo 10 poços. Após essa etapa foi realizada a microdiluição da substância (ácido Cafeico), sendo 100 µL nesse meio até a penúltima cavidade (1:1). Com concentrações que variaram de 1024 µg/mL a 2 µg/mL. Após 24h foi realizado 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 substância (ácido cafeico) em concentração sub-inibitória (CIM/8) e completado o volume do *ependorf* até o volume de 1,5mL. Para o controle foi colocado o mesmo volume de inóculo do teste e completado o volume do *ependorf* até 1,5mL. 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 à preparada anteriormente. Após 24 h foi realizado a leitura pela adição de resazurina. Todos os experimentos foram

realizados em triplicatas.

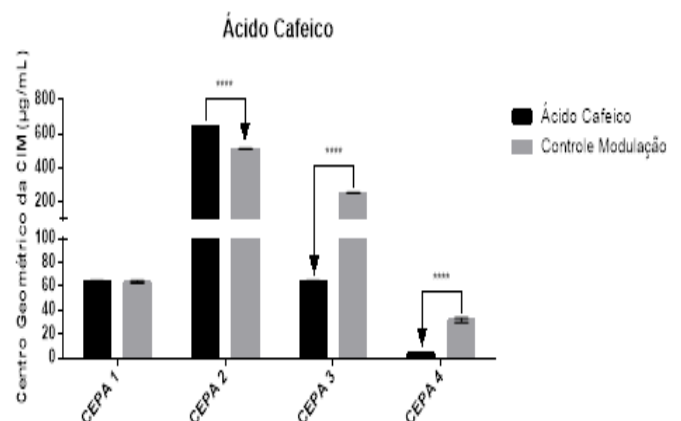
Análise estatística dos resultados microbiológicos: os resultados dos testes foram feitos em triplicata e expressados como média geométrica. Na análise estatística foi utilizada ANOVA de uma via, seguida do *post hoc* Tukey usando GraphPad Prism 5.0.

## Resultados e Discussão:

O ácido cafeico não apresentou atividade antibacteriana clinicamente relevante com uma CIM  $\geq 1024$  µg/mL para todas as cepas testadas. Este fato torna o ácido cafeico uma ferramenta para inibição de bomba de efluxo, já que o inibidor ideal deve ser livre de qualquer atividade bacteriana para não ser possível o desenvolvimento de resistência (BAMBEKE et al., 2006).

Em relação aos ensaios de inibição de bomba de efluxo por redução da CIM do antibiótico, a Cepa 1 não obteve resultados relevantes estatisticamente. Ao se avaliar os resultados para Cepa 2 pôde-se observar um antagonismo, sendo preciso uma concentração maior do antibiótico para a inibição do crescimento da bactéria. O ácido cafeico apresentou um efeito potencializador da atividade antibacteriana sobre a cepa 3. Resultado semelhante a este foi observado para cepa 4, porém como esta bactéria é uma linhagem selvagem e não é portadora de mecanismo de bomba de efluxo este efeito não pode ser atribuído a este mecanismo (TINTINO et al., 2016).

Os resultados relatados acima podem ser observados no Gráfico 1.



**Gráfico 1:** atividade do ácido cafeico na reversão da resistência de *S. aureus* por inibição de bomba de efluxo.

Os polifenóis como o ácido cafeico são reconhecidos como antioxidantes fisiológicos, estando presentes em muitas plantas e alimentos (PRASAD et al., 2011). Efeitos relacionados à inibição da bomba de efluxo também foram verificados para estes compostos (DINIZ-SILVA et al., 2016). Na literatura existem registros da ação do ácido cafeico sobre bactérias, onde esta foi a substância que apresentou efeito sinérgico com o maior número de antibióticos e o maior número de bactérias, sendo *S. aureus* a bactéria mais sensível à associação com os produtos testados (LIMA et al., 2016).

### Conclusões:

Os resultados obtidos com o ácido cafeico demonstraram que ele pode vir a se tornar uma fonte alternativa para potencializar a reversão de bomba de efluxo quando associada a antibióticos, embora não possua atividade antibacteriana direta. Novos estudos são necessários para elucidar os mecanismos de ação deste ácido fenólico frente a bactérias portadoras de bomba de efluxo.

### Referências bibliográficas

BAMBEKE, F. V.; PAGÈS, 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.

DINIZ-SILVA, H. T.; MAGNANI, M.; SIQUEIRA, S.; SOUZA, E. L.; SIQUEIRA-JÚNIOR, 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.

GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v. 217, n. 2, p. 213-220, 2006.

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.; HENRIQUE D. M. COUTINHO. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. **Microbial Pathogenesis**, v.99, p. 56-61, 2016.

NEYFAKH, A. A.; BORSCH, C. M.; KAATZ, G. W. Fluoroquinolone resistance protein *NorA* of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.37, n.1, p. 128-129, 1993.

PINHO, E.; SOARES, G.; Henriques M. Evaluation of antibacterial activity of caffeic acid encapsulated by  $\beta$ -cyclodextrins. **Journal of microencapsulation**, v.32, n.8, p.804-810, 2015.

PRASAD, N. R.; KARTHIKEYAN, A.; KARTHIKEYAN, S.; REDDY, B. V.; Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. **Molecular and cellular biochemistry**, v.349 n.1-2, p.11-19, 2011.

ROSS, J. L.; 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.

RUSSELL, A. D. Do biocides select for antibiotic resistance? **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.52, n.2, p.227-233, 2000.

SCHINDLER, B. D.; KAATZ, G. W. Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. **Drug Resistance Updates**, v.27, p. 1-13, 2016.

TINTINO, S. R.; OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M.; CAMPINA, F. F.; SILVA, R. L. P.; COSTA, M. S.; MENEZES I. R. A., CALIXTO-JÚNIOR 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