

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

FRANCIANE CABRAL PINHEIRO

**EFEITO ANTIMICROBIANO DO COMPOSTO 2- FENILETINIL-BUTILTELURIO
EM CEPAS DE *Escherichia coli* E SUA ASSOCIAÇÃO COM O ESTRESSE
OXIDATIVO**

URUGUAIANA, RS, BRASIL

2017

FRANCIANE CABRAL PINHEIRO

**EFEITO ANTIMICROBIANO DO COMPOSTO 2- FENILETINIL-BUTILTELURIO
EM CEPAS DE *Escherichia coli* E SUA ASSOCIAÇÃO COM O ESTRESSE
OXIDATIVO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Bioquímica**.

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. Marina Prigol**

Coorientador: **Prof^a. Dr^a. Carla Pohl Schen**

URUGUAIANA, RS, BRASIL

2017

FRANCIANE CABRAL PINHEIRO

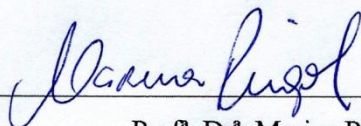
**EFEITO ANTIMICROBIANO DO COMPOSTO 2- FENILETINIL-
BUTILTELURIO EM CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* E SUA ASSOCIAÇÃO
COM O ESTRESSE OXIDATIVO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra em Bioquímica**.

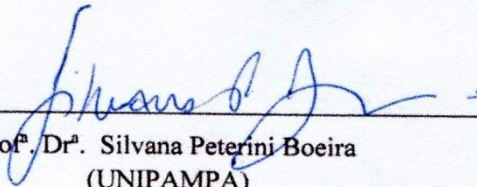
Área de concentração: Bioprospecção Molecular

Dissertação defendida e aprovada em: 06 de setembro de 2017.

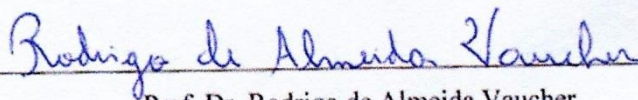
Banca examinadora:



Prof.^a Dr.^a Marina Prigol
Orientadora
(UNIPAMPA)



Prof.^a Dr.^a Silvana Peterini Boeira
(UNIPAMPA)



Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Vaucher
(UFPEL)

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

P654e Pinheiro, Franciane

EFEITO ANTIMICROBIANO DO COMPOSTO 2- FENILETINIL-
BUTILTELURIO EM CEPAS DE Escherichia coli E SUA ASSOCIAÇÃO COM
O ESTRESSE OXIDATIVO / Franciane Pinheiro.

62 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2017.

"Orientação: Marina Prigol".

1. Telúrio. 2. Estresse oxidativo. 3. Defesas
antioxidantes. 4. Atividade antimicrobiana. I. Título.

Dedico este trabalho a minha família,
aos meus rebentos HEITOR e ALICE, que são a luz dos olhos;
ao PAULO meu amigo, amor e companheiro,
pelo amor incondicional e pelo apoio;
aos meus pais MARIO e LAURA, que são a força que me sustenta;
as minhas irmãs, que são minhas melhores amigas.
E as minhas irmãs de laboratório.
Amo muito, todos vocês!

AGRADECIMENTOS

À minha estimada orientadora Prof^a Dr^a Marina Prigol, pelos seus ensinamentos e paciência incansáveis, pelo apoio e confiança, que além de orientadora é modelo de inspiração. Muito obrigada!

Ao LaftamBio Pampa, principalmente as Marinetes que além de colegas de laboratório tornaram-se amigas e uma grande família, corroborando por dias menos exaustivos de experimentos, tornando tudo alegre (exceto pelas músicas), obrigada meninas: Vandreza, Stífani, Márcia, Mari, Bianca, Luana, Francielli, e Shanda. Obrigada *migas!*

À minha família, meus filhos Heitor e Alice, meu companheiro Paulo, meus pais Mario e Laura, minhas irmãs Franciele, Josiane e Janine, pelo apoio, pela compreensão dos dias de ausência e pelo amor absoluto de vocês. Obrigada família!

Às minhas colegas de laboratório que na minha ausência me deram apoio, obrigada Giovana!

Às minhas irmãs de laboratório que além de parceiras de experimento, tornaram-se minhas amigas e grandes exemplos, Vandreza, Stífani e Marcia, adoro vocês!!!

E agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para este estudo. Ao PPG-Bioquímica e UNIPAMPA pela oportunidade na realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

“Sábio é aquele que conhece os limites da sua própria ignorância.”

Sócrates

RESUMO

O uso indiscriminado de antibióticos faz com que algumas cepas bacterianas desenvolvam defesas contra agentes antibacterianos, com o consequente aparecimento da resistência antimicrobiana. Bactérias como a *Escherichia coli*, que estão presentes na flora microbiana dos indivíduos, tem demonstrado um aumento significativo na resistência à antibióticos, e junto deste aumento da resistência surge à busca por novos fármacos para combater estes microrganismos resistentes. Os compostos orgânicos de telúrio tem demonstrado em estudos apresentar capacidade antimicrobiana frente à cepas de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Esta classe de compostos tem seus efeitos relacionados principalmente à sua capacidade de oxidação de grupos tióis (SH). Este trabalho teve como objetivo verificar a atividade antimicrobiana do composto teluroacetileno 2-feniletinil-butiltelúrio (PEBT), sobre cepas de *E.coli*, bem como estudar se o mecanismo de ação antimicrobiano está relacionado ao seu efeito pró-oxidante. Para a avaliação da atividade antimicrobiana do composto PEBT foram realizados os testes de: disco difusão com o composto nas concentrações de 1.28mg/disco, 0.128mg/disco, 0.0128mg/disco e 0.00128mg/disco; concentração inibitória mínima (CIM) com o composto nas concentrações de 3.84mg/ml; 1.92mg/ml; 0.96mg/ml; 0.48mg/ml; 0.24 mg/ml; 0.12 mg/ml; 0.06 mg/ml e 0.030mg/ml e curva de sobrevivência, com as 3 concentrações do composto 0.96 mg/ml; 1.92mg/ml e 3.84mg/ml(correspondentes ao 0,5CIM, CIM e 2CIM, respectivamente). Para avaliar se o mecanismo de ação do composto PEBT sobre a célula bacteriana, estava relacionado à sua atividade pró-oxidante, foram dosados os níveis de espécies reativas (ER); atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), e para avaliar a oxidação de grupos tióis foi realizada a dosagem intracelular de níveis de tióis não proteicos (NPSH) nas culturas bacterianas em presença ou ausência do composto nas concentrações de 0.96 mg/ml; 1.92mg/ml e 3.84mg/ml. A fim de confirmar seu efeito pró-oxidante, foram adicionados os antioxidantes glutatona (GSH) e ácido ascórbico (AA) ao meio de cultura. Como resultado, nosso estudo mostrou a capacidade antimicrobiana do composto PEBT nas concentrações 1.28mg/disco e 0.128mg/disco através da formação de halos de inibição no teste de disco difusão, sendo a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento bacteriano de 1.92mg/ml, e no teste de curva de sobrevivência o composto foi capaz de causar a inviabilidade das células bacterianas após o tempo de 9 horas de exposição nas 3 diferentes concentrações

testadas. Nossos resultados demonstram que a presença do composto nas 3 concentrações testadas levou ao aumento na produção de ER nas células da *E. coli*, concomitante a uma diminuição dos níveis de tióis intracelulares e redução na atividade das enzimas antioxidante SOD e CAT. Associado a isso, quando foi acrescido ao meio os antioxidantes GSH e AA, estes foram capazes de proteger a célula bacteriana do efeito antimicrobiano, através do desaparecimento do halo de inibição no teste de disco difusão. Contudo, nosso estudo sugere que o composto PEBT possui atividade antimicrobiana frente a cepas de *E.coli*, tendo como mecanismo de ação a geração de ER, oxidação de grupos tióis e diminuição das defesas antioxidantes da célula bacteriana.

Palavras chave: Telúrio. Estresse oxidativo. Defesas antioxidantes. Atividade antimicrobiana

ABSTRACT

The indiscriminate use of antibiotics causes some bacterial strains to develop defenses against antibacterial agents, with the consequent appearance of antimicrobial resistance. Bacteria such as *Escherichia coli*, which are present in the microbial flora of individuals, have shown a significant increase in resistance to antibiotics, and along with this increase of resistance comes the search for new drugs to combat these resistant microorganisms. Organic tellurium compounds have shown antimicrobial ability against strains of Gram-negative and Gram-positive bacteria. This class of compounds have these effects related to the oxidation of thiols groups. In this way, the objective of this work was to verify the antimicrobial activity of 2-phenylethynyl butyltellurium (PEBT) in strains of *E. coli*, as well as, to study if the antimicrobial action is related to its pro-oxidant effect. For the evaluation of the antimicrobial activity of the PEBT the following tests were performed: Disc diffusion with PEBT at the concentrations of 1.28; 0.128; 0.0128 and 0.00128 mg/disc; minimum inhibitory concentration (MIC) with PEBT at concentrations of 3.84; 1.92; 0.96; 0.48; 0.24; 0.12; 0.06 and 0.030 mg/ml; and survival curve, with PEBT at concentrations of 0.96; 1.92 and 3.84 mg/ml (corresponding to 0.5MIC, MIC and 2MIC, respectively). To evaluate if the antimicrobial action is related to its pro-oxidant effect we carried out the levels of extracellular reactive species (RS); activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and levels of non-protein thiols (NPSH). In order to confirm its pro-oxidant effect, the antioxidants glutathione (GSH) and ascorbic acid (AA) were added to the culture medium. Our study has demonstrated that PEBT has antimicrobial capability at concentrations of 1.28 and 0.128 mg/disc by formation of inhibition halo in the diffusion disc test. Additionally, the lowest concentration of the compound capable of inhibiting bacterial growth was 1.92 mg/ml, and in the survival curve test the compound was able to cause bacterial cell infeasibility after the 9 hour exposure time at the concentrations of 0.96; 1.92 and 3.84mg/ml. Our results in biochemical analysis show that the presence of the PEBT at concentrations of 3.84; 1.92 and 0.96mg/ml is able to induce an increase in extracellular RS production in *E. coli* cells, concomitant with a decrease in intracellular thiol levels and a reduction in the activity of antioxidant enzymes SOD and CAT. Associated with these results, the addition of GSH and AA to the medium was able to protect the bacterial cell from the antimicrobial effect of PEBT, by disappearance of the inhibition halo in the disc

diffusion test. Taken together, our results suggest that the PEBT presents antimicrobial activity against strains of *E. coli* and its action is related to the generation of ROS, oxidation of thiol groups and decrease of the antioxidant defenses of the bacterial cell.

Keywords: Organotellurium. Species reactive oxygen (ROS). Antibacterial. Pro-oxidant

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Mecanismos de resistência a antibióticos em uma célula bacteriana_____	22
Figura 2 Esquema dos danos causados por espécies reativas de oxigênio em <i>E. coli.</i> _	25
Figura 3 Mecanismo de ação do Telurito no meio intracelular de <i>E.coli.</i> _____	27
Figura 4 Efeito do telúrio na cadeia transportadora de elétrons, em <i>E.coli.</i> _____	28
Figura 5 Estrutura química do composto 2-feniletinil – butiltelúrio (PEBT)_____	30
Figura 6 Esquema de ação do composto PEPT, em <i>E.coli</i> _____	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ERO: Espécies reativas de oxigênio

CAT: Catalase

SOD: Superóxido dismutase

PEBT: 2-feniletinil-butiltelurio

DNA: Ácido desoxirribonucleico

RNA: Ácido ribonucleico

AIDS: Síndrome de imunodeficiência adquirida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Visão geral da célula bacteriana	19
2.2 Bactérias entéricas	20
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	21
2.3 Resistência bacteriana	21
2.4 Estresses oxidativo	23
2.4.1 Espécies reativas de oxigênio	23
2.4.2 Defesas antioxidantes	24
2.5 Telúrio	26
2.5.1 Compostos orgânicos de telúrio	29
2.5.2 Composto 2-feniletinil butiltelúrio (PEBT)	29
3 HIPÓTESE	31
4 OBJETIVOS	32
4.1 Objetivos geral	32
4.2 Objetivos específicos	32
5 MANUSCRITO CIENTÍFICO	33
6 CONCLUSÕES	56
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO** está descrita uma breve revisão de literatura sobre os temas abordados nesta dissertação seguida pelos itens **REVISÃO DE LITERATURA** e **OBJETIVOS**.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico, os quais são apresentados no item **MANUSCRITO CIENTÍFICO**. As seções: *Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas*, encontra-se no próprio artigo e representa a íntegra deste estudo. O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica “*Microbiological Research*” para a qual foi submetido.

Os itens **CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS** encontram-se no final desta dissertação e apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo contido neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens introdução e revisão bibliográfica.

1. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana é um grave problema de saúde pública que afeta a população mundial (PAUL et al., 2010). O uso abusivo e indiscriminado de fármacos antimicrobianas ao longo dos anos é o fator de maior impacto responsável pelo surgimento de mecanismos de resistência bacteriana (ANDREMONT et al., 2001). O crescente número de microrganismos resistentes a antibióticos leva a busca de novos agentes antimicrobianos tanto de origem natural quanto de novas estruturas químicas sintetizadas que são capazes de impedir infecções causando o mínimo de efeitos colaterais ao indivíduo.

A *Escherichia coli* é um microrganismo pertencente à família das Enterobacteriaceae, que tem comprovado papel como patógeno entérico e também extra intestinal, sendo conhecido como um agente etiológico de amplo espectro de infecções invasivas no homem e nos animais, esta família tem demonstrado um aumento na resistência a antibióticos principalmente a partir de isolados clínicos, a *Escherichia coli* juntamente com a *Klebsiella pneumoniae*, estão sendo relacionadas a 95% das infecções em unidades de saúde (CARDOSO, 2017; SILVA et al, 2011).

Fármacos com atividade antimicrobiana como as fluoroquinolonas e a ciprofloxacina tem sua atividade antimicrobiana relacionada intimamente com a produção de espécies reativas (ALBESA et al., 2004). Espécies reativas de oxigênio (ERO) é um termo utilizado para um grupo de oxidantes, que são os radicais livres ou espécies moleculares capazes de gerar radicais livres. A geração intracelular de ERO compreende principalmente radicais superóxido e óxido nítrico (PRIYADARSINI, KUNWAR, 2011).

A fim de reverter os danos causados pela formação de ERO, as células desenvolveram um sistema de defesa antioxidante com base em enzimas de eliminação, tais como catalase, peroxidase de ascorbato e superóxido dismutase que reagem com oxidantes prejudiciais e converte-os em produtos inofensivos (EZRATY et al., 2017; ZHANG et al. 2012). Grande parte das bactérias, incluindo *E. coli*, como meio de eliminação O_2 e H_2O_2 decorrentes de ERO, utilizam como forma de reparo principalmente as ação das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (McCORMICK, 1997).

Os compostos orgânicos de telúrio são substâncias bem conhecidas desde 1840 e já são largamente utilizados na química orgânica, no entanto há uma crescente descrição

das propriedades farmacológicas desses compostos, como antioxidantes, neuroprotetores, agentes anti-tumorais, inibidores enzimáticos e imunomoduladores (NOGUEIRA et al., 2004; KLAMAN,1990).

A literatura já vem demonstrando a aplicação do telúrio no tratamento de infecções microbianas, mesmo antes da descoberta de antibióticos. Um exemplo disso é o oxianion de telúrio (TeO_3^{2-}), que tem sido utilizado na microbiologia desde de 1930. Estudos de Soni et.al. (2005) mostraram a atividade antibacteriana de uma série de compostos orgânicos de telúrio, e estes compostos foram eficazes contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Recentemente, o composto RF-07 foi capaz de destruir o parasita *Leishmania (Leishmania) chagasi in vitro* e *in vivo* em concentrações não tóxicas, podendo ser uma alternativa para o tratamento da leishmaniose visceral (PIMENTEL et al., 2012).

Em contraste, vários estudos tem demonstrado que os compostos orgânicos de telúrio, em doses maiores, são capazes de produzir toxicidade. A toxicidade dos compostos orgânicos de telúrio deve-se principalmente pela oxidação de grupos tióis de moléculas biologicamente ativas, inativando enzimas ou diminuindo a concentração de glutathione (BLAIS et al., 1972; BARBOSA et al., 1998; NOGUEIRA et al., 2003). Autores relatam a inibição dos complexos I e II da cadeia respiratória via oxidação de grupos tióis (PUNTEL et al., 2012), podendo contribuir para os efeitos pró-oxidantes destes compostos, e associam sua toxicidade ou pelo menos parte dela a geração de espécies reativas de oxigênio (CALDERO'N et al., 2009).

Dentre os compostos orgânicos de telúrio destaca-se o 2-feniletinil – butiltelúrio (PEBT), um composto teluroacetileno testado em trabalhos anteriores, que tem demonstrado baixa toxicidade em pequenas concentrações e efeitos farmacológicos em modelos animais de neurotoxicidade e memória (QUINES et al., 2015; SOUZA et al., 2009; SOUZA et al., 2012; ÁVILA et al., 2006). Contudo, compostos orgânicos de telúrio, incluindo o PEBT são conhecidos por seus efeitos toxicológicos dose dependente, tendo sua toxicidade relacionada à sua capacidade de oxidar cataliticamente os grupos sulfidrilo de várias substâncias, incluindo o tripeptídeo glutathione, proteínas e enzimas. No caso das enzimas, a oxidação de grupos tióis por este tipo de composto pode inibir a atividade enzimática, o que pode contribuir para a toxicidade celular (QUINES et al.,2015; PUNTEL et al, 2013).

Conforme relatado acima a resistência bacteriana é um grave problema de saúde pública, uma vez que as bactérias tendem a buscar novos mecanismos para perpetuarem,

o uso indiscriminado de fármacos antimicrobianas faz com que as bactérias busquem novas formas de se adaptar, com isso, faz-se necessário a busca de novos agentes que possam apresentar atividade antimicrobiana.

Por isso neste trabalho far-se-á a investigação da atividade antimicrobiana do composto de teluroacetileno 2-feniletinil-butiltelurio (PEBT), sobre cepas de *E.coli* bem como verificar-se-á se o mecanismo de ação antimicrobiano está relacionado ao seu efeito pró-oxidante.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Visão geral da célula bacteriana

As bactérias são organismos unicelulares primitivos, pertencentes ao reino Monera, e por terem seu material genético não envolto por uma membrana nuclear as células bacterianas são chamadas de células procariontes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). E apesar de serem considerados organismos simples, as bactérias são seres metabolicamente complexos e diversificados, o que as tornam adaptáveis aos mais diversos ambientes (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2012).

As células bacterianas estão entre os menores organismos, a maioria mede de 0,2 a 2,0 μm de diâmetro e de 2 a 8 μm de comprimento. Em geral as bactérias apresentam-se em três formas básicas: cocos (esféricos ou ovoides), bacilos (em forma de bastão) e espirilos (em forma de saca-rolha ou curvados), e ainda podem apresentar forma de estrelas ou quadradas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Estes microrganismos podem formar pares, cadeias de grupos ou outros agrupamentos, estas formações são geralmente características de um gênero particular ou uma espécie de bactéria (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; MADIGAN; MARTINO; CLARK, 2010).

Estruturalmente as bactérias são constituídas de uma parede celular que é praticamente formada por um complexo de carboidratos e proteínas (peptidoglicano), de uma membrana celular que geralmente envolve a parede celular, e do citoplasma com ribossomos, região nuclear e em alguns casos vesículas, e ainda podem apresentar apêndices de movimento (flagelos e *pili*) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; MADIGAN; MARTINO; CLARK, 2010; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2012). As bactérias se reproduzem geralmente por divisão, ou seja, uma célula da origem a outras duas células, este processo é conhecido por divisão binária, esse evento ocorre após a replicação do DNA, da formação da membrana celular e da parede que separa as células formadas (MADIGAN; MARTINO; CLARK, 2010).

Como forma de nutrição as bactérias utilizam-se de substratos orgânicos do meio onde se encontram, algumas ainda são capazes de produzirem seus próprios nutrientes através do processo de fotossíntese e também podem obtê-los a partir de compostos inorgânicos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A alta relação superfície/volume das bactérias lhes confere a capacidade de estar intimamente exposta aos nutrientes do meio, uma vez que todas suas estruturas internas estão próximas à superfície facilitando a absorção dos mesmos (BLACK, 2002).

Uma forma clássica de identificação e catalogação das bactérias é o teste de coloração de Gram, que as classifica de acordo com a coloração de sua parede celular, sendo divididas em gram-positivas que apresentam várias camadas peptidoglicanas na parede celular, formando uma estrutura espessa e rígida, além da presença de ácidos teicoicos, e gram-negativas que na parede celular apresentam uma ou poucas camadas de peptidoglicanas e uma membrana externa composta de lipopolissacarídeos, lipoproteínas e fosfolipídeos (GUEST, 2017; WANG, ZHAO, 2009 ; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2012).

Microrganismos como as bactérias são particularmente versáteis na forma de obter energia, as formas de captar energia e obter carbono, podem classificá-los como autotróficos (fotoautotróficos e quimioautotróficos) que utilizam o dióxido de carbono para sintetizar moléculas orgânicas e heterotróficas que utilizam moléculas orgânicas previamente produzidas obtidas de outros organismos (BLACK, 2002).

As bactérias assim como outros microrganismos estão amplamente difundidas em todo o globo, e apenas uma minoria destes organismos podem ser patogênicos, contudo esta minoria é capaz de causar grandes danos aos indivíduos, seja pela contaminação de fontes de alimentos, água e habitats quando pela geração de moléstias. Bactérias patogênicas frequentemente possuem estruturas especiais ou características fisiológicas que aumentam suas chances de infectar um hospedeiro com sucesso. A virulência de cada microrganismo está intimamente ligada às suas características, e a sua capacidade de proliferação nas células do hospedeiro (BLACK, 2002).

2.2 Bactérias entéricas

As bactérias entéricas são um grupo de bacilos aeróbios facultativos, Gram-negativos, não esporulantes, que são imóveis ou móveis por flagelação peritríquia. Esta classe de bactérias é comumente oxidase negativa, com exigências nutricionais relativamente simples e fermentam açúcares, dando origem a uma gama de produtos finais.

Dentro do grupo de bactérias entéricas pode-se encontrar uma grande variedade de patógenos humanos, animais e vegetais, como também microrganismo de importância para a indústria. A *Escherichia coli*, está dentro deste grupo, e é considerada um exemplo clássico desta classe. Por serem em grande parte patógenos, as bactérias entéricas são de grande importância médica, tendo diversos estudos com

isolados deste grupo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; MADIGAN; MARTINO; CLARK, 2010).

2.2.1 *Escherichia coli*

Este agente foi descrito primeiramente por Theodor Von em 1885, sendo denominado primeiramente *Bacterim coli commune*, e somente em 1958 recebeu a atual nomenclatura. A *E.coli* pertencente à família Enterobacteriaceae e ao gênero *Escherichia* que compreende as espécies *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermanii*, *Escherichia vulneris*. A *Escherichia coli* faz parte da microbiota entérica de mamíferos e aves, que se caracteriza por ser um bastonete curto, gram-negativo, não esporulado, medindo entre 1,1 a 1,5 µm de espessura por 2 a 6µm de comprimento, móvel se tiver a presença de flagelos a temperatura ideal de crescimento deste microrganismo é de +/- 37° (OLOKETUYI, et al., 2017).

Esta espécie de bactéria apresenta metabolismo anaeróbico facultativo, isto significa que ela é capaz de produzir energia na presença ou ausência de oxigênio, ou seja, na ausência de oxigênio o ATP é obtido por processo de fermentação e na presença o ATP é obtido a partir da reação do oxigênio (O₂) com a glicose. Durante a respiração aeróbica na *E.coli*, uma importante fonte de O₂ e H₂O₂ é a "autoxidação", que resulta na eliminação acidental de um elétron por O₂, tipicamente de flavinas reduzidas no citoplasma ou de cofactores de flavina reduzidos na cadeia respiratória ligada à membrana (CHOIA, YANGA, WEISSHAAR, 2014).

E. coli faz parte do grupo de coliformes fecais (coliformes a 45 °C) sendo considerada o mais específico indicador de contaminação fecal e eventual presença de bactérias patogênicas. De acordo com Silva et,al,(2011) a *E. coli* tem comprovado papel como patógeno entérico e também extraintestinal, sendo o agente etiológico de amplo espectro de infecções invasivas no homem e nos animais.

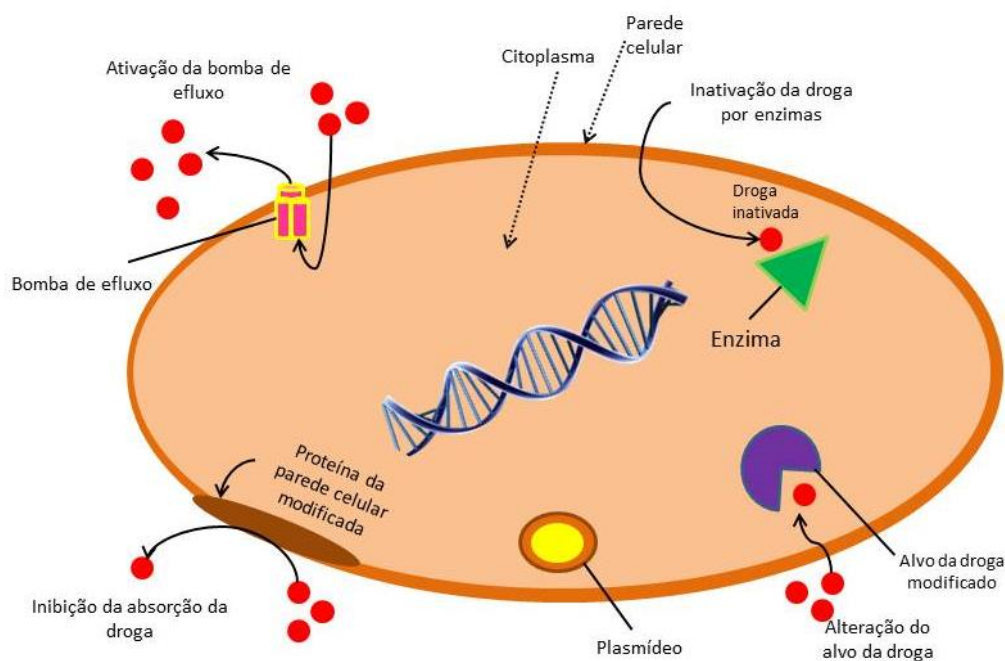
2.3 Resistência bacteriana

Desde a descoberta e posterior utilização clínica de antibióticos, a resistência a estes agentes foi observada, com um impacto negativo proporcional ao tratamento de doenças infecciosas (WRIGHT, 2005), em decorrência deste fenômeno, a resistência bacteriana tornou-se um sério problema de saúde pública que afeta a população mundial (PAUL et al., 2010), e passou a ser considerado um dos fatores mais importantes no

surgimento, seleção e disseminação de patógenos bacterianos resistentes a uma grande variedade de antibióticos convencionais (CARDOSO, et al; 2017).

Os mecanismos de resistência aos antibióticos (Fig. 1) se desenvolvem como uma natural consequência da habilidade de adaptação da população bacteriana (SANTOS, 2004). De acordo com Loureiro et al.,(2016), os quatro principais mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos são: a modificação ou destruição enzimática do antibiótico; a prevenção da acumulação intracelular do antibiótico através da redução da permeabilidade celular ao antibiótico ou da existência de bombas de efluxo dos antibióticos das células bacterianas; as alterações nas moléculas alvo dos antibióticos, e a produção de moléculas alvo alternativas que não são inibidas pelo antibiótico, enquanto se continua a produzir as moléculas alvo originais, contornando desse modo a inibição induzida pelo antibiótico.

Figura 1 Mecanismos de resistência a antibióticos em uma célula bacteriana.



Fonte: arquivo próprio (2017).

No entanto, mesmo considerando a importância farmacológica e social de ambos os grupos, as bactérias Gram-negativas de isolados clínicos demonstraram um aumento impressionante da resistência aos antibióticos, principalmente os membros de Enterobacteriaceae, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, que foram relacionados a 95% das infecções em unidades de saúde (CARDOSO et al., 2017).

2.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é consequência de um desequilíbrio na quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais são também comumente denominadas radicais livres. Esse desequilíbrio pode ser causado por diversos fatores relacionados com o aumento da produção de ERO e/ou a redução da disponibilidade de antioxidantes (BIRBEN et al., 2012). Quimicamente, os radicais livres são átomos, moléculas ou íons que apresentam um elétron desemparelhado, reativo e instável, o qual, para alcançar a estabilidade, tende a se ligar a outro elétron (MARTINDALE, HOLBROOK, 2002).

2.4.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

Espécies reativas de oxigênio (ERO) é um termo empregado para um grupo de oxidantes, que são conhecidos como radicais livres ou espécies moleculares capazes de produzir radicais livres, principalmente radicais superóxido e óxido nítrico durante a produção intracelular de ERO (PRIYADARSINI, KUNWAR, 2011). Podem-se elencar três principais espécies reativas de oxigênio são elas: superóxido, peróxido hidrogênio, e radical hidroxilo, que são gerados como subprodutos de respiração aeróbia normal (WANG, ZHAO, 2009). As espécies reativas de oxigênio, além de fazer parte do metabolismo aeróbio normal, podem aumentar em concentração como resultado de uma exposição a substâncias tóxicas (OLCHANHESKI, et al., 2014).

O aumento na taxa de produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O_2^-) e hidroxilo ($OH \cdot$) está entre os agentes mais comuns que danificam estruturas celulares, e são conhecidos por promover a mutagênese em excesso, ao mesmo tempo em que atacam essencialmente todas as macromoléculas celulares, incluindo DNA, RNA, proteínas e lipídios (MOORE, 2017).

As bactérias aeróbias usam oxigênio molecular (O_2) para a respiração ou oxidação de nutrientes para obtenção de energia, desta forma estes microrganismos estão em contato contínuo com ERO ao longo de seu ciclo de vida, sendo a produção de ERO um produto do metabolismo aeróbio durante a irradiação ionizante (e não ionizante) que leva à produção de uma série de espécies radicais e peróxidos através da ionização de H_2O intracelular (CABISCOL et al., 2000).

Em microrganismos como as bactérias o aumento na produção ERO durante o estresse oxidativo leva à oxidação dos tióis, entre outros efeitos. Alguns desses tióis fazem parte de proteínas celulares como o regulador transcricional OxyR e SoxRS, que

demonstram desempenhar um papel importantíssimo no estresse oxidativo bacteriano e no estresse gerado por metais tóxicos também (CHASTEEN, et al., 2009).

Em *E. coli* ambos os fatores de transcrição SoxRS e OxyR, atuam de formas distintas. Enquanto o SoxRS ativa a resposta a produção de superóxido e seus radicais, detoxificando por ação da superóxido dismutase (SOD), o fator OxyRS regula a expressão de vários genes induzíveis de peróxido de hidrogênio que codificam enzimas que participam da resposta bacteriana ao estresse oxidativo, podemos citar como exemplo a hidroperoxidase I, alquil-hidroperóxido redutase, glutatona redutase, glutaredoxina 1, tioredoxina-2, entre outras (CHASTEEN et al., 2009; MOORE et al., 2017). Na *E. coli* os níveis de ERO são controlados pelas enzimas antioxidantes SOD, que atua convertendo O_2 em H_2O_2 , e catalases que é responsável pela conversão de H_2O_2 em H_2O (CHOIA, YANGA, WEISSHAAR, 2014).

2.4.2 Defesas antioxidantes

Os organismos vivos têm que construir mecanismos para se proteger contra o estresse oxidativo, como as enzimas catalase e superóxido dismutase, pequenas proteínas como a tioredoxina e glutaredoxina, e moléculas como o tripeptídeo glutatona (KASHMIR, MANKAR, 2014). As enzimas catalase e superóxido dismutase reagem com oxidantes prejudiciais e converte-os em produtos inofensivos, várias enzimas antioxidantes, cuja função é eliminar os radicais livres de oxigênio e proteger o organismo, indiretamente, podem refletir nas mudanças do teor de oxigênio nos radicais livres nas células vivas (EZRATY et al., 2017; ZHANG et al., 2012; FARR, KOGOMA, 1997).

A maioria das bactérias, incluindo *E. Coli*, contém superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) como forma de eliminação de O_2 e H_2O_2 , respectivamente (MCCORMICK, 1997), sendo amplamente distribuídas em organismos aeróbicos. Desde a primeira descoberta dessas metaloenzimas, a SOD foi considerada como uma enzima chave que defende contra o estresse oxidativo. SOD pode catalisar $O_2^{\cdot-}$ para O_2 e H_2O_2 rapidamente. Então H_2O_2 é decomposto em H_2O e O_2 . Para muitas bactérias em ambientes naturais, a resistência a H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ é principalmente devido à presença de SOD e CAT (LIN et al., 2009).

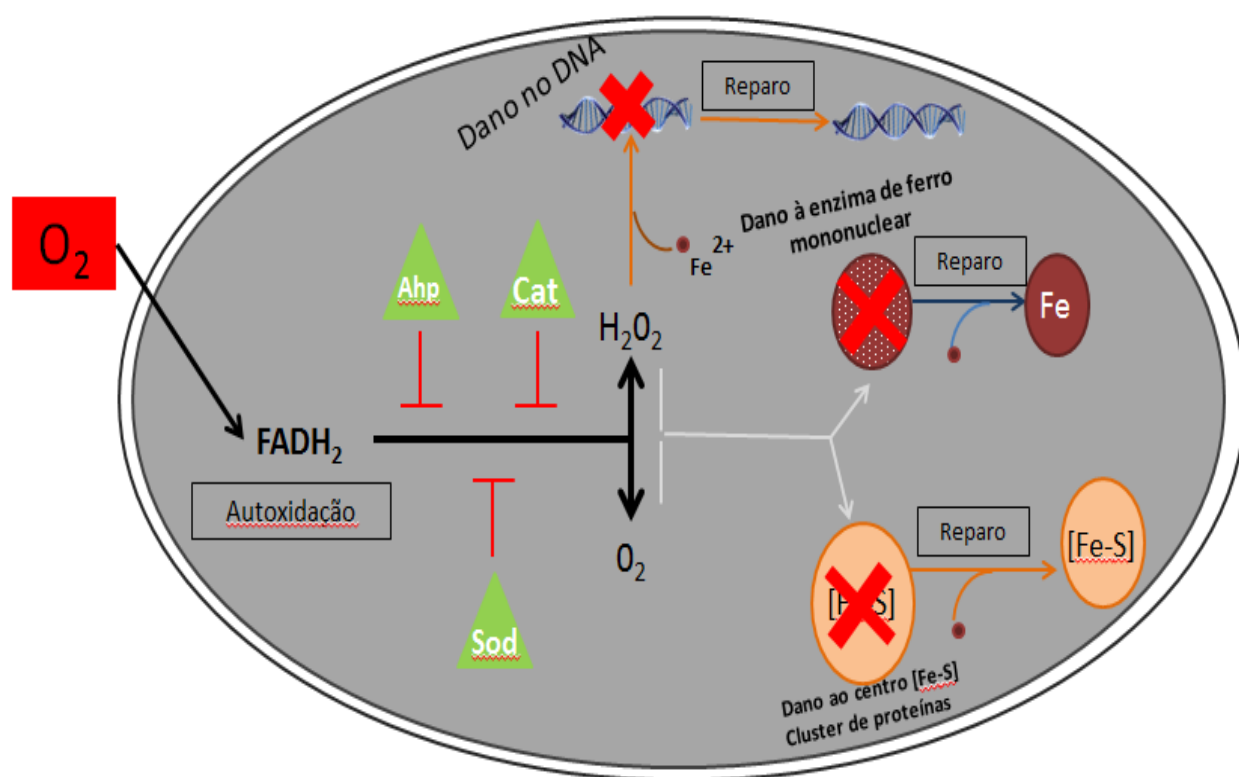
A catalase por sua vez, possui um grupamento heme e tem a capacidade de degradar rapidamente o H_2O_2 . O grupo heme desta enzima interage com o H_2O_2 formando o peróxido de ferro, comumente chamado de componente 1, que em baixas

concentrações de H_2O_2 é reduzido por doadores de hidrogênio e em condições elevadas é catalisado rapidamente, formando H_2O e O_2 .

Em células de *E. coli* (Figura 2), com crescimento aeróbio estão equipadas com duas superóxido dismutases (MnSOD e FeSOD), e catalases (HPI e HPII) H_2O_2 desproporcional em H_2O e a hidroperóxido redutase de alquilo (Ahp), que é uma fornecedora de defesa adicional pela redução de vários hidroperóxidos orgânicos (IMLAY,2013; FARR, KOGOMA, 1997).

As respostas genéticas bacterianas ao estresse oxidativo são controladas por dois principais reguladores transcricionais (OxyR e SoxRS) (IMLAY, 2013; IMLAY, 2008). A *E. coli* possui este mesmo sistema de regulação, e em condições normais de crescimento, o SoxR é produzido em uma forma inativada (reduzida), mas quando exposto a superóxido ou fármacos de ciclo redox é ativado. O regulador OxyR é ativado principalmente pelo H_2O_2 , aumentando a transcrição de um conjunto de genes que aumentam a resistência ao peróxido de hidrogênio (BAEZ, SHILOACH, 2013)

Figura 2 Esquema dos danos causados por espécies reativas de oxigênio em *E. coli*.



Fonte: arquivo próprio (2017) adaptado de Kashmir, Mankar (2014), Imlay (2013).

É importante ressaltar que em estudos com *E.coli* com cepas mutantes, onde a atividade da SOD é suprimida, estes microrganismos se tornam mais suscetíveis aos danos causados pela produção de ERO, do que as cepas de tipo selvagem (MCCORMICK,1998; PESARICO et al., 2013)

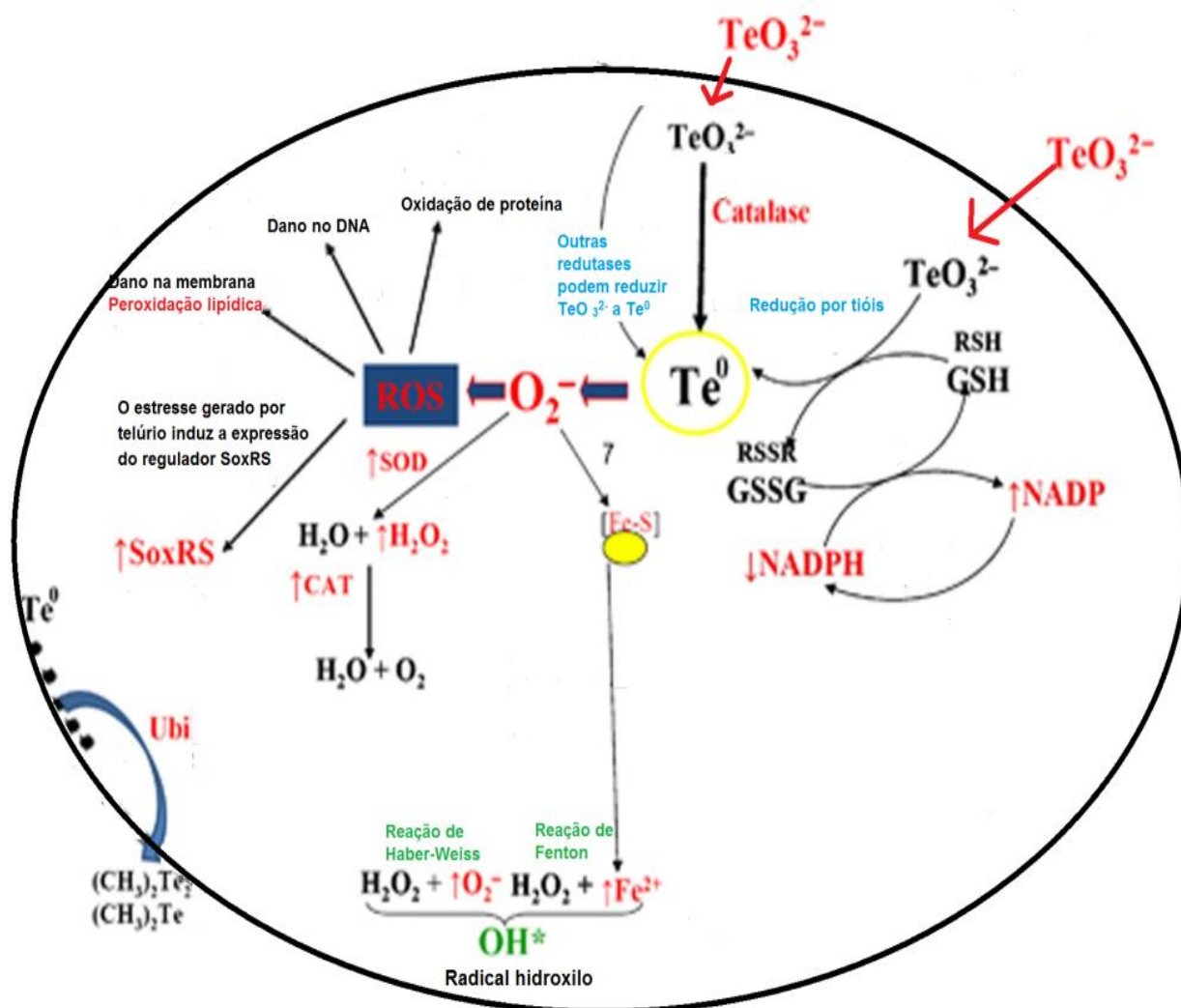
2.5 Telúrio

O telúrio foi descrito primeiramente por Franz Joseph Müller von Reichenstein em 1782 durante trabalhos nas minas de ouro na Hungria (CHASTEEN et al., 2009). É classificado como um metalóide pertencente ao grupo 16 (VIA) da tabela periódica, conhecida como família dos calcogênios, deste modo compartilha várias características químicas com elementos biologicamente importantes como oxigênio, enxofre e selênio (REINOSO et al., 2012), e ocupa o 75º lugar em abundância de todos os elementos da crosta terrestre (TAYLOR,1999; CUNHA et al., 2009). Este elemento apresenta-se em diferentes estados de oxidações como telurato, telurito, telúrio elementar e telureto.

Enquanto o Te elementar (Te^0) não apresenta toxicidade aparente, o oxianion de telurito (TeO_3^{2-})² é extremamente tóxico para a maioria dos microrganismos, especialmente bactérias gram negativas (VÁSQUEZ et al., 2014; MALTMAN; DONALD, YURKOV, 2017). Para enfrentar o estresse oxidativo induzido por telurito, vários microrganismos desenvolveram mecanismos desintoxicantes, como a alquilação, e redução enzimática ou não enzimática do telurito ao Te^0 de forma menos tóxica que se acumula intra ou extracelularmente (CHASTEEN et al., 2009).

Quando o telurito atravessa a parede da *Escherichia coli*, uma vez dentro da célula ele causa uma série de modificações prejudiciais (Figura 3), pois a célula bacteriana busca converter o telurito a telúrio elementar, sua forma menos danosa, e como consequência desta ação ocorre um aumento na produção de espécies reativas (ROS), principalmente superóxido, que conseqüentemente leva a danos com a oxidação de proteínas, danos do DNA, peroxidação lipídica e ainda redução de tióis. Como forma de defesa da célula aos insultos oxidativos, o estresse gerado pelo telúrio induz a expressão dos reguladores Sox RS, aumentando a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT (CHASTEEN et al.,2009).

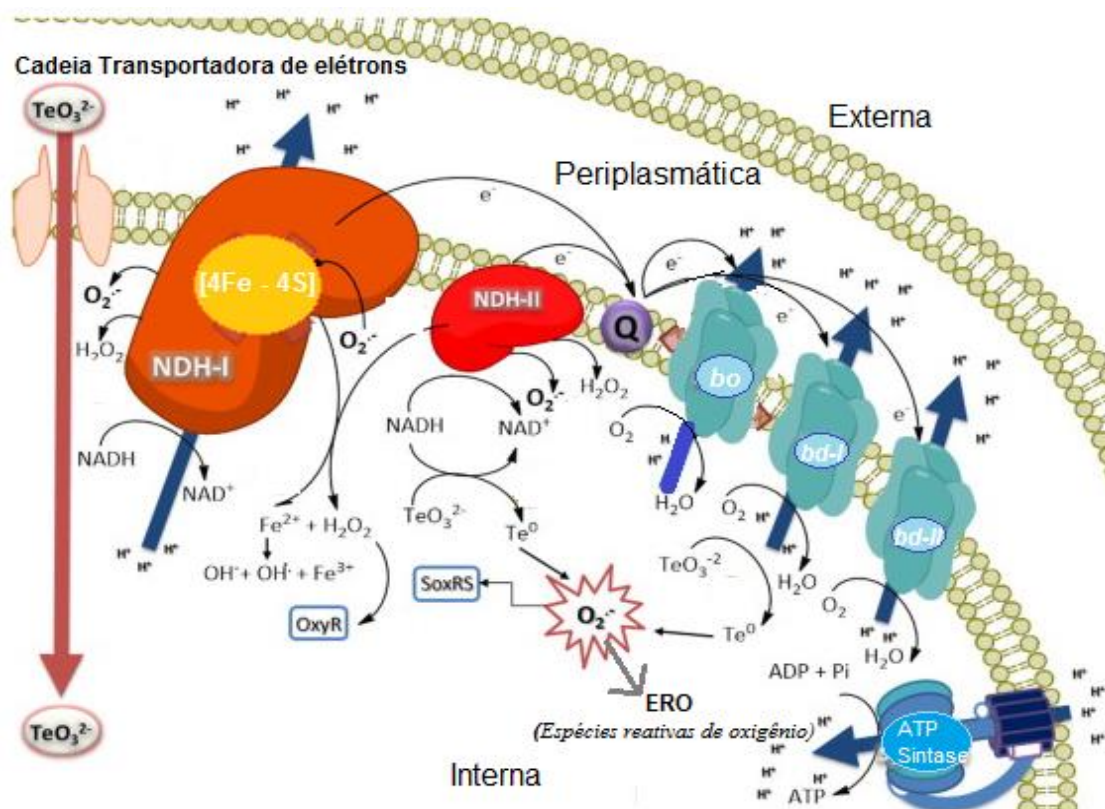
Figura 3 Mecanismo de ação do Telurito no meio intracelular de *E. coli*.



Fonte: arquivo próprio (2017) adaptado de CHASTEEN et al.(2009).

Embora raramente encontrado na natureza o oxianion de telúrio (TeO_3^{2-}) é altamente tóxico para a maioria das bactérias em concentrações tão baixas quanto $1\mu\text{g mL}^{-1}$ (TAYLOR, 1999), quando comparado a outros metalóides como o selênio, cromo, ferro, mercúrio, cádmio e o cobre, que somente são tóxicos em concentrações 100 vezes maiores do que a do TeO_3^{2-} (NIES, 1999). Em *E. coli*, os efeitos tóxicos de TeO_3^{2-} começam em concentrações de várias ordens de grandeza inferiores ao padrão determinado para metais pesados que são de saúde pública e preocupação ambiental, como cobalto, zinco e cromo (NIES, 1999; HARRISON et al., 2004). Na figura 4 pode-se ter uma visão do dano induzido por TeO_3^{2-} a cadeia transportadora de elétrons de *E. coli* sob condições de crescimento aeróbio.

Figura 4 Efeito do telúrio na cadeia transportadora de elétrons, em *E.coli*.



Fonte: arquivo próprio (2017) adaptado de Vásquez et al. (2015).

Vários mecanismos diferentes foram propostos para explicar a toxicidade do telúrio. Parte disso resulta da geração de EROs como subproduto da redução do telúrito a telúrio elementar, seja por dismutação superóxido específica por SOD ou por transferência acidental de elétrons para O_2 durante a auto oxidação de desidrogenases respiratórias. O telúrito oxida os tióis celulares como glutatona ou causa danos específicos dos grupos [Fe-S] presentes em enzimas essenciais e pode substituir o enxofre e/ou o selênio em metabolitos ou enzimas, diminuindo as funções essenciais (ARADSKÁ et al., 2013).

São encontradas aplicações históricas de telúrio no tratamento de infecções microbianas antes da descoberta de antibióticos, a documentação inicial relata o uso desde 1926 já no tratamento da sífilis e da lepra. O oxianion de telúrio (TeO_3^{2-}) tem sido utilizado em microbiologia desde a década de 1930, quando Alexandre Fleming relatou suas propriedades antibacterianas, já no ano de 1984, o TeO_3^{2-} surgiu como potencial agente antiespista de glóbulos vermelhos no tratamento de anemia falciforme (VÁSQUEZ et al., 2015), em meados de 1988 fármacos imunomoduladores contendo telúrio foram propostos como agentes de tratamento para AIDS (CUNHA et

al.,2008).Os compostos de telúrio têm uma longa história como agentes antimicrobianos e terapêuticos (TAYLOR, 1999).

2.5.1 Compostos orgânicos de telúrio

O telúrio compõe tanto derivados inorgânicos como orgânicos, pode-se diferenciar um composto de telúrio inorgânico de um derivado orgânico porque o primeiro possui pelo menos uma ligação de carbono de telúrio na sua estrutura. São conhecidas várias classes diferentes de compostos orgânicos de telúrio (CUNHA et al., 2009).

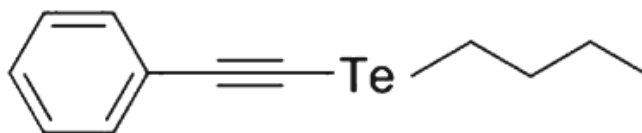
Os compostos orgânicos de telúrio são sintetizados desde 1840, e têm sido objeto de pesquisa devido às suas propriedades farmacológicas (ÁVILA et al., 2006), estes foram relatados em estudos como antioxidantes em vários modelos animais de estresse oxidativo, além de apresentar ações imunomoduladoras e anti-inflamatórias (QUINES et al.,2015; ÁVILA et al.,2006, SOUZA et al., 2009). Entretanto estes compostos também apresentam graus de toxicidade, o mecanismo proposto para explicar este fenômeno é similar aos compostos orgânicos de selênio, e envolve a oxirredução de grupamentos –SH de moléculas biologicamente ativas (PUNTEL et al., 2013) .

Soni et al. (2005) mostraram a atividade antibacteriana de uma série de compostos orgânicos de telúrio. Estes compostos foram eficazes contra bactérias gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) e gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella sp.*). Recentemente, o composto RF-07 foi capaz de destruir o parasita *Leishmania (Leishmania) chagasi* *in vitro* e *in vivo* em concentrações não tóxicas, podendo ser uma alternativa para o tratamento da leishmaniose visceral (PIMENTEL et al., 2012).

2.5.2 Composto 2-feniletinil – butiltelúrio (PEBT)

O 2-feniletinil – butiltelúrio (PEBT) (fig. 5) é um composto teluroacetileno já testado em trabalhos anteriores com animais, onde apresentou baixa toxicidade nas concentrações testadas (10mg/Kg; 5mg/Kg (SOUZA et al., 2013); 300µM (QUINES et al., 2013); 1mg/Kg (QUINES et al., 2015) em camundongos, bem como apresentou efeitos farmacológicos em estudos realizados em modelos animais de neurotoxicidade e memória (QUINES et al., 2015; SOUZA et al, 2009; SOUZA et al, 2012).

Figura 5 Estrutura química do composto 2-feniletinil – butiltelúrio (PEBT).



Fonte: arquivo próprio (2017).

Contudo, compostos orgânicos de telúrio, incluindo o PEBT, são conhecidos por seus efeitos toxicológicos dependentes de sua concentração/dose, tendo sua toxicidade relacionada à sua capacidade de oxidar cataliticamente os grupos sulfidrilos de tióis como da glutathiona ou de diferentes proteínas ou enzimas. No caso das enzimas, a oxidação de grupos tióis por este tipo de composto pode inibir a atividade enzimática, o que pode contribuir para a toxicidade celular. Alguns estudos demonstram que o composto PEBT, inibe a atividade das enzimas sulfidrilato, δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase, oxidando importantes resíduos cisteinílicos localizados no sítio ativo destas enzimas. (PUNTEL et al., 2013; PUNTEL et al., 2012, QUINES et al., 2013, QUINES et al., 2015)

3. HIPÓTESE

O composto PEBT pertence ao grupo dos compostos teluroacetenos, que conforme estudos possui atividade antioxidante capaz de proteger contra danos oxidativos, isto em doses baixas, porém quando em doses elevadas este composto passa a ter ação pro-oxidante, com base nestes dados acreditamos que este composto é capaz de ter ação bactericida e/ou bacteriostática, devido a suas características químicas e sua forma de ação dentro de células.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

Verificar a atividade antimicrobiana do composto de teluroacetileno 2-feniletinil-butiltelurio (PEBT), sobre cepas de *E.coli* bem como verificar se o mecanismo de ação antimicrobiano está relacionado ao seu efeito pró-oxidante.

4.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a atividade antimicrobiana dos composto PEBT frente a cepas de *E.coli*
- Determinar quais as concentrações do composto PEBT, são capazes de inibir o crescimento das cepas de *E.coli*
- Investigar se a atividade antimicrobiana do composto PEBT está relacionada ao seu efeito pró-oxidante

5. MANUSCRITO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. Os itens *Materiais e Métodos*, *Resultados*, *Discussão* e *Referências Bibliográficas*, encontram-se no próprio artigo. O **artigo** está disposto na forma que será submetido na revista “*Microbiological Research*”

Artigo:

“Antimicrobial effect of 2-phenyletinil-butyltellurium in *Escherichia coli* and its association with oxidative stress.”

Antimicrobial effect of 2-phenyletinil-butyltellurium in *Escherichia coli* and its association with oxidative stress.

Pinheiro, FC^a., Bortolotto VC^a., Araujo, SM^a., Poetini MR^a., Schen, CP^a., Neto, JS.,
Zeni, G., Prigol, M^{a*}

^aLaboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas aplicadas às Moléculas Bioativas – Unipampa, Universidade Federal do Pampa - Campus Itaqui, Itaqui, RS, 97650-000, Brazil.

* Corresponding author:

Marina Prigol

Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui

Rua Luiz Joaquim de Sá Britto, s/n - Bairro: Promorar, Itaqui, Rio Grande do Sul,
Brasil, CEP 97650-000

Email: marinaprigol@gmail.com

ABSTRACT

Tellurium compounds have shown antimicrobial ability against strains of Gram-negative and Gram-positive bacteria. In this way, the objective of this work was to verify the antimicrobial activity of 2-phenylethynyl butyltellurium (PEBT) in strains of *E. coli*, as well as, to study if the antimicrobial action is related to its pro-oxidant effect. For the evaluation of the antimicrobial activity of the PEBT the following tests were performed: Disc diffusion with PEBT at the concentrations of 1.28; 0.128; 0.0128 and 0.00128 mg/disc; minimum inhibitory concentration (MIC) with PEBT at concentrations of 3.84; 1.92; 0.96; 0.48; 0.24; 0.12; 0.06 and 0.030 mg/ml; and survival curve, with PEBT at concentrations of 0.96; 1.92 and 3.84 mg/ml (corresponding to 0.5MIC, MIC and 2MIC, respectively). To evaluate if the antimicrobial action is related to its pro-oxidant effect we carried out the levels of extracellular reactive species (RS); activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and levels of non-protein thiols (NPSH). In order to confirm its pro-oxidant effect, the antioxidants glutathione (GSH) and ascorbic acid (AA) were added to the culture medium. Our study has demonstrated that PEBT has antimicrobial capability at concentrations of 1.28 and 0.128 mg/disc by formation of inhibition halo in the diffusion disc test. Additionally, the lowest concentration of the compound capable of inhibiting bacterial growth was 1.92 mg/ml, and in the survival curve test the compound was able to cause bacterial cell infeasibility after the 9 hour exposure time at the concentrations of 0.96; 1.92 and 3.84mg/ml. Our results in biochemical analysis show that the presence of the PEBT at concentrations of 3.84; 1.92 and 0.96mg/ml is able to induce an increase in extracellular RS production in *E. coli* cells, concomitant with a decrease in intracellular thiol levels and a reduction in the activity of antioxidant enzymes SOD and CAT. Associated with these results, the addition of GSH and AA to the medium was able to protect the bacterial cell from the antimicrobial effect of PEBT, by disappearance of the inhibition halo in the disc diffusion test. Taken together, our results suggest that the PEBT presents antimicrobial activity against strains of *E. coli* and its action is related to the generation of RS, oxidation of thiol groups and decrease of the antioxidant defenses of the bacterial cell.

Keywords: antibacterial. tellurium. oxidation of thiols.

INTRODUCTION

The emergence, propagation, accumulation, and maintenance of strains of antimicrobial-resistant (AR) pathogenic bacteria have become a worldwide health concern in human and veterinary medicine (Holvoet et al. 2013), antibiotic resistance is one of the main reasons for the difficulty we face in curing infectious diseases (Matuschek et al. 2014). The abusive and indiscriminate use of antimicrobial drugs over the years is the main factor responsible for the appearance of bacterial resistance (Andremont, 2001). This reason imposes severe limitations on therapeutic options, implying a threat to public health (Pesarico et al. 2013).

Escherichia coli, a Gram-negative rod-shaped bacterium that can be found as a normal flora in the gastrointestinal tract of animals and humans, present pathogenic strains by the acquisition of virulence factors through transposons, plasmids, bacteriophage and / or islands of pathogenicity (Oloketuyi, Khan 2017). The level of antimicrobial resistance in *E. coli* is a useful indicator of resistance levels expected in pathogenic bacteria. antimicrobial resistant (AR) bacteria and antimicrobial resistance genes can be exchanged between the animal reservoir and the human reserve. This can be a consequence of direct contact with animals or their environment or through indirect contact through the food chain (Holvoet et al. 2013). Studies have demonstrated the involvement of oxidative stress with the antimicrobial activity of many drugs, as well as, fluoroquinolones and ciprofloxacin that have antimicrobial activity related to the production of reactive species (Albesa et al. 2004). Additionally, studies with norfloxacin, ampicillin and kanamycin A demonstrated that they were able to induce oxidative stress and cell death in *E. coli* (Choia et al. 2014).

Some substances affect the reactive oxygen species (ROS) generation in bacterial cells, and they have the capability to undergo redox cycling, resulting in the generation of superoxide anion (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2). We have described that several antibiotics induce oxidative stress in bacteria, among them ciprofloxacin (Paéz et al. 2013). Moreover, the production of reactive oxygen species (ROS), including superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical. In *E. coli* they are mainly related to respiratory chain activity (Semchyshyn et al. 2005), and the increase in reactive oxygen species (ROS) can cause oxidative stress and lead to thiol oxidation. The thiol oxidation has multiple damaging effects on cellular macromolecules. Some of these thiols form part of cellular proteins such as the OxyR transcriptional regulator,

which is transitorily activated by disulfide linkage formation under oxidative stress (Chasteen et al. 2009, Zheng et al. 1998).

To cope with chemical stress, microorganisms use various defense mechanisms involving complementary action of distinct pathways. These include the evolution of specific mechanisms targeted against a particular dangerous agent along with the recruitment of well-established general defense (Aradská et al. 2013). three different SOD enzymes encoded by *sodA*, *sodB* and *sodC* that metabolize O₂, and two catalases, hydroperoxidase I (encoded by *katG*) and hydroperoxidase II (encoded by *katE*) have been described in *E. coli*, (Cabiscol et al. 2000).

In this way, some studies demonstrate that compounds derivate from tellurium can exhibit toxic effects against the microorganism. For example, the compound oxyanion tellurite (TeO₃²⁻) is extremely toxic for most microorganisms, especially Gram-negative bacteria (Vásquez et al. 2014, Vásquez et al. 2015). It has been suggested that tellurite toxicity stems from its strong oxidizing ability, which might interfere with many cellular enzyme processes (Taylor 1999). Bacteria turn black upon exposure to tellurite as a result of the deposition of elemental tellurium (Te⁰) within the cell (Turner et al.1999). The biological effects of inorganic and organic tellurium compounds have been studied, leading to a set of interesting and promising applications (CUNHA et al. 2009).

Organotellurium compounds have been the subject of research because of their pharmacological properties (Ávila et al. 2006, Quines et al. 2013, Quines et al. 2015, Souza et al. 2009). The 2-phenylethynyl-butyltellurium (PEBT) is a telluroacetylene compound that, at low concentration, showed pharmacological effects in studies carried out on animal models of neurotoxicity and memory (Quines et al. 2013, Quines et al. 2015, Souza et al. 2009). In contrast, several studies have demonstrated that organic compounds of tellurium, including PEBT are capable of producing toxicity, which is associated with the oxidation of thiol groups of biologically active molecules, inhibiting sulfhydryl enzymes (δ -aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) And Na⁺ K⁺ ATPase) or even decreasing the glutathione concentration (Puntel et al. 2012, Puntel et al. 2013, Quines et al. 2013, Quines et al. 2015; Souza et al. 2012).

Some studies have demonstrated the involvement of oxidative stress in the antimicrobial activity of drugs. Antibiotics, such as fluroquinolones and ciprofloxacin, have antibacterial activity through reactive species (RS) (Albesa et al. 2004). In addition, it has been reported that the non-enzymatic antioxidant glutathione protected against ROS produced by ciprofloxacin in the microorganisms (Pesarico et al. 2013).

Based on the above considerations, the objective of this study work was to verify the antimicrobial activity of 2-phenylethynyl butyltellurium (PEBT) in strains of *E. coli*, as well as, to study if the antimicrobial action is related to its pro-oxidant effect.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

The compound 2-phenylethynyl-butyltellurium (PEBT) (Fig.1) was prepared according to the literature method (Comasseto et al.1996). Analysis of the ¹H NMR and ¹³C NMR spectra have shown that PEBT synthesized exhibited analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. All other chemicals were obtained from the analytical grade and from standard commercial suppliers.

2.2 Bacterial strain and growth conditions

Escherichia coli (CCBHI 7961) was obtained from Oswaldo Cruz Foundation – FIOCRUZ. The colonies were kept frozen in 10% glycerol and for each experiment were transferred to Nutrient broth and incubated for 24 hours at 37 ° C at 150 rpm, for later use.

2.3 Antimicrobial activity

2.3.1 Disk diffusion method

Antimicrobial resistance by disc diffusion technique was carried out according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2009). Isolates were first cultivated in Nutrient broth at 36 °C and inoculated in a saline solution 0.85 % till Mac Farland scale 0.5. The culture was then spread on a plate containing Agar Muller Hinton and the paper discs of +/-6mm diameter, with 10 µl of PEBT at concentration 1,28; 0,128; 0,0128 and 0,00128 mg/disk diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) were placed on the seed plates. The plates were incubated at 37°C for 24h. Halo was measured in centimeters from one extremity to the other. The negative control used was DMSO (10µl) and the positive control antibiotics used were: meropenem (MER 10), ceftazidina (CAZ 30), amiacina (AMI 30), ampilicilina (AMP 10), sulfametaxazol+trimetoprin (SUT 25), cefaclor (CFL 30), cefpime (CPM 30), gentamicina (GEN 10), ciprofloxacina (CIP 5), cefoxitina (CFO 30), amoxicilina+clavulanato (AMC 30) and cefuroxina (CRX

30). The technique was performed according to César et al (2015) and Matuschek et al (2014) with modifications. The experiments were performed in triplicate.

2.3.2 Effects of antioxidants in the disk diffusion method

To confirm if the pro-oxidant activity is related to PEBT antimicrobial activity, the agar disk diffusion technique was applied with the addition of antioxidants, GSH and AA. The *E. coli* strain was subculture in Nutrient Agar to isolate colony and incubated at 37 °C for 24 h to prepare the inoculums. The inoculum were prepared according to turbidity the 0.5 McFarland scale ($\sim 1.5 \times 10^8$ CFU/ml) in sterile saline solution. Müller-Hinton agar (MHA) with or without solutions (10 mM) of GSH or AA was poured into sterilized petri dishes, where the inoculum were seeded. The paper discs of 6 mm diameter (Laborclin, Ltda), with 10 μ l of PEBT at concentration 1,28; 0,128; 0,0128; and 0,00128 mg diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) were placed on the seed plates. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. The inhibition of the bacterial growth was determined by measuring the inhibition zone around the disks by a digital caliper. The negative control used was DMSO. The technique was performed according to Politi et al. (2011) and Goswami et al. (2006) with modifications. The experiments were performed in triplicate.

2.3.3 Broth macrodilution assay for minimum inhibitory concentration

The MIC for the compound PEBT was determined by the broth macrodilution method according to the CLSI guideline (1999, 2011). A standard bacterial inoculum of 5×10^5 colony forming units (CFU) / ml was used. Dilutions were done serially at the different concentrations of PEBT (3,84; 1, 92; 0, 96; 0, 48; 0, 24; 0, 12; 0, 06 and 0,030 mg/ml) diluted in DMSO. After dilution 17 μ g standard inoculum were added and incubated for 24 hours at 36 ° C. MIC was defined as the lowest concentration of compound that completely inhibited visible growth. The experiments were performed in triplicate. (Tetz et al. 2016, Ostrosky et al. 2008)

2.3.4 Kill- time curve assay

The kill-time curve assay method was used to investigate the bactericidal effects of the compound PEBT against *Escherichia coli* that was investigated over the MICs , $0.5 \times$ MICs and $2 \times$ MICs. Tests were performed in triplicate at 37 °C. At predetermined time points (0 and 3, 6, 9,12 and 24 h), 15 μ l of sample was removed from each test

suspension, diluted in sterile saline 0,9%, and plated on Muller-Hinton Agar plates for colony count determination. Data from triplicate runs was averaged and plotted as log CFU/ml *versus* time (h) for each time point (Santos et al. 2012).

2.4 Extracellular Reactive species (RS) assay

E.coli was cultured in Nutrient Agar, for 24^o hours at 37°C and suspended in sterile saline 0,9%, pH 7,4. Microorganism absorbance was adjusted to 0,8 OD600 and it was incubated 67µl with 10 µl of 2',7'- dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA; 10nM) and in presence of PEBT at concentration of 0.96; 1.92 and 3.84 mg/ml (corresponding to 0.5MIC, MIC and 2MIC, respectively). The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm excitation (with 488 nm emission) 30 minutes after exposure of DCHF-DA the oxidation of DCHF-Da to fluorescent diclorofluorescein (DCF) was measured for the detection of ROS in *E.coli*. RS levels were expressed as units of fluorescence, according to Socci et al. (1999) with modifications.

2.5 Incubation and preparation of lysates

Bacterial cells (50 ml) harvested from nutrient broth were centrifuged at 6000 rpm for 10 min, the supernatant was removed and the pellet formed was weighed and transferred to microtubes and resuspended in 1 ml of 0.1 mM sodium phosphate buffer. Then, the preparation were incubated for 30 minutes at 37 °C in presence of PEBT at concentration of 0.96; 1.92 and 3.84 mg/ml (corresponding to 0.5MIC, MIC and 2MIC, respectively) or DMSO (control group). After, 0.9 g of glass beads were added and the tubes were subjected to 6 cycles of 5 minutes on the vortex-type stirrer and 2 minutes in an ice bath to complete a 30 minute cycle (Medeiros et al., 2008). The debris was removed by centrifugation at 6,000 rpm for 10 min. After centrifugation, the supernatant was removed and used for biochemical assays.

2.6 Non-protein thiols levels (NPSH)

The intracellular non-protein thiols levels in *E. coli* were estimated spectrophotometry using Ellman's method (1959) with adaptations. For the preparation of the sample (200 µl supernatant) was added to 200 µl 10% TCA and vortexed for one minute and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. For non-protein thiol measurements, 50 µl of sample, 750µl of 1M TFK and 50 µl of 10 mM 5,50-dithio-2-nitrobenzoic (DTNB)

were added and the readout was at 412nm and made immediately after addition of the reagents.

2.7 Superoxide dismutase (SOD) activity

The activity of superoxide dismutase was assayed at 406 nm as the inhibition of quercetin oxidation in reaction medium containing 30 mM Tris HCl buffer (pH 9.0), 0.3 mM EDTA, 0.8 mM TEMED, 14 μ M quercetin, and 30 μ l of supernatant in a final volume of 2 ml. One unit of SOD activity was defined as the amount of supernatant protein that inhibited the maximal rate of quercetin oxidation by 50 (Kostyuk, Potapovich, 1989).

2.8 Catalase (CAT) activity

Catalase activity was measured following the method of Aebi (1984). The mix solution contained was prepared (0.25 M KPi buffer / 2.5 mM EDTA pH 7.0, 30% H₂O₂ and X-100 water triton), for the performance of the test forms used 2 ml of the prepared mix. This solution was added to the 60 μ l of supernatant and samples were monitored at 240 nm for 1 min.

2.9 Protein concentration

The protein concentration was determined by the Coomassie brilliant blue G-250 dye-binding method using bovine serum albumin as the standard (Bradford, 1976).

2.10 Statistical analysis

The data were analyzed using Prism 5 (GraphPad) software. Comparisons between the experimental and control groups were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Newman Keuls post hoc test. Descriptive statistics data were expressed as the mean(s) \pm S.D. Probability values less than 0.05 ($P < 0.05$) were considered statically significant.

3. RESULTS

3.1 PEBT causes inhibition of *E.coli* growth and the presence of GSH and AA blocks this antimicrobial effect

E.coli was sensitive to the PEBT at concentrations 1,28 mg and 0,128 mg applied in the disk, and the increase of diameter the zone inhibition was dependent on the PEBT concentration. *E.coli* is not sensitive to compound at concentrations of 0,0128 and 0,00128 mg/disk (Table 1).

The presence of 10mM GSH and AA in the growth medium rendered *E.coli* less susceptible to PEBT as demonstrated in Table 1. The presence of GSH and AA in the culture medium blocked the antimicrobial effect of PEBT.

3.2 Minimum inhibitory concentrations

Our results in minimum inhibitory concentration indicates that the lowest concentration of PEBT capable of inhibiting *E. coli* growth was 1.92 mg/ml.

3.3 Kill- time curve

E. coli was exposed to PEBT for up to 24 hours in order to determine the time-response effect on the compound. After 9 hours of treatment with PEBT, no viable cells of *E. coli* were observed (Figure 2) independent of the concentration tested.

3.4 PEBT exposure increases oxygen reactive species (ROS) production

Total extracellular reactive species (RS) levels increased significantly after exposure of *E. coli* to PEBT at different concentrations when compared to the control group (figure 3).

3.5 PEBT exposure decreases non-protein thiols levels

It was observed a significant reduction in the levels of non-protein thiols on the *E.coli* cells that were exposed to the PEBT at different concentrations (Fig. 4), when compared to the control.

3.6 PEBT exposure decreases superoxide dismutase and catalase activities

Exposure of *E.coli* cells to the PEBT at different concentrations resulted in a

decrease on superoxide dismutase (Fig. 5A) and catalase (Fig.5B) activities.

4. DISCUSSION

Tellurium compounds have proven toxic effects for most microorganisms, especially Gram-negative bacteria (Vásquez et al. 2014; Vásquez et al.2015) In our study, we used the telluroacetylene compound PEBT to verify its antimicrobial activity against *E. coli* strains. Our results demonstrate the antimicrobial activity of PEBT against *E. coli* bacterial strains. In addition, the results suggest the pro-oxidant activity as a possible mechanism of action for this organotellurium compound, since it acts causing the generation of ER, oxidation of thiol groups and reduction of antioxidant enzymes SOD and CAT, producing cellular damage and consequently cell death.

The antimicrobial evaluation of the PEBT compound was positive, since it indicates that the compound has an inhibitory and consistent effect against strains of *E. coli*. This assertion is made based on the tests of diffusion disk, minimum inhibitory concentration (MIC) and the survival curve. In the evaluation of the diffusion disc test, PEBT at concentrations of 0.128 and 1.28mg /disc produces the zones of inhibition, demonstrating that *E. coli* was susceptible to this compound. This study is important since bacteria such as *E. coli* have shown an impressive increase in resistance to antibiotics, being related to 95% of infections in health units (CARDOSO, 2017). In other studies with tellurium compounds, they were able to show antibacterial activity against Gram (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) and mainly gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella sp.*) (Soni et al. 2005, Vásquez et al. 2014).

Additionally, PEBT had a bactericidal action against *E. coli* at 1,92 mg/ml, which confirms the susceptibility of this bacterial strain to the compound, besides that, in kill- time curve assay, PEBT (0,96 mg/ml, 1,92 mg/ml e 3,84 mg/ml) had bactericidal activity, evident by the significant reduction in microbial counting, resulting in inviability of *E.coli* cells after 9 hour of exposure to the compound . We suggest that both bactericidal and bacteriostatic actions are associated with compound concentration and time of exposure to PEBT.

An important result of our study is the increase in the production of reactive species (RS) in *E. coli* cells treated with PEBT at different concentrations (0.96; 1.92 and 3.84 mg/ml), the concentrations that represent 0,5 MIC, MIC and 2MIC. It is well known that increased levels of ROS can lead to damage to cellular components, including DNA, membrane lipids and proteins. In addition, we observed a decrease in

NPSH levels in *E. coli* exposed to PEBT. Together, these two results clearly demonstrate the pro-oxidant effect of PEBT in this study. Previous studies have shown that PEBT has the ability to catalytically oxidize glutathione sulfhydryl groups or different proteins or enzymes (Quines et al. 2013, Quines et al. 2015, Souza et al. 2009, Souza et al. 2012). This effect can lead to cellular toxicity and it is possibly associated to antimicrobial activity of PEBT observed by us. In this view, other authors demonstrated that exposure of *E. coli* cell to tellurium compounds causes a decrease in ATP levels, increase on generation of reactive oxygen species, carbonylation of proteins, and decrease in the reduced thiol content of the cell (Imlay 2008, Imlay 2013, Turner et al. 1999, Vásquez et al. 2015, Vásquez et al. 2014). Being the loss of content of RSH (thiol oxidation) associated with toxicological effects and cell death (Puntel et al. 2012, Puntel et al. 2013, Tuner et al. 2009).

In studies with *E. coli*, it has been demonstrated that it can react efficiently in the presence of substances that alter O₂ levels due to its excellent activity of superoxide dismutase SOD (ALBESA et. al, ARADSKÁ et al, 2013, CHASTEEN et. al, 2009). In fact, *E. coli* has three different SOD enzymes encoded by *sodA*, *sodB* and *sodC* that metabolize O₂, and two catalases, hydroperoxidase I (encoded by *katG*) and hydroperoxidase II (encoded by *katE*) involved in the detoxification of intracellular H₂O₂ (Keele 1970; Loewen 1985). The various responses of the SOD and CAT activity to oxidative stress showed in other studies suggest that oxidative stress is one of the most important aspects among many aspects of stress (Lin et al. 2009). In our study with strains of *E. coli* it is possible to observe that SOD and CAT activities were decreased in presence of PEBT at different concentration. In fact, the activity of these enzymes is closely linked to the elevated levels of RS and previous studies have shown that the SOD and CAT are considered to be a key enzyme that defends against oxidative stress (Lin et al. 2009; Lü et al. 2008; Santos et al. 2012). In this way, the decrease on antioxidant activity of the SOD and CAT observed on our study can lead to an unsatisfactory enzymatic response, resulting in the poor defense of the cell to oxidative insults and lead the cell to death.

To confirm the involvement of pro-oxidant activity in the antimicrobial effect of PEBT we used GSH and AA, two well-know antioxidants, in culture medium of *E. coli*. We observed that the presence of GSH and AA in medium was effective in decreasing the inhibition zone caused by PEBT. It is well know that GSH is important defense that removes oxygen radicals and some studies demonstrate that antioxidants, like GSH and

AA, can protect *E. coli* mutants against pro-oxidant compounds (Goswami et al. 2006; Pesarico et al, 2013). The present results are consistent with other that reported the association between oxidative stress and antimicrobial effect of ciprofloxacin (Becerra, Albesa 2002; Goswami et al. 2006), norfloxacin, ampicillin and kanamycin A (Choia et al. 2014) and 2,2' dithienyl diselenide (Pesarico et al. 2013).

The results of this study revealed that PEBT has bactericidal and bacteriostatic actions against *E. coli*. Additionally, we can confirm that the pro-oxidant activity of the PEBT compound is involved in its antimicrobial effect. PEBT acts to oxidize the thiol groups of biomolecules, consequently raising the levels of reactive species and decreasing activity of SOD and CAT. These alterations together lead to a reduced decomposition of free radicals in the *E coli*, causing cellular damage and consequently cell death.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge financial support received from FAPERGS, CNPq (Universal 483529/2013-3) and UNIPAMPA.

REFERENCES

Aebi H. Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology. 1984;105:121-126

Albesa I, Becerra MC, Battan PC, Paez PL. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. Biochem Biophys Res Commun 2004; 317:605–9.

Andremont A. The future control of bacterial resistance to antimicrobial agents. AmJ Infect Control 2001; 29:256–8.

Aradská J, Smidák R, Turkovicová L, Turna J, Lubec G. Proteomic Differences between Tellurite-Sensitive and Tellurite-Resistant *E.coli*. PLOS ONE 2013; 8.

Ávila DS, Beque MC, Folmer V, Braga AL, Zeni G, Nogueira CW, Soares FA, Rocha JB. Diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate: an organotellurium compound with low toxicity. Toxicology. 2006; 224:100–107.

Becerra MC; Albesa I. Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Communications* 2002. 4:1003-1007

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248–254

Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiol* 2000; 3: 3-8.

Chasteen TG, Fuentes DE, Tantaleán JC, Vásquez CC. Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. *FEMS Microbiol* 2009: 820-832.

Choi H, Yanga Z, Weisshaar J. C. Single-cell, real-time detection of oxidative stress induced in *Escherichia coli* by the antimicrobial peptide CM15. *PNAS* 2015; 112: E303–E310.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. Wayne, PA: CLSI; 2009.

Comasseto JV, Menezes PH, Stefani HA, Zeni G, Braga AL.. Show more. Addition of hydrogenhalides to acetylenic selenides. Synthesis of 1-halo-1-selenoalkenes. *Tetrahedron* 1996; 52: 9687-702.

Ellman, GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1959; 82: 70-77.

Goswami M, Mangoli SH, Jawali N. Involvement of Reactive Oxygen Species in the Action of Ciprofloxacin against *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:949-54.

Holvoet K, Sampers I, Callens B, Dewulf J, Uyttendaele M. Moderate Prevalence of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Lettuce, Irrigation Water, and Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 2013; 79: 6677–6683.

Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* 2008; 77: 755–776.

Imlay JA. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Rev Nat Microbiol* 2013; 11:443–454.

Keele BB, McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B: a new manganese-containing enzyme. *J Biol Chem* 1970; 245:6176-6181.

Kostyuk VA, Potapovich AI. Superoxide driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. *Biochem. Int* 1989; 19:117–1124

Lin X, Xu X, Yang C, Zhao Y, Feng Z, Dong Y. Activities of antioxidant enzymes in three bacteria exposed to bensulfuron-methyl. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. p.1899-1904. 2009

Loewen PC, Switala J, Triggs-Raine L. Catalase HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently. *Arch Biochem Biophys* 1985; 243:144-149.

Lü Z, Sang L, Li Z, Min H. Catalase and superoxide dismutase activities in a *Streptotrophomonas maltophilia* WZ2 resistant to herbicide pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2008; 72: 136-143.

Matuschek E, Brown DF, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin. Microbiol Infect* 2014. 20: 255–266.

Medeiros FO, Alves FG, Lisboa CR, Martins DR, Burkert CAV, Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. *Química Nova* 2008; 31:336-339

Oloketuyi SF, Khan F. Strategies for Biofilm Inhibition and Virulence Attenuation of Foodborne Pathogen-*Escherichia coli* O157:H7. *Current Microbiology* 2017; 1-13.

Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima ME, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2008; 18: 301-307.

Páez P L, Bazán C M, Bongiovanni M E, Toneatto J, Albesa I, Becerra M C, Argüello G A. Oxidative stress and antimicrobial activity of chromium(III) and ruthenium(II) complexes on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *BioMed Research International* 2013; 7.

Pesarico AP, Sartori G, dos Santos CFA, Neto JSS, Bortolotto V, Santos RCV, Nogueira CW, Prigol, M. 2,2-Dithienyl diselenide pro-oxidant activity accounts for antibacterial and antifungal activities. *Microbiological Research* 2013; 168: 563-568

Politi ASF, Mello PCJ, Migliato FK, Neupomuceno ALA, Moreira DRR, Pietro CLRR. Antimicrobial, Cytotoxic and Antioxidant Activities and Determination of the Total Tannin Content of Bark Extracts *Endopleura uchi*. *International Journal of Molecular Sciences* 2011; 12: 2757-2768.

Puntel RL, Roos D, Seeger RL, Rocha JB. Organochalcogens Inhibit Mitochondrial Complexes I and II in Rat Brain: Possible Implications for Neurotoxicity. *Res Neurotox* 2012; 24:109-18.

Puntel RL, Roos D, Seeger RL, Rocha JB. Mitochondrial inhibition by different organochalcogens. *Toxicology in vitro* 2013; 27:59-79.

Quines CB, Rosa SG, Neto JS, Zeni G, Nogueira CW. Phenylethynyl-butyltellurium inhibits the sulfhydryl enzyme Na⁺, K⁺ ATPase: an effect dependent on the tellurium atom. *Bid Trace Elem Res* 2013; 155:261-266.

Quines CB, Rocha JT, Pesarico AP, Neto, JS. Zeni G, Nogueira CW. Involvement of the serotonergic system in the anxiolytic-like effect of 2-phenylethynyl-butyltellurium in mice. *Behavioural Brain Research* 2015. 277:221-227.

Santos RC, dos Santos Alves CF, Scheneider T, Lopes LQ, Aurich C, Giongo JL, et al. Antimicrobial activity of Amazonian oils against *Paenibacillus* species. *J Invertebr Pathol* 2012; 8:109:265.

Semchyshyn H, Bagnyukova T, Storey KB, Lushchak V. Hydrogen peroxide increases the activities of soxRS regulon enzymes and the levels of oxidized proteins and lipids in *Escherichia coli*. *Cell Biology International* 2005; **29**: 898-902.

Socci DJ, Bjugstad KB, Jones HC, Pattisapu JV, Arendash GW. Evidence that oxidative stress is associated with the pathophysiology of inherited hydrocephalus in the H-Tx rat model. *Exp Neurol* 1999; 155:109–17.

Soni D, Gupta KP, Humar Y, Chandrashekharn TG. Antibacterial activity of some unsymmetrical diorganyltellurium (IV)dichlorides. *Journa of Biochemistry e Biphyses* 2005; 42:398-400.

Souza AC, Luchese C, Neto JS, Nogueira CW. Antioxidant effect of a novel class of telluroacetilene compounds studies in vitro and in vivo. *Life Science* 2009; 351-357.

Souza AC, Acker CI, Gai B M, Neto JS, Nogueira CW. 2-Phenylethynyl-butyltellurium improves memory in mice. *Neurochemistry International* 2012; 60: 409-414.

Taylor ,D. E. Bacterial tellurite resistance. *Trends Microbiol* 1999; 7: 111-115.

Tetz G, Vikina D, Tetz V. Antimicrobial activity of mul-1867, a novel antimicrobial compound, against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2016; 15-18.

Turner RJ, Weiner JH, Taylor DE. Tellurite-mediated thiol oxidation in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 1999, 145: 2549-2557

Vásquez WA, Lagunas MJ, Arenas FA, Pinto CA, Cornejo FA, Wansapura PT, Appuhamilage GA, Chastenn TG, Vásquez CC. Tellurite reduction by *Escherichia coli* NDH-II dehydrogenase results in superoxide production in membranes of toxicant-exposed cells. *Biometals* 2014. 27:237–246.

Vásquez WA, Lagunas MJ, Cornejo FA, Pinto CA, Arenas FA, Vásquez CC. Tellurite-mediated damage to the *Escherichia coli* NDH-dehydrogenases and terminal oxidases in aerobic conditions. Archives of Biochemistry and Biophysics 2015; 566: 67-75.

Figure captions

Figure 1: Chemical structure of 2-phenylethynyl butyltelurium (PEBT).

Figure 2: The time-course of different concentrations of PEBT after exposure to *E.coli* 0,5MIC (0.5-fold minimum inhibitory concentration), MIC (one fold minimum inhibitory concentration) and 2MIC (two fold minimum inhibitory concentration). Data are reported as mean \pm S.D. and were analyzed by one-way ANOVA, followed by Newman–Keuls test when appropriated.

Figure 3: Total extracellular RS in *E.coli* exposed to PEBT. Data are reported as mean \pm S.D. and were analyzed by one-way ANOVA, followed by Newman–Keuls test when appropriated. *Numerical values are significantly different from the values of the corresponding control ($p < 0.05$).

Figure 4: Levels of non-protein thiols (NPSH) in *E. coli* exposed to PEBT. Data are reported as mean \pm S.D. and were analyzed by one-way ANOVA, followed by Newman–Keuls test when appropriated. *Numerical values are significantly different from the values of the corresponding control ($p < 0.05$).

Figure 5: Activity of superoxide dismutase (A) and catalase (B) in *E. coli* exposed to PEBT. Data are reported as mean \pm S.D. and were analyzed by one-way ANOVA, followed by Newman–Keuls test when appropriated. *Numerical values are significantly different from the values of the corresponding control ($p < 0.05$).

Figures

Figure 1

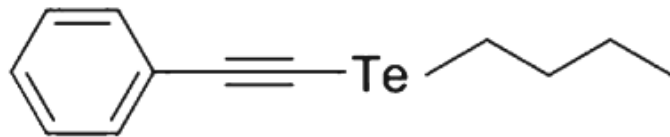


Figure 2

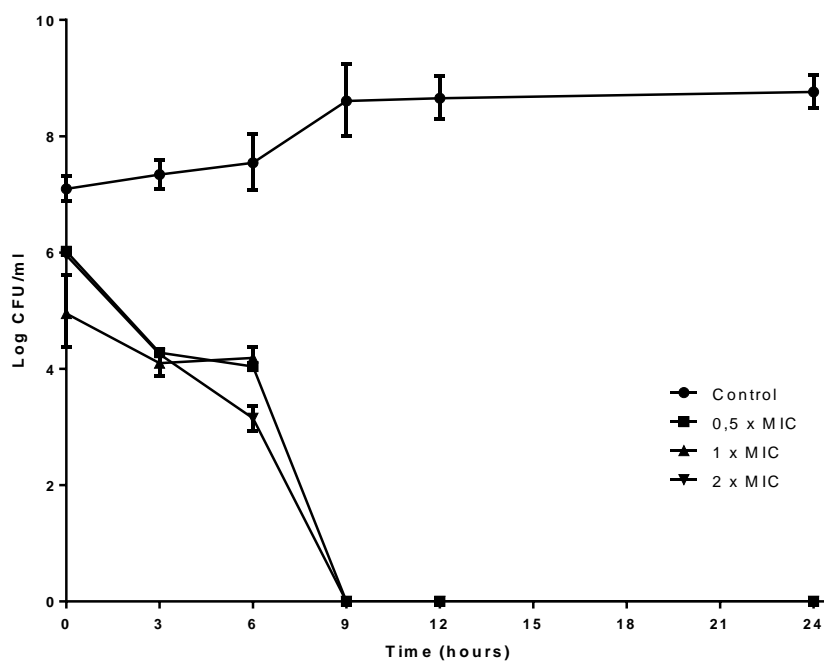


Figure 3

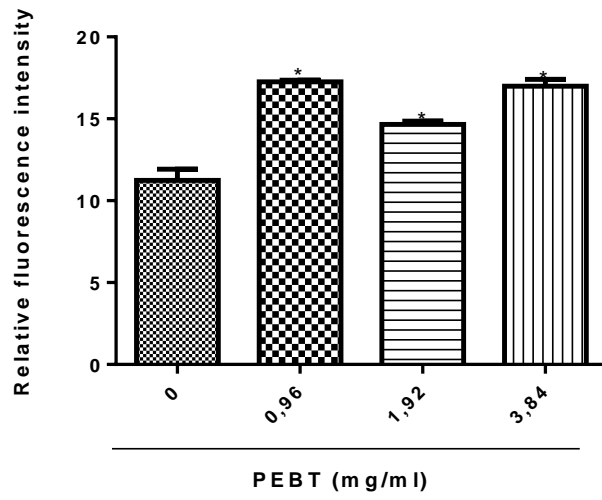


Figure 4

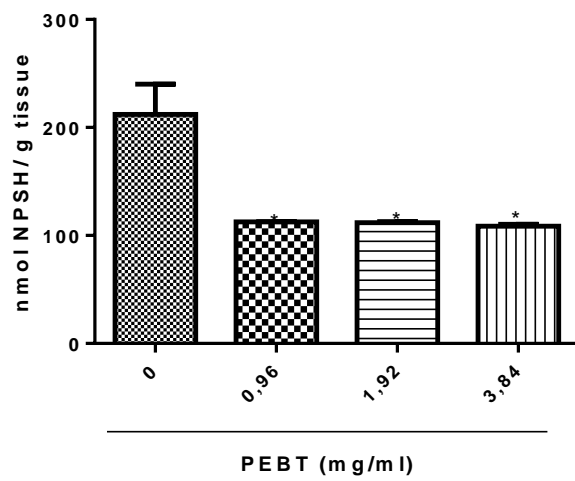
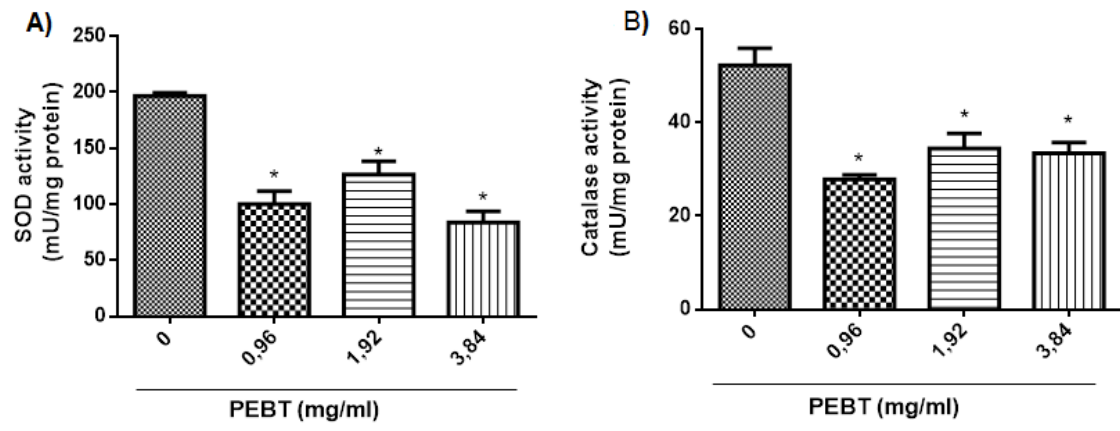


Figure 5



Tables

Table 1. Effect of glutathione (GSH) or ascorbic acid (AA) in PEBT inhibition of *E. coli* growth.

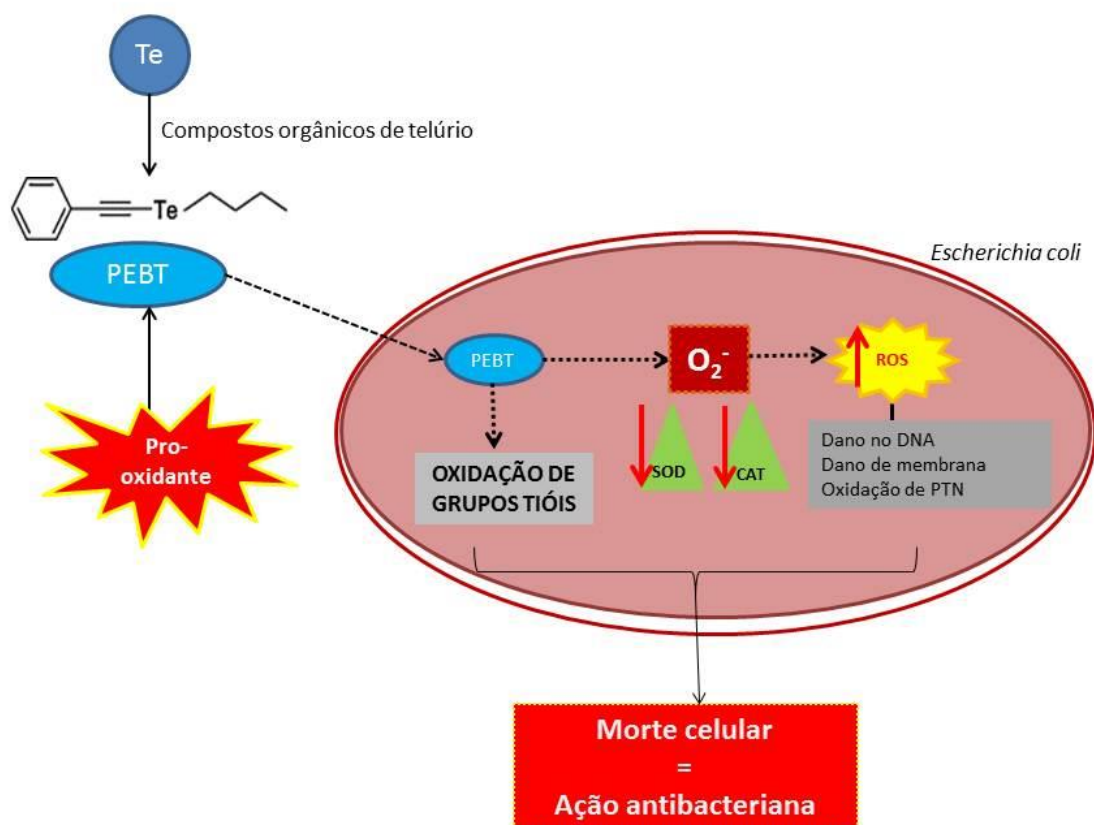
PEBT (mg/disc)	Diameter of zone inhibition (nm) (mean±S.D.)		
	Medium	Medium +GSH	Médium +AA
0	-	-	-
0,00128	-	-	-
0,0128	-	-	-
0,128	1,067±0,3055*	-	-
1,28	1,267±0,3055*	-	-

Data are reported as mean ± S.D. and it was analyzed using one-way ANOVA, followed by Newman-Keuls test when appropriated. *Numerical values are significantly different from the values of the corresponding control ($p < 0.05$).

5. CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível demonstrar pela primeira vez, que o composto orgânico de telúrio 2-feniletinil-butiltelúrio (PEBT) possui atividade antimicrobiana frente a cepas de *E. coli*, e sugerimos que seu mecanismo de ação ocorre através da oxidação de grupos tióis resultando no aumento da produção de espécies reativas extracelular e concomitantemente na diminuição da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, resultando em uma resposta antioxidante, o que pode causar aumento nas espécies reativas de oxigênio, danos e morte celular.

Figura 6 Esquema de ação do composto PEBT, em *E. coli*.



Fonte: arquivo próprio (2017)

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREMONT A. The future control of bacterial resistance to antimicrobial agents. **AmJ Infect Control**. vol.29.p. 256–8, 2001.

ALBESA I, BECERRA MC, BATTAN PC, PAEZ PL. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. **Biochem Biophys Res Commun**. vol.317. p. 605–9, 2004.

ÁVILA DS, BEQUE MC, FOLMER V, BRAGA AL, ZENI G, NOGUEIRA CW, SOARES FA, ROCHA JB. Diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate: an organotellurium compound with low toxicity. **Toxicology**. 2006; 224:100–107.

ARADSKÁ J, SMIDÁK R, TURKOVICOVÁ L, TURNA J, LUBEC G. Proteomic Differences between Tellurite-Sensitive and Tellurite-Resistant *E.coli*. **PLOS ONE** 2013; 8.

BAEZ A, SHILOACH J. *Escherichia coli* avoids high dissolved oxygen stress by activation of *soxRS* and manganese superoxide dismutase. **Microbial Cell Factories**. 12-23, 2013

BARBOSA, N. B. V. et al. Effect of organic forms of selenium on δ -aminolevulinate dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. **Toxicol Appl Pharmacol**, 149, 243-253, 1998.

BLACK, J G. Microbiologia Fundamentos e Perspectivas. **Editora Guanabara Koogan**. 4ª Edição. 2002.

BLAIS, F. X.; ONISCHUK, R. T.; DE MEIO, R. H. Hemolysis by tellurite. I. The tellurite test for hemolysis. **J Am Osteopaht Assoc**, 73, 207-210, 1972.

BIRBEN E, SAHINER U, SACKESEN C, ERZURUM S, KALAYCI O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense . **Journal World Allergy Organ**. vol. 5.p. 9–19, 2012.

CABISCOL E, TAMARIT J, ROS J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **Internatl Microbiol** vol.3.p.3-8, 2000

CALDERO'N, et.al. Tellurite-mediated disabling of [4Fe-4S] clusters of Escherichia coli dehydratases. **Microbiology**, 155, 1840-1846, 2009.

CHOIA H, YANGA Z, WEISSHAAR J. C. Single-cell, real-time detection of oxidative stress induced in Escherichia coli by the antimicrobial peptide CM15. **PNAS** 2015; 112: E303-E310.

CHASTEEN TG, FUENTES DE, TANTALEÁN JC, VÁSQUEZ CC. Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. **FEMS Microbiol** 2009: 820-832.

CUNHA R.O.R, GOUVEA I, JULIANO L.A glimpse on biological activities of tellurium compounds. **Annals of theBrazilian Academy of Sciences**.Vol.3. p393-407, 2009.

EZRATY B, GENNARIS A, BARRAS F, COLLET J F. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**. vol.15.p.385-396, 2017.

FARR SB, KOGOMA TO. Oxidative Stress Responses in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. **Microbiological reviews**. Vol. 55.p. 561-585, 1991.

IMLAY JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. **Annu Rev Biochem** 2008; 77: 755-776.

IMLAY JA. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. **Rev Nat Microbiol** 2013; 11:443-454.

LIN X, XU X, YANG C, ZHAO Y, FENG Z, DONG Y. Activities of antioxidant enzymes in three bacteria exposed to bensulfuron-methyl. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. p.1899-1904. 2009

LOUREIRO, R. J., ROQUE F., RODRIGUES A. T., HERDEIRO M. T., RAMALHEIRA E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **REV. PORT. Saúde Pública**. Vol.34. Pag.77–84, 2016

KASHMIR Z.N, MANKAR S.A. Free radicals and oxidative stress in bactéria. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. vol. 3.p.34-40, 2014.

KLAMAN, D. Organotellurium compounds. In: *Methods of Organic Chemistry*. **New York:George Thieme Verlag Stuttgart**, 1990.

MARTINDALE J L, HOLBROOK N J.Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. **Journal of cellular physiology**. Vol.192.p.1–15,2002.

MADIGAN M, MARTINKO J M, DUNLAP P V, CLARK D P. Microbiologia de Brock. **Editora Artemed**. 12ª Edição, 2010.

MALTMAN C, DONALD L J, YURKOV V .Tellurite and Tellurate Reduction by the Aerobic Anoxygenic Phototroph *Erythromonas ursincola*, Strain KR99 Is Carried out by a Novel Membrane Associated Enzyme. **MPDI Microorganisms**. 2017.

MCCORMICK ML, BUETTNER GR, BRITIGAN BE. Endogenous Superoxide Dismutase Levels Regulate Iron-Dependent Hydroxyl Radical Formation in *Escherichia coli* Exposed to Hydrogen Peroxide. **Journal of bacteriology**. Vol. 180. p. 622–625, 1998

NIES D. Microbial heavy-metal resistance. **Appl Microbiol Biot**. Vol.57.p.730-750, 1999.

NOGUEIRA, C.W. et al. Organochalcogens effects on δ -aminolevulinatase activity from human erythrocytic cells in vitro. **Toxicology**, 191, 169-178, 2003.

NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chemical Reviews**, v. 104, p.6255-6285, 2004.

PAUL S M.; MYTELKA D S.; DUNWIDDIE C T.; PERSINGER C C.; MUNOS B H.; LINDBORG S R.; SCHACH A L. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. **Nature Reviews Drug Discovery**. vol 9. p. 203-214, 2010.

PESARICO AP, SARTORI G, DOS SANTOS CFA, NETO JSS, BORTOLOTTI V, SANTOS RCV, NOGUEIRA CW, PRIGOL, M. 2,2-Dithienyl diselenide pro-oxidant activity accounts for antibacterial and antifungal activities. **Microbiological Research**. vol.168.p.563-5682013

PRIYADARSINI, K.I. KUNWAR, A., Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. **Journal of Medical & Allied Sciences**. 53 - 60. 2011.

PIMENTEL, I. A. S. et al. In vitro and in vivo activity of an organic tellurium compound on Leishmania (Leishmania) chagasi. **Plos One**, **7**, e48780, 2012.

PUNTEL RL, ROOS D, SEEGER RL, ROCHA JB. Organochalcogens Inhibit Mitochondrial Complexes I and II in Rat Brain: Possible Implications for Neurotoxicity. **Res Neurotox**. vol.24.p.109-18, 2012

PUNTEL RL, ROOS D, SEEGER RL, ROCHA JB. Mitochondrial inhibition by different organochalcogens. **Toxicology in vitro**. vol.27.p.59-79,2013.

QUINES CB, ROSA SG, NETO JS, ZENI G, NOGUEIRA CW. Phenylethynyl-butyltellurium inhibits the sulfhydryl enzyme Na⁺, K⁺ ATPase: an effect dependent on the tellurium atom. **Bid Trace Elem Res** 2013; 155:261-266.

QUINES CB, ROCHA JT, PESARICO AP, NETO, JS. ZENI G, NOGUEIRA CW. Involvement of the serotonergic system in the anxiolytic-like effect of 2-phenylethynyl-butyltellurium in mice. **Behavioural Brain Research** 2015. 277:221-227.

OLCHANHESKI, L. R. et al. Mechanisms of Tolerance and High Degradation Capacity of the Herbicide Mesotrione by *Escherichia coli* Strain DH5- α . **Plos ONE**. Vol 9, 2014

OLOKETUYI, S. F.; KHAN, F. Strategies for Biofilm Inhibition and Virulence Attenuation of Foodborne Pathogen-*Escherichia coli*O157:H7. **Current Microbiology**. p.1-13, 2017.

REINOSO CA, AUGER C, APPAMA V D, VÁSQUES CC. Tellurite-exposure *Escherichia coli* exhibits intracellular α -ketoglutarate. **Biochemical and Biophysical Research**. 241. p.721-726, 2012.

SILVA I.M. M, J. NETO E, SILVA R.M, N. SILVA L, MAGALHÃES J, BALIZA M. Genotypically characterization of *Escherichia coli* isolates from poultry. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. vol.63. p.333-339, 2011.

SONI, D; Gupta PK; Kumar Y; Chandrashekhar TG. Antibacterial activity of some unsymmetrical diorganytellurium(IV) dichlorides. **Indian J Biochem Biophys**. Vol.6.p. 398-400, 2005.

SOUZA AC, LUCHESE C, NETO JS, NOGUEIRA CW. Antioxidant effect of a novel class of telluroacetilene compounds studies in vitro and in vivo. **Life Science** 2009; 351-357.

SOUZA AC, ACKER CI, GAI B M, NETO JS, NOGUEIRA CW. 2-Phenylethynyl-butyltellurium improves memory in mice. **Neurochemistry International** 2012; 60: 409-414.

TAYLOR ,D. E. Bacterial tellurite resistance. **Trends Microbiol**. Vol. 7, Pag. 111-115.1999

TORTORA G J, FUNKE B R, CASE CL. Microbiologia. **Editora Artmed**. 10^o Edição. 2012.

VÁSQUEZ WA, LAGUNAS MJ, ARENAS FA, PINTO CA, CORNEJO FA, WANSAPURA PT, APPUHAMILAGE GA, CHASTENN TG, VÁSQUEZ CC. Tellurite reduction by *Escherichia coli* NDH-II dehydrogenase results in superoxide production in membranes of toxicant-exposed cells. **Biometals**. Vol.27.p.237–246. 2014

VÁSQUEZ WA, LAGUNAS MJ, CORNEJO FA, PINTO CA, ARENAS FA, VÁSQUEZ CC. Tellurite-mediated damage to the *Escherichia coli* NDH-dehydrogenases and terminal oxidases in aerobic conditions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. Vol.566.p.67-75, 2015.

WANG X, ZHAO X. Contribution of Oxidative Damage to Antimicrobial Lethality. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. vol. 53. p. 1395–1402, 2009.

WRIGHT GD. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**. Vol.57.p.1451-1470, 2005

ZHANG Y, MENG D, WANG Z, GUO H, WANG Y, WANG X, DONG X. Oxidative stress response in atrazine-degrading bacteria exposed to atrazine. **Journal of Hazardous Materials**. Vol. 229–230, 30 Pag. 434-438, 2012