

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: “Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão”



EFEITO DO EUGENOL EM *Staphylococcus aureus* PORTADORA DA BOMBA DE EFLUXO MsrA

Suieny Rodrigues Bezerra¹, Antonio Henrique Bezerra², Zildene de Sousa Silveira³, Jessyca Nayara Mascarenhas Lima⁴, Alisson Justino Alves da Silva⁵, Maria Apoliana Costa dos Santos⁶, Francisco Assis Bezerra da Cunha⁷

Resumo: Devido ao uso exagerado de antibióticos novas cepas bacterianas adquiriram resistência a diversas classes de antibióticos. Em *Staphylococcus aureus* um dos principais mecanismos de resistência são as ou Bombas de Efluxo, responsáveis por expulsar antibióticos do seu interior citoplasmático, sendo necessárias novas estratégias para o controle da multirresistência de patógenos infecciosos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do Eugenol na cepa RN4220 de *S. aureus* portadora da bomba de efluxo MsrA. Foram realizados ensaios de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do composto através do método de microdiluição em caldo, e verificação da inibição da bomba de efluxo, analisando a capacidade do Eugenol de reduzir a CIM da Eritromicina e do Brometo de Etídio (EtBr). O Eugenol apresentou atividade antibacteriana direta contra a cepa testada, entretanto, quando associado com o antibiótico Eritromicina houve um efeito antagônico. O mesmo efeito foi observado na associação do Eugenol com o Brometo de Etídio, resultando no aumento da CIM do mesmo, indicando que o composto não foi eficaz na reversão do mecanismo de efluxo ativo.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. Bomba de efluxo. Compostos naturais.

1. Introdução

O uso desenfreado de antibióticos contribui de forma significativa para a seleção de bactérias multirresistentes, tornando-se um grande problema de saúde pública (OLIVEIRA *et al.*, 2015). *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva que está presente na microbiota da pele e mucosa nasal, no entanto, é uma das principais responsáveis por causar infecções hospitalares, além de apresentar mecanismos de resistência a diversas classes de antibióticos (JENUL; HORSWILL, 2018). A resistência bacteriana se dá por meio de alguns mecanismos, sendo o mecanismo de bombas de efluxo, um dos mais descritos

- 1 Universidade Regional do Cariri, email: suieny.urca@gmail.com
- 2 Universidade Regional do Cariri, email: henriquebezerra.urca@gmail.com
- 3 Universidade Regional do Cariri, email: zildenesousa15@gmail.com
- 4 Universidade Regional do Cariri, email: jessyca.lima@urca.br
- 5 Universidade Regional do Cariri, email: alisson12justino@gmail.com
- 6 Universidade Regional do Cariri, email: apolianacosta14@gmail.com
- 7 Universidade Regional do Cariri, email: cunha.urca@gmail.com

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: “Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão”



na literatura, visto que através desses mecanismos, as bactérias conseguem expulsar antibióticos e outros substratos para fora do citoplasma bacteriano. Isso ocorre através da presença de genes que acionam as proteínas de efluxo acopladas na membrana celular, em alguns outros casos, o plasmídeo é responsável por ativar as proteínas de efluxo (SCHINDLER; KAATZ, 2016). Nesse contexto, torna-se urgente a necessidade de novas alternativas para reduzir a multirresistência aos antibióticos (BAKKALI *et al.*, 2008). Dessa forma, novas alternativas são constantemente estudadas, como a introdução de compostos naturais, como óleos essenciais e terpenos, devido sua capacidade de modificar mecanismos de resistência microbiana como os presentes em *S. aureus* (SIDDIQUE *et al.*, 2019). O Eugenol é um terpeno, descrito na literatura por possuir potencial anti-inflamatório, antifúngico, antioxidante, eficaz contra células cancerígenas, entre outros efeitos (FANGJUN; ZHIJIA, 2018; PURKAIT *et al.*, 2020). Relatórios anteriores já evidenciaram o efeito antibacteriano do Eugenol contra cepas de *S. aureus*, além de outras cepas Gram-positivas e Gram negativas, sendo assim, um composto promissor a ser estudado como uma estratégia para o controle da multirresistência, devido sua capacidade de degradar a membrana celular de patógenos infecciosos (DAS *et al.*, 2016; PALANIAPPAN; HOLLEY, 2010).

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do composto Eugenol contra a cepa RN4220 de *Staphylococcus aureus* portadora da bomba de efluxo MsrA.

3. Metodologia

Cepas Bacterianas e Meios de Culturas

A cepa de *S. aureus* utilizada foi: RN4220 que expressa a proteína de efluxo MsrA que expulsa antibióticos e outras drogas, como corantes intercalantes de DNA. Para realização dos testes microbiológicos foram utilizados os meios de cultura: *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco) preparado de acordo com o fabricante e *Brain Heart Infusion* (BHI, Acumedia Manufacturers Inc.) preparado na concentração de 10 %.

Substâncias

Todas as substâncias foram adquiridas pela Sigma Aldrich Brasil e Aché Laboratórios Farmacêuticos. O antibiótico Eritromicina, bem como o Eugenol, foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) e em água estéril. A proporção de DMSO utilizada foi inferior a 5 %. A Clorpromazina (CPZ) e o Brometo de Etídio foram dissolvidos em água destilada estéril, enquanto o Cianeto de Carbonila m-Clorofenil-Hidrazona (CCCP) foi dissolvido em metanol/água (1:3, v/v). Todas as substâncias foram diluídas a concentração padrão de 1024 µg/mL.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada para o composto isolado Eugenol de acordo com o método de microdiluição em caldo proposto por (CLSI, 2015) com adaptações. Os inóculos foram preparados 24 horas após a semeadura das cepas.

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão"



Posteriormente os microtubos foram preenchidos com 1440 μL de BHI e 160 μL do inóculo. As placas foram então preenchidas com 100 μL da solução final. A microdiluição foi realizada com 100 μL em diluições seriadas até a última cavidade (1:1), a penúltima fileira da placa foi utilizada como controle de crescimento e a última com controle de esterilidade. As concentrações dos compostos variaram de 512 $\mu\text{g/mL}$ até 0,25 $\mu\text{g/mL}$. Após 24 h de incubação, as leituras foram realizadas pela adição de Resazurina (7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one). Os testes foram realizados em triplicata.

Avaliação da Inibição da Bomba de Efluxo por Modificação da CIM do Antibiótico Eritromicina e do Brometo de Etídio

Para observar se o Eugenol atua como potencial inibidor da bomba de efluxo MsrA, um estudo comparativo entre os efeitos dos inibidores padrão da bomba de efluxo foi utilizado, avaliando a capacidade de ambos na diminuição da CIM do Brometo de Etídio e do antibiótico Eritromicina. Os EPIs padrões CCCP e o CPZ, foram utilizados para comprovar a expressão da bomba MsrA pela cepa testada. A inibição da bomba de efluxo foi testada usando uma concentração sub-inibitória (CIM/8) dos EPIs e do Eugenol. Nos testes, 160 μL de cada inóculo bacteriano suspenso em solução salina, correspondente a 0.5 da escala de McFarland, foram adicionados juntamente com EPIs e Eugenol (CIM/8) e completados com BHI. Estes foram então transferidos para placas de microdiluição de 96 poços, a qual foram adicionados 100 μL do antibiótico ou do EtBr em diluições seriadas (1:1) que variaram de 512 a 0.25 $\mu\text{g/mL}$. A penúltima fileira da placa foi utilizada como controle de crescimento e a última com controle de esterilidade. Por fim, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e o crescimento bacteriano foi avaliado pelo uso da Resazurina (7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one). A CIM foi definida como a menor concentração em que houve inibição do crescimento bacteriano, tanto com Eritromicina como com Brometo de Etídio. A CIM dos controles foi avaliada utilizando o apenas antibiótico Eritromicina e o Brometo de Etídio (CLSI, 2015).

Análise Estatística

Os resultados dos testes foram expressos como a média geométrica. A análise de hipótese estatística foi aplicada usando *Two-Way ANOVA*, seguido do teste *post hoc* de Bonferroni, usando o software GraphPad Prism 7.0.

4. Resultados

Através dos ensaios de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram obtidos resultados de CIM de 512 $\mu\text{g/mL}$ para Eritromicina e de 512 $\mu\text{g/mL}$ para o Eugenol, o que evidencia uma atividade antibacteriana direta do Eugenol contra a cepa RN4220 de *S. aureus*. Os resultados, demonstraram efeito antagônico resultante da associação do Eugenol com o antibiótico Eritromicina, sendo observado um aumentando da CIM do antibiótico de 512 $\mu\text{g/mL}$ para 1024 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, os estudo de Palaniappan; Holley, (2010) demonstraram que o Eugenol apresentou interações sinérgicas com outros antibióticos como, Penicilina e Ampicilina contra *S. aureus*, potencializando a ação dos mesmos.

Ensaio microbiológicos realizados por (YADAV et al., 2015) determinaram que o Eugenol também é eficaz na diminuição do crescimento de biofilmes de *S. aureus* MsrA, tendo sua inibição completa dependente de altas concentrações do composto. O Brometo de Etídio é um substrato usado em testes microbiológicos com o intuito de buscar novos Inibidores de Bombas de efluxo (VIVEIROS et al., 2008). Os resultados do presente estudo, mostraram que a associação entre o Eugenol e o Brometo de Etídio, resultou em efeito antagônico, com aumento da CIM do Brometo de Etídio de 32 µg/mL para 58,1 µg/mL, evidenciando que o Eugenol não foi capaz na inibir o mecanismo de Bomba de efluxo MsrA. Figura 1.

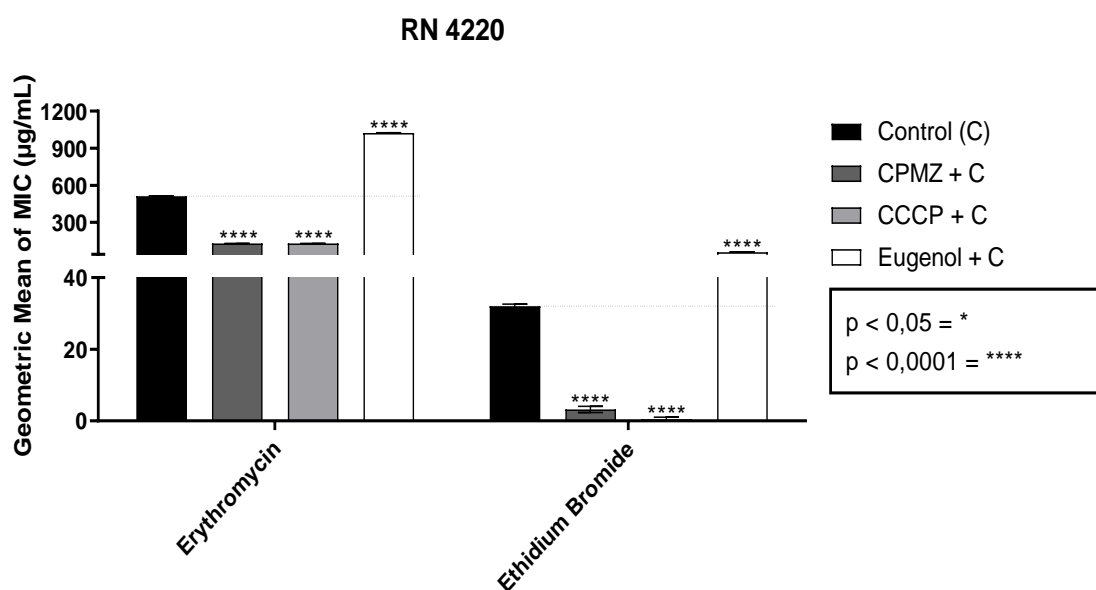


Figura 1: Atividade associada do Eugenol com Eritromicina, e Eugenol com o Brometo de Etidio. CPMZ e CCCP representam os inibidores padrão Clorpromazina e Carbonyl Cyanidem-Chlorophenylhydrazone respectivamente. Os valores representam a média geométrica ± E.P.M. (erro padrão da média). Utilizou-se ANOVA de duas vias, seguido do *post hoc* de Bonferroni: ****p < 0.0001

5. Conclusão

O Eugenol apresenta atividade antibacteriana direta contra as cepas de *S. aureus* RN4220 portadora da bomba de efluxo MsrA. Porém, sua associação com o antibiótico e com o Brometo de Etídio demonstra um efeito antagônico, não sendo eficaz contra mecanismo de Bomba de Efluxo expresso pela cepa estudada.

6. Agradecimentos

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP (BP3-0139-00077.01.00/18); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

7. Referências

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA
XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino,
pesquisa e extensão"



BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement Clinical and Laboratory Standards Institute**. [s.l.: s.n.]. v. 32

DAS, B. et al. Eugenol Provokes ROS-Mediated Membrane Damage-Associated Antibacterial Activity against Clinically Isolated Multidrug-Resistant Staphylococcus aureus Strains . **Infectious Diseases: Research and Treatment**, 2016.

DE OLIVEIRA, D. R. AKELL. et al. In vitro antimicrobial and modulatory activity of the natural products silymarin and silibinin. **BioMed research international**, v. 2015, p. 292797, 2015.

FANGJUN, L.; ZHIJIA, Y. Tumor suppressive roles of eugenol in human lung cancer cells. **Thoracic Cancer**, v. 9, n. 1, p. 25–29, 2018.

JENUL, C.; HORSWILL, A. R. Regulation of Staphylococcus aureus Virulence. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 1, p. 1–21, 2018.

PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, R. A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, n. 2–3, p. 164–168, 2010.

PURKAIT, S. et al. Synergistic antibacterial, antifungal and antioxidant efficacy of cinnamon and clove essential oils in combination. **Archives of Microbiology**, n. 5, 2020.

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

SIDDIQUE, H.; PENDRY, B.; MUKHLESUR RAHMAN, M. Terpenes from zingiber montanum and their screening against multi-drug resistant and methicillin resistant staphylococcus aureus. **Molecules**, v. 24, n. 3, 2019.

VIVEIROS, M. et al. Demonstration of intrinsic efflux activity of Escherichia coli K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, n. 5, p. 458–462, 2008.

YADAV, M. K. et al. Eugenol: A phyto-compound effective against methicillin-resistant and methicillin-sensitive Staphylococcus aureus clinical strain biofilms. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–21, 2015.