

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EUGENOL EM *Staphylococcus aureus*
PORTADORA DA BOMBA DE EFLUXO QacC**

**Alisson Justino Alves da Silva¹, Antônio Henrique Bezerra², Suieny
Rodrigues Bezerra³ Dárcio Luiz de Sousa Júnior⁴ Nair Silva Macêdo⁵
Zildene de Sousa Silveira⁶ Francisco Assis Bezerra da Cunha⁷**

Resumo: *Staphylococcus aureus* é uma bactéria com alta patogenicidade devido aos seus mecanismos de resistência principalmente pelo mecanismo de efluxo ativo que expulsa da célula bacteriana antibióticos e outras substâncias tóxicas. Em vista disso, a necessidade de desenvolvimento de novos antibióticos aumenta a cada dia, principalmente a partir de produtos naturais, tendo como exemplo os terpenos extraídos de óleos essenciais devidos aos seus potenciais antibacterianos. Dito isso, o trabalho teve como objetivo avaliar a ação antibacteriana direta e associada do Eugenol sobre a cepa SA K4100 portadora do mecanismo de efluxo QacC. Foram realizados ensaios de microdiluição em caldo a fim de se obter a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Eugenol contra a cepa de *S. aureus* K4100, portadora da bomba de efluxo QacC e verificar a inibição da bomba de efluxo, analisando a capacidade do Eugenol de reduzir a CIM do Brometo de Etídio (EtBr) e do antibiótico Oxacilina. Os resultados revelaram que o Eugenol não apresenta atividade antibacteriana direta com valor de CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$. A associação do Eugenol a Oxacilina não apresentou efeito de modificação da CIM do antibiótico, já quando associado ao Brometo de Etídio, houve antagonismo demonstrando que o Eugenol não possui capacidade inibitória do mecanismo de efluxo QacC em SA K4100.

Palavras-chave: Bomba de Efluxo. *Staphylococcus aureus*. QacC.

1. Introdução

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva encontrada na pele e mucosas do organismo humano. Este micro-organismo possui alta patogenicidade devido aos seus diversos mecanismos de resistência a antibióticos, sendo considerada um problema de saúde pública (ALMEIDA et al., 2020; SCHERF et al., 2020). Dentre esses mecanismos está o efluxo ativo, promovido por proteínas de efluxo como QacC, que expulsa do interior da célula bacteriana, substâncias tóxicas como antibióticos e compostos tóxicos

-
- 1 Universidade Regional do Cariri, email: alisson12justino@gmail.com
 - 2 Universidade Regional do Cariri, email: henriquebezerra.urca@gmail.com
 - 3 Universidade Regional do Cariri, email: suieny.urca@gmail.com
 - 4 Universidade Regional do Cariri, email: darciolsjr@gmail.com
 - 5 Universidade Regional do Cariri, email: naiirmacedo@gmail.com
 - 6 Universidade Regional do Cariri, email: zildenesousa15@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"



(SCHERF et al., 2020). Deste modo, compostos naturais como óleos essenciais e seus constituintes isolados, vem sendo estudados como possível estratégia para inibir o mecanismo de efluxo de bactérias, contribuindo para a redução da resistência aos antibióticos e sua disseminação entre bactérias (MORAIS OLIVEIRA-TINTINO et al., 2018; MILADI et al., 2017). O Eugenol é o principal elemento do óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*) atuando contra bactérias que afetam a permeabilidade da membrana e a captação e utilização de glicose (APOLÓNIO et al., 2014). Ademais a atividade antibacteriana do Eugenol foi demonstrada contra cepas de *S. aureus*, diminuindo o seu crescimento, além de apresentar uma interação sinérgica com antibióticos e outros tipos de antimicrobianos, sendo uma alternativa válida um estudo mais aprofundado sobre a atividade do Eugenol, em cepas de *S. aureus* que expressam bombas de efluxo (SILVA et al., 2018)

Objetivo

O objetivo do trabalho foi avaliar a ação antibacteriana do Eugenol sob a estirpe K4100 de *Staphylococcus aureus*, portadora da bomba de efluxo QacC.

2. Metodologia

Cepas Bacterianas

A cepa de *S. aureus* utilizada foi: K4100, que expressa a proteína de efluxo QacC que expõe antibióticos e outras drogas, como corantes intercalantes de DNA. A cepa foi fornecida pelo Prof. S. Gibbons (*University of London*), sendo mantidas em ágar sangue (Laboratórios Difco Ltda., Brazil) e, antes dos experimentos, foram cultivadas durante 24 h a 37 °C em meio sólido *Heart Infusion agar* (HIA, Difco).

Meios de Culturas

Para realização dos testes microbiológicos foram utilizados os meios de cultura: *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco). BHI, Acumedia Manufacturers Inc.), preparado de acordo com o fabricante e *Brain Heart Infusion* (BHI, Acumedia Manufacturers Inc.) preparado na concentração de 10 %.

Substâncias

O antibiótico Oxacilina, bem como o Eugenol adquiridas pela Sigma Aldrich Brasil e Aché Laboratórios Farmacêuticos, 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-

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"



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. Posteriormente os *ependorfs*® 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 µg/mL até 0,25 µg/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 Oxacilina e do Brometo de Etídio

Para observar se Eugenol atua como potencial inibidor da bomba de efluxo QacC, 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 Oxacilina. Os EPIs padrões CCCP e o CPZ, foram utilizados para comprovar a expressão da bomba QacC pelas cepas testadas.

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 µg/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 Oxacilina como com Brometo de Etídio. A CIM dos controles foi avaliada utilizando o apenas antibiótico Oxacilina e o Brometo de Etídio (CLSI, 2015).

Análise Estatística

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"



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

3. Resultados

Os ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) resultou na CIM do antibiótico Oxacilina de 512 µg/mL e do composto Eugenol de ≥ 1024 µg/mL tabela 1, não expressando atividade direta do composto contra a cepa K4100 de *S. aureus*.

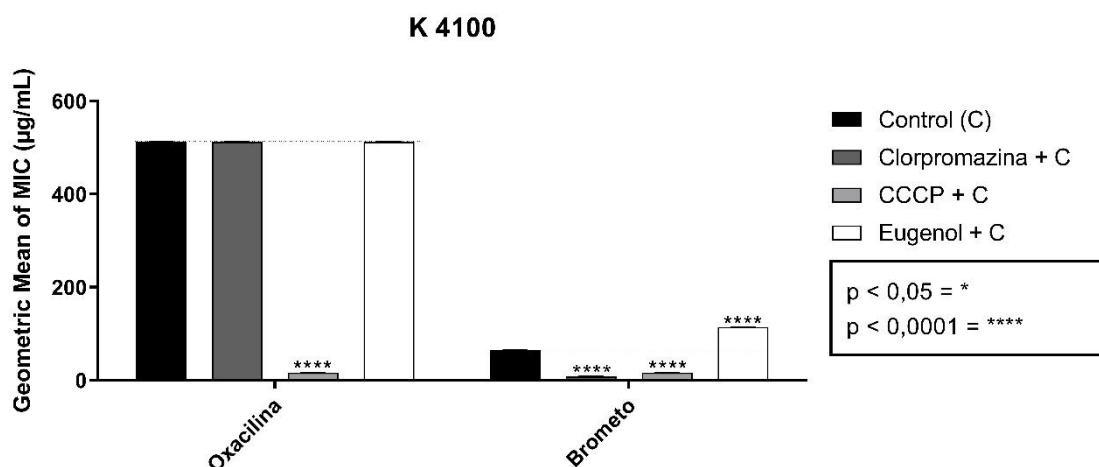
Tabela 1. Valor de CIM da Oxacilina e da associação entre Oxacilina e Eugenol

Oxacilina	Eugenol
512 µg/mL	≥ 1024 µg/mL

Legenda. Os valores de CIM foram expressos em µg/mL.

Em relação a associação do Eugenol com a Oxacilina, não houve eficácia contra a cepa, ou seja, o eugenol não potencializou a ação do antibiótico. No entanto, estudos já comprovaram a interação sinérgica do Eugenol com outros antibióticos em *S. aureus*, além de sua atividade antibacteriana neste patógeno (NASCIMENTO *et al.*, 2000). A associação do Eugenol com o Brometo de Etídio apresentou efeito antagônico, aumentando sua CIM de 64 µg/mL para 114,035 µg/mL, ou seja, o composto não foi eficaz contra o mecanismo de efluxo. Conforme a figura 1.

Figura 1 – Efeito da associação do Composto Eugenol com a Oxacilina e Brometo de Etídio. C



representa a Oxacilina e Brometo de Etídio, CPMZ e CCCP representam os inibidores padrão Clorpromazina e Carbonyl Cyanidem-Chlorophenylhydrazone respectivamente. Os valores

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”



representam a média geométrica \pm E.P.M. (erro padrão da média). Utilizou-se ANOVA de duas vias, seguido do *post hoc* de Bonferroni: $p < 0.0001$ ****

Conclusão

Os resultados expressaram que o Eugenol não demonstrou atividade direta contra *S. aureus* e sua associação com o antibiótico, não demonstrou eficácia, já sua associação com o Brometo de Etídio apresentou efeito antagônico, não apresentando eficácia contra o mecanismo de efluxo ativo QacC de *Staphylococcus aureus*. Portanto, novos estudos devem ser realizados com o intuito de avaliar os mecanismos pelos quais o Eugenol atua e verificar o efeito do mesmo, sob outras cepas portadoras de bomba de efluxo.

4. 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.

5. Referências

ALMEIDA, R. S. et al. GC-MS Profile and Enhancement of Antibiotic Activity by the Essential Oil of *Ocotea odorifera* and Safrole: Inhibition of *Staphylococcus aureus* Efflux Pumps. **Antibiotics**, v. 9, n. 5, p. 247, 12 maio 2020.

APOLÓNIO, J. et al. No induction of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during continuous exposure to eugenol and citral. **FEMS Microbiology Letters**, v. 354, n. 2, p. 92–101, maio 2014.

ARAÚJO-LEONÍDIO, A. R. et al. Atividade antimicrobiana de moringa oleifera lam. antimicrobial activity of moringa oleifera lam. **Gestão & Tecnologia**, p. 4–15, 2019.

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

DA SILVA, F. F. M. et al. Eugenol derivatives: synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial and antioxidant activities. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2018.

DE MORAIS OLIVEIRA-TINTINO, C. D. et al. Inhibition of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L. and α -terpinene on the NorA efflux-pump of *Staphylococcus aureus*. **Food Chemistry**, v. 262, n. December 2017, p. 72–77, 2018.

LAMUT, A. et al. Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant

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"



bacteria. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, n. 6, p. 2460–2504, 19 nov. 2019.

MILADI, H. et al. Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and γ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 112, p. 156–163, nov. 2017.

NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 247–256, 2000.

SCHERF, J. R. et al. Effect of terpinolene against the resistant *Staphylococcus aureus* strain, carrier of the efflux pump QacC and β -lactamase gene, and its toxicity in the *Drosophila melanogaster* model. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, n. August, p. 104528, dez. 2020.

SEUKEP, A. J. et al. Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n. 4, p. 277–290, ago. 2020.