



**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE INIBIÇÃO DA RESISTÊNCIA A
ANTIBIÓTICOS POR COMPOSTOS DE EUGENOL E SEUS DERIVADOS DE
HIDRAZINOTIAZÓLICOS SOBRE BOMBAS DE ELUXO NORA**

**Gildênia Alves de Araújo¹, Jaqueline Lima Santos², Isaac Moura Araujo³
Raimundo Luiz Silva Pereira⁴, Cícera Datiane de Moraes Oliveira-
Tintino⁵, Ray Silva de Almeida⁶, Saulo Relison Tintino⁷**

Resumo: A resistência bacteriana ocorre por via seletiva exercida pelo uso de antibióticos, um fenômeno biológico natural, mas a utilização inadequada desses fármacos tem criado um maior consumo de antibióticos e níveis elevados de resistência. Essa resistência se dá de várias formas e uma delas é por bombas de efluxo. Bombas de efluxo são proteínas de transporte que fazem a retirada de produtos indesejados pela célula para o meio externo. Na necessidade de novos compostos capazes de apresentar atividades antimicrobianas e farmacológicas, o eugenol é um composto promissor, assim também, como, os hidrazinotiazólicos. Objetivo do trabalho é verificar os efeitos dos compostos de eugenol e derivados de hidrazinotiazólicos, sobre os mecanismos de resistência de bomba de efluxo em *S. aureus*, por meio da ação direta e indireta, ou seja, inibição da NorA (Bomba de efluxo). Para a realização dos testes se utilizou cepas de *S. aureus* 1199B, como antibiótico foi usado a norfloxacin CCCP e CPZ. Foi feita a CIM (controle de modulação) dos compostos. Perante o estudo e testes realizados concluímos que as substâncias Hidrazinotiazóis potencializaram a atividade da norfloxacin, inibindo assim a 1199B.

Palavras-chave: Resistência bacteriana. Bomba de efluxo e hidrazinotiazólicos.

-
- 1 Universidade Regional do Cariri, email: gildenia.araujo@urca.br
 - 2 Universidade Regional do Cariri, email: Jaqueline_limasanto@gmail.com
 - 3 Universidade Regional do Cariri, email: isaac.moura@urca.br
 - 4 Universidade Regional do Cariri, email: raimundoluiz.silva@urca.br
 - 5 Universidade Federal do Pernambuco, email: datianemorais@hotmail.com
 - 6 Universidade Regional do Cariri; email; ray.almeida@urca.br
 - 7 Universidade Regional do Cariri; email; Saulo.tintino@urca.br



1. Introdução

A resistência bacteriana ocorre por via seletiva exercida pelo uso de antibióticos, um fenômeno biológico natural, mas a utilização inadequada desses fármacos tem criado um maior consumo de antibióticos e níveis elevados de resistência, tanto na comunidade quanto em hospitais e Instituições^{1,2,3}. Entretanto vale salientar que por conta desse problema bactérias resistentes a múltiplas drogas (MDR) são responsáveis por altos índices de mortalidade todos os anos (TACCONELLI et al., 2018)⁷.

Essa resistência se dar das seguintes formas: 1 - alteração dos sítios de ligação, 2 - diminuição da permeabilidade pela membrana, 3 - enzimas que inativam antibióticos e 4 – bombas de efluxo dependente de energia (BLANCO et al., 2016; TORTORA., 2012)³.

As bombas de efluxos são proteínas de transporte que faz a retirada de produtos indesejados pela célula para o meio externo, e dentre esses produtos indesejados ou tóxicos estão os antibióticos. Dentre as bactérias multiresistentes a cepa de *Staphylococcus aureus* recebe um destaque pelo seu perfil de resistência aos antibióticos, além de ser um dos principais patógenos relacionados a infecções hospitalares graves. Esta espécie é de grande importância clínica, considerando o grande número de infecções e a sua resistência a diversos medicamentos, entre estes, aminoglicosídeos, macrolídeos, fluoroquinolonas, cloranfenicol, tetraciclina, entre outros (LEE et al., 2018; TINTINO et al., 2018)⁶.

Baseado na necessidade de novos compostos capazes de apresentar atividades antimicrobianas e farmacológicas, o eugenol e derivados é um composto promissor, assim também, como, os hidrazinotiazólicos (XAVIER, F. J. S. et al.)⁹

2. Objetivo

Verificar os efeitos dos compostos de eugenol e derivados do hidrazinotiazólicos, sobre os mecanismos de resistência bomba de efluxo em *Staphylococcus aureus*, por meio da ação direta e indireta, ou seja, inibição da expressão gênica da respectiva proteína: NorA (Bomba de efluxo).

3. Metodologia

3.1 Microorganismos

Para a realização dos testes foram utilizadas cepas bacterianas de *S. aureus* 1199B doadas pelo Professor Gibbons da Universidade de Londres, Inglaterra. as cepas foram cultivadas em meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI), no período de 24 horas antes, e incubadas a uma temperatura de 37 °C. As cepas bacterianas de *S. aureus* 1199B possuem os genes de resistência a NorA, respectivamente, que são responsáveis pelas bombas de efluxo para os antibióticos ciprofloxacina e norfloxacina.



3.2 Preparação de soluções

Os compostos eugenol e derivados de hidrazinotiazólicos foram sedidos pela professora Dra. Danielle Ferreira do Instituto de Química – UNIFAL-MG. Os antibióticos, norfloxacin e ciprofloxacina, oxacilina, ampicilina, ampicilina + sulbactam e as substâncias CCCP, clorpromazina e brometo de etídio foram obtidos através do fabricante Sigma Aldrich. Em relação ao preparo destas substâncias, cada uma foi pesada 10 mg e diluída em 1 mL de solvente dimetilsulfóxido (DMSO), com exceção do brometo de etídio que foi diluído em 1 mL de água destilada estéril. Após essa diluição foram diluídas separadamente em 8,765 mL de água destilada estéril, resultando em uma concentração inicial de 1.024 µg / mL para cada substância.

3.3 Avaliação da CIM –Concentração inibitória mínima dos compostos

Foi avaliado a Concentração Inibitória Mínima dos compostos de eugenol e derivados de hidrazinotiazólicos, como também dos antibióticos e brometo de etídio. 24h anterior ao teste as bactérias foram repicadas para o meio de cultura HIA e incubadas a 37 °C. Os ensaios da CIM foram realizados em série 1:1 através da técnica de microdiluição em caldo utilizando placas esterilizadas com 96 poços (NCCLS, 2003). O meio de distribuição foi preparado em eppendorfs utilizando 100 µL do inóculo em 900 µL do meio de cultura líquido BHI a 10%. Após esse período, foi realizada a análise a partir da metodologia de microdiluição em placas de 96 poços, seguindo a metodologia de COUTINHO et al. (2008).

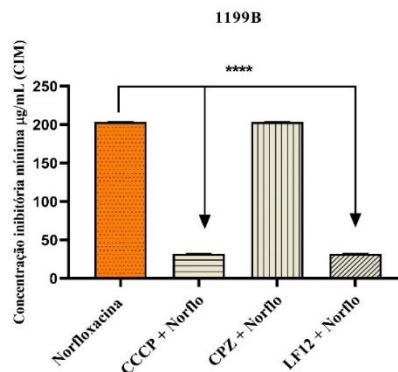
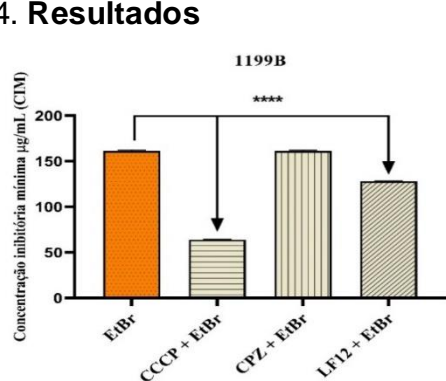
3.4 Avaliação do potencial de inibição de bomba por emissão de Brometo de etílico.

Para a realização dos testes as bactérias foram cultivadas em meio de cultura BHI a 37 °C durante 24h. Após esse período, foi transferida uma pequena quantidade da cultura para eppendorfs contendo solução salina estéril. Em seguida, estes eppendorfs foram centrifugados a 3000 rpm durante 3 min para a formação do pellet. Os eppendorfs foram preenchidos com as seguintes soluções: 1- microrganismo, brometo de etídio, substância em concentração sub inibitória (CIM/8) e solução salina; 2- inóculo bacteriano, brometo de etídio e solução salina; 3- substancia CIM/8 e cepas bacterianas.

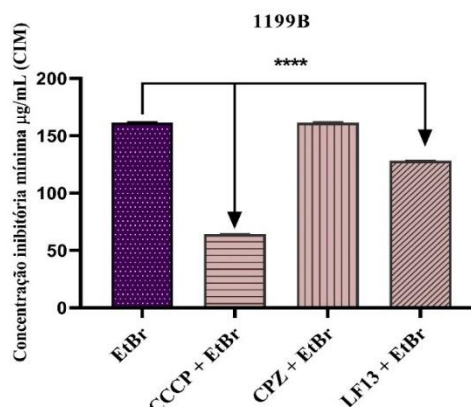
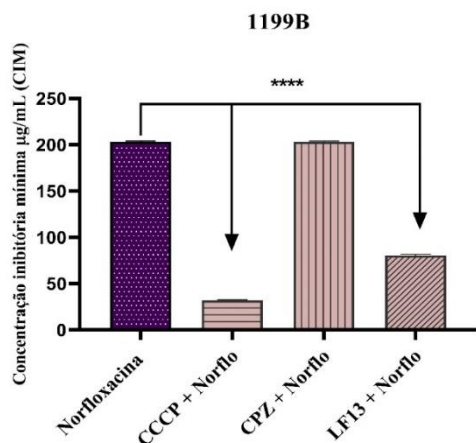
3.5 Análise Estática

A emissão de fluorescência em tempo real é transformada em log que por seguinte é transformado em número para ser quantificados e analisado, como também, os dados da CIM, seguido pelo pós-teste de Bonferroni usando o software GraphPad Prism versão 7.00. Sendo tabulados Microsoft Excel e analisados por ANOVA.

4. Resultados



Podemos concluir os resultados dos testes realizados com a 1199B perante a substância LF12(Hidrazinatiazóis) usando o medicamento norfloxacin juntamente CCCP e da clorpomazina (inibidores de bomba) perante o uso da bomba de efluxo norA. A substância Hidrazinatiazol (LF12) potencializou a atividade da norfloxacin atuando diretamente na bomba de efluxo impedindo que a norfloxacin fosse expulsa pela bactéria através da bomba de efluxo, causando a morte bacteriana e diminuindo a concentração da MIC assim como o CCCP e CPZ, sendo que a substância do Hidrazinatiazol teve uma maior eficiência que a CPZ. Quando avaliado a substância com brometo de etílico se obteve uma mesma resposta, mostrando que a substância bloqueia a bomba de efluxo.



Já a substância Hidrazinatiazol LF13 segue o mesmo padrão, ele potencializou a norfloxacin isso se comprova devido ao controle desse medicamento da qual para 1199B deu alto a MIC e associando a substância deve a redução da MIC, ou seja o antibiótico potencializou através da inibição da bomba de efluxo, verificando assim também para o CCCP e CPZ, contudo o efeito da substância Hidrazinatiazol foi melhor que a própria CPZ. Já com o brometo de etílico se observa o mesmo padrão, tendo uma associação da substância a bomba de efluxo fazendo com que a concentração de brometo diminua a MIC, tendo uma eficiência melhor que a CPZ isso perante a 1199B.



4. Conclusão

Perante o estudo e testes realizados concluímos que as substâncias – Hidrazinatiazóis (LF12 e LF13) potencializaram a atividade da norfloxacina, inibindo assim a 1199B da qual seria a bomba de efluxo norA. Podemos também concluir que o CCCP e CPZ mostraram eficiência, Contudo ambas as substâncias Hidrazinatiazóis tiveram melhor eficiência que a própria CPZ.

5. Agradecimentos

Universidade Regional do Cariri-URCA, ao Fundo Estadual de Combate à Pobreza (FECOP) pelo financiamento da pesquisa e ao laboratório de microbiologia molecular.

6. Referências

1-Aschbacher R, Pagani E, Confalonieri M, Farina C, Fazii P, Luzzaro F, et al. Review on colonization of residents and staff in Italian long-term care facilities by multidrug-resistant bacteria compared with other European countries. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2016;5:33. Review.

2-Atividade Vasorrelaxante de Adutos de Morita-Baylis-Hillman Derivados do Eugenol em Artéria Mesentérica Superior de Ratos Normotensos. *Revista virtual de química*. V.11, n. 4, 2019.

3- BLANCO, P. et al. Bacterial multidrug efflux pumps: Much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms*, v. 4, n.14, p. 1-19, 2016. doi:10.3390/microorganisms4010014

4-COUTINHO, H. D. M. et al. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy*, 54, n. 4, p. 328-330, 2008.

5-Gravey F, Loggia GV, Blanchardière AL, Cattoir V. Bacterial epidemiology and antimicrobial resistance profiles of urinary specimens of the elderly. *Med Mal Infect*. 2017;47(4):271-8.6-LEE, A. S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews Disease primers*, 4, n. 1, p. 1-23, 2018.

7- Tacconelli E, De Angelis G, Cataldo MA, et al. Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 61(1): 26 – 38.

8- van Dulm E, Tholen AT, Pettersson A, van Rooijen MS, Willemsen I, Molenaar P, et al. High prevalence of multidrug resistant Enterobacteriaceae among residents of long term care facilities in Amsterdam, the Netherlands. *PLoS One*. 2019;14(9): e0222200.

9-XAVIER, F. J. S. et al. Atividade Vasorrelaxante de Adutos de Morita-Baylis-Hillman Derivados do Eugenol em Artéria Mesentérica Superior de Ratos Normotensos. *Revista virtual de química*. V.11, n. 4, 2019.