



**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO DO
MONOTERPENO ISOPULEGOL.**

**Daniel Sampaio Alves¹, Gustavo Miguel Siqueira¹, Cicera Laura Roque
Paulo¹, Sheila Alves Gonçalves¹, Ana Carolina Justino de Araújo², Priscilla
Ramos Freitas², Raimundo Luiz Silva Pereira², Isaac Moura Araujo³,
Henrique Douglas Melo Coutinho⁴**

Resumo:

A resistência bacteriana é uma problemática mundial e de grande importância, devido a resistência das bactérias frente ao uso indiscriminado dos antibióticos. Desse modo, a utilização de produtos naturais associados a antibióticos tem se mostrado uma alternativa promissora. Tem-se como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e inibidora de bombas de efluxo do Isopulegol frente a *Staphylococcus aureus*. Serão utilizados os antibióticos norfloxaxina (para bomba de efluxo NorA) e ciprofloxacina (para bomba de efluxo MepA), o inibidor padrão de bomba Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl-hydrazone (CCCP), o Isopulegol e o brometo de etídio. Serão utilizadas cepas de *S. aureus* que são portadoras das bombas de efluxo. E espera-se obter valores promissores e estatisticamente significantes em relação à substância Isopulegol frente às bombas de efluxo NorA e MepA presentes em *S. aureus*.

Palavras-chave: Bombas de efluxo. Isopulegol. Resistência bacteriana.

1. Introdução

A resistência bacteriana frente aos antibióticos é tida como um processo biológico natural, originado a partir do uso destes medicamentos para o tratamento de infecções e que, devido à utilização de antibióticos de maneira indiscriminada e insensata, tem aumentado notavelmente em todo o mundo, tornando-se um problema de saúde pública (PRATES *et al.*, 2020). Essa resistência já é uma realidade global e que nos últimos vinte anos, houve resistência de cepas muito perigosas como: *Staphylococcus aureus* (*S.*

1 Graduando em Ciências Biológicas da Universidade Regional do Cariri, email: daniel.sampaio10@urca.br

4 Docente do Departamento de Química Biológica da Universidade Regional do Cariri, email: hdmcoutinho@gmail.com

VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV

Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



aureus), *Klebsiella pneumoniae*, e *Pseudomonas aeruginosa* (ALARCO, 2014; PIEROZAN *et al.*, 2009). No caso da bactéria *Escherichia coli*, sua espécie possui reservatórios que contém genes de resistência aos antimicrobianos (KORB *et al.*, 2013). Os procariotos do tipo *Staphylococcus aureus*, possuem mecanismos de defesas que conseguem atuar contra alguns fármacos (LIMA *et al.*, 2015). Para controlar a resistência bacteriana por meio de bombas de efluxo se tem utilizado a associação de antibióticos com substâncias capazes de inibir estas bombas. Existem diversas substâncias de origem natural e sintética que já foram identificadas como inibidores de bombas de efluxo. (STAVRI; PIDDOCK; GIBBONS, 2007; PRASCH & BUCAR, 2015).

Para mitigar essa problemática, existem vários estudos que relatam o uso de produtos naturais e seus óleos essenciais como substâncias antimicrobianas. Estas substâncias são derivadas do metabolismo secundário das plantas, por exemplo, os flavonoides, terpenos, sesquiterpenos, taninos e alcaloides (TINTINO, 2018). Durante as últimas décadas, vários compostos derivados de planta juntos de seu princípio ativo foram analisados, apresentando atividade fitoquímica e antibacteriana significativa (SHARMA; GUPTA; PATHANIA, 2019). Salienta-se a importância dos óleos essenciais dentre esses produtos, uma vez que sua utilização se torna um potencializador na confecção de muitos fármacos, como, por exemplo, antibióticos. Já que os mesmos apresentam compostos químicos que são capazes de combater com alguns patógenos (CARVALHO *et al.*, 2014). Dentre os compostos existentes nas plantas com potencial de estudo, pode-se citar o isopulegol (SOLER; DELLACASSA; MOYNA, 1986). Essa substância é um monoterpeneo pode ser encontrado em vários óleos essenciais de diversas espécies, sendo responsável por diversas atividades biológicas (ALCÂNTARA *et al.*, 2010).

A resistência dos micro-organismos ameaça a prevenção e o tratamento de um conjunto cada vez maior de doenças. Essa resistência a antibióticos é preocupante e progressiva tendo em vista que o micróbio uma vez exposto ao antibiótico, para os que resistiram, geralmente apresentam alguma característica genética incumbida por sua sobrevivência de forma que sua descendência é de igual modo resistente.

2. Objetivo

Pretende-se com o presente trabalho, avaliar a atividade antibacteriana e inibição de bombas de efluxo em *Staphylococcus aureus* do monoterpeneo isopulegol.



3. Metodologia

Serão utilizados os antibióticos norfloxacin (para bomba NorA) e ciprofloxacina (para bomba MepA), o inibidor padrão Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl-hydrazone (CCCP), o isopulegol e o brometo de etídio, obtidos da SIGMA Chemical Co., St. Louis, E.U.A. Um total de 10 mg dos antibióticos e do isopulegol serão inicialmente diluídos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e depois em 8.765 µL de água destilada estéril, atingindo a concentração de 1024 µg/mL. O brometo de etídio (10 mg) será diluído apenas em água destilada estéril até atingir concentração de 1024 µg/mL, e o CCCP (10 mg) será diluído em uma solução de água destilada estéril e metanol (1:1) até atingir a mesma concentração dos outros produtos. Serão utilizadas as cepas de *S. aureus* portadoras de bomba de efluxo demonstradas na Tabela 1. As cepas foram gentilmente cedidas pelo Prof. S. Gibbons (University of London) e serão armazenadas no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM/URCA. Todas as cepas serão inicialmente mantidas em ágar sangue para comprovar o tipo de cepa (Laboratorios Difco Ltda., Brazil), depois transferidas para o estoque. Sendo mantidas em dois estoques: um em Heart Infusion Agar (HIA, Difco) a 4^o C outro mantido em glicerol em freezer -80 °C.

Tabela 1. Cepas de *S. aureus* portadoras de bomba de efluxo utilizadas

Linagem	Proteína (Classe ou Antibiótico)
1199B	NorA (Norfloxacin)
1199 (Selvagem)	
K2068	MepA (Ciprofloxacina)

A partir das colônias bacterianas cultivadas e crescidas, após o período determinado, serão preparados os respectivos inóculos, colocando-se as bactérias em tubos de ensaio contendo 5 ml de solução salina estéril (0,9% NaCl). Os tubos contendo as suspensões serão levados ao agitador vortex e terão a turbidez comparada à escala de McFarland, que corresponde a 105 UFC (Unidades Formadoras de Colônias).

Os ensaios da CIM serão realizados em série 1:1 através da técnica de microdiluição em caldo utilizando placas esterilizadas com 96 poços (NCCLS, 2003). Será preparado o meio de distribuição em *ependorfs* utilizando 100 µL dos respectivos inóculos e 900 µL do meio de cultura líquido BHI. O conteúdo do *ependorf* será transferido para placa de microdiluição. A próxima etapa será a realização da microdiluição das substâncias (isopulegol e CCCP), com concentração de 1024 µg/mL, sendo 100 µL nesse meio até penúltima cavidade. Como a última cavidade trata-se do controle de crescimento, não será adicionada. As concentrações finais das amostras no meio de cultura serão de 512 a 8 µg/mL. Os testes serão realizados em triplicata e as placas

VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV

Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



serão incubadas a 35 ± 2 °C, durante 24h. Após esse período, as placas serão reveladas com corante específico, a resazurina. Considera-se positivo para os poços que não apresentaram crescimento microbiano, ou seja, permaneceram com a coloração azul e negativa os que obtiveram coloração vermelha (SALVAT *et al*, 2001).

Para a realização desse teste, em cada tubo *ependorf* será utilizado caldo BHI a 10%, 150 µl do inóculo de cada cepa e um volume de cada composto (isopulegol e CCCP) correspondente à concentração sub-inibitória (CIM/8). Os controles de modulação serão preparados utilizando-se apenas 1350 µl do meio BHI 10% e 150 µl do inóculo. Os conteúdos dos tubos serão distribuídos em placas de microdiluição de 96 poços, 100 µl em cada poço, em sentido numérico. A microdiluição será realizada, separadamente, com 100 µl do antibiótico correspondente à bomba de efluxo específica e com o brometo de etídio, até o penúltimo poço, de modo que a concentração varia de 1024 a 0,5 µg/ml. Os testes serão realizados em triplicata e as placas incubadas em estufa por 24h a 37 °C, após esse período será realizada a leitura com a resazurina (COUTINHO *et al.*, 2008). A redução do CIM do brometo de etídio ou de antibiótico específico, em cepas portadoras de bomba de efluxo, é um indicativo de inibição de bomba de efluxo. A análise estatística dos resultados dos testes será realizada utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.0. As médias geométricas serão analisadas por ANOVA de duas vias seguida por teste post-hoc de Bonferroni (onde $p < 0,05$ e $p < 0,0001$ serão considerados significativos e $p > 0,05$ não demonstrando significância).

4. Resultados

Com relação aos resultados, o projeto está em desenvolvimento, espera-se obter valores promissores e estatisticamente significantes em relação a substância Isopulegol frente às bombas de efluxo NorA e MepA presentes em *S. aureus*.

5. Conclusão

Por conseguinte, conclui-se que as atividades biológicas já comprovadas são um indicativo do efeito bioativo positivo do Isopulegol na atividade antibacteriana.

6. Agradecimentos

Agradeço ao laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) e ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

7. Referências

VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV

Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: "DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL"



ALCÂNTARA, J. M. et al. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae), **Revista Acta Amazonica**, v. 40, n. 3, p. 567-572, 2010.

KORB, A. et al. Perfil de resistência da bactéria *Escherichia coli* em infecções do trato urinário em pacientes ambulatoriais. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, v. 13, n. 1, p. 72-79, 2013.

LIMA, M. F. P. et al. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – Revisão de Literatura. **Revista Uningá Review**, v. 21, n. 1, p. 32-39, 2015.

PRATES, F.I.F. et al. Agravos provocados pela resistência bacteriana: um problema de saúde pública mundial. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR**, v. 32, n. 2, p. 131–138, 2020.

PIEROZAN, M. et al. Caracterização química e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de espécies de *Sálvia L.* **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v. 29, n 4, p. 764- 770, 2009.

STAVRI, M.; PIDDOCK, L. J.; GIBBONS, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, 59, 1247-1260, 2007.

SHARMA, A.; GUPTA, V. K.; PATHANIA, R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 149, n. 2, p. 129, 1 fev. 2019.

SOLER, E.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. **Composition of Aloysia gratissima leaf essential oil. Phytochemistry**, v. 25, n. 6, p. 1343-1345, 1986.

TINTINO, S. R. Avaliação da inibição de bombas de efluxos em linhagens de *Staphylococcus aureus* por substâncias sintéticas de origem natural. Tese (doutorado) - Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Recife, 2018.