

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"



AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS POR DERIVADOS DE EUGENOL E HIDRAZINOTIAZÓLICOS SOBRE BOMBA DE EFLUXO MEPA EM CEPAS DE *Staphylococcus aureus*

Jaqueline Lima dos Santos¹, Gildênia Alves de Araújo², Isaac Moura Araujo³, Raimundo Luiz Silva Pereira⁴, Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino⁵, Ray Silva de Almeida⁶, Saulo Relison Tintino⁷

Resumo:

A resistência bacteriana promove a busca de antibacterianos e outras substâncias, dentre os mecanismos de resistência tem por destaque as bombas de efluxo, proteínas transmembranares que exportam antibióticos do meio intracelular para o meio extracelular. O eugenol e hidrazinotiazólicos possuem ação antibiótica promissoras. O objetivo é avaliar a capacidade de inibir a bomba de efluxo MepA por derivados de eugenol e hidrazinotiazólicos LF12 e LF13. Foram usadas cepas *S. aureus* K2068, antibiótico ciprofloxacino, brometo de etídio, CCCP e CPZ. Foram feitos ensaios de avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias, verificando a inibição da bomba de efluxo pelo método de microdiluição em caldo. O efeito de redução da CIM do brometo de etídio e antibiótico foram testados com inóculos obtidos de placas incubadas. Depois foi usado inóculos em solução salina. O LF12 exibiu efeito significativo de redução do CIM junto ao antibiótico, inibindo o mecanismo de efluxo quando associada ao brometo de etídio contra bomba MepA. LF13 inibiu apenas associado ao brometo de etídio. Sugere que os compostos podem ser potentes inibidores da MepA em cepas de *S. aureus*.

Palavras-chave: Bomba de efluxo. Eugenol. Hidrazinotiazólicos. MepA. Resistência bacteriana.

1. Introdução

A resistência bacteriana é definida como a incapacidade de um determinado antibiótico de atingir o seu alvo em uma concentração que antes era ativo para inibir as atividades bacterianas. Essa resistência pode ocorrer pela alteração dos sítios de ligação do antibiótico, diminuição da

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

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"



permeabilidade pela membrana, enzimas que inativam antibióticos e bomba de efluxo dependentes de energia (BLANCO *et al.*, 2016).

As bombas de efluxo são proteínas que estão inseridas na membrana plasmática das células, podendo estar presente em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Essas proteínas são capazes de extrusar ativamente antibióticos e substâncias tóxicas para o exterior da célula. Uma das bombas mais estudadas inclui a proteína MepA de *Staphylococcus aureus*, com ampla capacidade de expulsar pentamidina, brometo de etídio (EtBr) e biocidas, como também, antibióticos da classe das fluoroquinolonas (BAMBEKE *et al.*, 2003, KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005).

O eugenol é um fenilpropanóide presente em óleos essenciais, em diversas espécies de plantas. Os triazóis são heterocíclicos aromáticos nitrogenados de cinco membros, contendo um ou mais átomos de nitrogênio, e estudado como potencial fármaco e agroquímico. Derivados de eugenol dos hidrazinotiazólicos são compostos promissores apresentando diversas atividades biológicas comprovadas como fungicida, bactericida, antioxidante, leishmanicida, anticâncer, anti-inflamatória e analgésica. (XAVIER *et al.*, 2019; GAZOLLA *et al.*, 2018; DEFFIEUX *et al.*, 2014; KAUFMAN., 2015).

2. Objetivo

Verificar o potencial dos derivados de eugenol e hidrazinotiazólicos, sobre os mecanismos de resistência bomba de efluxo em *Staphylococcus aureus* portadora da bomba de efluxo MepA.

3. Metodologia

3.1 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas cepas bacterianas de *S. aureus* K2068 doadas pelo Professor Gibbons da Universidade de Londres. As cepas foram cultivadas em meio de cultura infusão de cérebro e coração (Brain Heart Infusion - BHI), no período de 24 horas antes do experimento, a uma temperatura de 37 °C.

3.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

Os compostos derivados de eugenol e hidrazinotiazólicos denominados LF12 e LF13, foram cedidos pela professora Dr^a. Danielle Ferreira do Instituto de Química (UNIFAL-MG). O antibiótico ciprofloxacino e as substâncias CCCP (Cianeto de carbonilo m-clorofenilhidrazona) e brometo de etídio foram obtidos pela Sigma Aldrich. Essas substâncias de teste foram diluídas no solvente dimetilsufóxido (DMSO) e água. O brometo de etídio foi diluído em água destilada estéril, o CCCP diluído em etanol e água. Todas as substâncias foram diluídas separadamente em concentração inicial de 1024 µg/mL para cada substância.

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"



3.3 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS COMPOSTOS

A Concentração Inibitória Mínima dos compostos derivados de eugenol e hidrazinotiazólicos, como também dos antibióticos e brometo de etídio (EtBr) foram realizados pelo método de microdiluição em caldo. 24hs anterior ao teste as bactérias foram repicadas para o meio de cultura HIA e incubadas a 37 °C. Logo após será feita a análise a partir da metodologia de microdiluição seriada em placas de 96 poços, seguindo a metodologia de Coutinho *et al.* (2008). As concentrações variaram entre 512 a 0,5 µg/mL. Após 24h foi realizada a leitura das placas por visualização de mudança de cor do meio caracterizado pela adição de resazurina. A coloração rosa indicou crescimento bacteriano e coração azul indica inibição de crescimento.

3.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO DE BOMBA DE EFLUXO PELA ASSOCIAÇÃO COM ANTIBIÓTICO E BROMETO DE ETÍDIO

A associação de LF12 e LF13 com a ciprofloxacino e com brometo de etídio foi realizado pelo método de microdiluição em caldo semelhantemente ao descrito no item anterior (Oliveira-Tintino). Exceto que a preparação das soluções nos *ependorfs* já foi realizada com os derivados em concentração subinibitória de CIM/8. A solução preparada nos *ependorfs* foi distribuída na placa de 96 poços e realizada a diluição seriada com ciprofloxacino ou brometo de etídio ambos a 1024 µg/mL. A leitura procedeu com resazurina de forma semelhante ao item anterior. Foram consideradas significativas as concentrações de LF12 e LF13 que reduziram em três vezes ou mais a CIM da ciprofloxacino e do EtBr (Oliveira tintino).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média geométrica ± erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados através da análise de variância (ANOVA), de uma via, seguido pelo *post hoc* de Bonferroni, usando o software GraphPad Prism 5.0. Foram considerados significativos os valores de $P < 0,5$.

4. Resultados

Os derivados LF12 e LF13 não apresentaram atividade antibacteriana direta, obtendo uma CIM maior ou igual a 1024 µg/mL. O produto LF12 associado ao antibiótico e ao brometo de etídio apresentou efeito sinérgico, com redução da CIM em comparação a ciprofloxacina e EtBr sozinhos. O inibidor de bomba CCCP também apresentou resultados estatisticamente significantes demonstrando a reprodutibilidade do ensaio. Esses resultados sugerem que LF12 inibe a proteína MepA (Figura 1).

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"

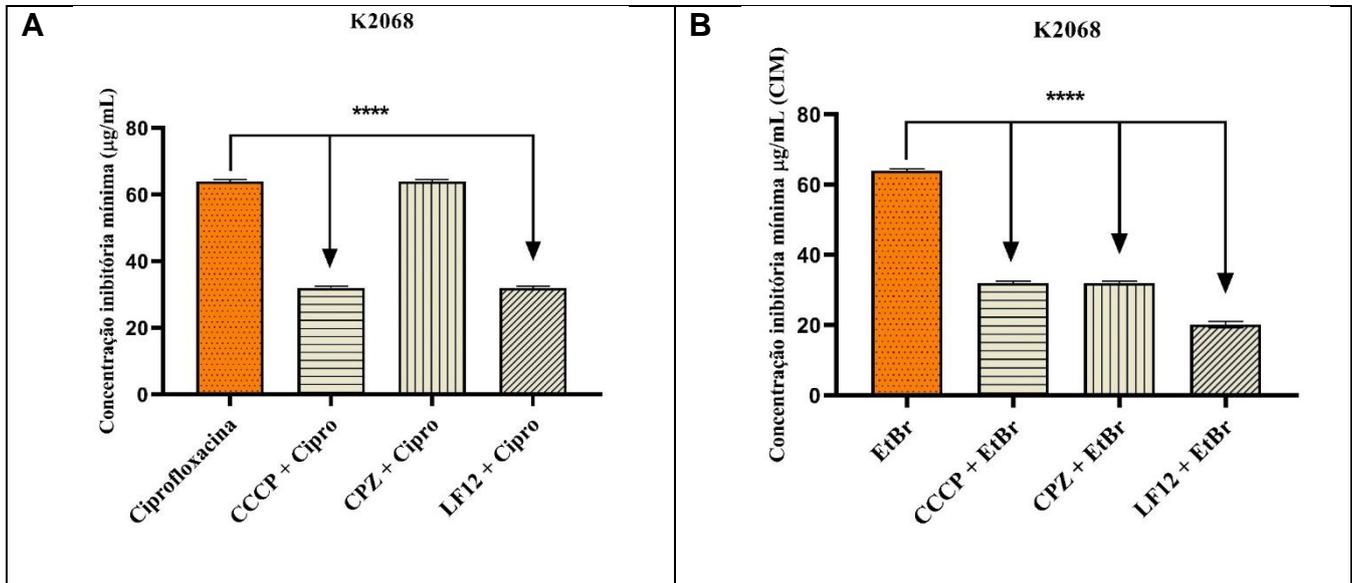


Figura 1. Avaliação da capacidade inibidora de bomba de efluxo MepA da cepa *S. aureus* K2068, por LF12. **A** = associado à ciprofloxacina. **B** = Associado ao brometo de etídio. Cipro = ciprofloxacina; CPZ = clorpromazina; EtBr = brometo de etídio. **** = $P < 0,0001$ vs controle.

O derivado LF13 associado ao brometo de etídio apresentou efeito sinérgico, com redução da CIM em comparação ao controle EtBr, mas não potencializou o efeito do antibiótico ciprofloxacina. Os inibidores padrões CCCP também apresentaram resultados estatisticamente significantes demonstrando a reprodutibilidade do ensaio. Esses resultados sugerem que LF13 inibe a proteína MepA (Figura 2).

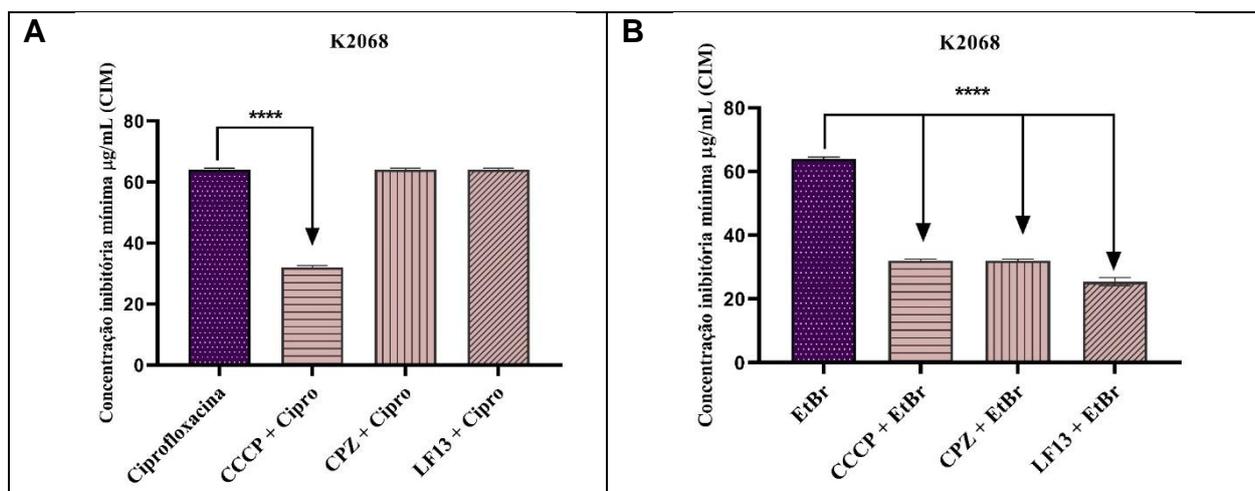


Figura 2. Avaliação da capacidade inibidora de bomba de efluxo MepA da cepa *S. aureus* K2068, por LF13. **A** = associado à ciprofloxacina. **B** = Associado ao brometo de etídio. Cipro = ciprofloxacina; CPZ = clorpromazina; EtBr = brometo de etídio. **** = $P < 0,0001$ vs controle.

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"



5. Conclusão

O composto LF12 possui bioatividade satisfatória, atuando como um possível potencializador de antibióticos e inibidor de mecanismo de efluxo em cepas de *S. aureus* resistente à múltiplas drogas.

6. REFERÊNCIAS

- BAMBEKE, V. F. et al. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: Occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 51, n. 5, p. 1055–1065, 2003.
- 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.
- 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.
- DEFFIEUX, D., GOSSART, P., QUIDEAU, S. Facile and sustainable synthesis of the natural antioxidant hydroxytyrosol. *Tetrahedron Letters* 2014, 55, 2455.
- GAZOLLA, P.A.R. et al. Síntese e avaliação da atividade citotóxica de derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólicos. *Química nova*, v. 41, n.5, 2018.
- KAATZ, G. W.; MCALEESE, F.; SEO, S. M. Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 5, p. 1857– 1864, 2005.
- KAUFMAN, T. S. The multiple faces of Eugenol. A versatile starting material and building block for organic and bio-organic synthesis and a convenient precursor toward bio-based fine chemicals. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2015, 26, 1055.
- DE MORAIS OLIVEIRA-TINTINO, Cícera Datiane et al. Do 1, 8-naphthyridine sulfonamides possess an inhibitory action against Tet (K) and MsrA efflux pumps in multiresistant *Staphylococcus aureus* strains?. **Microbial Pathogenesis**, v. 147, p. 104268, 2020.
- 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.