

VIII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVI Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 09 de dezembro de 2023

Tema: "INTERIORIZAÇÃO DA CIÊNCIA E REDUÇÃO DE ASSIMETRIAS: O PAPEL DOS PIBIC'S COMO EXPERIÊNCIA DE ARTICULAÇÃO DA PESQUISA NA GRADUAÇÃO E NA PÓS GRADUAÇÃO"



ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO MENTONA E GERANIOL CONTRA *Staphylococcus aureus*

João Arthur de Oliveira Borges¹, Gildênia Alves de Araújo², Ewerton Yago de Sousa Rodrigues³, Maria Jéssica Mendes Brito⁴, Talysson Felismino Moura⁵, Isaac Moura Araújo⁶, Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino⁷, Saulo Relison Tintino⁸

Resumo

A resistência aos antibióticos representa uma ameaça global à saúde humana e animal, devido a muitas espécies bacterianas desenvolvendo alguma forma de resistência. O uso exagerado de antibióticos é responsável pela seleção de bactérias adaptadas e portadoras de resistência a antibióticos que perdem sua eficácia no tratamento de infecções. Com isso, os fármacos antimicrobianos perdem sua eficácia contra bactérias multirresistentes. Assim, é necessária a busca por métodos eficazes no combate à resistência bacteriana. Dessa forma, estão em investigação novas alternativas para inibir o crescimento bacteriano e o aumento da atividade antibiótica. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana contra cepas de 1199B e K2068. O método de microdiluição em caldo foi utilizado nos testes microbiológicos. Na avaliação da inibição de bombas de efluxo os compostos foram avaliados em concentração subinibitória (CIM/8) associados ao norfloxacino, ciprofloxacino e ao brometo de etídio. Observou-se atividade antimicrobiana direta do geraniol frente a K2068 com CIM de 512 µg/mL. Já contra a cepa 1199B não apresentou atividade.

1 Introdução

Desde a descoberta dos antibióticos por Alexander Fleming, eles têm sido usados em toda a medicina e desempenham um papel vital no combate aos microorganismos. Entretanto, com seu amplo uso, o desenvolvimento de resistência tornou-se mais prevalente. A resistência aos antibióticos representa uma ameaça global à saúde humana e animal, com muitas espécies bacterianas desenvolvendo alguma forma de resistência (ALI, et al., 2018).

Entre as classes de bactérias que apresentam perfil de resistência está a cepa de *Staphylococcus aureus*. Ela é uma bactéria Gram-positiva que é capaz de causar uma gama diversificada de infecções, principalmente hospitalares, com capacidade rápida de adquirir resistência à antibióticos (ONANUGA, 2011). Em casos leves de infecções causar espinhas, terçol, furúnculo e foliculite, mas em casos graves podem causar pneumonia, endocardite e osteomielite (TONG, et al., 2015).

Assim, o uso de produtos naturais tem se mostrado uma alternativa promissora na atividade antibacteriana e na reversão da resistência bacteriana. Os produtos naturais terpênicos são responsáveis por mais de 30.000 diferentes compostos de metabólitos secundários que desempenham papéis distintos (ou seja, compostos de defesa em plantas contra infecções virais, bacterianas e parasitárias) também são encontrados em frutas, flores (DUDAREVA, et al., 2005).

Os monoterpenos pertencem a um grande e diversificado grupo de compostos que ocorrem naturalmente. A estrutura básica dos monoterpenos, consiste em duas unidades de isopreno ligadas, os terpenos apresentam diversas atividades biológicas, incluindo ações antimicrobianas (LIMA, et al., 2019).

A mentona é um monoterpeno que ocorre de forma natural em óleos essenciais. Sua estrutura está relacionada ao mentol, que possui um álcool secundário no lugar da carbonila. O mesmo é utilizado em aromatizantes, perfumes e cosméticos por seu odor mentolado e agradável (DESAM, et al., 2019).

O geraniol é um composto monoterpeno bem conhecido como o principal componente de muitos óleos essenciais. Este é encontrado principalmente em plantas herbáceas aromáticas e é econômico e fácil de produzir

2 Objetivo

Avaliar a atividade antibacteriana direta e a potencialização da ação antibiótica frente às cepas portadoras de bomba de efluxo pelos monoterpenos Mentona e Geraniol.

3 Materiais e Métodos

3.1. Ensaio microbiológicos

3.1.1. Cepas bacterianas e meios de cultura

Foram utilizadas as cepas de *S. aureus* 1199B, que expressa a proteína efluxo NorA e expele antibióticos e outras drogas, como corantes intercalantes de DNA; e cepa *S. aureus* K2068, portadora da bomba de efluxo MepA. Para a realização dos experimentos as cepas foram cultivadas por 24h a 37 °C em meio sólido *Heart Infusion Agar* (HIA) (Laboratórios Difco Ltda., Brasil).

3.1.2. Substâncias

Todas as substâncias, incluindo o Mentona e Geraniol utilizados nos testes foram adquiridas pela Sigma Aldrich Brasil. Os antibióticos Norfloxacino e Ciprofloxacino foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e em água estéril. A Clorpromazina (CPZ) e brometo de etídio (EtBr) 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 até uma concentração padrão de 1024 µg/mL.

3.1.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A atividade antibacteriana direta foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para os compostos Mentona e Geraniol. Foi utilizado o método de microdiluição em caldo proposto pelo [17] com adaptações. Os inóculos foram preparados 24h após a semeadura das cepas. Posteriormente, os microtubos foram preenchidos com 1350 μL de BHI e 150 μL de inóculo. As placas foram então preenchidas com 100 μL da solução final. Microdiluições seriadas foram realizadas com 100 μL dos compostos testados até a penúltima cavidade (1:1), onde as últimas fileiras verticais de placas foram utilizadas como controle de crescimento. As concentrações do composto variaram de 512 $\mu\text{g/mL}$ a 0,25 $\mu\text{g/mL}$. Após 24h de incubação, as leituras foram feitas pela adição de 20 μL de Resazurina (7-hidroxi-10-oxidofenoxazin-10-ium-3-ona). Os testes foram realizados em triplicatas.

3.1.4. Avaliação da inibição da bomba de efluxo pela redução da CIM dos antibióticos e do EtBr

Para verificar se Mentona e Geraniol atuam como um potencial inibidor da bomba de efluxo de NorA e MepA, a sua capacidade de diminuir a CIM do EtBr e dos antibióticos Norfloxacino e Ciprofloxacino foram comparadas aos inibidores padrão da bomba de efluxo. Os inibidores da bomba de efluxo padrão (EPI) CCCP e CPZ foram usados para comprovar a expressão da cepa da bomba NorA e MepA testada. A inibição das bombas de efluxo foram testadas usando uma concentração sub-inibitória (CIM/8) de EPIs e Mentona e Geraniol. Nesses testes, 150 μL do inóculo bacteriano foram suspensos em solução salina, correspondendo a 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC). Em seguida, foi adicionado EPI ou as substâncias testadas (MIC/8) e completada com BHI, para um volume final de 1500 μL . Estes foram então transferidos para placas de microdiluição de 96 poços, e em seguida realizada a microdiluição seriada com 100 μL do antibiótico ou EtBr, de formas que as concentrações ao longo dos poços variaram entre 512 a 0,25 $\mu\text{g/mL}$. A microdiluição ocorreu até a penúltima fileira, a última fileira foi destinada ao controle de crescimento. Por fim, as placas foram incubadas a 37 °C por 24h e o crescimento bacteriano foi avaliado com Resazurina (7-hidroxi-10-oxidofenoxazina-10-ium-3-ona). A CIM foi definida como a menor concentração na qual o crescimento bacteriano foi inibido, tanto com Norfloxacino e Ciprofloxacino quanto com EtBr. A CIM dos controles foi avaliada utilizando-se apenas os antibióticos Norfloxacino e Ciprofloxacino e o EtBr.

3.2 Análise estatística

Os ensaios antibacterianos foram realizados em repetições de triplicatas e os resultados foram expressos como a média geométrica das repetições. A análise estatística de hipóteses foi realizada para os ensaios antibacterianos por meio de ANOVA de duas vias seguidas do teste post hoc de Bonferroni, utilizando-se o software GraphPad Prism 7.0.

4 Resultados

4.1 Atividade antibacteriana sobre cepas portadoras de bomba de efluxo

Foi observado atividade antibacteriana direta do monoterpene Geraniol com CIM de 512 µg/ml, contra K2068, com relação ao Mentona não foi observado atividade bacteriana direta, com MIC \geq 1024 µg/ml, valor considerado clinicamente irrelevante, contra a cepa K2068. Contra 1199b, não foi observado qualquer atividade antibacteriana. No entanto a ausência de atividade antibacteriana ou baixa atividade observada no Mentona, o torna vantajoso para ser utilizado com inibidor de bomba de efluxo, tendo em vista que umas das vantagens de inibidores ideias é a ausência de atividade antibacteriana direta.

Compostos voláteis presentes em óleos essenciais já demonstraram apresentar grande potencial antibacteriano. Pode-se destacar a atividade dos monoterpenos, que podem atuar em vários alvos bacterianos (REICHLING, et al.,2006). Muitos monoterpenos podem causar perturbação na fração lipídica da membrana plasmática bacteriana, resultando em alterações da permeabilidade da membrana e no vazamento de materiais intracelulares (TROMBETTA, et al.,2005).

4.2 Atividade de redução da concentração inibitória mínima do antibiótico e brometo de etídeo.

Quando associado ao antibiótico dentre os monoterpenos analisados apenas o geraniol foi capaz de reduzir o MIC do antibiótico, na cepa 1199B de *S.aureus*, com redução de 64µg/ml para 16µg/m. Já quando associado ao brometo de etídeo, apenas o geraniol foi capaz de reduzir o MIC do brometo de etídeo de 64µg/ml para 16µg/mL.

Com relação à cepa de *S.aureus* K2068, foi observado redução de MIC do antibiótico em todas as associações com o ciprofloxacino, redução de 16µg/mL para 8µg/mL. Na associação com o brometo de etídeo também ocorreu redução do CIM, o geraniol reduziu de 64µg/mL para 32µg/mL.

5 Conclusão

O estudo demonstrou que Geraniol potencializou a ação de antibióticos e do brometo de etídeo, possivelmente inibindo as bombas de efluxo NorA e MepA. O mentona não possui atividade antibacteriana direta frente *S. aureus* 1199B e K2068. Porém, possivelmente o mentona pode potencializar a ação de fluoroquinolonas como o ciprofloxacino.

6 Referências

- ALI, J.; RAFIQ, Q. A.; RATCLIFFE, E. Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments. *Future science OA*, v. 4, n. 4, p. FSO290, 2018.
- ONANUGA, A.; TEMEDIE, T.C. Multidrug-Resistant Intestinal *Staphylococcus aureus* among Self-Medicated Healthy Adults in Amassoma, South-South, Nigeria. *J. Health. Popul. Nutr.* 2011, 29, 446.
- TONG, S.Y.C.; DAVIS, J.S.; Eichenberger, E.; Holland, T.L.; Fowler, V.G. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2015, 28, 603–661.
- DUDAREVA, N., Andersson S., Orlova I., Gatto N., Reichelt M., Rhodes D., Boland W. and Gershenzon J. (2005): The nonmevalonate pathway supports

both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 933–938.

Lima, D. S. de, Lima, J. C., Calvacanti, R. M. C. B., Santos, B. H. C. dos, & Lima, I. O. (2019). Estudo da atividade antibacteriana dos monoterpenos timol e carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro. *Revista an-Amazonica e aude*, 8(1), 5.

DESAM, N. R., AL-RAJAB, A. J., SHARMA, M., MYLABATHULA, M. M., GOWKANAPALLI, R. R., & ALBRATTY, M. (2019). Chemical constituents, in vitro antibacterial and antifungal activity of *Mentha* × *Piperita* L. (peppermint) essential oils. *Journal of King Saud University-Science*, 31(4), 528-533.

JAVADPOUR, M. M.; JUBAN, M. M.; LO, W. C. J.; BISHOP, S. M.; ALBERTY, J. B.; COWELL, S. M.; BECKER, C. L.; MCLAUGHLIN, M. L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996.

REICHLING, J., SUSCHKE, U., SCHNEELE, J., & GEISS, H. K. (2006). Antibacterial activity and irritation potential of selected essential oil components—structure-activity relationship. *Natural Product Communications*, 1(11), 1934578X0600101116.

TROMBETTA, D., CASTELLI, F., SARPIETRO, M. G., VENUTI, V., CRISTANI, M., DANIELE, C., ... & BISIGNANO, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6), 2474-2478.