

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 ANTIBACTERIANO DO CITRAL CONTRA *Staphylococcus aureus* E EFEITO TÓXICO CONTRA *Aedes aegypti* e *Drosophila melanogaster*

Gildênia Alves de Araújo¹, Talysson Felismino Moura², João Arthur de Oliveira³, Ewerton Yago de Sousa Rodrigues⁴, Raimundo Luíz Silva Pereira⁵, Isaac Moura Araújo⁶, Cícera Datiane de Moraes Oliveira Tintino⁷, Saulo Relison Tintino⁸

Resumo: Em outubro de 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) afirmou que a resistência bacteriana aos antibióticos é um dos principais problemas de saúde em todo o mundo, Entre as classes de bactérias que apresentam perfil de resistência está a cepa de *Staphylococcus aureus*. Um dos mecanismos de resistência da *S. aureus* são as bombas de efluxo, onde consiste em uma série de proteínas transportadoras, que estão localizadas na membrana celular bacteriana removem diversos substratos estranhos. Assim, o uso de produtos naturais tem se mostrado uma alternativa, promissora na atividade antibacteriana e na reversão da resistência bacteriana. Os terpenos têm apresentado diversas atividades biológicas, incluindo ações antimicrobianas. Dentre as classes de monoterpenos destacam-se o citral um aldeído monoterpênico. Estudos relataram efeitos antimicrobianos do citral contra diversas bactérias patogênicas. No processo de descoberta de novos agentes antibacterianos, a avaliação da toxicidade de produtos naturais é uma etapa crucial para determinar o perfil toxicológico e a segurança em células eucarióticas, portanto, *Drosophila melanogaster* é recomendada como modelo alternativo, já com o modelo de determinação da seletividade e risco de toxicidade a organismos (bioindicadores) utilizamos *Aedes Aegypti*.

Palavras-chave: Bactérias. Resistência. Produtos naturais

1. Introdução

Em outubro de 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) afirmou que a resistência bacteriana aos antibióticos é um dos principais problemas de saúde em todo o mundo, pois prolonga o tempo de internação hospitalar, aumenta os custos do tratamento e, o que é ainda mais grave, aumenta consideravelmente a mortalidade relacionada a doenças infecciosas (Harbarth S, et al., 2015). Entre as classes de bactérias que apresentam perfil de

-
- 1 Universidade Regional do Cariri, email: gildenia.araujo@urca.br
 - 2 Universidade Regional do Cariri, email: talysson.f.moura@urca.br
 - 3 Universidade Regional do Cariri, email: arthur.oliveira@urca.br
 - 4 Universidade Regional do Cariri, email: ewerton.sousarodrigues@urca.br
 - 5 Universidade Regional do Cariri, email: raimundoluiz.silva@urca.br
 - 6 Universidade Regional do Cariri, email: isaac.moura@urca.br
 - 7 Universidade Regional do Cariri, email: datianemorais@hotmail.com
 - 8 Universidade Regional do Cariri, email: saulo.tintino@urca.br

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"



resistência está a cepa de *Staphylococcus aureus*. Abscessos, infecções pulmonares, bacteremia, endocardite e osteomielite são todos causados por infecções por *S. aureus* em humanos (Tong, SYC et al., 2015). Um dos mecanismos de resistência da *S. aureus* são as bombas de efluxo.

As bombas de efluxo multidrogas funcionam na linha de frente para proteger as bactérias, esta barreira protetora consiste em uma série de proteínas transportadoras, que estão localizadas na membrana celular bacteriana e no periplasma e removem diversos substratos estranhos das células bacterianas (Ahmad-Mansour, N et al., 2021).

Assim, o uso de produtos naturais tem se mostrado uma alternativa, promissora na atividade antibacteriana e na reversão da resistência bacteriana (ARAÚJO et al., 2020; FREITAS et al., 2020).

Os terpenos têm apresentado diversas atividades biológicas, incluindo ações antimicrobianas (Lima, D. S. et al., 2019). Dentre as classes de monoterpenos destacam-se o citral. Citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal) é um aldeído monoterpênico formado por uma mistura natural de geranial (trans-citral) e neral (cis-citral). É encontrada em diversas plantas, como murta, bergamota, melissa, capim-limão e verbena (Dudai et al., 2005; Shi et al., 2016). Vários estudos relataram efeitos antimicrobianos do citral contra diversas bactérias patogênicas (Somolinos et al., 2010; Ouyang et al., 2018; Qian et al., 2020).

No processo de descoberta de novos agentes antibacterianos, a avaliação da toxicidade de produtos naturais é uma etapa crucial para determinar o perfil toxicológico e a segurança em células eucarióticas (Li, X., 2021). Pois portanto, *Drosophila melanogaster* é recomendada como modelo alternativo pelo *Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos* (ECVAM) (SHARMA et al., 2011). Com o modelo de determinação da seletividade e risco de toxicidade a organismos (bioindicadores) como afetados por agentes químicos são realizados através da ecotoxicidade (Hawkins et al., 2018).

2. Objetivo

Avaliar a atividade do monoterpeneo Citral contra cepas de *Staphylococcus aureus*, na inibição das bombas de efluxo NorA e MepA. E verificar a toxicidade em modelos de *Drosophila melanogaster* e *Aedes aegypti*.

3. Metodologia

3.1 Cepas bacterianas

Foram utilizadas as cepas de *S. aureus* 1199B, que expressa a proteína efluxo NorA e expõe antibióticos e outras drogas, como corantes intercalantes de DNA; e cepa *S. aureus* K2068, portadora da bomba de efluxo MepA. As cepas foram fornecidas pelo Prof. S. Gibbons (University of London).

3.2 Substâncias

O Citral utilizado no teste foi adquirido pela Sigma Aldrich Brasil. Os antibióticos Norfloxacin 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.

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"



3.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A atividade antibacteriana direta foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para o composto citral. Foi utilizado o método de microdiluição em caldo.

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

Para verificar se citral atua 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 Citral. Nesses testes, 150 μ L do inóculo bacteriano foram suspensos em solução salina, correspondendo a 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC).

3.5 Ensaio de mortalidade de *Drosophila melanogaster*

Foi realizada a metodologia de bioensaio de fumigação, para avaliar a toxicidade do citral, onde moscas adultas (machos e fêmeas, com idade aproximada de 4 dias), em número de 20, foram colocadas em frascos de 130 mL, previamente preparados com 1 mL de solução de sacarose a 20% em água destilada, permitindo que as moscas se alimentam *ad libitum*. Esta solução foi embebida em papel manteiga e colocada no fundo do frasco. A tampa do frasco continha papel de filtro (cortado em pedaços de aproximadamente 2 cm de diâmetro), impregnado com as respectivas doses compostas, fixado à face inferior da tampa. Do Citral foi utilizado nas quantidades de 1 μ L, 3 μ L e 5 μ L. Todos os bioensaios foram conduzidos em estufa do tipo BOD com ciclo claro e escuro de 12:12 h, temperatura controlada para $26 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ com umidade relativa de 60%. Os testes foram realizados em triplicatas e as leituras das taxas de mortalidade foram realizadas em 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 36h e 48h.

3.6 Ensaio de geotaxia negativa em *Drosophila melanogaster*

O dano ao aparelho locomotor foi determinado pelo teste de geotaxia. Resumidamente, após a contagem horária da mortalidade por moscas em 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 36h e 48h, o teste de geotaxia negativa foi realizado simultaneamente com as moscas sobreviventes, que consiste na contagem do número de moscas que se elevam acima de 5 cm na coluna de vidro do próprio experimento, em um intervalo de tempo de 5 s. Os testes foram repetidos duas vezes em intervalos de 1 min. Os resultados foram apresentados como o(s) tempo(s) médio(s) \pm SE obtido a partir de dois experimentos independentes.

3.7 Atividade inseticida contra larvas de *Aedes Aegypti*

Foram utilizados ovos doados do criatório de dípteros do laboratório de Ecologia Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Antes dos experimentos os ovos foram colocados para incubar com água destilada e ração de peixe para obtenção das larvas em L3, em uma câmara climatizada do tipo B.O.D por três dias, com a temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa do ar ($70 \pm 10\%$).

VIII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

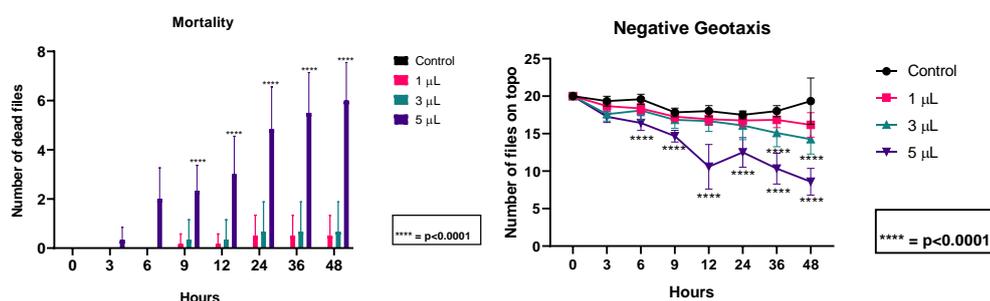
XXVI Semana de Iniciação Científica da URCA

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"



Na atividade inseticida do citral, foi observado uma mortalidade dose dependente e com efeitos tóxicos acumulativos com o passar do tempo, e com a maior mortalidade verificada após 72h de exposição, com todas as larvas mortas. No ensaio de associação com o piriproxifeno os feitos de dose dependente e efeito acumulativo de toxicidade também foram observados. Até a menor volume óleo de 5 μL a potencialização do inseticida foi observada. Os valores foram considerados significativo quando comparado com o piriproxifeno sozinho.



De acordo com a figura a maior mortalidade foi observada na maior concentração, mostrando uma relação dose dependente, já com relação ao tempo de exposição, foi apresentado pouca associação com aumento da mortalidade verificada. Citral, foi o que apresentou maior toxicidade com CL50 determinada precisamente de 2,478 μL . Conforme observado alterações claras da geotaxia foram observadas dependentes de concentração, sendo mais intensas na concentração de 5 μL .

5. Conclusão

Diante dos estudos apresentado o monoterpeno citral potencializou o efeito dos antibióticos e possivelmente inibindo as bombas de efluxo NorA e MepA. Contudo o monoterpeno estudado apresentou toxicidade em modelo *Drosophila melanogaster* e *Aedes Aegypti*, apresentando uma ação inseticida.

6. Agradecimentos

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

7. Referências

Ahmad-Mansour, N.; Loubet, P.; Pouget, C.; Dunyach-Remy, C.; Sotto, A.; Lavigne, J.-P.; Molle, V. Staphylococcus aureus Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. *Toxins* 2021, 13, 677.

ARAÚJO, A. C. J. et al. GC-MS-FID characterization and antibacterial activity of the Mikania cordifolia essential oil and limonene against MDR strains. *Food and Chemical Toxicology*, v. 136, p. 111023, 2020.

FREITAS, P. R. et al. GC-MS-FID and potentiation of the antibiotic activity of the essential oil of Baccharis reticulata (ruiz & pav.) pers. and α pinene. *Industrial Crops and Products*, v. 145, p. 112106, 2020.