

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"



MONOTERPENO ISOPULEGOL: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E INIBIDORA DE BOMBAS DE EFLUXO EM CEPAS DE *Staphylococcus aureus*

Daniel Sampaio Alves¹, Gabriel Gonçalves Alencar², Gustavo Miguel Siqueira³, Sheila Alves Gonçalves⁴, Ewerton Yago de Sousa Rodrigues⁵, Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino⁶, Henrique Douglas Melo Coutinho⁷

Resumo:

A resistência bacteriana é uma problemática global e de suma importância, devido a resistência das cepas bacterianas frente ao uso indiscriminado dos antibióticos. Dessa forma, a utilização de produtos naturais associados a antibióticos tem surgido como uma alternativa promissora. Pode-se frisar os monoterpenos que já apresentam atividade antibacteriana em alguns estudos e precisam ser mais bem estudados. Um monoterpeno promissor é o Isopulegol, encontrado em vários óleos essenciais, possuindo várias bioatividades. Objetivase avaliar a atividade antibacteriana e inibidora de bombas de efluxo do Isopulegol frente a *Staphylococcus aureus*. Foram utilizados os antibióticos norfloxaxina (para bomba de efluxo NorA) e ciprofloxacina (para bomba de efluxo MepA), o inibidor padrão de bomba Carbonyl Cianide m-ChloroPhenylhydrazone (CCCP), o Isopulegol e o brometo de etídio. Também foram utilizadas cepas *S. aureus* 1199B e K2068 que são portadoras das bombas de efluxo. O Isopulegol apresentou atividade direta relevante contra a cepa *S. aureus* K2068 e agiu como possível inibidor das bombas de efluxo NorA e MepA expressas pelas cepas *S. aureus* 1199B e K2068, respectivamente.

Palavras-chave: Isopulegol. Resistência bacteriana. *Staphylococcus aureus*.

1. Introdução

A resistência bacteriana representa um desafio crescente, uma vez que o desenvolvimento de antibióticos foi considerado um dos maiores avanços na área, porém os benefícios dessas drogas estão agora seriamente ameaçados pela resistência (LAXMINARAYAN et al., 2016). A resistência a antibióticos, especialmente no caso do *Staphylococcus aureus*, representa um

¹ Universidade Regional do Cariri, email: daniel.sampaio10@urca.br

² Universidade Regional do Cariri, email: gabriel.goncalves101@urca.br

³ Universidade Regional do Cariri, email: gustavo.miguelsiqueira@urca.br

⁴ Universidade Regional do Cariri, email: sheila.alves@urca.br

⁵ Universidade Regional do Cariri, email: ewerton.sousarodrigues@urca.br

⁶ Universidade Regional do Cariri, email: datianemorais@hotmail.com

⁷ Universidade Regional do Cariri, email: hdmcoutinho@gmail.com

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"



desafio crescente para a saúde pública, tornando as opções de tratamento limitadas e menos eficazes (TSOUKLIDIS et al., 2020; SILVA; NOGUEIRA, 2021; MOTA et al., 2022). A resistência bacteriana já é uma realidade hodierna e nos últimos anos houve a resistência de cepas muito perigosas como a de *S. aureus* que já conta com mecanismos de resistência como os genes que expressam bombas de efluxo dos fármacos, detergentes e substâncias tóxicas, gerando, então, a necessidade de buscar alternativas para burlar esses mecanismos de resistência, uma dessas alternativas se mostrou funcional, que foi a associação dos antibióticos aos produtos naturais. Segundo TINTINO (2018), para reduzir este problema, apoiado em vários estudos que relatam o uso de produtos naturais e seus óleos essenciais como substâncias antimicrobianas. Estas substâncias derivam do metabolismo secundário das plantas, como por exemplo, os flavonoides, terpenos, sesquiterpenos, taninos e alcaloides. De acordo com ALCÂNTARA et al. (2010), o Isopulegol é um monoterpene que pode ser encontrado em vários óleos essenciais, em diversas espécies, sendo responsável por diversas bioatividades. A resistência aos antimicrobianos representa uma ameaça crescente à saúde pública mundial e requer ações de todos os setores do governo, sociedade e principalmente da pesquisa. O sucesso de uma grande cirurgia ou quimioterapia, como também a prevenção e o tratamento de um conjunto cada vez maior de doenças seriam comprometidos na ausência de antibióticos eficazes, o que demonstra a necessidade de uma alternativa a esta resistência que é preocupante e crescente, tendo em vista a passagem desses genes de resistência para cepas descendentes, que são igualmente resistentes.

2. Objetivo

O objetivo deste estudo é avaliar a atividade antibacteriana e a capacidade de inibição de bombas de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus* mediante a aplicação do monoterpene isopulegol.

3. Metodologia

Foram utilizados os antibióticos norfloxacin (para bomba NorA) e ciprofloxacina (para bomba MepA), o inibidor padrão 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) foi diluído apenas em água destilada estéril até atingir concentração de 1024 µg/mL, e o CCCP (10 mg) foi diluído em uma solução de água destilada estéril e metanol (1:1) até atingir a mesma concentração dos outros produtos. Foram 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 foram inicialmente mantidas em ágar sangue para comprovar o tipo de cepa (Laboratorios Difco Ltda., Brazil), depois transferidas

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"



para o estoque. Sendo mantidas em dois estoques: um em Heart Infusion Agar (HIA, Difco) a 4° C outro mantido em glicerol em freezer -80 °C.

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

Linhagem	Proteína (antibiótico substrato)
1199B 1199 (Selvagem)	NorA (Norfloxacin)
K2068	MepA (Ciprofloxacina)

A partir das colônias bacterianas cultivadas e crescidas, após o período determinado, foram preparados os respectivos inóculos, suspendendo as bactérias em tubos de ensaio contendo 5 ml de solução salina estéril (0,9% NaCl). Os tubos contendo as suspensões foram levados ao agitador vortex e tiveram sua turbidez comparada à escala de McFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC (Unidades Formadoras de Colônias). Para avaliação da atividade antibacteriana direta foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Nootkatona, através da técnica de microdiluição em caldo, utilizando placas estéreis com 96 poços (NCCLS, 2003). Foi preparado o meio de distribuição em eppendorfs utilizando 100 μ L dos respectivos inóculos e 900 μ L do meio de cultura líquido BHI. O conteúdo do eppendorf foi transferido para placa de microdiluição. A próxima etapa sucedeu-se com a microdiluição das substâncias (Isopulegol e CCCP), com concentração de 1024 μ g/mL, sendo 100 μ L nesse meio até penúltima cavidade. Como a última cavidade trata-se do controle de crescimento, não foi adicionada. As concentrações finais das amostras no meio de cultura foram de 512 a 8 μ g/mL. Os testes foram realizados em triplicata e as placas incubadas a 35 ± 2 °C, durante 24h. Após esse período, as placas foram reveladas com corante específico, a resazurina. Poços com coloração azul após adição de resazurina indicou ausência de crescimento, enquanto coloração vermelha indicou crescimento bacteriano (SALVAT et al, 2001). Para a realização desse teste, em cada tubo eppendorf foi utilizado caldo BHI a 10%, 150 μ l 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 foram preparados utilizando-se apenas 1350 μ l do meio BHI 10% e 150 μ l do inóculo. O conteúdo dos tubos, distribuído em placas de microdiluição de 96 poços, 100 μ l em cada poço, em sentido numérico. A microdiluição foi realizada, separadamente, com 100 μ l 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 μ g/ml. Os testes foram realizados em triplicata e as placas incubadas em estufa por 24h a 37 °C, após esse período

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"



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 foi realizada utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.0. As médias geométricas foram 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

O Isopulegol apresentou atividade bacteriana direta frente a cepa *S. aureus* K2068 com CIM de 645 $\mu\text{g/mL}$, porém não apresentou atividade direta considerável frente a cepa *S. aureus* 1199B com CIM de 1024 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima do Isopulegol, contra cepas de *S. aureus* 1199B e K2068.

	<i>S. aureus</i> 1199B	<i>S. aureus</i> K2068
Isopulegol	1024 $\mu\text{g/ml}$	645 $\mu\text{g/ml}^*$

Frente a cepa *S. aureus* 1199B, os controles positivos, CCCP e CPZ (Clorpromazina), reduziram a CIM do antibiótico e do brometo de etídio, indicando reprodutibilidade do experimento. Diante da cepa *S. aureus* 1199B, o Isopulegol apresentou uma redução da CIM do Norfloxacino em 37% em comparação ao controle negativo do norfloxacino, na associação com o brometo de etídio, o Isopulegol foi capaz de reduzir a CIM em 50% em relação ao controle negativo do brometo. Esses resultados indicam que o Isopulegol age como possível inibidor da bomba de efluxo NorA. Frente a cepa *S. aureus* K2068, os controles positivos, CCCP e CPZ, reduziram a CIM do antibiótico e do brometo de etídio, indicando reprodutibilidade do experimento. Diante da cepa *S. aureus* K2068, o Isopulegol apresentou uma redução da CIM do Ciprofloxacino em 68% em comparação ao controle negativo do Ciprofloxacino, na associação com o brometo de etídio, o Isopulegol foi capaz de reduzir a CIM em 50% em relação ao controle negativo do brometo. Esses resultados indicam que o Isopulegol age como possível inibidor da bomba de efluxo MepA.

5. Conclusão

A pesquisa demonstrou que o Isopulegol apresentou atividade direta relevante contra a cepa *S. aureus* K2068. Não obstante, também age como possível inibidor das bombas de efluxo NorA e MepA expressas pelas cepas *S. aureus* 1199B e K2068, respectivamente. Posto isto, mais estudos são

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"



necessários para melhores esclarecimentos acerca do potencial antibacteriano do Monoterpeno Isopulegol.

6. Agradecimentos

Agradeço ao laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM), a Universidade Regional do Cariri (URCA) e ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

7. Referências

LAXMINARAYAN, R. et al. Acesso a antimicrobianos eficazes: um desafio mundial. **Lancet** (Londres, Inglaterra), v. 10014, pág. 168–75, 2016.

TSOUKLIDIS, N.; KUMAR, R.; HEINDL, S. E.; SONI, R.; KHAN, S. Understanding the fight against resistance: hospital-acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* vs. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Cureus**, v. 12, n. 6, p. 1-10, 2020.

SILVA, L. O. P.; NOGUEIRA, J. M. R. Resistência bacteriana: potencial de plantas medicinais como alternativa para antimicrobianos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 53, n. 1, p. 21-27, 2021.

MOTA, E. A.; CARRARO, F. M.; REY, L. M. R.; RUBIO, K. A. J.; ONACA, F. M. T.; FERREIRA, L. R. P.; SANTOS, I. C.; BARBOSA, L. N.; GONÇALVES, D. D. Uma revisão descritiva sobre o perfil de resistência de *Staphylococcus* spp. em gestantes e uso de extratos de plantas medicinais como perspectiva terapêutica. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, p. 1-11, 2022.

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

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.

COUTINHO, Henrique Douglas Melo et al. Peptides and proteins with antimicrobial activity. **Indian journal of pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 3, 2008.