

IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024

Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"



PINOCEMBRINA: UMA NOVA ABORDAGEM CONTRA A RESISTÊNCIA BACTERIANA

Janaina Tomaz de Melo¹, Débora de Menezes Dantas¹, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa¹, Ângella Eduarda da Silva Sousa¹, Débora Feitosa Muniz¹, Antonio Henrique Bezerra¹, Suieny Rodrigues Bezerra¹, Gildênia Alves de Araújo¹ e Francisco Assis Bezerra da Cunha¹.

Resumo

A resistência bacteriana aos antibióticos representa um desafio significativo para a medicina contemporânea, essa crescente resistência aos antibióticos compromete a capacidade de combater infecções, tornando doenças antes tratáveis em ameaças à saúde pública. Este estudo avaliou o potencial antibacteriano da Pinocembrina contra cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. A metodologia envolveu a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por microdiluição em caldo, utilizando as cepas SA-10 e ATCC 25213, além de ensaios para avaliar a modificação da CIM dos antibióticos em combinação com a Pinocembrina. Os resultados mostraram que a Pinocembrina apresentou uma CIM de $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ isoladamente, mas houve uma redução significativa das CIMs quando combinada com os antibióticos. Esses achados ressaltam a importância de investigar alternativas terapêuticas contra infecções causadas por *Staphylococcus aureus* multirresistente, destacando o potencial farmacológico da Pinocembrina.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana. Terapia combinada. Inibidores de resistência.

1. Introdução

A resistência bacteriana aos antibióticos representa um desafio significativo para a saúde pública global, caracterizando-se pela capacidade das bactérias de sobreviver à ação desses fármacos, o que compromete a eficácia dos tratamentos clínicos (SALAM *et al.*, 2023). Embora a adaptação bacteriana ocorra naturalmente, o uso inadequado e indiscriminado de antibióticos tem acelerado o surgimento e a disseminação de cepas resistentes (MUTEEB *et al.*, 2023).

A bactéria *Staphylococcus aureus* é um dos microrganismos que têm desenvolvido resistência a diversos antibióticos comumente prescritos, tornando-se uma ameaça à saúde pública (WHO, 2022). Infecções invasivas, como a bacteremia causada por *S. aureus*, apresentam alta mortalidade (VAART *et al.*, 2022) e fatores como sepse grave e choque séptico aumentam ainda mais o risco de óbito nessas infecções (JU *et al.*, 2021).

¹ Universidade Regional do Cariri, email: janaina.melox3@gmail.com; debora.menezes@urca.br; cristinase75@gmail.com; angella.eduarda@urca.br; deehmuniz78@gmail.com; henriquebezerra.urca@gmail.com; suieny.rodrigues@urca.br; gildene.araujo@urca.br; cunha.urca@gmail.com

IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024



Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"

Diante desse cenário, a busca por terapias alternativas é essencial, com ênfase no uso de substâncias naturais em combinação com antibióticos para potencializar o efeito desses fármacos (SEUKEP *et al.*, 2023).

Nesse contexto, a Pinocembrina se destaca como um potencial adjuvante, capaz de amplificar a ação dos antibióticos ao inibir mecanismos de resistência. Presente em várias plantas e na própolis, a Pinocembrina é reconhecida por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas (ELBATREEK *et al.*, 2023). Essas características tornam a Pinocembrina uma opção promissora para potencializar a eficácia dos antibióticos convencionais contra cepas resistentes (LAN *et al.*, 2016).

2. Objetivo

Avaliar o potencial antibacteriano da Pinocembrina contra *Staphylococcus aureus* multirresistente e investigar sua capacidade de modificar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de antibióticos em combinação, visando determinar o potencial adjuvante da Pinocembrina.

3. Metodologia

3.1 Substâncias

As substâncias Pinocembrina, Norfloxacin, Gentamicina e Ampicilina foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) e água esterilizada, utilizando menos de 5% de DMSO. Todas as soluções foram preparadas em uma concentração padrão de 1024 µg/mL.

3.2 Meios de Cultura e Cepas

Utilizou-se o meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) na forma de BHI-Agar (Acumedia Manufacturers Inc.) preparado conforme as instruções do fabricante e BHI caldo na concentração de 10%. As cepas de *S. aureus* empregadas foram a multirresistente SA-10 e a cepa padrão ATCC 25213, ambas fornecidas pelo Prof. S. Gibbons (University of London).

3.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM)

A CIM foi determinada pelo Método de Microdiluição em Caldo, adaptado de CLSI, (2008). As estirpes bacterianas, semeadas 24h antes, foram ajustadas para 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). A microdiluição foi feita com Pinocembrina em concentrações de 512 µg/mL a 8 µg/mL, com o último poço usado como controle de crescimento. Após 24h de incubação, a leitura foi realizada com resazurina, que mudou de azul para rosa na presença de crescimento bacteriano (ELSHIKH *et al.*, 2016). Os testes foram feitos em triplicata. A CIM foi definida como a concentração mais baixa em que não se pode observar crescimento bacteriano (ANDREWS, 2001).

IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024

Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"



3.4 Avaliação da atividade de modificação do efeito dos antibióticos

Foram realizados ensaios de associação para avaliar a capacidade da Pinocembrina em modificar a CIM dos antibióticos Norfloxacin, Gentamicina e Ampicilina. Nos testes, 150 µL de inóculo bacteriano ajustado para 0,5 na escala de McFarland foram combinados com Pinocembrina (CIM/8) e completados com caldo BHI. Essa solução foi transferida para placas de microdiluição, onde se adicionaram antibióticos em diluições de 512 a 0,5 µg/mL. Após incubação a 37 °C por 24h, o crescimento bacteriano foi monitorado com resazurina (ELSHIKH *et al.*, 2016). A CIM foi definida como a menor concentração sem crescimento visível (ANDREWS, 2001).

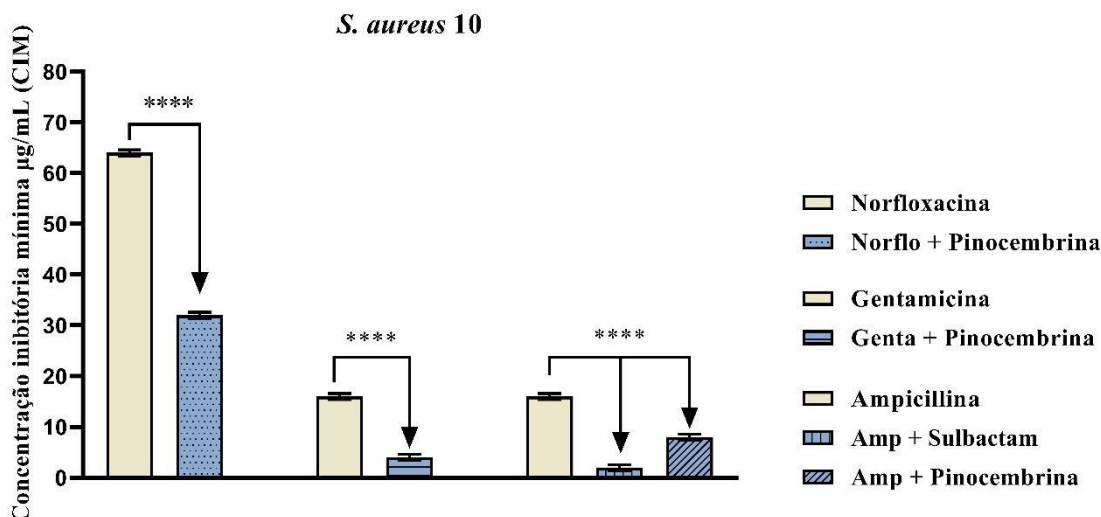
4. Resultados e Discussão

4.1 Atividade Antibacteriana e Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Pinocembrina apresentou uma CIM ≥ 1024 µg/mL para as cepas SA-10 e ATCC 25213. Esses valores indicam que os resultados observados não apresentaram relevância clínica (HOUGHTON *et al.*, 2007). Em contraste, no estudo de Soromou *et al.* (2013), a Pinocembrina mostrou atividade antibacteriana significativa contra diversas cepas de *S. aureus*, com CIMs de 64 e 128 µg/mL, resultados que divergem dos achados deste estudo.

4.1 Ensaio de associação com antibióticos contra *S. aureus*

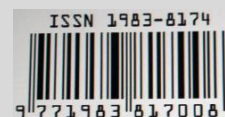
Com relação aos resultados dos ensaios de modificação da CIM dos antibióticos, foi observado uma redução significativa nas CIMs quando os antibióticos foram combinados com a Pinocembrina. A combinação de Pinocembrina com Norfloxacin reduziu a CIM de 64 µg/mL para 32 µg/mL, sugerindo um efeito aditivo que potencializou a atividade antibacteriana, Figura 1. De forma semelhante, a combinação com Gentamicina reduziu a CIM de 16 µg/mL para 4 µg/mL, Figura 1.



IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024



Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"

Figura 1. Potencialização de antibióticos pela Pinocembrina em *S. aureus* 10 multirresistente. Valores expressos como média geométrica $\pm$ DP da CIM de antibióticos isolados ou combinados. Norflo: Norfloxacin; Genta: Gentamicina; Amp: Ampicilina; ****: $p < 0,0001$ vs controle; ns: não significativo vs controle.

Em relação à Ampicilina, a CIM foi reduzida de 16 $\mu\text{g/mL}$ para 8 $\mu\text{g/mL}$ quando combinada com Pinocembrina, demonstrando também um efeito positivo na atividade do antibiótico, Figura 1. Esses dados sugerem que a Pinocembrina pode atuar como adjuvante no tratamento de infecções bacterianas, potencializando a ação de antibióticos como Norfloxacin, Gentamicina e Ampicilina. Estudos relatam que a combinação de Pinocembrina com antibióticos pode diminuir a CIM necessária para um tratamento eficaz (RANDHAWA *et al.*, 2016). Além disso, a Pinocembrina parece desestabilizar as membranas celulares bacterianas e alterar os processos metabólicos, promovendo uma maior penetração e eficácia dos antibióticos na célula bacteriana (WU *et al.*, 2022).

5. Conclusão

Por meio desse trabalho conclui-se que a Pinocembrina não apresenta atividade antibacteriana direta, entretanto potencializa a ação de antibióticos de referência, ação evidenciada pela significativa redução das CIMs dos antibióticos testados. Essa descoberta reforça o potencial das substâncias naturais como alternativas promissoras no combate à crescente resistência bacteriana.

6. Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. Ao CNPq [PDJ 32/2023 Junior Postdoctoral-172358/2023-0] e FUNCAP; [BPI 04/2022 BP5-0197-00174.01.00/22].

7. Referências

- ANDREWS, J.M., Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 5–16, 2001.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 11th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
- ELSHIKH, Mohamed *et al.* Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology letters**, v. 38, p. 1015-1019, 2016.
- ELBATREEK, Mahmoud H. *et al.* Current advances on the therapeutic potential of pinocembrin: An updated review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 157, 2023.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022**. World Health Organization, 2022.

IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024



Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"

- HOUGHTON, P. J. *et al.* Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p. 391–400, 2007.
- JU, Mohan *et al.* Predictors of mortality in adult patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: a meta-analysis and systematic review **Annals of palliative medicine**, v. 10, n. 8, p. 8617627-8618627, 2021.
- LAN, X., WANG, W., LI, Q. *et al.* The Natural Flavonoid Pinocembrin: Molecular Targets and Potential Therapeutic Applications. **Mol Neurobiol** v.53, p.1794–1801, 2016.
- MUTEEB, Ghazala *et al.* Origem dos antibióticos e resistência aos antibióticos, e seus impactos no desenvolvimento de medicamentos: Uma revisão narrativa. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 11, p. 1615, 2023.
- RANDHAWA, Harmandeep K. *et al.* Efflux pump inhibitory activity of flavonoids isolated from *Alpinia calcarata* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Biologia**, v. 71, n. 5, p. 484-493, 2016.
- SALAM, Md Abdus *et al.* Antimicrobial resistance: a growing serious threat for global public health. **Healthcare**, MDPI, 2023. p. 1946.
- SEUKEP, Armel J. *et al.* Bacterial drug resistance towards natural products. In: **Advances in Botanical Research**. Academic Press, 2023. p. 21-45
- SOROMOU, L. W. *et al.* Subinhibitory concentrations of pinocembrin exert anti-*Staphylococcus aureus* activity by reducing α -toxin expression. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 1, p. 41-49, 2013.
- VAN DER VAART, Thomas W. *et al.* All-cause and infection-related mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia, a multicenter prospective cohort study. In: **Open forum infectious diseases**. US: Oxford University Press, 2022. p. ofac653.
- WU, Yuru *et al.* A study of the antibacterial mechanism of pinocembrin against multidrug-resistant *Aeromonas hydrophila*. **International Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 605-613, 2022.