

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

VANESSA ELLEN FIGUEIREDO MELO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO 2-ALILFENOL
FRENTE *Staphylococcus aureus***

Juazeiro do Norte – CE
2022

VANESSA ELLEN FIGUEIREDO MELO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO 2-ALILFENOL
FRENTE *Staphylococcus aureus***

Trabalho de Conclusão de Curso – Artigo científico, apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientador: Dra. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro

Juazeiro do Norte – CE
2022

VANESSA ELLEN FIGUEIREDO MELO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO 2-ALILFENOL
FRENTE *Staphylococcus aureus***

Trabalho de Conclusão de Curso – Artigo científico, apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientador (a): Dra. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro.

Data de apresentação: 29/11/2022

BANCA EXAMINADORA

Dra. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro

Esp. Vanessa Lima Bezerra

Ma. Tassia Thaís Al Yafawi

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO 2-ALILFENOL FRENTE *Staphylococcus aureus*

Vanessa Ellen Figueiredo Melo¹;
Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro²

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e moduladora da substância 2-alilfenol a fim de encontrar novas alternativas para seu uso, uma vez que é um fenilpropanóide sintético amplamente estudado em sua atividade fungicida. Desse modo, este estudo experimental visa ainda observar a interação de características da substância frente concentrações diferente na microdiluição de diferentes cepas da bactéria *Staphylococcus aureus*, a ATCC 10536 padrão e a 10 resistente, associadas aos aminoglicosídeos Amicacina e Gentamicina que foram utilizados. Após o repique das bactérias em meio BHI, foi preparado o inóculo em escala de 0,5 da escala McFarland e a solução de 2-alilfenol em dimetilsufóxido, sendo essa diluída em água destilada em concentrações diferentes nos poços da placa de microdiluição. Após isso, foram incubadas e testadas com o uso dos antibióticos de interesse, sendo avaliada a mudança de cor com o auxílio do corante resazurina. Sugere-se que novos experimentos sejam realizados com outras metodologias para que haja uma maior exploração de novas alternativas bactericidas, diminuindo os malefícios causados por a resistência bacteriana.

Palavras-chave: Bactérias. Microdiluição. Resistência. Produtos naturais

ABSTRACT

The present work aims to evaluate the antibacterial and modulating activity of the substance 2-allylphenol in order to find new alternatives for its use, since it is a synthetic phenylpropanoid widely studied in its fungicidal activity. Thus, this experimental study also aims to observe the interaction of the characteristics of the substance against different concentrations in the microdilution of different strains of the bacterium *Staphylococcus aureus*, ATCC 10536 standard and resistant, associated with the aminoglycosides Amikacin and Gentamicin that were used. After multiplying the bacteria in BHI medium, the inoculum was prepared on a 0.5 McFarland scale and the solution of 2-allylphenol in dimethylsuffoxide, which was diluted in distilled water at different concentrations in the wells of the microdilution plate. After that, they were incubated and tested with the use of the antibiotics of interest, and the color change was evaluated with the help of resazurin dye. It is suggested that new experiments be carried out with other methodologies so that there is a greater exploration of new bactericidal alternatives, reducing the harm caused by bacterial resistance.

Keywords: Bacteria. Microdilution. Resistance. Natural products.

¹ vanessaefm@hotmail.com

² karollynasilva@leaosampaio.edu.br

1 INTRODUÇÃO

O uso da natureza para sobreviver é análogo à existência humana, visto que, anteriormente aos estudos e conhecimento da medicina, o meio natural era o único ambiente a ser explorado para combater enfermidades. Para isto, a evolução da ciência sempre seguiu aprimorando e validando técnicas que são herdadas de costumes e hábitos passados socialmente (CARNEIRO et al., 2014).

Nesse contexto, a exploração do ambiente natural para tratar doenças é principalmente associada a uma problemática dentro do ramo farmacêutico: a resistência de bactérias a antibióticos e a necessidade de suprirem esse problema com novas fórmulas mais agressivas e, conseqüentemente, mais prejudiciais ao corpo humano. Os processos de mutações, transdução ou seleção proporcionam uma alteração na genética do microrganismo que possibilita sua mediação ao medicamento exposto (LIMA et al., 2020).

Com o ideal de explorar substâncias que visem outros métodos de tratamento das patologias causadas por microrganismos, o 2-alilfenol vem sendo estudado como um fungicida (MENG et al., 2007), pois sua ação, principalmente associada a outros fenilpropanóides, age diminuindo o ATP, o que inibe respiração dos fungos (ARAGÃO NETO et al., 2019).

Destarte, por haverem classes de fenóis com propriedades antimicrobianas, há a possibilidade de explorar outros meios, como o composto sintético 2-alilfenol frente às bactérias, principalmente por ser uma questão de grande preocupação dentro de órgãos que visam maior qualidade e segurança para pacientes (BUENO-SILVA et al., 2016) e, dentre as de maior interesse hospitalar por seus altos riscos de infecções, tem-se as cepas de *Staphylococcus aureus* (VIANA et al., 2011).

Mesmo com o avanço da ciência e a capacidade dos fármacos em combaterem enfermidades, o uso indiscriminado, sem receitas e a interrupção do tratamento são os principais fatores que condicionam a uma grande problemática: a resistência bacteriana.

Nesse viés de alternativas naturais, o uso do 2-alilfenol, este grupo de fenóis usados principalmente em tratamentos inflamatórios, avalia a utilização dessa substância como uma nova alternativa farmacêutica, com o objetivo de contribuir para o tratamento de patologias que são comuns em toda a sociedade, causados pela bactéria

Staphylococcus aureus, ampliando-se, dessa maneira, as opções de tratamento alternativo em hospitais e em todo o meio da saúde coletiva.

¹ vanessaefm@hotmail.com

² karollynasilva@leaosampaio.edu.br

O seguinte estudo tem como premissa analisar a ação da substância 2-alilfenol como antimicrobiana e moduladora da resistência aos antibióticos frente à bactéria e *Staphylococcus aureus*; avaliando seus efeitos sinérgicos, antagônicos e/ou indiferentes da substância ao modular com aminoglicosídeos.

2 METODOLOGIA

2.1 LOCAL DA PESQUISA

As atividades foram realizadas nos Laboratórios de Microbiologia do Centro Universitário Leão Sampaio (UNILEÃO), em Juazeiro do Norte-CE.

2.2 PERÍODO DE REALIZAÇÃO DOS TESTES

Os testes foram realizados durante o período de agosto a outubro de 2022.

2.3 MICRORGANISMOS E PRODUTO UTILIZADO

Foi utilizada a linhagem bacteriana padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 10536 cedida pelo Instituto Oswaldo Cruz e a linhagem multirresistente de isolados clínicos *Staphylococcus aureus* 10. Todas as linhagens foram mantidas em Agar infusão de coração (HIA). Para a realização dos testes de microdiluição, as linhagens foram suspensas em tubo de ensaio com água destilada para obter uma suspensão com turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL). O composto 2-alilfenol foi obtido de *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, E.U.A.*

2.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E MODULAÇÃO DOS FÁRMACOS POR TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO

A determinação da CIM realizou-se através da técnica de microdiluição em caldo utilizando placas esterilizadas com 96 poços com diluições em série 1:1 (NCCLS, 2003). Culturas microbianas mantidas em ágar estoque sob refrigeração foram repicadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 35°C durante vinte e quatro horas. Após este período, realizou a padronização do inóculo, que consiste na preparação de uma suspensão em BHI, cuja turvação seja similar ao tubo 0,5 da escala McFarland (1×10^8 UFC/ml). Esta suspensão foi diluída cem vezes, em meio BHI, o que

corresponde aproximadamente a uma suspensão contendo 1×10^8 UFC/ml, da qual foi retirado 100 μ L e adicionado em cada poço da placa acrescido de diferentes concentrações do composto.

A solução teste está preparada utilizando 10 mg do 2-alilfenol solubilizado em 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo uma concentração inicial de 10 mg/mL. A partir desta concentração, foram realizadas as diluições em água destilada estéril para obter uma solução estoque de 1024 μ g/mL. As concentrações finais das amostras no meio de cultura são 512, 256, 128, 64, 32, 16 e 8 μ g/mL.

Os testes foram realizados em triplicata. As placas incubadas a 35 ± 2 °C durante vinte e quatro horas. Após este período, usou-se um corante específico para a revelação das placas, a resazurina. Esta solução foi preparada em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v). Após o período de incubação, 20 μ g/mL da resazurina, solução indicadora, foi acrescentada nas placas em cada cavidade e, depois de uma hora em temperatura ambiente, realizada a leitura do teste, que é determinada através da coloração do meio de cultura, sendo considerado crescimento microbiano para os poços que não apresentaram alteração na cor, ou seja, permaneceram com a coloração azul, e inibição para os que obtiveram coloração vermelha (SALVAT et al., 2001).

O controle negativo do teste é realizado com os meios de cultura contendo o inóculo. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) que definiu a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano nos poços de microdiluição, conforme detectado macroscopicamente.

O teste para avaliação da atividade moduladora foi realizado utilizando cepas bacterianas multirresistentes e o composto na concentração subinibitória. Os antibióticos amicacina e gentamicina serão utilizados em concentração de 1.024 μ g/mL e, por meio da microdiluição, adicionados nos poços contendo BHI a 10%, mais inóculo e 2-alilfenol. As concentrações finais de antibióticos foram de 512 a 0,5 μ g/mL. As placas foram incubadas por vinte e quatro horas a 35 ± 2 °C. Todos os testes realizados em triplicata e a revelação obtida através do uso de resazurina (COUTINHO et al., 2010).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos em média (geométrica) \pm desvio padrão, avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) seguida pelo *pos-test*

Bonferroni utilizando o software *GraphPad Prism 7.0*, onde as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O produto utilizado foi o 2-alilfenol, que segundo o estudo de Cui et al., (2021) esse fenilpropanóide pode apresentar a capacidade de desenvolver mecanismos que inibem a ação de microrganismos, como mostrado em sua pesquisa o uso dessa substância frente a fungos, mostrando atuação eficaz por inibir a ação desses quando associados a substâncias medicamentosas.

Após a obtenção da amostra, foi empregada a metodologia de microdiluição em caldo que permite encontrar a concentração inibitória mínima, sendo por essa razão um bom auxílio na determinação de qual melhor antimicrobiano utilizado no tratamento da infecção e se os testes de novos métodos serão eficazes (CLSI, 2018). Nessa análise, aplicada ao 2-alilfenol, obteve-se uma CIM de $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$, ou seja, a substância não apresentou efeito frente às cepas de *S. aureus*, sendo observada pouca ação entre essa e os aminoglicosídeos utilizados na modulação.

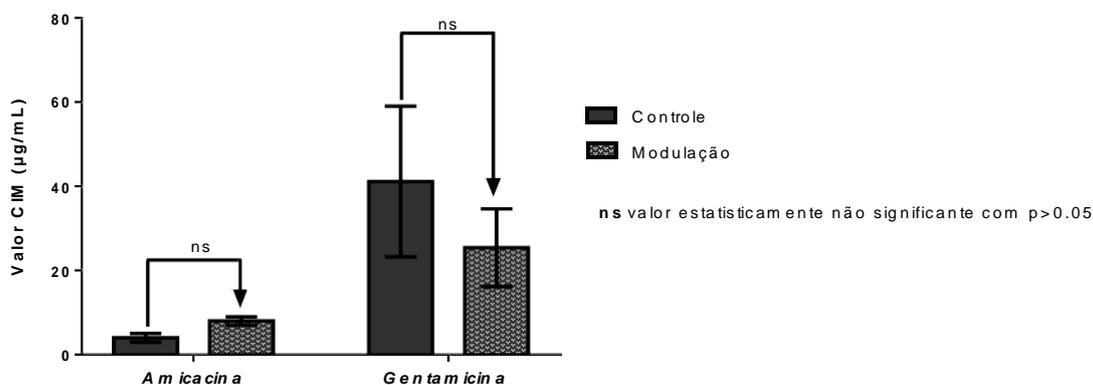
Por outro lado, outros autores obtiveram, do 2-alilfenol, uma atividade fungicida significativa afetando o sistema de respiratório e a produção de ATP, tendo suas funções normais prejudicadas pela exposição à substância (XIA et al., 2010). Esses resultados divergentes podem ser consequência do microrganismo estudado, devido principalmente a grande divergência entre a morfologia e fisiologia dos fungos e bactérias (EMIDIO et al., 2020).

Em contrapartida, o uso do Eugenol, substância semelhante em classe e estrutura ao fenilpropanóide testado, obteve resultados significativos como bactericidas em Gram negativas e positivas e, já avaliado e testado em cepas de *Staphylococcus aureus*, quando isolado ou associado à aminoglicosídeos de interesse na rotina hospitalar (ASSIS, 2016). Apesar da semelhança, a estrutura química do Eugenol possui um anel aromático que classifica uma maior estabilidade a cadeia, o que pode ter sido prejudicado na cadeia simples do 2-alilfenol na exposição aos testes (SANTOS et al., 2021).

A microdiluição do produto revelou que não houve inibição do crescimento bacteriano em nenhuma das concentrações testadas. Quando associados aos antibióticos, os resultados também não foram significantes no Gráfico 1, pois não houve diminuição da ação da bactéria em relação a coluna controle e a teste, sendo essa uma combinação

dos antimicrobianos aminoglicosídeos associados a amostra obtida do 2-alilfenol, o que resultou em resultado não significativo ao método empregado nos testes.

Gráfico 1 - Avaliação da atividade moduladora do 2-alilfenol frente *S.aureus* 10



Fonte: Próprio autor

Diante da realização dos testes, não foi possível estabelecer uma mudança estatisticamente na ação dos aminoglicosídeos Gentamicina e Amicacina ao serem associados ao produto, sendo estabelecido seu uso associado em outros métodos e mecanismos que visem melhor aproveitamento da amostra, já que seu uso de fenilpropanóides é, na literatura, associado à produção de fármacos classe dos antibióticos (SOUSA et al., 2022)

A gentamicina e amicacina são aminoglicosídeos, sendo essa classe associada à melhores resultados em bactérias Gram-negativos aeróbicos, tendo potencial moderado em bactérias Gram-positivas e sem efeito em bactérias anaeróbicas estritas (RIBEIRO, 2017). A bactéria *Staphylococcus aureus*, por ser Gram-positiva, pode ter limitado a ação do fármaco associado à substância estudada, pois antibióticos aminoglicosídeos apresentam propriedades químicas e farmacológicas semelhantes (LEGGETT, 2017).

Ao ser testado um produto em uma bactéria, é importante associar os fatores que podem dificultar a ação desses, como é o caso da parede celular dos procariontes, que é composta por peptidoglicano, que além de conferir a morfologia também atua na proteção do microrganismo, sendo as Gram-positivas composta por tripla camada desse heteropolissacarídeo, sendo assim mais espessa e apresentando maior dificuldade de que sejam penetrados algumas substancias, quando comparados as Gram-negativas que por apresentarem camada de peptidoglicano mais fina, possuem maior fragilidade (ROSA, 2008)

Nesse viés, outros métodos podem ser necessários para encontrar a forma mais

eficaz de utilizar o 2-alilfenol, como na extração de DNA bacteriano, pois essa técnica permite que sejam determinadas as particularidades do microrganismo, bem como reconhecer sua ação, diferenciação e, através da produção de fármacos que são geneticamente modificados. (BIERHALS et al.,2020)

4 CONCLUSÃO

Pelos estudos nesse trabalho, foi obtido resultados que aplicaram bactérias de interesse clínico para novas alternativas no minimização do impacto da resistencia bacteriana, apesar dos testes não conclusivos, a substância pode ser inovadora no ramo anribacteriano. Seria de suma importância para o amplo estudo do 2-alilfenol outros testes que mostrem melhor sua ação, encontrando a melhor metodologia viável para seu uso ser explorado como bactericida, sendo ampliado o uso de métodos alternativos na rotina medicamentosa.

REFERÊNCIAS

- ARAGÃO NETO, H. C. et al. 2-Allylphenol Reduces IL-1 β and TNF- α , Promoting Antinociception through Adenosinergic, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Mechanisms. *Hindawi*, v. 2019, n.1, p 2-6, 2019.
- ASSIS, D. B. **Efeito antinociceptivo do fenilpropanoide 2-alilfenol**. 81 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.
- BUENO-SILVA, B. et al. Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory processo. **Phytomedicine**, v. 23, n. 13, p. 1583-1590, 2016.
- BIERHALS, N. D. et al. Extração de DNA genômico bacteriano: uma comparação de métodos comerciais e in house. **Saúde (Santa Maria)**, v. 46, n. 2, 2020.
- CARNEIRO, F. M. et al. Tendências dos Estudos com Plantas Medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedades, saberes e práticas educacionais**, v. 3, n.2, p. 44-75, 2014.
- COUTINHO, H. D. M. et al. Effect of Momordicacharantia L. in the resistance to aminoglycosides in methicilin-resistant Staphylococcus aureus. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis**, v. 33, n. 1, 2010.

- CLSI. **Performance Standards for Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other Aerobic Actinomycetes.** Approved standard, 1st ed. CLSI Document M62 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- CUI, W. et al. Activity of eugenol derivatives against *Fusarium graminearum* Q1 strain and screening of isoeugenol mixtures. **Journal of Plant Pathology**, v. 3, n.3, p. 415-421, 2021.
- EMIDIO, E. C. P. et al. **Estudo da interação entre três diferentes reinos: entendendo a complexidade de co-infecções entre bactérias e o fungo *Cryptococcus gattii* em modelo murino.** Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.
- LEGGETT, J. E. Aminoglycosides. **Infectious Diseases**. v 4, n. 2, p. 1233-1238, 2017.
- LIMA, L. O. et al. Comparação de protocolos de extração de DNA genômico de *Capsicum* Spp. **Brazilian Journal Of Development**, v. 6, n. 5, 2020.
- MENG, Z. et al. Effect of 2-allylphenol against *Botrytis cinerea* Pers., and its residue in tomato fruit. **Crop Protection**, v. 26, n. 11, p. 1711-1715, 2007.
- RIBEIRO, A. M. F. **Farmacologia dos antibióticos aminoglicosídeos.** Tese (Mestrado - Ciências Farmacêuticas) Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2017.
- ROSA, D. D. Método rápido de extração de DNA de bactérias. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n.3, p. 259-261, 2008.
- SALVAT, A. et al. Screening of some plants from North Argentina for their antimicrobial activity. **Let. In. Appli. Microbio**, v. 32, n. 5, 2001.
- SANTOS, K. M. S. et al. Avaliando Métricas em Química Verde de Experimentos Adaptados para a Degradação do Corante Amarelo de Tartrazina para Aulas no Ensino Médio. **Química Nova na Escola**. v. 43, n. 4, p. 411-417, 2021.
- SOUSA, T. M; DA SILVA. F. B; DOS SANTOS O. C. Efeito antimicrobiano do cinamaldeído, principal componente dos óleos essenciais da canela: uma revisão da literatura. **Revista científica da faculdade de educação e meio ambiente**, v. 13, n.4, 2022.
- VIANA, A. P. P. et al. Incidência Bacteriana em Hemoculturas de Recém-nascidos e perfil de suscetibilidade frente aos antimicrobianos. **Revista Brasileira de Biologia e Farmácia**, v. 5, n. 1, p. 117-123, 2011.
- XIA, Y. et al. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of the new fungicide 2-allylphenol in strawberry fruits. **Food chemistry**, v. 120, n. 4, p. 1178-1184, 2010.