

VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODIFICADORA DA AÇÃO ANTIBIÓTICA DO MENTOL FRENTE A CEPAS BACTERIANAS

Raimundo Luiz Silva Pereira¹, Isaac Moura Araújo¹, Ana Carolina Justino de Araújo¹, Priscilla Ramos Freitas¹, Sheila Alves Gonçalves¹, Cicera Laura Roque Paulo¹, Daniel Sampaio Alves¹, Gustavo Miguel Siqueira¹, Henrique Douglas Melo Coutinho¹

Resumo: O uso indiscriminado de antibióticos tem aumentado o desenvolvimento da resistência bacteriana. Assim, a busca por compostos ativos para essas atividades aumentou e, nesse contexto o mentol como monoterpeno encontrado em vários óleos essenciais tem sido destacado para esses devidos fins. O objetivo desse trabalho é avaliar atividade antibacteriana direta e associada com antibióticos deste monoterpeno frente a cepas bacterianas de interesse clínico. O efeito antibacteriano do Mentol e a atividade modificadora da ação antibiótica foram realizados por microdiluição em caldo, sendo determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM). O mentol não apresentou atividade direta clinicamente relevante. Já no processo de associação do Mentol com os antibióticos, notamos que para algumas cepas houve um possível sinergismo como também foi notado antagonismo do mesmo, tendo valores significantes para essa observação. Para *Staphylococcus aureus* a oxacilina de acordo com seu controle observamos um possível sinergismo onde houve uma redução de 20,15 µg/mL em relação ao mentol associado com o mesmo 0,5 µg/mL, mostrando assim uma redução na concentração inibitória. Com o norfloxacino o controle foi de 256 µg/mL e a sua associação com o mentol foi de 128 µg/mL, ocorrendo novamente uma interação de redução da CIM. E para gentamicina sendo o controle 12,7 µg/mL e sua associação 10 µg/mL. Para *Pseudomonas aeruginosa* o antibiótico oxacilina foi indiferente não, demonstrou atividade clinicamente relevante. Já para gentamicina foi observado um possível sinergismo onde o controle do antibiótico foi de 16 µg/mL e a associação com mentol foi de 8 µg/mL. e para o norfloxacino houve um antagonismo. Podemos concluir que o mentol de forma isolada não apresentou atividade antibacteriana direta. Porém em associação com os antibióticos foi observado possíveis sinergismos desmontando assim sua capacidade de interagir com os mesmos. Principalmente com o antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, como a gentamicina e o norfloxacino que é um fluoroquinolona.

Palavras-chave: Monoterpeno. Mentol. Modulação.

1. Introdução

O surgimento de cepas bacterianas capazes de resistir aos antibióticos existentes no mercado se deve ao uso inadequado, empírico e excessivo dessas drogas. Além disso, outro fator que pode colaborar para o aumento da Resistência Antimicrobiana é a contaminação do meio ambiente através do descarte inadequado de antibióticos, contribuindo efetivamente para disseminação da resistência bacteriana a antibióticos largamente utilizados na

¹Universidade Regional do Cariri, email: raimundoluiz.silva@urca.br

VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



clínica, como os aminoglicosídeos, clorofenicol e β - lactâmicos (BOTTERY; PITCHFORD; FRIMAN, 2021).

Como exemplos importantes sobre resistência a antibióticos, destacam-se as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* que apresentam cepas resistentes a vários agentes antimicrobianos de importância para a saúde pública, podendo, serem utilizadas para observar a variação da resistência aos antibióticos utilizados comercialmente (BOSS; OVERESCH; BAUMGARTNER, 2016; PORMOHAMMAD; NASIRI; AZIMI, 2019).

Felipe e Bicas (2017) afirmam que os óleos essenciais são constituídos majoritariamente por terpenos, e que estruturas terpênicas de menor massa molecular, como os monoterpenos, apresentam volatilidade acentuada. Um exemplo é o monoterpeno mentol, que em dias quentes, principalmente, é liberado pelas folhas de hortelã. As espécies mais comercializadas são *M. x piperita* e *M. arvensis* tendo o mentol como constituinte majoritário (BOZOVIC *et al.*, 2015). Devido as suas várias propriedades terapêuticas o uso do mentol em alimentos, produtos farmacêuticos e tabaco, foi relatado por mais de 50 anos (ECCLES, 1994).

2. Objetivo

Geral

Avaliar a atividade antibacteriana do mentol frente as cepas padrões e multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, como a associação desse composto à antibióticos.

Específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM);
- Observar o efeito da modificação antibiótica do composto em relação aos antibióticos testados, norfloxacino, gentamicina, oxacilina.
- Observar possível efeito sinérgico ou antagônico frente as cepas bacterianas a serem testadas;

3. Metodologia

Obtenção do mentol

O composto foi obtido da Sigma-Aldrich, St. Louis.

Microrganismos, drogas e Reagentes

As cepas bacterianas padrão e multirresistentes utilizadas foram *Pseudomonas aeruginosa* (PA-ATCC 9023 e PA-24) e *S. aureus* (SA-ATCC 25923 e SA-10). Todas as cepas foram mantidas em ágar de infusão de coração (HIA, Difco Laboratories Ltda., Detroit-MI, EUA). Antes da realização dos ensaios, as cepas foram cultivadas por 24 h a 37 ° C. Todos os fármacos foram dissolvidos em água destilada e estéril na concentração de 1024 $\mu\text{g} / \text{mL}$. O reagente resazurina sódica para leitura.

Concentração Inibitória Mínima

VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método do caldo de microdiluição. Para sua confecção, foi utilizada uma placa de microdiluição estéril de 96 poços, e um meio de distribuição foi preparado em tubos Eppendorf® contendo uma solução de 1 mL composta por 900 µL de BHI 10% e 100 µL da suspensão bacteriana. A placa de microdiluição será preenchida no sentido numérico, adicionando-se 100 µL da solução de distribuição em cada cavidade, a seguir será realizada a microdiluição serial com 100 µL da solução teste, com concentrações finais variando de 512 a 8 µg / mL, até a penúltima cavidade, uma vez que esta se destinava ao controle do crescimento microbiano. As placas foram então incubadas por 24 h a 35 ° C (JAVADPOUR et al., 1966). Para a leitura das placas com bactérias, foram adicionados 20 µL de resazurina e, após 1 h em temperatura ambiente, foi realizada a leitura.

Atividade potencializadora de antibióticos

A metodologia proposta por Silva *et al.*, 2020 foi usado para avaliar o potencial da substância para modificar a resistência antibiótica. A solução foi diluída em uma concentração subinibitória. O meio foi preparado em tubos Eppendorf® contendo cada BHI 10% + 150 µL da suspensão bacteriana + substância, chegando a 1,5 mL de solução. Para o controle, a solução de 1,5 mL continha apenas 10% de BHI + 150 µL de suspensão microbiana. As concentrações dos antibióticos variaram gradativamente de 1.024 a 1 µg / mL. A leitura foi realizada da mesma forma que o teste MIC.

Análise Estatística

Os ensaios antibacterianos foram feitos em triplicata, e os resultados expressa em média geométrica para avaliação da atividade antibacteriana. Uma análise estatística ANOVA one-way foi aplicada para a análise da atividade antimicrobiana modulatória do mentol, tendo o teste de Tukey como um teste post hoc para ambas as análises, feito no software GraphPadPrism 5.0.

4. Resultados

A tabela a seguir mostra o resultado da atividade direta do mentol frente as cepas testadas mostrando que não houve uma atividade clinicamente relevante.

MENTOL	SA-ATCC 25923	EC-ATCC 25922	SA-10	EC- 06
	≥1024 µg/mL	≥1024 µg/mL	≥1024 µg/mL	≥1024 µg/mL

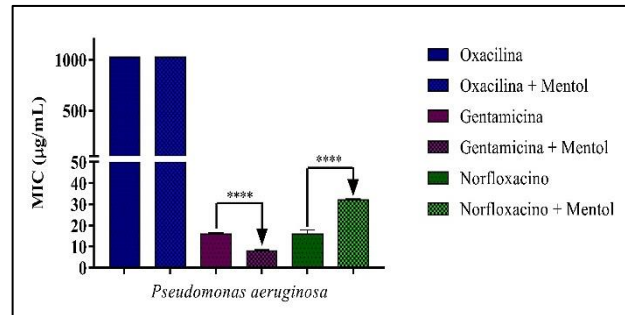
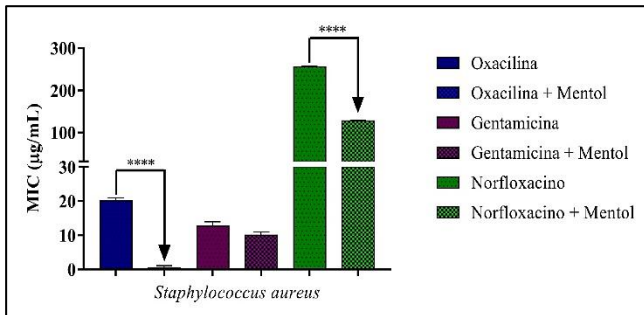
VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: "DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL"



Já no processo de associação do Mentol com os antibióticos, notamos para algumas cepas ouve um possível sinergismo como também foi natado antagonismo do mesmo, tendo valores significantes para essa observação.



****" $p < 0.0001$ indicates significant differences between groups. Statistical significance was determined by one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test.

Podemos notar que para *Staphylococcus aureus* a oxacilina de acordo com seu controle observamos um possível sinergismo onde houve uma redução de 20,15 µg/mL em relação ao mentol associado com o mesmo 0,5 µg/mL, mostrando assim uma redução na concentração inibitória. Com o norfloxacino o controle foi de 256 µg/mL e a sua associação com o mentol foi de 128 µg/mL, ocorrendo novamente uma interação de redução da CIM. E para gentamicina sendo o controle 12,7 µg/mL e sua associação 10 µg/mL.

Para *Pseudomonas aeruginosa* o antibiótico oxacilina foi indiferente não, demonstrou atividade clinicamente relevante. Já para gentamicina foi observado um possível sinergismo onde o controle do antibiótico foi de 16 µg/mL e a associação com mentol foi de 8 µg/mL. E para o norfloxacino houve um antagonismo.

O efeito modulador contra *Pseudomonas aeruginosa* foi observado de forma inesperada pois os microrganismos Gram-positivos possuem mais suscetibilidade a antibióticos do que os microrganismos gram-negativos como *P. aeruginosa* devido à sua composição da parede celular, o que dificulta a passagem de antibióticos (ERNEST *et al.* 2013; GUIMARAES *et al.* 2010). *P. aeruginosa* apresenta vários mecanismos de resistência, por exemplo, a produção de beta-lactamase e o aumento da expressão de bombas de efluxo sendo que *S. aureus* apresenta alguns componentes que também lhe conferem a capacidade de resistir as drogas como os de acima citados (LIVERMORE, 2002) e, portanto, possui resistência a uma ampla classe de antibióticos (FUENTEFRÍA *et al.* 2008).Mostrando assim que a junção do composto aos antibióticos potencializou a atividade dos mesmos, em determinadas situações mostrando assim a efetividade dos compostos isolados de produtos naturais.

VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



5. Conclusão

Podemos concluir que o mentol de forma isolada não apresentou atividade antibacteriana direta. Porém em associação com os antibióticos foi observado possíveis sinergismos desmontando assim sua capacidade de interagir com os mesmos. Principalmente com o antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, como a gentamicina e o norfloxacino que é uma fluoroquinolona.

6. Referências

BOSS, Renate; OVERESCH, Gudrun; BAUMGARTNER, Andreas. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, Enterococci, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* from raw fish and seafood imported into Switzerland. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 7, p. 1240-1246, 2016.

BOTTERY, M. J.; PITCHFORD, J. W.; FRIMAN, V.-P. Ecology and evolution of antimicrobial resistance in bacterial communities. **The ISME Journal**, v. 15, n. 4, p. 939–948, 2021.

BOŽOVIĆ, Mijat; PIROLLI, Adele; RAGNO, Rino. Óleo essencial de *Mentha suaveolens* Ehrh. (Lamiaceae) e seu principal constituinte óxido de piperitenona: atividades biológicas e química. **Moléculas**, v. 20, n. 5, pág. 8605-8633, 2015.

ECCLES, R. Mentol e compostos refrigerantes relacionados. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, n. 8, pág. 618-630, 1994.

ERNEST, A. AZZOPARDI; ELAINE, L. FERGUSON; DAVID, W. THOMAS. **The enhanced permeability retention effect: a new paradigm for drug targeting in infection**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* v. 68, p. 257-274, 2013.

FELIPE, Lorena O. et al. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

FUENTEFRÍA, Daiane Bopp et al. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 470-473, 2008.

GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.

Javadpour MM, Juban MM, Lo WCJ, Bispo SM, Alberty JB, Cowell SM, McLaughlin ML (1966) Peptídeos antimicrobianos de novo com baixa toxicidade celular em mamíferos. **J Quim Med** 36(19):3107–3113

LIVERMORE, D.M. **Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare?** *Clinical Infectious Diseases* v. 34, p. 634-640, 2002. <https://doi.org/10.1086/338782>

PORMOHAMMAD, A.; NASIRI, M. J.; AZIMI, T. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains simultaneously isolated from humans, animals, food, and the environment: a systematic review and meta-analysis. **Infection and drug resistance**, v. 12, p. 1181, 2019.

SILVA, Priscila Teixeira da et al. Análise estrutural, vibracional, eletroquímica e potencial antibacteriano de chalconas isoméricas derivadas da acetofenona natural. **Ciências Aplicadas**, v. 10, n. 14, pág. 4713, 2020.