

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CARVACROL EM BACTÉRIAS PADRÕES E MULTIRRESISTENTES

Débora Feitosa Muniz¹, Ana Raquel Pereira da Silva², Thiago Sampaio de Freitas³, Henrique Douglas Melo Coutinho⁴

Resumo: O uso desenfreado de fármacos tem causado a resistência bacteriana mais difícil de tratar, com isso a busca por terpenos, substância extraída das plantas tem sido muito estudada como um meio promissor. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do Carvacrol em sua composição simples contra cepas microbianas padrões e multirresistentes. A atividade antibacteriana foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, obtendo-se desta forma o valor da Concentração Inibitória Mínima (CIM), e a partir do valor da concentração subinibitória (CIM/8) foi determinado a atividade modificadora da ação dos antibióticos. O Carvacrol apresentou uma CIM clinicamente relevante para as cepas. Na atividade moduladora, o carvacrol em associação com a gentamicina para *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* foi visto o efeito sinérgico, essa substância conseguiu reduzir a CIM deste antibiótico. A associação da gentamicina com o Carvacrol para *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, pode ser promissor contra a resistência dessas cepas.

Palavras-chave: Resistência. Fármaco. Atividade bacteriana. Terpenos.

1. Introdução

A humanidade utiliza-se das plantas aromáticas desde os tempos imemoriais, como realçadores do sabor de alimentos e bebidas (Franz, 2010). Neste contexto as especiarias e plantas aromáticas são fonte importante de óleos essenciais, estes tem evidenciado diferentes ações farmacológicas, sendo frequentemente associados á atividade antibacteriana, por este motivo podem ser utilizados para diferir ou inibir o crescimento de micro-organismos (Mendes et al., 2011). Nas últimas décadas, a resistência bacteriana a drogas de patógenos humanos e animais, é uma preocupação mundial, a vista disso á busca por novos agentes antimicrobianos que possam superar o problema da resistência tem sido alvo de pesquisas (Duarte, 2006; Coutinho et al., 2008).

Os estudos de produtos naturais com atividade antimicrobiana inerente ou combinada com antibióticos podem representar uma nova forma de combate aos micro-organismos. Nesse seguimento, os metabólitos secundários de vegetais, tem se destacado tanto por apresentarem atividade antibacteriana, como também capacidade de potencializar a atividade de antibióticos (Tintino et al., 2013). O estudo do Carvacrol tem em vista as propriedades biológicas

1 Universidade Regional do Cariri, email: deboramuniz231@outlook.com

2 Universidade Regional do Cariri, email: anaraquel_ar@hotmail.com

3 Universidade Regional do Cariri, email: thiagocrato@hotmail.com

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

XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018
Universidade Regional do Cariri

resultantes dos metabólitos secundários das plantas, estas capazes de suprir a necessidade de novos agentes antimicrobianos, podendo ainda resultar na produção de novos fármacos. Este estudo consistirá em avaliar a atividade antibacteriana do Carvacrol determinando a concentração inibitória mínima (CIM) tanto isoladamente quanto no seu efeito modulatório em antibióticos padrões.

2. Objetivo

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana do Carvacrol em sua composição simples contra cepas microbianas padrões e multirresistentes.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana carvacrol, em sua forma simples, em cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* padrões e resistentes;
- ✓ Avaliar a atividade de modulação antimicrobiana do carvacrol, em sua forma simples, com norfloxacino, gentamicina e imipenem, em cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* resistentes;

3. Metodologia

3.1 Composto

Carvacrol compostos extraído de óleos vegetais da classe dos terpenos.

3.2 Cepas Microbianas

Os micro-organismos utilizados nos testes foram obtidos através do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA) cedida pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As linhagens utilizadas foram: cepas padrão de bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, e linhagens multirresistentes de *Escherichia coli* 06, *Staphylococcus aureus* 10, *Pseudomonas aeruginosa* 24.

3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo com placas contendo 96 cavidades e em triplicata. O inóculo depositado em solução salina para formar uma suspensão de 10^5 Unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Uma

XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018
Universidade Regional do Cariri

solução contendo 900 µL BHI a 10% e 100 µL do inóculo foi colocado em cada *ependorf*. Em seguida realizou-se a distribuição de 100 µL da solução em cada cavidade da placa (placa de 96 poços) adicionado 100 µL do composto em cada cavidade, através de sucessivas diluições na proporção de 1:1, até a penúltima cavidade, sendo a última cavidade reservada para controle (meio + inóculo). As placas foram colocadas na estufa a 35 °C, por um período de 24 horas (Javadpour et al., 1996). Para verificar se houve crescimento foi adicionado 20 µL de resazurina sódica.

3.4 Avaliação da atividade moduladora do Carvacrol

Para a avaliação da atividade moduladora do Carvacrol, foi preparado *ependorfs* contendo concentração sub-inibitória (CIM/8) do composto testado. Suspensões dos micro-organismos foram depositadas juntamente ao meio BHI a 10% e esta solução distribuída nas cavidades da placa de 96 poços. Logo em seguida 100 µL de cada antibiótico diluído foram adicionados na maior concentração na primeira cavidade seguindo com sucessivas microdiluições na proporção de 1:1, até a penúltima cavidade, em seguida as placas de microdiluição foram incubadas por 24 h a 35 °C, em estufa.

3.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados através de um teste ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni post hoc (onde $p < 0,05$ e $p < 0,0001$ são considerados significativos e $p > 0,05$ não significativo).

4. Resultados

A partir dos resultados foi observado que a CIM do carvacrol foi clinicamente relevantes. As cepas EC ATCC 25922, SA 10 e EC 06 tiveram uma CIM de 256 µg/mL. Já para as cepas SA ATCC 25923, PA ATCC 9027 e PA 24, foram obtidas CIM 81 µg/mL, 161 µg/mL e 128 µg/mL, respectivamente. Tabela 1. Concentração inibitória mínima (µg/mL)

Legenda: S.A- *Staphylococcus aureus*; P.A- *Pseudomonas aeruginosa*, E.C- *Escherichia coli*.

Bactéria	S. A	P. A	E. C	S. A 10	P. A 24	E. C 06
	ATCC 25923	ATCC 9027	ATCC 25922			
Carvacrol	81	161	256	256	128	256

XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018
Universidade Regional do Cariri

A bactéria SA ATCC 25923 apresentou a menor CIM, corroborando com outros trabalhos sobre a atividade antibacteriana de extratos, óleos essenciais ou substâncias isoladas, onde demonstrou possuir um melhor efeito sobre as bactérias Gram-positivas do que sobre Gram-negativas, devido à diferença da estrutura da parede e membrana celular que faz com que as Gram-positivas sejam mais sensíveis aos componentes dos óleos essenciais (Wang et al., 2012 e Obidi et al., 2013). Para as Gram-negativas, a natureza da membrana celular restringe a absorção de moléculas e seu movimento para dentro das células através dos canais de porinas (Tortora, 2012).

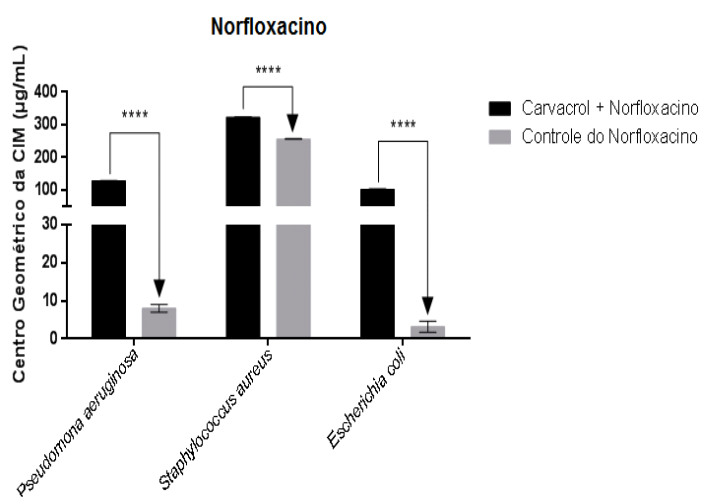


Gráfico 1. Teste da avaliação da atividade moduladora de antibiótico: carvacrol em sua composição simples associado com norfloxacino.

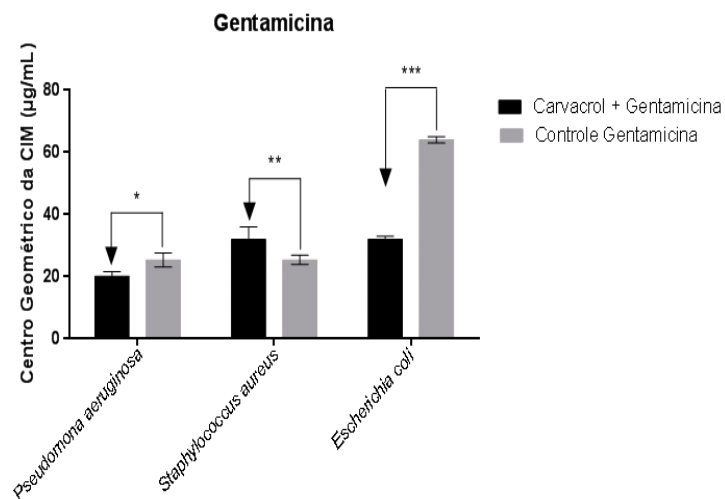


Gráfico 2. Teste da avaliação da atividade moduladora de antibiótico: carvacrol em sua composição simples associado com gentamicina.

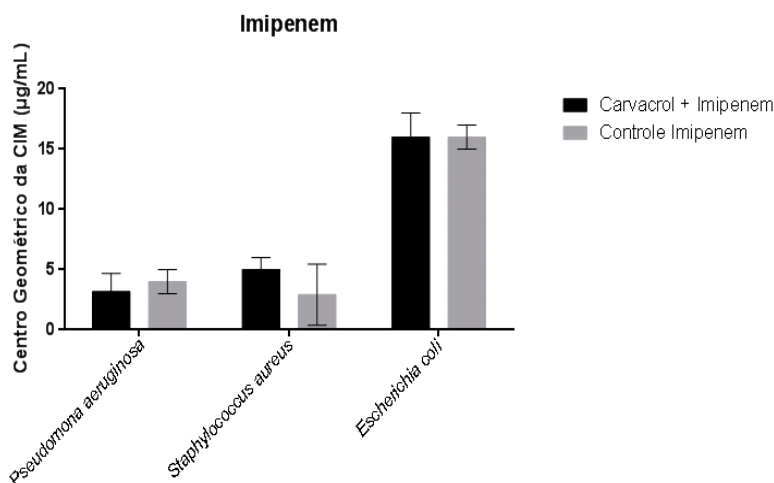


Gráfico 3. Teste da avaliação da atividade moduladora de antibiótico: carvacrol em sua composição simples associado com Imipenem.

De acordo com os resultados obtidos na associação com o norfloxacino para *P. aeruginosa* com o Carvacrol, apresentou antagonismo quando comparado com a CIM do norfloxacino isolado, ou seja, o Carvacrol com este antibiótico aumentou a concentração da CIM (gráfico 1). Para a *S. aureus* e *E.*

XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018
Universidade Regional do Cariri

coli foi observado antagonismo. A substância simples em associação com o antibiótico imipeném não apresentou resultados significantes estatisticamente (Gráfico 3). O antagonismo das substâncias em associação com os antibióticos pode ser explicado pela ligação dos compostos no local onde o antibiótico se ligaria ou a um possível mecanismo de quelação com o antibiótico, diminuindo o espectro de ação da droga (Oliveira et al., 2017; Coutinho et al., 2015).

5. Conclusão

- O carvacrol demonstrou atividade antibacteriana direta clinicamente relevante para cepas SA e PA padrões e PA 24 resistente.
- A substância em associação com o norfloxacino e o imipeném apresentou efeito antagônico para as cepas testadas.
- O carvacrol em associação com a gentamicina para *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* demonstrou efeito sinérgico, ou seja, essa substância conseguiu reduzir a CIM deste antibiótico.

6. Agradecimentos

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela o custeio da bolsa.

7. Referências

Coutinho, H.D. M. et al. Atividade antimicrobiana in vitro de Geraniol e Cariofileno sobre *Staphylococcus aureus*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 20, n. 1, p. 98- 105, 2015.

Coutinho, H. D. M., FALCÃO-SILVA, V. S., GONÇALVES, G. F. Pulmonary bacterial pathogens in cystic fibrosis patients and antibiotic therapy: a tool for the health workers. **International Archives of Medicine**, Londres, v. 1, n. 1, p. 1-7, Nov. 2008.

Duarte, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência**, Campinas, v. 7, n. 10, p. 1-17, out. 2006.

Franz, C. M. Essential oil research: past, presente and future. **Flavour and Fragrance Journal**, Nova Iorque, v. 25, n. 3, p. 112-113, maio-jun. 2010.

Javadpour, M. M., et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity, **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 3107-3113, 1996.

Mendes, L. P. M., et al. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e

Portulaca pilosa. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, n. 1, p. 121-5, 2011.

Obidi, O. F. et al. Antimicrobial activity of orange oil on selected pathogens. **The International Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 113-122, 2013.

Oliveira, H. F. D. **Nanoagregados baseados em ciclodextrinas em associação com a tetraciclina: caracterização físico-química e avaliação antimicrobiana**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais- BH, 2007.

Tintino, S. R., et al. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity and modulating the ethanol and hexane extracts of *Costus arabicus* bulb. **Bioscience Journal**, v. 29, n.3, p.732-738, 2013.

Tortora, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C. L; **Microbiologia**. 10a Edição. Porto Alegre: Artmed, 2012.

Wang, Y.W. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Kumquat (*Fortunella crassifolia* Swingle) Peel. *International journal of molecular sciences*, v. 13, n. 3, p. 3382-3393, 2012.