

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

GABRIELLA SOUZA NICOLAU

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATORIA DO α -PINENO ASSOCIADO
AO APARELHO DE LUZ LED**

Juazeiro do Norte – CE
2018

GABRIELLA SOUZA NICOLAU

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATORIA DO α -PINENO ASSOCIADO
AO APARELHO DE LUZ LED**

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.

Orientadora: Prof^a. Esp. Lívia Maria Garcia Leandro

Juazeiro do Norte – CE
2018

GABRIELLA SOUZA NICOLAU

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATORIA DO α -PINENO ASSOCIADO
AO APARELHO DE LUZ LED**

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.

Orientadora: Prof^a. Esp. Lívia Maria Garcia Leandro

Data de aprovação: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Esp. Lívia Maria Garcia Leandro
Orientadora

Prof^a Ma Tassia Thaís de Al Yafawi
1º Examinador

Prof. Esp. Cícero Roberto Nascimento Saraiva
2º Examinador

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATORIA DO α -PINENO ASSOCIADO AO APARELHO DE LUZ LED

Gabriella Souza Nicolau ¹, Livia Maria Garcia Leandro ²

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e modulatória do α -pineno quando associada ao aparelho de LED (Diodo emissor de luz) frente a cepas bacterianas multirresistentes *Escherichia coli* 27 e *Staphylococcus aureus* 358. O composto foi obtido por recursos próprios através da empresa Sigma Aldric, a técnica utilizada foi através do contato gasoso e a modulação com antibióticos e luz LED azul para determinação da atividade antibacteriana. Com o composto utilizado foi possível observar sinergismo quando associado aos antibióticos da classe das Quilonas (Ciprofloxacina, Norfloxacina), Aminoglicosídeos (Amicacina, Gentamicina) e Beta Lactâmicos (Oxacilina) frente às cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os resultados encontrados mostraram que o composto α -pinene tem ação sinérgica quando associado aos antibióticos convencionais, a oxacilina teve atividade satisfatória frente a cepa de *E.coli* e amicacina frente a cepa de *S. aureus*.

Palavras-chave: Atividade bacteriana. α -pineno. Resistência. *E.coli*. *S.aureus*

ANTIBACTERIAL AND MODULATORY ACTIVITY OF α -PINENE ASSOCIATED WITH THE LED DEVICE

ABSTRACT

The present work aimed to evaluate the antibacterial and modulatory activity of α -pinene when associated to the LED device (light-emitting diode) against multi-resistant bacterial strains *Escherichia coli* 27 e *Staphylococcus aureus* 358. The compound was obtained by means of the Sigma Aldric company, the technique used was through the gaseous contact and the modulation with antibiotics and blue LED light to determine the antibacterial activity. With the compound used, it was possible to observe synergism when associated with the antibiotics of the class of Quilonas (Ciprofloxacin, Norfloxacin), Aminoglycosides (Amicacina, Gentamicina) and Beta Lactamic (Oxacillin) against the multiresistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The results showed that the α -pinene compound has synergistic action when associated with conventional antibiotics, oxacillin had satisfactory activity against *E. coli* strain and amicacin against *S. aureus* strain.

Key words: Bacterial activity. α -pinene. Resistance *E. coli*. *S.aureus*.

1 Discente do curso de Biomedicina do Centro Universitário doutor Leão Sampaio

2 Professora Especialista em microbiologia do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio - UNILEÃO

INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são utilizadas pela população há décadas como forma de controle e prevenção de doenças. Os óleos podem ser extraídos a partir das folhas, flores, frutos, caule, sementes e raízes, a grande variância de compostos dão a esses óleos diversas finalidades, um exemplo é o poder bactericida que muitos possuem que podem ser usados como substâncias fitoterápicas (ORTEGA-VEGA et.al, 2017).

O α -pineno é um composto monoterpene encontrado em diversos óleos essenciais voláteis e em plantas como a malva-santa e o eucalipto encontrados no Nordeste do Brasil e que possuem atividade miorelaxantes essenciais em distúrbios intestinais e respiratórios (JUCÁ 2007; FARIAS et al 2017).

A espécie bacteriana *Escherichia coli* é a principal responsável pelas infecções do trato urinário (ITU) atingindo principalmente indivíduos susceptíveis como crianças, idosos e gestantes, é também responsável por grande parte das infecções hospitalares apresentando resistência às grandes classes de medicamentos disponíveis na rede pública de tratamento (KORB et al., 2013).

Staphylococcus aureus é um dos importantes patógenos a desenvolver resistência bacteriana, são microrganismos que habitam normalmente cavidades, como fossas nasais e pele, e que devido a alguma abrasão migram de seu local de origem e dão início desde simples infecções até complicações mais graves, principalmente em pacientes imunocomprometidos, além disso são frequentemente relacionados a infecções hospitalares (LIMA et al., 2015).

A resistência bacteriana aos antibióticos é um problema bastante preocupante, isso ocorre pela alta taxa de replicação de células bacterianas, assim como a sua fácil adaptação aos mais diferentes locais, são partes inseparáveis do ser humano, encontradas em diversos lugares fazem importante papel na sua proteção. O uso abusivo e a venda indiscriminada de medicamentos como a classe dos antibióticos é um dos principais fatores de mecanismo de resistência bacteriana, mecanismo usado como forma de proteção e de sobrevivência (SANTOS DE QUEIROZ, 2004)

Light Emithing Diodes (LED) é uma luz emitida em baixa intensidade que pode interagir com os tecidos biológicos e gerar resposta, quando posta frente a cepas bacterianas sua ação muitas vezes é positiva causando a morte bacteriana. Seu uso ainda é pouco visto no

meio clínico mas estudos mostram bons resultados, deixando claro que seu uso poderá ser bem promissor (MATIAS et al., 2018; SANTOS 2018).

Sabendo-se que o óleo extraído de uma planta e que possui poder antibacteriano atua assim no tratamento de algumas doenças, quando associado ao uso de LED poderá ter resultados significativos frente a cepas bacterianas multirresistentes. Por isso o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e modulatória do α -pineno associada ao uso do aparelho de LED.

METODOLOGIA

O trabalho trata-se de um estudo experimental, de caráter qualitativo e quantitativo, onde os resultados serão submetidos à análise estatística com testes de significância.

Foi utilizado o fitoconstituente (+) – α – pineno, obtido da empresa Sigma-Aldrich do Brasil Ltda., situada em São Paulo, sendo adquirido com recursos próprios. O meio de cultura foi adquirido de HIMEDIA, Índia o Brain Heart Infusion – BHI (concentração indicada pelo fabricante e 10%). O meio de cultura foi preparado segundo as especificações do fabricante e esterilizado em autoclave de vapor quente.

O aparelho utilizado durante o procedimento experimental Light Emitting Diodes (LED), que é um diodo emissor de luz, da marca NEW Estética®, o qual possui os espectros de luz vermelha, azul e amarela, permitindo também a combinação destas cores. A luz a ser utilizada a azul tem comprimento de onda pré-determinado pelo aparelho, de 415nm.

Foram utilizadas as linhagens multirresistentes de isolados clínicos *Escherichia coli* 27 e *Staphylococcus aureus* 358. As linhagens foram mantidas em Agar infusão de coração (HIA). Para realização dos testes, as linhagens suspendidas 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).

Para realização da semeadura dos microrganismos, usou-se placas de Petri contendo Brain Heart Infusion (BHI) Ágar. Discos de papéis filtro semelhantes aos de antibiograma foram colocados no centro de cada placa sobre o semeio e 10 μ L dos produtos a ser testados serão acrescentados na tampa das placas, foram realizadas diluições do composto nas diluições de 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8. Para determinação dos halos de inibição, as placas foram incubadas na estufa a 37°C por 24 horas. Os testes foram realizados em triplicata e para determinação dos halos utilizado uma régua milimetrada. Para a realização atividade

moduladora por contato gasoso em placas de Petri contendo BHI, foi usado a metodologia modificada por (INOUE; TAKIZAWA; YAMAGUCHI, 2001). Utilizados discos de antibióticos: amicacina, gentamicina, oxacilina, norfloxacina e ciprofloxacina. As placas foram invertidas e 10 µL do óleo essencial acrescentados nas tampas, permitindo que a partir da volatilização ocorra a interação com os discos. Outras placas foram preparadas sem o óleo para posterior comparação entre placas somente com os antibióticos e placas com antibióticos e óleo essencial. Para determinação dos halos de inibição, as placas serão incubadas na estufa a 37°C por 24 horas. Os testes serão realizados em triplicata e para determinação dos halos será utilizada uma régua milimetrada.

As placas foram submetidas à luz de LED azul durante dez minutos cada uma, as placas controles onde foram adicionado apenas os discos de antibióticos não serão submetido à luz e incubadas a 35 ± 2 ° C, durante 24h. Os testes realizados em triplicata e para determinação dos halos foi utilizada uma régua milimetrada.

Os resultados foram expressos em média aritmética \pm desvio padrão, avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) seguido pelo pos-test Bonferroni utilizando o software GraphPad Prism. Onde as diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$.

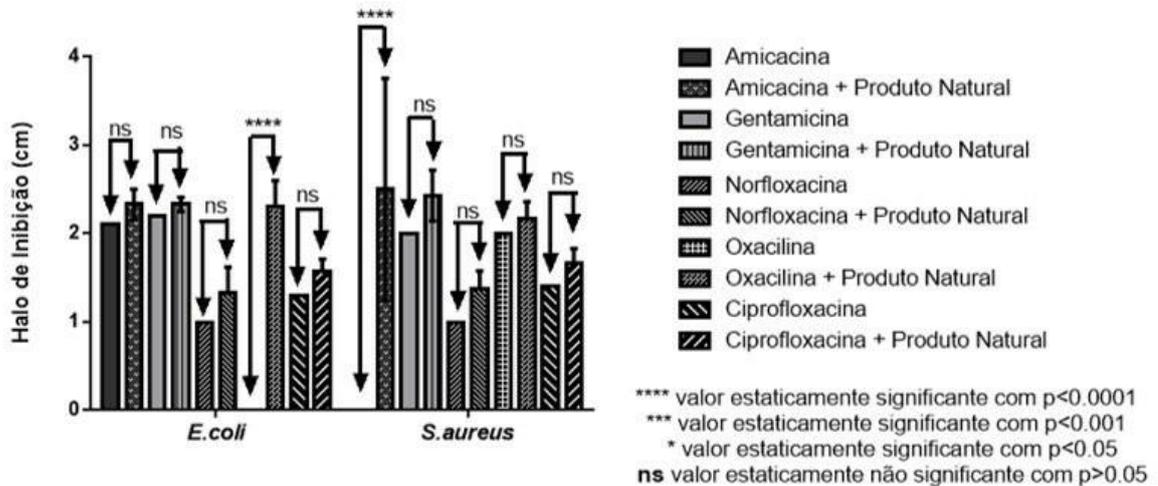
RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aumento de patógenos oportunistas vem se intensificando cada vez mais, com isso se faz necessário estudos que comprovem que compostos tenha ação positiva contra esses microrganismos (COLARES et al., 2018). Após a realização e obtenção dos resultados para determinação do halo foi visto que não houve inibição do crescimento bacteriano das cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Visto isso, mostra que o composto α -pineno não apresentou atividade antibacteriana considerável frente a esses microrganismos.

O efeito terapêutico de alguns compostos deve-se muitas vezes a princípios ativos presentes nele e que de acordo como é feito seu manuseio e a que cepas vão ser expostos a sua capacidade antibacteriana pode ser perdida (SOUZA et al., 2016).

O gráfico 1 a seguir mostra os testes de disco difusão utilizando 6 tipos de antibióticos Ciprofloxacina, Norfloxacina, Amicacina, Gentamicina e Oxacilina e associado ao composto α -pinene e expostos ao aparelho de LED azul.

GRAFICO 1: Modulação dos antibióticos associado ao composto α -pineno combinado com luz de LED azul.



A fototerapia com luzes de LED vem cada vez mais sendo usada é uma terapia com grande potencial antibacteriano a luz azul se mostra potencialmente promissora frente cepas bacteriana, Estudos mostram que a luz de LED azul revelou resultados inibitórios contra cepas bacterianas e as que não foram inibidas tiveram resultados diferentes e significativos quando comparado as placas controle (GALO et al., 2018).

Entre a diversidade de classes de antibióticos os aminoglicosídeos é a classe com maior interferência a resistência microbiana, devido a ações mutagênicas ou estruturais nas enzimas bacterianas (SOBRAL et al., 2016).

Na associação da cepa *S. aureus* com o aminoglicosídeo amicacina mostrou resistência bacteriana ao antibiótico, mas quando associada ao antibiótico, o composto e a luz de LED observou-se sinergismo. Resultados semelhantes foram encontrados na associação do antibiótico oxacilina, o composto e a luz de LED frente a cepa bacteriana multirresistente de *E. coli*. Mostrando assim resultados clinicamente significativos diante das cepas bacterianas multirresistentes *S. aureus* e *E. coli*.

Muitos são os mecanismos envolvidos para a resistência bacteriana, um deles está referentemente envolvido a sua estrutura como, a parede das bactérias Gram negativa que já possui mecanismos em sua membrana externa polissacarídica onde os fármacos não conseguem atravessar essa parede o que impede sua chegada ao local de ação. Os valores não significantes dos medicamentos frente a cepa bacteriana de *E. coli* pode ser explanado por sua estrutura de membrana que devido a sua larga camada de polissacarídeo impediu que o

fármaco mesmo associado ao composto e a luz de LED não teve ação farmacológica significativa, com exceção da amicacina que apresentou resultado significativo (SANTOS, RIBEIRO, 2016).

Segundo Soares e Pereira (2016) a cepa bacteriana de *S. aureus* pode apresentar resistência a classe de medicamento das penicilinas. Porém, o mesmo não ocorreu, pois o antibiótico oxacilina, que faz parte da classe de medicamento das penicilinas teve resultado clinicamente significativo, quanto aos outros testados não se teve valores significantes.

A classe de medicamento das quinolonas faz parte das maiores interações medicamentosas descritas em alguns estudos, isso pode causar desde riscos ao paciente e principalmente ocasionar resistência bacteriana incluído a ciprofloxacina e a norfloxacina (WEBER et al., 2012). Os aminoglicosídeos é uma das classes de medicamentos mais importantes pois além de eficazes são de baixo custo com isso se tornam a classe mais usada no mundo, a partir disso a resistência bacteriana dessa classe é muito comum justamente por sua grande utilização muitas vezes discriminada (OLIVEIRA, CANEDO, ROSSATO, 2002)

O uso de compostos naturais concomitantemente associado a medicamentos cresce muito rapidamente com o intuito de melhorar seu efeito, em alguns casos os compostos podem atuar inibindo ou intensificando seu efeito (OLIVEIRA et al., 2006). Nesse estudo foram realizados testes onde foi avaliado a ação do composto α -pineno com diluições diferentes onde foram testados o composto puro, e nas diluições de 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8 frente as cepas bacterianas multirresistente citadas acima, o resultado obtido foi resistência em todas as diluições.

Os resultados obtidos do composto quando utilizado individualmente não mostrou resultados significativos pois todos tiveram resistência mesmo nas diferentes diluições. Porém houve uma maior atividade quando associou o antibiótico junto do composto exposto a luz de LED onde houve um sinergismo quanto ao antibiótico amicacina frente a *E.coli*, pois quando apenas usado o antibiótico foi verificada resistência. Isso ocorreu também nessa mesma associação com o antibiótico oxacilina frente a *S. aureus* que mostrava resistência apenas com o antibiótico e mostrou o aumento do halo quando associado.

CONCLUSÃO

Demonstrou-se com base nos resultados que o composto α -pinene quando associada a luz de LED e a antibióticos convencionais como a amicacina e oxacilina possui ação

modulatória frente as cepas multirresistentes *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* respectivamente. Esse resultado colabora para futuras pesquisas que tenham o objetivo de elucidar os efeitos de associações medicamentosa e produtos naturais no controle de infecções bacterianas.

REFERÊNCIAS

COLARES, A. V. Avaliação da atividade antibacteriana das frações da entrecasca de *Guapira graciliflora* (Mart. ex Schmidt) Lundell (Nyctaginaceae). **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 5, n. 14, p. 02-06, 2018.

FARIAS, T. C. et al. Screening antibacteriano do (+)- α – pineno frente a cepas bacterianas Gram negativas. In: **II Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde**. 2017.

GALO, Í. D. C. et al. Fototerapia antimicrobiana: otimização de protocolo experimental in vitro e estudo de resistência bacteriana. 2018.

JUCÁ, D. M.; Propriedades farmacológicas de α - e β -pineno no musculo liso de gastrintestinal de rartos: efeito miorelaxante e pró-cinetico. Dissertação de mestrado em farmacologia UFC, 2007.

KORB, A. et al. Perfil de resistencia da bacteria escherichia coli em infecções do trato urinario em pacientes ambulatoriais. **Revista de biologia e ciencia da terra**, v. 13, n. 1, 2013.

LIMA, M. F. P. et al. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares - Revisão de literatura. **Journal Uningá review**, v. 21, n. 1, 2015

MATIAS, E. F. F. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora do óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. Associada as luzes de led. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 5, n. 14, p. 07-14, 2018.

OLIVEIRA, J. A. A. de; CANEDO, D. M.; ROSSATO, M. Otoproteção das células ciliadas auditivas contra a ototoxicidade da amicacina. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 68, n. 1, p. 7-13, 2002.

OLIVEIRA, R. de et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2006.

ORTEGA-VEGA, F. E. et.al. Avaliação da capacidade inibitória de óleos essenciais em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Rev.Bio.Agro** vol.15 no.spe2 Popayán Dez. 2017.

SANTOS DE QUEIROZ, N. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & |Contexto Enfermagem**, v.13, n. Esp, 2004

SANTOS, J. L. M. C. et al. Análise da influência da irradiação por led em cultura celular. 2018.

SANTOS, M. C.; RIBEIRO, M. 4. Bactérias de relevância clínica e seus mecanismos de resistência no contexto das infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS). **Revista Científica UMC**, v. 1, n. 1, 2016.

SOARES, A. V. S, PEREIRA, S. B. Inibição bacteriana do extrato fluido de *Stryphnodendron adstringens* (mart.) coville (barbatimão) sobre cepas selecionadas de *Staphylococcus aureus*. **Rev. Cient. Sena Aires**. 2016; 5(1): 39-44.

SOBRAL, M. A. F. et al. Atividade antibacteriana e modulação in vitro de extratos metanólicos e hexânicos de *beta vulgaris* spp. (Linnaeus). **Jornal Cubano de Plantas Mediciniais**, v. 21, n. 1, p. 20 a 30 de 2016.

SOUSA, A. T. L. de et al. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos metanólico e hexânico do caule folhado de *Melissa Officinalis*. **Ciencias de la salud**, v. 14, n. 2, p. 201-210, 2016.

WEBER, B. R. et al. Análise de dos medicamentos e interações potenciais em prescrições contendo antimicrobianos dispensados em uma farmácia comunitária de Ijuí/RS. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 2, n. 4, p. 122-127, 2012.