

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

CLÁUDIA MIELY DE SOUSA OLIVEIRA

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULÁTORIA DO COMPOSTO ISOLADO
Valenceno

Juazeiro do Norte – CE
2019

CLÁUDIA MIELY DE SOUSA OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULÁTORIA DO COMPOSTO ISOLADO
Valenceno**

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: Profº. Esp. Francisco Yhan Pinto Bezerra

Juazeiro do Norte – CE
2019

CLÁUDIA MIELY DE SOUSA OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULÁTORIA DO COMPOSTO ISOLADO
Valenceno**

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.

Orientador: Prof^o. Esp. Francisco Yhan Pinto Bezerra

Data de aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. (a): Prof. Esp. Francisco Yhan Pinto Bezerra
Orientador

Prof. (a): Prof^a Ma. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro
Examinador 1

Prof. (a): Prof^a Esp. Lívia Maria Garcia Leandro
Examinador 2

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULÁTORIA DO COMPOSTO ISOLADO Valenceno

Cláudia Mielly de Sousa Oliveira¹
Francisco Yhan Pinto Bezerra²

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e modulatória do composto isolado valenceno associado aos antibióticos da classe aminoglicosídeos amicacina e gentamicina pela técnica de microdiluição e modulação. Foram utilizadas as linhagens padrão e resistentes de *Escherichia coli* ATCC 25922 e 27, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e 358. Na avaliação antibacteriana foi utilizado apenas o composto valenceno enquanto na modulação foi utilizado o valenceno associado aos antibióticos e todos esses testes foram realizados em triplicata. Os testes com o composto não mostraram efeito antibacteriano frente às cepas testadas e nos testes modulatória, apresentaram tanto efeito sinérgico quanto antagônico do composto em associação com os antibióticos. Os resultados demonstram efeitos distintos, em que a modulação do composto Valenceno frente as cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* modulado a amicacina e *Escherichia coli* modulado a gentamicina apresentou efeito sinérgico. Por outro lado, frente as cepas bacterianas de *Escherichia coli* associado com amicacina e *Staphylococcus aureus* associado com gentamicina observou-se antagonismo. Diante dos resultados obtidos, fazem-se necessários estudos mais aprofundados a respeito do composto isolado valenceno para analisar seus efeitos antibacterianos e determinar os efeitos adversos.

Palavras-chave: Aminoglicosídeos. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. Valenceno.

ANTIBACTERIAL AND MODULATORY ACTIVITY OF THE ISOLATED COMPOUND Valenceno

ABSTRACT

The present work had the objective of evaluating the antibacterial and modulatory activity of the isolated valencene compound associated to aminoglycoside antibiotics amicacin and gentamicin by the microdilution and modulation technique. Standard and resistant strains of *Escherichia coli* ATCC 25922 and 27, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and 358 were used. In the antibacterial evaluation, only the valencene compound was used while in the modulation, the valencecene associated to the antibiotics was used and all these tests were performed in triplicate. Testing with the compound showed no antibacterial effect against the tested strains and in the modulatory tests, they presented both synergistic and antagonistic effects of the compound in combination with the antibiotics. The results demonstrate distinct effects in that the modulation of the compound Valencene against the bacterial strains of amicacin-modulated *Staphylococcus aureus* and gentamicin-modulated *Escherichia coli* showed synergistic effect. On the other hand, antagonism was observed against the bacterial strains of *Escherichia coli* associated with amikacin and *Staphylococcus aureus* associated with gentamicin. In view of the results obtained, more in-depth studies on the isolated compound valencene are necessary to analyze its antibacterial effects and to determine the adverse effects.

Keywords: Aminoglycosides. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. Valencene.

¹ Discente do curso de Biomedicina, Centro Universitário Dr. Leão Sampaio- UNILEÃO, claudiamielly@gmail.com

² Docente do curso de Biomedicina, Centro Universitário Dr. Leão Sampaio- UNILEÃO, yhanbezerra@leaosampaio.edu.br

1 INTRODUÇÃO

Destacando-se como um dos principais problemas públicos de saúde, a resistência antibacteriana é uma inevitável consequência do uso incorreto de antibióticos na espécie humana e animal. Dentre as várias consequências da resistência antibacteriana, ressalta-se o risco de superinfecções e o aumento dos efeitos colaterais (BORTOLOTTI et al., 2018).

Diante do vasto aparecimento de microrganismos multirresistentes aos antibióticos populares, faz necessário a buscar por saídas naturais, como por exemplo o uso de plantas medicinais (TINTINO et al., 2015). Em consequência a isso, pesquisas estão sendo feitas no intuito de aprimorar e investigar novos compostos que possam representar possibilidades à terapia antibiótica padrão (SANTOS, 2004).

Foi relatada a sensibilidade reduzida aos antibióticos que no Brasil são conhecidos como mais eficazes em casos de infecções causados por *Staphylococcus aureus*, como a vancomicina, oxacillina e a meticilina (ANVISA, 2010).

Staphylococcus aureus que pertencem ao grupo dos cocos Gram positivos, por terem forma esférica, fazem parte da microbiota normal, sendo encontrados habitualmente na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Entretanto, podem ser responsáveis por uma série de doenças caso migrem para um local que não seja da sua flora natural, causando desde uma simples infecção ou até mesmo casos mais graves como pneumonias e endocardites (SANTOS et al., 2007).

Escherichia coli é uma das bactérias que compõem o grupo dos bacilos Gram negativos, pertencente a flora intestinal sendo a causa mais comum de infecções, quando se deslocam para locais fora do intestino, principalmente no trato urinário. Essa classe apresenta resistência a diversos antimicrobianos, como a ampicilina, tetraciclinas e aos beta-lactâmicos (ROGERS; SIDJABAT; PATERSON, 2010).

A diversidade de conhecimento popular provindo da antiguidade alerta os pesquisadores da necessidade de aprofundar os estudos sobre a eficácia dos compostos que são encontrados em plantas que apresentam efeitos e são usadas na medicina popular, procurando esclarecer o poder de cura e benefícios dos princípios ativos das mesmas (FRANÇA et al., 2008).

O sesquiterpeno valenceno é composto extraído de plantas e um componente essencial das frutas cítricas. Obtido da laranja de Valência, o valenceno é biosintetizado a partir do pirofosfato de farnesilo (SHARON-ASA et al., 2003).

O composto valenceno tem como características ações antibacteriana, antialérgicas, antioxidantes, antissépticas e ainda age como barreira da pele, sendo usado para o tratamento de inflamações cutânea, por exemplo a dermatite atópica (YANG; DONG-UNG; SHIN, 2016).

A destilação a vapor é o método usado para a separação do valenceno dos óleos cítricos, entretanto, os pesquisadores tem evoluído no processo de produção do valenceno via biotecnologia, pois a concentração desse composto nas frutas cítricas é baixa, variando entre 0,2%-0,6% em peso (BEEKWILDER et al., 2014).

Portanto, o principal objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e modulatória do composto isolado valenceno frente a cepas de bactérias padrões e multirresistentes (*Escherichia coli* ATCC 25922 e 27, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e 358), como também avaliar o espectro de ação e o grau de inibição do composto obtidos a partir da mesma, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do composto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

O composto *Valenceno* foi obtido de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, E.U.A. e os aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) de LaborClin, Brasil. Os meios de cultura foram adquiridos de HIMEDIA, India e o Dimetilsulfóxido (DMSO) de Merck, Alemanha.

2.2 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas as linhagens bacterianas padrão de *Escherichia coli* ATCC 25923 e *Staphylococcus aureus* ATCC 10536 cedidas pelo Instituto Oswaldo Cruz e as linhagens multirresistentes de isolados clínicos *Escherichia coli* 27 e *Staphylococcus aureus* 358. Todas as linhagens foram mantidas em *Ágar infusão de coração* (HIA).

2.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA POR MICRODILUIÇÃO

A determinação da CIM foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo utilizando placas esterilizadas com 96 poços com diluições em série 1:1 (NCCLS, 2000). 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 24 h. Após esse período preparou uma suspensão contendo 1×10^6 UFC/mL, da qual retirou 100 µL e adicionado em cada poço da placa acrescido de diferentes concentrações do composto valenceno.

A solução teste do composto valenceno foi preparada utilizando 10 mg do produto solubilizado em 1 mL de dimetilsufóxido (DMSO) obtendo uma concentração inicial de 10 mg/mL. A partir desta concentração efetuou diluições em água destilada estéril para obter uma solução estoque de 1024 µg/mL. As concentrações finais das amostras no meio de cultura foram de 512, 256, 128, 64, 32, 16 e 8 µg/mL.

Os testes foram realizados em triplicata. As placas ficaram incubadas a 35 ± 2 °C, durante 24 h. Após esse período, para evidenciar os resultados adicionaram as placas 25 microlitros de resazurina.

2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MODULADORA POR MICRODILUIÇÃO

Para o teste de modulação foram usadas as linhagens multirresistentes (*Escherichia coli* 27, *Staphylococcus aureus* 358). As drogas utilizadas nos testes foram os aminoglicosídeos amicacina e gentamicina a uma concentração inicial de 1.024 µg/mL. A atividade moduladora foi determinada de acordo com os métodos propostos por Javadpour et al (1996); NCCLS (2000); Lorenzi et al (2003). As placas foram incubadas por 24 h a 35 ± 2 °C e a atividade foi evidenciada pelo uso de 25 microlitros resazurina sódica. A mudança de coloração azul para rosa, devido à redução de resazurina, indica o crescimento bacteriano

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média geométrica $\pm$ desvio padrão, avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) e teste de Borfemom, utilizando o programa GraphPad Prism 6,0 para Windows, onde as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na obtenção da Concentração Inibitória Mínima do composto isolado valenceno, onde não apresentou ação antibacteriana clinicamente relevante frente as linhagens testadas

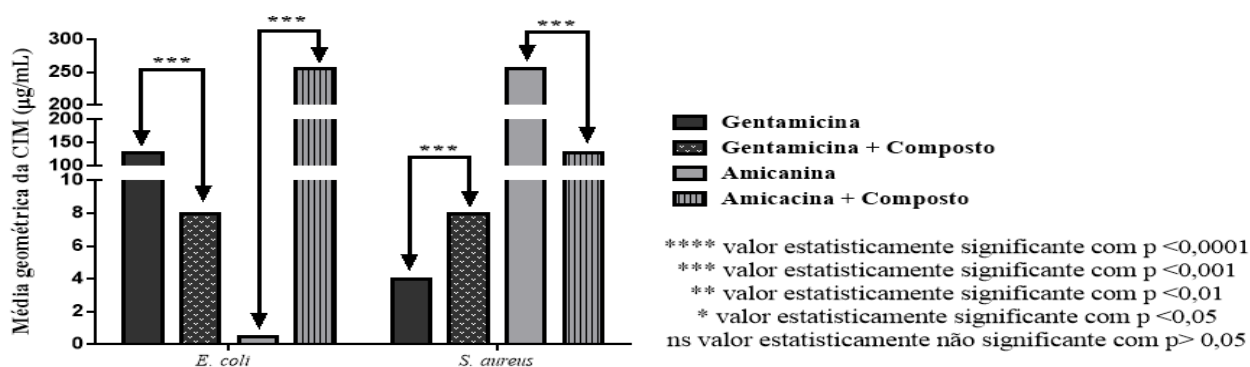
Escherichia coli ATCC 25922 e 27, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e 358. Com isso, realizou-se teste para avaliar o potencial modulador por contato direto.

Conforme apresentado por Caldas (2011), os terpenos têm sido descritos com atividade antibacteriana, sobre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, os microrganismos possuem uma sensibilidade diferenciada, dependendo do material vegetal analisado e a composição química dos óleos e compostos, entretanto, divergendo da pesquisa relatada, onde o valenceno isolado que pertence ao grupo dos sesquiterpenos um subtipo dos terpenos, não apresentou efeito inibitorio frente as cepas testadas.

Em estudo realizado por Heberle et al. (2016), o óleo essencial da laranja de valencia, que tem como componente o valenceno, não apresentou efeito antibacteriano frente a cepa de Gram-negativa *E. coli*, devido a estrutura da parede celular dessas bactérias ser constituída essencialmente de lipopolissacarídeos, que bloqueiam a penetração do óleo essencial e evitam o seu acúmulo na membrana de células alvo, conferindo maior resistência a essas bactérias. Condizendo com as informações, a presente pesquisa obteve resultados na qual não apresentou ação antibacteriana nas cepas de *E. coli*.

Os resultados dos testes de modulação do composto isolado valenceno frente aos antibióticos da classe aminoglicosídeos amicacina e gentamicina são apresentados no Gráfico 1. Os resultados demonstram efeitos distintos, em que a modulação do composto em estudo frente as cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* modulado a amicacina e *Escherichia coli* modulado a gentamicina apresentou efeito sinérgico. Por outro lado, frente as cepas bacterianas de *Escherichia coli* combinado com amicacina e *Staphylococcus aureus* combinado com gentamicina observou-se antagonismo com valor estatisticamente significativo de $p \geq 0,001$.

Gráfico 1 - Atividade modulatória de antibióticos aminoglicosídeos na presença e na ausência do composto valencene frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.



Fonte: primária

Segundo Madigan et al (2004) bactérias Gram-positivas, como exemplo *Staphylococcus aureus*, apresentam uma sensibilidade maior frente aos antibióticos, comparado com a *Escherichia coli*, pois, Gram-negativas, possuem maior resistência devido à complexidade da sua membrana plasmática, o que pode dificultar a ação de produtos naturais e a atividade de alguns antibióticos. Observa-se esse resultado no estudo realizado quando testamos a amicacina associada com o valenceno na *E. coli*, onde apresentou efeito antagônico.

De acordo com Trabulsi & Alterthum (2005), a gentamicina é um aminoglicosídeo, potente antibiótico bactericida que atuam através da criação de fissuras na membrana externa da célula bacteriana. Esse grupo tem como característica inibir a síntese proteica causando a morte de bactérias, particularmente ativos contra bactérias Gram-negativas e agem sinergicamente contra algumas bactérias Gram-positivas. Tais dados corroboram com a presente pesquisa quando observamos um efeito sinérgico testando a amicacina (que pertence a mesma classe da gentamicina e possuem o mesmo efeito) associado com o valenceno frente a cepa de *Staphylococcus aureus*.

Em estudos realizados por Coutinho et al (2015), o antagonismo em *E. coli* associada com a amicacina nos testes utilizando o composto isolado *d-limoneno*, deve-se a um possível mecanismo de quelação com o antibiótico ou a ligação do composto no local onde o antibiótico se ligaria, diminuindo o espectro de ação da droga. Evidenciando com os resultados obtidos na presente pesquisa quando testaram a amicacina associado com o valenceno na *E. coli*, onde apresentou efeito antagônico.

O valenceno que é um sesquiterpenos, possui ativos contra bactérias e segundo Heel (2007), a formação de complexos de proteínas solúveis que se liga na parede celular das bactérias, pode explicar a atividade modulatória e o efeito sinérgico, devido a presença de componentes como os sesquiterpenos, explicitando essa ação nos resultados do trabalho descrito quando testamos a amicacina associada ao valenceno na cepa de *S. aureus*.

O composto isolado valenceno possui poucos trabalhos relacionados a ação antimicrobiana e sobre o efeito potencializador em associação com drogas antimicrobianas geralmente utilizados na clínica, entretanto estudos demonstraram que compostos isolados e óleos essenciais de plantas podem modificar a atividade de antimicrobianos e assim melhorar seu desempenho diminuindo a concentração necessária para que haja inibição do crescimento. Vale salientar que diante os resultados observados, estudos aprofundados sobre o composto isolado é necessário.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que não houve ação antibacteriana *in vitro* do composto isolado valenceno, frente as cepas testadas. Os resultados estatisticamente significativos no potencial modulatório resultante da associação do composto estudado aos antibióticos da classe dos aminoglicosídeos geram tanto efeito sinérgico como antagônico em cepas bacterianas multirresistentes, sendo necessários mais estudos a fim de comprova sua eficácia e determinar os efeitos adversos, visando encontrar alternativas no combate a microrganismos multirresistentes.

REFERENCIAS

- ANVISA. Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Detecção a identificação de bactérias de importância médica. Brasília, 2010.
- BEEKWILDER, J, et al. Valencene synthase from the heartwood of Nootka cypress (*Callitropsis nootkatensis*) for biotechnological production of valencene. **Plant Biotechnology Journal**, v.12, n. 1, p 105, 2014.
- BORTOLOTI, K. DA C. S. et al., Qualidade microbiológica de águas naturais quanto ao perfil de resistência de bactérias heterotróficas a antimicrobianos. **Eng. Sanit. Ambient.** v.23, n.4, p. 33, 2018.
- CALDAS, F. R. L. **Avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante de óleos essenciais de folhas e inflorescências de *Ocimum gratissimum* L. (LAMIACEAE).** 2011. Dissertação de mestrado (Pós-graduação em Bioprospecção Molecular) Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-Ceará, 2011.
- 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.
- FRANÇA, I. S. X. et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Rev. Bras. Enferm.** Brasília, v. 61, n. 2, p. 23-27, 2008.
- HEBERLE, T. Estudo de processos de extração de óleos essenciais e bioflavonóides de frutas cítricas. **EDUCS**, v.1, n. 1, p. 19-29, 2016.
- HELL, B. F.; Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apitone. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3357–3360, 2007.
- JAVADPOUR, M. M.; JUBAN, M. M.; LO, W. C.; BISHOP, S. M.; ALBERTY, J. B.; COWELL, S. M.; BECKER, C. L.; MCLAUGHLIN, M. L. The New antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996.

LORENZI, H.; SOUZA, H. Plantas exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas. **Nova Odessa: Editora Plantarum**. v. 1, p. 384, 2003.

MADIGAN, M. T.; MARTINHO, J. M.; PARKER, J. Evolução e sistemática microbianas. **Microbiologia de Brock**, v. 1, n. 1, p. 302-330, 2004.

NCCLS. **National Committee For Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard: document M7-A3**. NCCLS, 2000.

ROGERS, B. A.; SIDJABAT, H. E.; PATERSON, D. L. *Escherichia coli*: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 1, n. 2, p. 113-117, 2010.

SANTOS, A. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 43, n. 6, p. 42-47, 2007.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enferm.**, v. 13, (n.esp), p. 13-17, 2004.

SHARON-ASA, T, et al. Citrus Fruit Flavor and aroma biosynthesis isolation, functional characterization, and developmental regulation of Cstps 1, a key gene in the production of the sesquiterpene aroma compound valencene. **The Plant Journal**. v. 36, n. 10, p. 10-15, 2003.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. **ArtMed**, v. 1, n. 4, p. 73-75, 2005.

TINTINO, S.R, et al. Atividade antimicrobiana e efeito combinado sobre drogas antifúngicas e antibacterianas do fruto de *Morinda citrifolia* L. **Acta biol. Colomb.** v. 20, n. 3, p. 22-26, 2015.

YANG, I.J; DONG-UNG, L; SHIN, H.M. Inhibitory Effect of Valencene on the Development of Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in NC/Nga Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2, n. 1, p. 7-10, 2016.