

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

MARIA DE FÁTIMA GUEDES MONTEIRO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA *in vitro* POR CONTATO
GASOSO DO COMPOSTO ISOLADO Valenceno**

Juazeiro do Norte – CE
2019

MARIA DE FÁTIMA GUEDES MONTEIRO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA *in vitro* POR CONTATO 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: Prof. Esp. Francisco Yhan Pinto Bezerra

MARIA DE FÁTIMA GUEDES MONTEIRO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA *in vitro* POR CONTATO 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: Prof. Esp. Francisco Yhan Pinto Bezerra

Data de aprovação: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Esp. Francisco Yhan Pinto Bezerra
Orientador

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

Prof^a Esp. Lívia Maria Garcia Leandro
Examinador 2

AGRADECIMENTOS

A Deus , pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência. Obrigado por me permitir errar, aprender e crescer, por sua eterna compreensão e tolerância, por seu infinito amor, pela Sua voz “invisível” que não me permitiu desistir e principalmente por ter me dado uma família tão especial, enfim, obrigado por tudo. Ainda não descobri o que eu fiz para merecer tanto.

À minha mãe, Aurora Guedes Neta deixo um agradecimento especial, por todas as lições de amor, companheirismo, amizade, caridade, dedicação, abnegação, compreensão e perdão que a senhora me proporcionou a cada novo dia. Sinto-me orgulhosa e privilegiada por ter uma mãe tão especial. E ao meu pai, Juraci Monteiro por não ter medido esforços em prol da minha educação.

Ao Prof. Yhan, pela orientação, competência, profissionalismo e dedicação tão importantes. Obrigado por todo incentivo e paciência.

Aos membros da banca examinadora, Prof^a Livia Maria e Prof^a Maria Karollyna, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com este trabalho. À Prof^a Livia, agradeço ainda pelas conversas breves, porém importantíssimas.

Aos meus amigos que contribuíram na realização deste trabalho, Antonio Erivan pela tarde que passamos juntos realizando os testes, serei eternamente grata. A Claudia, por ter compartilhado essa trajetória comigo, levarei tudo que passamos juntas como experiência e aprendizado. A minha melhor amiga, Maria Gabriella que mesmo distante se fez presente em todos momentos dessa caminhada, sempre me incentivando e segurando a minha mão quando eu pensei em desistir.

Aos meus irmãos Aila, Allan, Ayron (*in memóriam*), pelo carinho que transmitiram mesmo distantes. Ayron, pelo apoio que me deu desde o começo, no entanto você não ficou até o fim, mas sei que ai do Reino dos céus você continua torcendo e cuidando para que todos os meus sonhos se realizem.

A minha Avó, Tereza por ter contribuído na minha educação a qual eu tenho um grande amor.

Ao Professor Cicero Roberto, por ter me ajudado nos momentos de duvidas e aflição, sou uma grande admiradora sua.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, Ninguém vence sozinho... OBRIGADA A TODOS!

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA *in vitro* POR CONTATO DO COMPOSTO ISOLADO Valenceno

Maria de Fátima Guedes Monteiro¹, Francisco Yhan Pinto Bezerra².

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e moduladora *in vitro* por contato gasoso do composto isolado Valenceno. Foram utilizadas as linhagens padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Escherichia coli* 25922 e linhagens multirresistentes de *Staphylococcus aureus* 358, *Escherichia coli* 27, para a modulação foram usados os antibióticos, amicacina, gentamicina, ciprofloxacina e norfloxacina. Realizando o estudo através da técnica de contato gasoso. Os ensaios foram realizados em triplicata, e expressos como a média aritmética. Na análise estatística foi aplicada ANOVA two-way seguida do teste de Bonferroni, considerando significância de $p \leq 0,05$. Na atividade antibacteriana realizada pelo método de contato gasoso não obteve resultados para ambas as cepas. Nos testes de modulação apresentou resultado estatisticamente significativo quando associado às bactérias padrão e multirresistentes *E. coli*, e *S. aureus*. Devido o Valenceno ter apresentado atividade modulatória significativa novas e aprofundadas pesquisas devem ser desenvolvidas em busca da ampliação e comprovação do conhecimento do composto estudado. Os resultados obtidos são promissores e poderão estimular no desenvolvimento de outras novas pesquisas.

Palavras-chave: Efeito Modulador. *E.coli*. Resistência Bacteriana. *S.aureus*. Valenceno.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND MODULATORY *in vitro* FOR CONTACT OF THE COMPOSITION ISOLATED Valencene

ABSTRACT

The present work had as objective evaluates the antibacterial activity and modulatory *in vitro* for gaseous contact of the isolated composition Valenceno, the lineages standard of *Staphylococcus aureus* were used ATCC6538, *Escherichia coli* 25922 and lineages multiresistant of *Staphylococcus aureus* 358, *Escherichia coli* 27, for the modulation degree antibiotics amicacina, gentamicina, ciprofloxacina and norfloxacina. Accomplishing the study through the technique of gaseous contact. The rehearsals were accomplished in triplicata, and expressed as the arithmetic average. In the statistical analysis ANOVA two-way following by the test of Bonferroni was applied, considering significance of $p \leq 0,05$. Na antibacterial activity accomplished by the method of gaseous contact didn't obtain results for both stumps. In the modulation tests it presented resulted clinically relevant when associated with standard and multiresistant bacteria *E. coli*, e *S. aureus*. New and deepened researches should be developed in search of the enlargement and proof of the knowledge of the studied composition. The obtained results are promising and they can stimulate in the development of other new researches.

Keywords: Modulator Effect. *E. coli*. Bacterial resistance. *S.aureus*. Valencene.

¹ Discente do curso de biomedicina, mariguedes2803@gmail.com, Centro Universitário Doutor Leão Sampaio.

² Docente do curso de biomedicina, yhanbezerra@leãosampaio.edu.br, Centro Universitário Doutor Leão Sampaio.

1 INTRODUÇÃO

A resistência antibacteriana é um problema de saúde pública, com o aumento dos casos de resistência é amplamente reconhecido como uma grave ameaça à saúde. Um exemplo de relevância clínica são as infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, tanto hospitalares quanto domiciliares, apresentando morbidade e mortalidade elevadas, (RATTI & SOUSA, 2009). *Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa conhecida por propiciar infecções do trato urinário, também apresenta resistência aos antibióticos, como o grupo das quilononas (CRUZ et al., 2016).

Nas últimas décadas, a resistência dos microrganismos a novos antibióticos ou drogas modificadas vem aumentando. Nesse sentido surge a preocupação para a procura de novas alternativas terapêuticas para o combate de infecções (DIAS et al., 2017).

É observado um maior número de pesquisas relacionadas ao potencial terapêutico das plantas medicinais, associando os produtos vegetais e/ou seus subprodutos com drogas antibacteriana, onde pode inibir ou intensificar o efeito terapêutico dos medicamentos convencionais (SARAIVA, 2012).

Os produtos naturais, essencialmente os de origem vegetal, tem se destacado tanto por mostrar uma eficácia na atividade antibacteriana, como pela sua competência em potencializar o exercício antibiótico. Sendo assim, o uso de itens oriundos dos produtos naturais, pode ser uma via relevante, já que pesquisas demonstram a sua eficiência em reduzir resistência bacteriana (TINTINO et al., 2015).

As plantas medicinais aromáticas possuem na sua composição óleos essenciais. Estes são oriundos do metabolismo secundário das plantas e apresentam composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanóides. Esses óleos são encontrados em vários órgãos vegetais, realizando atividades importantes para a sobrevivência deste, particularmente, na defesa contra microrganismos (CORTEZ et al, 2015).

Dentre as substâncias oriundas dos óleos essenciais, encontra-se o Valenceno, que é um sesquiterpeno, composto cítrico proveniente de diversas espécies de citrinos e do óleo essencial de laranja valência. Esse composto possui uma enzima conhecida como valencene sintase que quando comparada a outras sintases sesquiterpênicas possui um desempenho eficiente sob microrganismos (BEEKWILDER et al,2014).

O composto Valenceno, C₁₅H₂₄ é detectado em pequena concentração em vegetais cítricos, sendo elaborado biosinteticamente a partir do difosfato de farnesila pela rota bioquímica do mevalonato (ZAMPIERI, 2006).

Em decorrência do aumento da resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas, surge a preocupação pela busca de novas alternativas terapêuticas. Nesse contexto as atividades sinérgicas antimicrobianas de compostos isolados extraídos de vegetais necessitam ser estudadas. Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e modulatória *in vitro* por contato gasoso do composto isolado Valenceno.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 TIPO DE ESTUDO, LOCAL E PERÍODO DE REALIZAÇÃO DOS TESTES

O presente estudo trata-se do tipo experimental. As atividades foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Leão Sampaio (UNILEÃO), Juazeiro do Norte– CE, no período de Abril a Maio de 2019.

2.3 MEIOS DE CULTURA, OBTENÇÃO DO VALENCENE E ANTIBIÓTICOS

O Meio *Brain Heart Infusion* (BHI) e Agar Mueller Hinton (MH) foi o meio de cultura das cepas de escolha, preparado de acordo com as especificações sugeridas pelo fabricante. O composto Valencene foi obtido de Sigma Chemical e os antibióticos amicacina, gentamicina, ciprofloxacina e norfloxacina de LaborClin, Brasil.

2.4 MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados nos testes foram às linhagens multirresistentes e padrão das seguintes bactérias: *Escherichia coli* 27, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* 358 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, ambas disponibilizadas pelo Centro Universitário Leão Sampaio.

2.5 PREPARO E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO BACTERIANO

As linhagens foram inoculadas em caldo BHI, na concentração indicada pelo fabricante e ficaram incubadas durante 24 horas à temperatura de 37°C para propiciar o desenvolvimento das cepas bacterianas. Estas suspensões acrescidas de bactérias desenvolvidas foram diluídas na proporção de 1:10 em caldo BHI até o equivalente a 10^5 céls/mL (NCCLSI, 2005).

2.6 TESTE DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA POR CONTATO GASOSO

Para realização da semeadura dos microrganismos, foram utilizadas placas de Petri contendo Agar Mueller Hinton (MH). Discos de papéis filtro semelhantes aos de antibiograma que foram colocados no centro de cada placa sobre o semeio e 20 µL do produto puro a ser testado foi acrescentado na tampa das placas. 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 foi utilizada uma régua milimetrada.

Para a realização atividade moduladora por contato gasoso em placas de Petri contendo Agar Mueller Hinton (MH), foi utilizada a metodologia modificada por Inouye; Takizawa; Yamaguchi (2001). Foram utilizados discos de antibióticos: amicacina, gentamicina, norfloxacin e ciprofloxacina. As placas foram invertidas e 20 µL do composto foi acrescentado nas tampas permitindo que a partir da volatilização ocorra a interação com os discos. Outras placas foram preparadas sem o composto para posterior comparação entre placas somente com os antibióticos e placas com antibióticos e composto. 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 foi utilizada uma régua milimetrada.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em média aritmética. Para análise estatística foi aplicada ANOVA two-way seguida do teste de Bonferroni, considerando significância de $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise da atividade antibacteriana realizada pelo método de contato gasoso, o composto isolado Valenceno (C15H24) não apresentou atividade bacteriana frente às cepas multirresistentes e padrão de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

De acordo com Beekwilder et al. (2014) o Valenceno está incluso em diversas espécies de citrus, como no óleo essencial da laranja de Valência. Em trabalho realizado por Heberle et al. (2016), foi observado que o óleo essencial extraído principalmente da casca da laranja de valência apresentou uma pequena resposta antibacteriana contra bactérias Gram positivas, destacando-se *Staphylococcus aureus*, no entanto não teve atividade frente as bactérias Gram negativas que foi o caso da bactéria *Escherichia coli*.

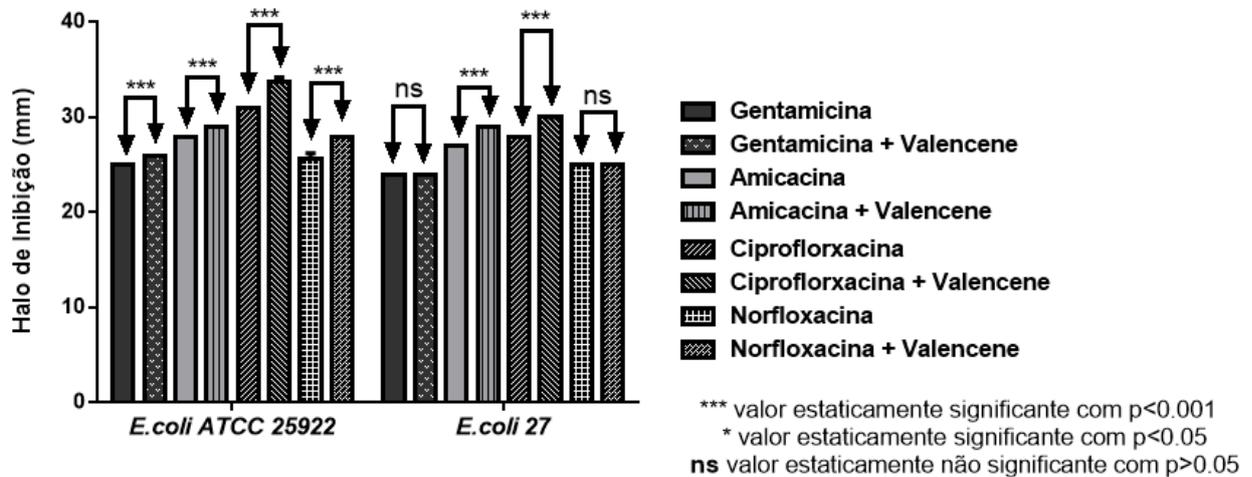
Bactérias Gram positivas, tais como *Staphylococcus aureus* são mais susceptíveis aos óleos essenciais que as bactérias Gram negativas, tais como *Escherichia coli*. Este fato pode ser devido à interação direta das membranas das células com componentes hidrofóbicos dos óleos (CALO et al., 2015).

Diversos estudos vêm sendo realizados com produtos naturais em busca de novos tratamentos a infecções bacterianas. Um grande número de plantas é testado não apenas por sua atividade antimicrobiana direta, mas também como um agente modificador de resistência (GIBBONS, 2004).

Devido o Valenceno ser um composto isolado, não existe relatos sobre sua atividade antibacteriana na literatura.

A figura 1 está apresentando os resultados do teste de modulação por contato gasoso do composto isolado Valenceno frente aos antibióticos da classe dos aminoglicosídeos amicacina e gentamicina e da classe das quinolonas norfloxacina e ciprofloxacina. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de $p \leq 0,001$.

Gráfico 1: Potencial modulatório do Valenceno frente à *Escherichia coli*



Fonte: Primária

De acordo com Yang; Dong-ung; Shin, (2014) o Valenceno é um integrante dos sesquiterpenos (denominação dos terpenos), e o composto bioativo mais reputado isolado dos rizomas de *Cyperus rotundus* que é uma planta medicinal que vem sendo utilizada no tratamento de diversas doenças. Pesquisas relatam que o Valenceno possui um amplo espectro farmacológico especificamente como antisséptico, antioxidante e atividade antialérgica.

Estudos recentes realizados por Macedo et al., (2018) mostram que a *Cysperus rotundus*, apesar de possuir bioatividades, sendo assim fonte potencial de antioxidantes naturais, também apresenta citotoxicidade estando esses efeitos biológicos relacionados a compostos fenólicos como os taninos e flavonóides. A pesquisa realizada não apresentou resultados antibacterianos e modulatórios.

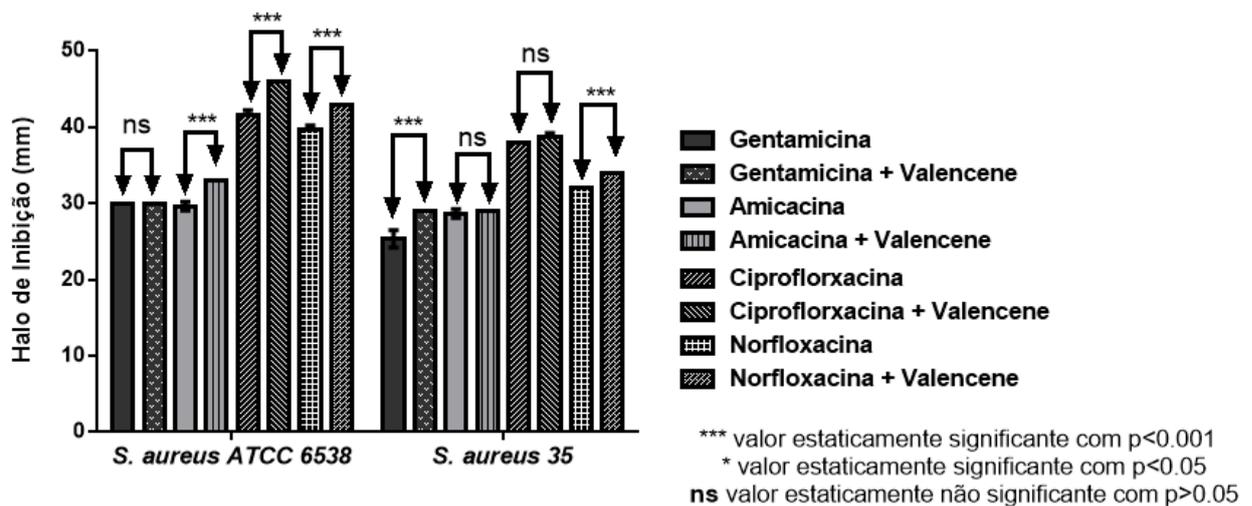
No entanto uma avaliação feita por Sharma e Singh (2011), a partir do extrato etanólico de rizomas de *Cysperus rotundus* comprovou a atividade antibacteriana e modulatória contra a bactéria *Escherichia coli* podendo esse resultado ser referente à presença de metabólitos secundários tais como os terpenos e esteróides.

Em estudo realizado por Parekh e Chanda (2006), para avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do extrato etanólico de plantas inteiras de *C. rotundus* foi relatado que o extrato etanólico de *C. rotundus* apresentou cerca de 70 % de atividade antibacteriana em todos os microrganismos investigados, tendo mais eficiência contra a maioria das bactérias Gram-negativas testadas como a *E. coli*.

Os resultados com valores estatisticamente não significantes podem ser justificados pela parede celular da bactéria Gram-negativa na qual possui uma membrana externa que forma um envelope, desta forma, se torna difícil a ação de produtos naturais e outros medicamentos antimicrobianos (HOLLEY; PATEL, 2005). Entretanto, foi possível observar resultados relevantes frente *E. coli* na modulação com amicacina e ciprofloxacina que apresentou aumento do halo de inibição indicando efeito sinérgico. Dessa forma, o presente estudo mostra que a metodologia empregada pode modificar a resistência das bactérias Gram-negativas.

A figura 2 mostra a modulação do composto Valenceno em combinação com antibióticos das classes dos aminoglicosídeos e quinolonas pela técnica de contato gasoso frente as cepas de *Staphylococcus aureus*. A CIM dos antibióticos isoladamente quando comparadas a CIM dos mesmos associados ao Valenceno, demonstrou que essa associação modulou a atividade da droga sinergicamente na maioria das drogas testadas. Os resultados são expressos em halos de inibição com valor estatisticamente significativo de $p \leq 0,001$.

Gráfico 2: Potencial modulatório do Valencene frente à *Staphylococcus aureus*



Fonte: Primária

Segundo Freitas et al., (2013) as bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, geralmente são mais sensíveis aos antibióticos que bactérias Gram-negativas. Acredita-se que o efeito antibacteriano está relacionado, principalmente, à modificação na permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana onde, os compostos

sesquiterpenicos são capazes de dissolverem-se dentro da membrana plasmática e desta forma penetrar na célula, afetando o metabolismo microbiano.

De acordo com Costa et al., (2008) o Valenceno foi encontrado como sendo um dos compostos majoritários da *Lantana camara* L., Verbenaceae, que é uma planta encontrada em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Os ensaios de atividade antimicrobiana *in vitro* mostraram o óleo dessa planta como inibidor do crescimento de quase todas as bactérias testadas, aparecendo *S. aureus* como resistente à ação dos componentes presentes no óleo.

Nota-se que os resultados obtidos nesse trabalho divergem dos descritos por Costa (2008), onde não houve sensibilidade para *Staphylococcus aureus*, no entanto não foi atestado a ação de cada composto individualmente pois, possuem uma habilidade específica diferenciada para romper ou penetrar na estrutura bacteriana.

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho corroboram com a ideia de que o Valenceno por ter apresentado atividades modulatórias significantes contra as cepas de bactérias multirresistente como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* pode ser peça importante e promissora no combate a resistência bacteriana, no entanto estudos futuros se fazem necessários para um melhor entendimento das atividades aqui encontradas.

REFERÊNCIAS

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.5, Março-Agosto, 2014.

CALO, J.R, et al. Essential oils as antimicrobials in food systems- A review. **Food Control**, v.54, n.7, Abril-Maio, 2015

CORTEZ, L.E.R, et al. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) e *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (Poaceae). **O Mundo da Saúde**, v.39, n.4, Agosto-Setembro, 2015.

COSTA, J.G.M, et al. Chemical composition, evaluation of antibacterial activity and toxicity of the essential oils from *Lantana camara* L. and *Lantana* sp. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.3, Agosto-Setembro, 2008.

CRUZ, A.J.F, et al. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora dos extratos metanólico e hexânico da folha de *Allium cepa*. **Revista Ciencias de la Salud**, v.14, n.2, Maio-Junho,2016.

DIAS, E.C.M, et al. Uso de fitoterápicos e potenciais riscos de interações medicamentosas: reflexões para prática segura. **Revista Baiana de Saúde Pública**, São Paulo, v.41, n.2, Abril-Junho, 2017.

FREITAS, M.A, et al. avaliação *In Vitro* da atividade antimicrobiana do Carvacrol através dos métodos de contato direto e gasoso. **Biosci.J**, v.29, n.3, Maio-Junho, 2013.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural product reports**, v. 21, n. 2, p. Novembro-Dezembro, 2004.

HEBERLE, J, et al. Atividade antimicrobiana de óleo essencial de laranja. **Current Opinion in Biotechnology**. v.9, n.2, Setembro-Outubro,2016.

HOLLEY, R.A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food and Nutrition Sciences**. v. 22, n. 4, Julho-Agosto, 2005.

INOUYE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 47, n. 5, Janeiro-Março, 2001.

MACEDO, N.S, et al. Prospecção fitoquímica e modulação da atividade antibiótica de *Cyperus rotundus* L. contra bactérias multirresistentes. **Revista cubana de plantas medicinais**. V.23, n.2, Janeiro- Fevereiro, 2018.

NCCLS. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement**. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.

PAREKH J; CHANDA S. *In vitro* antimicrobial activities of extracts of *Launaea procumbens* Roxb. (Labiatae), *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) and *Cyperus rotundus* L. (Cyperaceae). **African Journal of Biomedical Research**.v.9,n.2, Novembro-Dezembro, 2006.

SARAIVA, R.M.C. **Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente á bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas**. 2012. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2012.

SHARMA S,K;. SINGH A,P. Antimicrobial investigations on rhizomes of *Cyperus rotundus* Linn. **Der Pharmacia Lettre**. v.3, n.3, Outubro-Novembro2011.

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, Setembro-Dezembro, 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**, Republic of Korea v.8, n.4, Maio-Julho, 2016..

ZAMPIERI, L.A. **Bioxidação Fúngica de Valenceno a Nootkatona, Bioflavorizante de Grapefruit**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química na Área de Química Orgânica) Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas,SP, 2006.