

AVALIAÇÃO *In Vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CARVACROL ATRAVÉS DOS MÉTODOS DE CONTATO DIRETO E GASOSO

EVALUATION *In vitro* OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CARVACROL BY THE DIRECT AND GASEOUS CONTACT METHODS

Maria Audilene FREITAS¹; Jacqueline Cosmo ANDRADE²;
 Glaucia Morgana Melo GUEDES³; Saulo Relison TINTINO⁴; Celestina Elba Sobral SOUZA¹;
 Nadghia Figueiredo LEITE¹; Cícera Natália Figueiredo Leite GONDIM¹;
 Maria Flaviana Bezerra MORAIS-BRAGA²; Edinaldo Fágner Ferreira MATIAS²;
 Henrique Douglas Melo COUTINHO^{5*}

1. Bióloga; 2. Professor(a) Mestre; 3. Enfermeira; 4. Graduando; 5.* Professor, Doutor, Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM, Departamento de Química Biológica - DQB, Universidade Regional do Cariri - URCA, Brasil. autor correspondente, hdmcoutinho@gmail.com;

RESUMO: Nas últimas décadas, a resistência bacteriana frente aos antimicrobianos se constituiu em um sério problema para a saúde pública, impondo barreiras ao controle de diversas espécies de microrganismos. O carvacrol é um composto fenólico geralmente encontrado como componente majoritário do óleo essencial de algumas plantas como *Origanum vulgare* (orégano), *Lippia graveolens* (Lípia) e *Lipia sidoides* (alecrim-pimenta). Estudos demonstram a atividade antibacteriana do orégano, possivelmente devido ao carvacrol. Para avaliar a ação antimicrobiana desse composto, foram utilizadas linhagens padrão bacterianas (*Staphylococcus aureus* ATCC25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442) e fúngicas (*Candida albicans* ICB12, *C. krusei* ATCC6258 e *C. tropicalis* ATCC13803). Os métodos de microdiluição em caldo e de contato gasoso foram utilizados para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a dose inibitória mínima (DIM) respectivamente, bem como a atividade moduladora da ação antibiótica através de ambos os métodos. O carvacrol, combinado em concentrações subinibitórias com as drogas antimicrobianas apresentou resultados relevantes frente às cepas de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, por tanto este estudo permitiu comprovar a atividade moduladora do carvacrol.

PALAVRAS-CHAVE: Contato direto. Contato gasoso. Atividade antimicrobiana. Carvacrol.

INTRODUÇÃO

As plantas aromáticas são utilizadas desde o início da história da humanidade para dar sabor a comidas e bebidas, para disfarçar odores desagradáveis, atrair outros indivíduos e controlar problemas sanitários, contribuindo para o bem estar de seres humanos e animais (FRANZ, 2010). As especiarias e plantas aromáticas são ricas em óleos essenciais, que se caracterizam por uma notável atividade antimicrobiana, e por este motivo, seus produtos derivados podem ser usados para retardar ou inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes (MARINO et al., 2001). Com o surgimento da ciência moderna, no século XIX, passou a ser dada maior importância para a produção de drogas em laboratórios, como foi o caso da penicilina, aspirina dentre outras. No entanto, o uso indiscriminado de muitas dessas substâncias acarretou efeitos indesejáveis como é o caso da dependência química e resistência bacteriana (COUTINHO et al., 2008).

Nas últimas décadas, a resistência frente aos antimicrobianos se constituiu em um sério problema para a saúde pública, impondo barreiras ao controle de diversas espécies de microrganismos de interesse médico-sanitário (BACCARO et al., 2002; MANTILLA et al., 2008; NAWAZ, 2002). A resistência a drogas de patógenos humanos e animais é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. O consumo de mais de uma tonelada diária de antibióticos em alguns países da Europa tem resultado na seleção de populações bacterianas resistentes (DUARTE, 2006). Baquero e Blázquez (1997) relataram o perigo do retorno a uma era pré-antibiótica, particularmente considerando que nenhuma nova classe de antibiótico foi descoberta nos últimos anos, apesar das intensas pesquisas das indústrias farmacêuticas. O óleo essencial de *Origanum vulgare* têm demonstrado atividade bactericida e fungicida contra diferentes patógenos, sendo esta atribuída ao Carvacrol, que é o composto

fenólico predominante em vários óleos essenciais como no orégano, *Lippia graveolens* (Lípia) e *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta). Sendo assim, existe um crescente interesse na utilização de óleos essenciais devido as suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas (OLIVEIRA et al., 2008).

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade moduladora da ação antibiótica do composto carvacrol através de contato direto e contato gasoso contra espécies de microrganismos com relatos de multiresistência a antimicrobianos e causadores de infecções hospitalares e oportunistas.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas utilizadas

As cepas utilizadas nos ensaios foram adquiridas do Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As cepas bacterianas utilizadas nos ensaios de Dose inibitória mínima (DIM) e modulação foram *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442, *Staphylococcus aureus* ATCC25923. As cepas fungicas utilizadas nos ensaios da dose inibitória mínima (DIM), concentração inibitória mínima (CIM) e modulação foram *Candida albicans* ICB12, *C. tropicalis* ATCC13803 e *C. krusei* ATCC6258. Todas as cepas foram mantidas em meio *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco Laboratories Ltda.). Antes dos ensaios, as células foram inoculadas por 24h a 37°C em Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco Laboratories Ltda.).

Obtenção do Produto

O carvacrol (Figura 1) foi obtido através da empresa Sigma Chemical Co.(St. Louis, E.U.A.). Para a realização dos ensaios, a substância 0,0530 g foram pesadas. Em seguida, a amostra foi diluída em 1 mL de DMSO até a obtenção de uma concentração final de 53 mg/mL. O material foi diluído em água destilada até uma concentração de 1024 µg/mL, diminuindo assim a concentração do DMSO para 0,2 %.

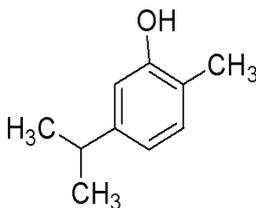


Figura 01. Fórmula estrutural do composto carvacrol

Drogas

Os discos de antibióticos utilizados no teste de contato gasoso foram vancomicina 30 µg, gentamicina 10 µg, ciprofloxacina 5 µg, e os antifúngicos utilizados no teste de microdiluição em caldo foram anfotericina B, nistatina, mebendazol, benzoilmetronidazol.

Avaliação da atividade moduladora por contato direto

A concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a menor concentração na qual nenhum crescimento microbiano foi observado. A CIM foi determinada pelo método de microdiluição em BHI 10 %, usando uma suspensão de 10⁵ UFC (Unidades Formadoras de Colônias)/mL (0,5 McFarland), associado com 100 µL de inóculo bacteriano e 100 µL do carvacrol. A amostra foi diluída de maneira seriada variando em 1024-2 µg/mL (JAVADPOUR et al., 1996). O teste de concentração inibitória mínima foi realizado utilizando as cepas fúngicas de *C. albicans* ICB12, *C. krusei* ATCC6258. Para avaliação do carvacrol como modificador de resistência microbiana, a CIM dos antifúngicos foi determinada na presença e na ausência de uma concentração subinibitória do produto natural (MIC/8). As concentrações dos antifúngicos usadas variaram entre 1024 – 0,5 µg/mL. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. A leitura foi feita através da visualização da turbidez característica do crescimento fúngico. O controle do experimento foi realizado na mesma condição experimental, apenas com a ausência do antifúngico. Todos os testes foram realizado em triplicata.

Determinações da DIM e avaliação da atividade moduladora por contato gasoso

A dose inibitória mínima (DIM) é definida como dose inibitória mínima por volume de ar capaz para suprimir o crescimento do microrganismo em um sistema fechado (INOUE et al., 2001). 23,6 mg de carvacrol foi diluído em 500 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO). A partir desta concentração foram obtidas as concentrações de 512 a 128 µg/mL. Foram preparadas placas de Petri pequenas contendo 5 mL de HIA cada. As linhagens bacterianas foram inicialmente inoculadas em BHI 3,7 % (*Brain Heart Infusion*) e depois semeadas com swab nas placas. Foram usadas placas semeadas com *P. aeruginosa*, *S. aureus* e placas controle com as bactérias e DMSO e outras apenas com o microrganismo. O teste foi realizado em triplicata. Uma quantidade de 100 µL de cada uma das diluições do carvacrol foi aplicada na parte interna da tampa da placa de Petri e estas foram

inoculadas a 37°C por 24 h para a determinação da DIM. A leitura foi feita através da aferição da inibição do crescimento do microrganismo.

Após a leitura da DIM, os resultados obtidos foram usados na modulação, utilizando uma concentração inferior a concentração inibitória. No ensaio com *S. aureus* ATCC25923 e *P. aeruginosa* ATCC15442 foi utilizada uma DIM de 0,5 e 1 mg/L de ar, respectivamente. A modulação foi feita em triplicata, onde uma placa seria o antibiótico em associação com produto, a segunda o antibiótico junto com DMSO e a terceira somente o antibiótico, cada placa continha um disco de cada antibiótico, totalizando três antibióticos por placa. A leitura foi feita através da medição de halos de inibição, os quais foram comparados ao controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tem sido amplamente estudada sobre uma série de microrganismos (LÓPEZ et al., 2005). A maior concentração de carvacrol nos óleos essenciais pode ser a explicação de sua atividade antimicrobiana (NOSTRO et al., 2007; SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2011).

A Tabela 1 mostra a CIM do composto carvacrol e a potencialização do efeito em combinação com antifúngicos. Com relação a *C. albicans*, a CIM dos antifúngicos sozinhos foi igual a CIM dos mesmos associados ao carvacrol, demonstrando que a associação não modulou a atividade da droga. Contra *C. krusei*, foi demonstrado um resultado semelhante, com exceção da associação com o benzoilmetronidazol, no qual houve um aumento de 8 vezes na CIM do antifúngico quando associado ao carvacrol, demonstrando um antagonismo.

Tabela 1. Atividade moduladora da atividade antifúngica do carvacrol sobre linhagens de *C. albicans* e *C. krusei*. (□g/mL).

Drogas/Produto natural	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>	
	CIM	CIM Droga+carvacrol	CIM	CIM Droga+carvacrol
anfotericina B	≥ 1024	≥ 1024	256	256
nistatina	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
mebendazol	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
benzoilmetronidazol	≥ 1024	≥ 1024	128	≥ 1024
carvacrol	≥ 1024	-	≥ 1024	-

Pozzatti et al. (2010) encontraram grande atividade antifúngica frente a diversas espécies de *Candida* spp. Com CIMs ≤ 800 µg/ml para o óleo essencial de orégano mexicano composto por carvacrol (56,8 %), entretanto, este resultados

corroboram com os nossos devido a similaridade das observações e concentrações testadas.

Na dose inibitória mínima mostrada na Tabela 2, foi observada inibição do crescimento por contato gasoso contra *S. aureus* ATCC25923 e *C. albicans* ICB12 em todas as concentrações testadas.

Tabela 2. Atividade inibitória pela DIM (mg/L de ar) em *P. aeruginosa* e *S.aureus*.

Cepas bacterianas	DIM 1	DIM 0,5	DIM 0,25	Controle DMSO	Controle
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	-	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	-	-	-	+	+
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	+
<i>C. krusei</i>	+	+	+	+	+

* sinais (+) crescimento e (-) inibição do crescimento

Na modulação por contato gasoso, os testes foram realizados em triplicata, com as cepas padrão de *P. aeruginosa* e *S. aureus* (Tabelas 3 e 4), os resultados são expressos em halos de inibição, sendo estes comparados ao controle. *P. aeruginosa*

apresentou um aumento de sensibilidade com todos os antibióticos testados, sendo o melhor resultado observado com vancomicina. Com relação a *S. aureus*, o melhor resultado foi contra a ciprofloxacina. As bactérias Gram-positivas, como *S.*

aureus, geralmente são mais sensíveis aos antibióticos que bactérias Gram-negativas, como *E. coli* e *P. aeruginosa* (MADIGAN et al., 2004). No entanto, Smith-Palmer et al. (1998) e Hoferl et al. (2009) relataram atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Acredita-se que o efeito

antimicrobiano está relacionado, principalmente, à modificação na permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana (LAMBERT et al., 2001). Os compostos fenólicos são capazes de dissolverem-se dentro da membrana plasmática e desta forma penetrar na célula, afetando o metabolismo microbiano (MARINO et al., 2001).

Tabela 3: Atividade moduladora da ação antibiótica por contato gasoso em *P. aeruginosa* (cm).

Antibióticos	DIM 1,0	Controle DMSO	Controle
vancomicina	1,8	1,6	1,6
gentamicina	2,5	2,5	2,5
ciprofloxacina	2,8	3	2,9

Tabela 4: Atividade moduladora da ação antibiótica por contato gasoso em *S. aureus* (cm).

Antibióticos	DIM 0,5	Controle DMSO	Controle
vancomicina	1,7	1,7	1,7
gentamicina	2	2	2
ciprofloxacina	2	2,2	2

CONCLUSÕES

O carvacrol não afetou ou diminuiu o efeito dos antifúngicos quando associados. Entretanto, por contato gasoso, o carvacrol demonstrou resultados promissores na modulação da atividade de antibióticos contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

A atividade moduladora deste composto é mais efetiva que sua atividade antimicrobiana intrínseca, indicando que este produto pode representar uma fonte de futuras formulações farmacêuticas para combater microrganismos patogênicos como uma nova forma de antimicrobioterapia.

ABSTRACT: In the last decades, the bacterial resistance to antimicrobials becomes a serious problem of public health, creating several difficulties to control several microorganisms with nosocomial interest. The carvacrol, the main phenol compound of many plants as *Origanum vulgare*, *Lippia graveolens* and *Lippia sidoides*. Studies demonstrated and intensive antibacterial activity of *O. vulgare*, probably due the carvacrol. To evaluate the antimicrobial activity of this compound, were assayed microbial strains of *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442, *Candida albicans* ICB12, *C. krusei* ATCC6258 and *C. tropicalis* ATCC 13803. Using the microdilution and the gaseous contact method, were determined the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum inhibitory dose (DIM), respectively as well as the modulatory activity with both methods. The carvacrol, used in subinhibitory concentrations associated with antimicrobial drugs demonstrated an interesting modulatory activity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* strains, indicating the antimicrobial and modulatory activity of this compound.

KEYWORDS: Direct contact. Gaseous contact. Antimicrobial activity. Carvacrol.

REFERÊNCIAS

- BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; CORRÊA, A.; FERREIRA, A. J. P.; CALDERARO, F. F. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 15-18, jun. 2002.
- BAQUERO, F.; BLÁZQUEZ, J. Evolution of antibiotic resistance, **Trends in Ecology and Evolution**, Londres, v. 12, n. 12, p. 482-487, dec. 1997.
- 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 Medicinais 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.

HOFERL, M.; BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. **Journal of Essential Oil Research**, Chicago, v. 21, n. 5, p. 459-463, out. 2009.

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**, Washington, v. 47, n. 5, p. 565-573, maio 2001.

JAVADPOUR, M. M.; JUBAN, M. M.; Lo, W.C.; Bishop, S. M.; Albert, J. B. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Boston, v. 39, n. 16, p. 3107-3113, ago. 1996.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Londres, v. 91, n. 3, p. 453-462, set. 2001.

LÓPEZ, P. SÁNCHEZ, C., BATLLE, R., NERÍN, C. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of Agricultural and food chemistry**, Washington, v. 53, n. 17, p. 6939-6946, ago. 2005.

MADINGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MANTILLA, S. P. S.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T. DE.; SANTOS, E. B.; GOUVÊA, R. Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria* spp. Isoladas de carne moída bovina. Braz. **Journal of Veterinary Research and Animal Science**, Ribeirão Preto, v. 45, n. 2, p. 116-121, maio 2008.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study of essential oils from Lamiaceae and compositae. **International Journal of food Microbiology**, Bruxelas, v. 67, n. 3, p. 187-195, ago. 2001.

NAWAZ, M. S. **Human health impact and regulatory issues involving antimicrobial resistance in the food animal production environment**. Disponível em: < [http:// www.fda.gov](http://www.fda.gov)>. Acesso em 25 jan 2012.

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; SUDANO ROCCARO, A.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin resistant *Staphylococcus* orégano essential oil, Carvacrol and Timol. **FEMS Microbiology Letters**, Londres, v. 230, n. 2, p. 191-195, jan. 2004.

OLIVEIRA, D. H.; FARIAS, A. M.; CLEFF, M. B.; MEIRELES, M. C. A.; RODRIGUES, M. R. A. **Caracterização química do óleo essencial de *Origanum vulgare*: Análise da relação Timol/Carvacrol**. In: XVII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2008, Pelotas, Brasil.

POZZATI, P.; LORETO, E. S.; LOPES, P. G. M.; ATHAYDE, M. L.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essences oils. **Mycoses**, Nova Iorque, v. 53, n. 1, p. 12-15, jan. 2010.

SMITH-PALMER, A.; STEAWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**. Londres, v. 26, n. 2, p. 118, fev. 1998.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M.G.. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, Chicago, v. 23, n. 2, p. 136-141, abr. 2012.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N.; FILHO, J. M. B. Orégano (*Origanum vulgare.*, Lamiaceae): uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 132, p. 40-45, abr. 2005.

VALERO, M.; SALMERON, M.C. Antimicrobial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. **International Journal of Food Microbiology**, Bruxelas, v. 85, n. 1-2, p. 73-81, ago. 2003.