

2.12.02 - Microbiologia / Microbiologia Aplicada

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* E DO POTENCIAL MODULADOR DA NARINGENINA PURA FRENTE A BACTÉRIAS MULTIRRESINTES

Fábia F.Campina^{1*}, Maria do S. Costa¹, Thiago S. Freitas², Antônia Thassya L. Santos¹, Raimundo L. S. Perreira¹, Rafael P. Cruz¹, Henrique Douglas M. Coutinho³.

1. Estudantes de ICs da Universidade Regional do Cariri, Ciências Biológicas-URCA
2. Mestrando em Bioprospecção Molecular-Universidade Regional do Cariri-URCA
3. Universidade Regional do Cariri-URCA - Departamento de Química Biológica / Orientador

Resumo:

A naringenina é um flavonoide que pertence à classe das flavonas. A naringenina foi avaliada nesse estudo como possível modulador através do método de microdiluição em caldo. Também foi testada a ação da naringenina com antibióticos. Na avaliação da atividade moduladora dos antibióticos foram utilizadas linhagens multirresistentes de *P. aureginosa*, *E. coli* e *S. aureus* onde demonstraram atividade $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$. Interessantes resultados foram obtidos frente *S. aureus* e *E. coli*. Estes resultados sugerem que metabólitos secundários podem ser utilizados como novas alternativas na composição de novas drogas contra essas bactérias. Avaliar o efeito antimicrobiano e o potencial modulador *in vitro* da Naringenina pura frente a bactérias multirresistentes, quando combinados a antibióticos.

Palavras-chave: Atimicrobiano; Antibióticos; Flavonoides.

Apoio financeiro: CNPq, FUNCAP e CAPES

Introdução:

Durante séculos tem-se observado um crescente interesse na busca por novas descobertas científicas no mecanismo de ações e atividades biológicas que os produtos naturais apresentam em suas ações medicinais. Alimentos que além de serem utilizados na alimentação são amplamente investigados na medicina popular, apresentando vasto espectro de benefícios à saúde.[7].

Os medicamentos fitoterápicos são preparações farmacêuticas (extratos, tinturas, pomadas e cápsulas) de ervas medicinais,

obtidos a partir de uma ou mais plantas e utilizados para o tratamento de várias doenças. Inúmeras são as vantagens para o uso terapêutico, como o baixo custo e a grande disponibilidade para a população de baixa renda [3].

A naringenina é um flavonoide que pertence à classe das flavonas. Essa substância apresenta-se sem cor e é encontrada, em grande quantidade, em frutas cítricas; sua importância se deve ao fato de por reações químicas simples, darem origem às diidrochalconas, compostos de sabor doce bem aceituado e substitutos em potencial da sacose[2].

A resistência bacteriana a cada ano vem se tornando alvo de muitas investigações com plantas medicinais ou produtos isolados para diminuir o número elevado de microrganismo.

Levando-se em conta a aplicabilidade terapêutica e as atividades biológicas comprovadas de algumas espécies de plantas no combate a microrganismos, faz-se necessário um estudo mais aprofundado das mesmas, uma vez que, os estudos ainda são insipientes, no entanto, os resultados podem contribuir significativamente para minimizar o percentual de morbidade e mortalidade por infecções bacterianas onde o principal objetivo é; Avaliar o efeito antimicrobiano e o potencial modulador *in vitro* da Naringenina pura frente a bactérias multirresistentes, quando combinados a antibióticos.

Metodologia:

Obtenção do Composto Naringenina

O composto naringenina foi cedida pela Universidade Vale do São Francisco localizada na cidade de Juazeiro da Bahia- Bahia.

Microrganismos

As cepas bacterianas utilizadas no teste de concentração inibitória mínima foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922. Já na avaliação da modulação de antibióticos serão utilizadas cepas multirresistentes *S. aureus* 10, *P. aeruginosa* 24 e *E. coli* 06.

Drogas e Reagentes

As drogas utilizadas no teste de modulação foram os antibióticos Norflaxino, Imipenem e Gertamicina (Sigma Co. St. Louis, USA), preparados em uma concentração de 1024 µg/mL. Todas as drogas foram dissolvidas em água destilada e estéril. Para leitura dos testes foi utilizado o reagente resazurina sódica (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) um indicador de crescimento bacteriano colorimétrico de óxido-redução. A ocorrência da mudança de coloração azul para rosa devido à redução da resazurina indica o crescimento bacteriano. Resazurina sódica foi diluída em água destilada e armazenada a 4° C protegida da luz.[9,8].

Meios de Cultura

Nos ensaios microbiológicos foram utilizados os seguintes meios de cultura: *Heart Infusion Agar* - HIA (Difco Laboratories Ltda.), *Caldo Brain Heart Infusion* – BHI (Acumedia Manufacturers Inc.). Todos os meios de cultura foram preparados segundo as especificações do fabricante. As Culturas de bactérias foram mantidas a 4° C em HIA, antes dos testes, as linhagens foram inicialmente cultivadas também em HIA onde logo em seguida, incubadas a 35° C por 24 horas para crescimento microbiano.

Inóculo

Todas as linhagens foram inicialmente mantidas em tubos de ensaio contendo HIA inclinado, sob refrigeração (4°C) e a temperatura ambiente (28-30°C). Para os testes da CIM e para o teste modulação com antibióticos, na preparação dos inoculo das bactérias, inicialmente os isolados foram cultivados em meio HIA vertido e placa de petri a 37°C por 24h. A partir destas, foram preparadas suspensões dos microrganismos em tubos de ensaios contendo 3mL de solução estéril (NaCl a 0,9%). Em seguidas essas suspensões foram agitadas por 2 minutos com auxílio do aparelho *vortex* e cada suspensão teve sua turbidez comparada e ajustada àquela apresentada pela suspensão de sulfato de bário do tubo 0,5 da escala de McFarland, a

qual corresponde a um inoculo de aproximadamente 10⁵ unidades formadoras de colônias/mL-UFC/mL[10].

Preparação da Solução Teste

Para o preparo da solução, foi pesada 10 mg e diluída em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO– Merck, Darmstadt, Alemanha), obtendo uma concentração inicial de 100 mg/mL. A partir dessa concentração será feita uma diluição em água destilada estéril para atingir a concentração de 1024 µg/mL, solução utilizada no teste.

Teste da Concentração Inibitória Mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo o método de microdiluição em caldo. A CIM é definida como a menor concentração onde não é observado crescimento microbiano (NCCLS, 2008). Para realizá-la foi utilizada uma placa de microdiluição estéril com 96 poços, e preparado um meio de distribuição em tubos *ependorf*® contendo uma solução de 1 mL composta por 900 µL de BHI 10% e 100 µL da suspensão bacteriana. A placa de microdiluição foi preenchida no sentido numérico, adicionando 100 µL da solução de distribuição em cada cavidade, posteriormente foi realizada a microdiluição seriada com 100 µL da solução teste, com concentrações finais variando de 512 a 8 µg/mL, até a penúltima cavidade, pois a ultima é destinada ao controle do crescimento microbiano. Em seguida as placas foram incubadas durante 24 h a 35° C[6]. Para revelação das placas com bactérias, será adicionado 20 µL de resazurina, e após 1 hora em temperatura ambiente será realizada a leitura.

Teste de Modulação de Drogas

Para avaliar o potencial da substância como modificadora da resistência aos antibióticos, foi utilizado o método proposto por Coutinho et al. (2008). A soluçãofoi testada em concentração subnibitória. O meio de distribuição foi preparado em tubos *ependorf*® contendo cada BHI 10% + 150 µL da suspensão bacteriana + substância, atingindo 1,5 mL de solução. Para controle, a solução de 1,5 mL possuirá apenas BHI 10% + 150 µL de suspensão microbiana. A placa de microdiluição foi preenchida no sentido alfabético, adicionando 100 µL da solução de distribuição em cada cavidade, em seguida fazendo microdiluição seriada (proporção 1:1) com 100 µL da droga (antibiótico), até a penúltima cavidade, posteriormente as placas

serão incubadas a 37° C por 24 horas. A concentração dos antibióticos variaram gradualmente de 1024 a 1 µg/mL respectivamente. A leitura foi realizada da mesma maneira do teste de CIM.

Análise estatísticas

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 significativo e $p > 0,05$ não significativo). e expressos em gráficos.

Resultados e Discussão

Nos testes da CIM que foram realizados frente as linhagens bacterianas padrões a naringenina não apresentou atividade antibacteriana clinicamente relevante, onde todos os resultados foram ≥ 1024 µg/mL.

A naringenina quando combinada com os antibióticos, verificou-se a diminuição da concentração inibitória mínima, com resultados relevantes a partir do CIM/8.

A associação da naringenina frente *S.aureus* 10 apresentou diminuição da CIM, principalmente quando associada com Norfloxacin evidenciando um possível sinergismo.

A CIM da Norfloxacin foi de 128µg/mL, quando associado com a naringenina frente a bactéria *S.aureus* 10, obtendo uma redução da CIM para 64 µg/mL. As demais bactérias *E.coli* 06 e *P.aeruginosa*-24 quando associados com os antibióticos obtiveram um efeito antagônico.

O uso de produtos isolados como um possível agente antimicrobiano, apresentam uma baixa possibilidade dos microrganismos adquirem resistência á sua ação. Pois essas misturas são bastante complexas, dificultando a adaptabilidade microbiana.[5]. Vários estudos vem demonstrando a eficácia dos flavonoides, contra a resistência bacteriana [1,8].

Conclusões:

Após a análise dos resultados, os mesmos indicaram que a naringenina é muito eficaz quando associada com a norfloxacin frente a *S. aureus*, bactéria multirresistente. 'Podendo assim possibilitar o uso de produtos isolados quando combinados com

antibióticos.

Referências bibliográficas

[1] ANDRADE CA, PEITZ, CÚNICO M, CARVALHO JLS, ABRAHÃO WM, MIGUEL OG, MIGUEL MD, KERBER VA. Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das flores de acácia podalyriifoli A. Cunn. Ex G. Don Leguminosae Mimosoideae ver. **Bras Farmacogn.** 2003; 15 (1):13-15.

[2] BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. Introdução à química de alimentos. 2.ed. SãoPaulo: **Varela**, 1995. 223p.

[3] CALIXTO. J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Braz J Med Biol Res** 2000;33:79-89.

[4] COUTINHO, HDM; COSTA, JG; LIMA, EO; FALCÃO-SILVA, VS; SIQUEIRA JÚNIOR, JP. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, 54: 328-330, 2008

[5] COUTINHO HDM, COSTA JGM, LIMA OE, FALCÃO-SILVA VS, JUNIOR-SIQUEIRA JP. In Vitro interferece of *Momordia Carantia* in the resistance to aminoglycosides. **Pharm Biol.** 2009; 47(11): 1056-59.

[6] JAVADPOUR, MM; JUBAN, MM; LO, WC; BISHOP, SM; ALBERTY, JB; COWELL, SM; BECKER, CL; MCLAUGHLIN, ML. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **J Med Chem**, 39: 3107–3113. 1996.

[7] LOBO, L. T., CASTRO, K. C. F., ARRUDA, M. S. P., SILVA, M. N. DA, ARRUDA, A. C.; MÜLLER, A. H., ARRUDA, G. M. S. P., SANTOS, A. S. & FILHO, A. P. DA S. S. Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosae). **Quim. Nova** v. 31, n. 3, p. 493-497, 2008.

[8] PALOMINO JC, MARTIN A, CAMACHO M, GUERRA H, SWINGS J, PORTAELS F.. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother** 2002.46:2720–2722

[9] PEITZ, CÚNICO MM, MIGUEL MD, KERBER VA. Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das folhas

de Acacia Ionifolia (Andr.) Willd.
(Leguminosae). **Rev Bras Farmacogn.** 2033;
13(2): 61-5.

[10] SALVAT, A.; ANTONNACCI, L.;
FORTUNATO, R.H.; SUAREZ, E. Y.; GODOY,
H. M. Screening of some plants from North
Argentin for their antimicrobial activity. Letters
in **Applied Microbiology and Biotechnology**,
Vol. 32: 293-297, 2001.

[11] SOUZA, O. C. et al. Antimicrobial
resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa*
isolated in feces of patients infected with
human immunodeficiency vírus. **Caderno
Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, Vol.15(3):
392 -379, 2007.