

Atividade antimicrobiana *in vitro* de Geraniol e Cariofileno sobre *Staphylococcus aureus*

Actividad antimicrobiana de Geraniol e Cariofileno contra *Staphylococcus aureus*

In vitro antimicrobial activity of Geraniol and Cariophyllene against *Staphylococcus aureus*

PhD. Henrique Douglas Melo Coutinho, BSc. Maria Audilene de Freitas, BSc. Cícera Natália Figueiredo Leite Gondim, BSc. Rosimeire Sabino de Albuquerque, BSc. João Victor de Alencar Ferreira, MSc. Jacqueline Cosmo Andrade

Laboratorio de Microbiología e Biología Molecular. Universidade Regional do Cariri, Crato-CE, Brasil.

RESUMO

Introdução: os óleos essenciais das plantas medicinais são tipicamente constituídos por um complexo de compostos químicos, principalmente derivados de terpenos como o geraniol e o cariofileno. O geraniol é encontrado em muitas espécies de flores, inclusive rosas. O cariofileno é um sesquiterpeno de ocorrência comum em muitos óleos essenciais.

Objetivo: testar contra bactérias Gram-positivas do gênero *Staphylococcus* a ação antimicrobiana dos compostos geraniol e cariofileno.

Métodos: para avaliar a ação antimicrobiana do geraniol e do cariofileno, foi utilizada a linhagem MRSA *Staphylococcus aureus* 358. Através do método de microdiluição em caldo foi avaliada a concentração inibitória mínima (CIM) e a atividade moduladora de ambos os compostos sozinhos ou associados aos antibioticos aminoglicosídios gentamicina, canamicina, amicacina e neomicina.

Resultados: os resultados indicam que o geraniol aumentou a ação da canamicina. Por sua vez, o cariofileno aumentou a resistência da bactéria contra a neomicina.
Conclusões: os dados demonstraram que ambos os compostos tem potencial modulador da atividade antibiótica.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, cariofileno, geraniol, resistência microbiana, *Staphylococcus aureus*.

RESUMEN

Introducción: los aceites esenciales de plantas medicinales son típicamente compuestos por un complejo de compuestos químicos, en lo principal derivados de terpenos como geraniol y cariofileno. El geraniol se encuentra en muchas especies de flores, incluyendo rosas. El cariofileno es un sesquiterpeno de ocurrencia común en muchos aceites esenciales.

Objetivo: ensayar frente a bacterias Gram positivas del género *Staphylococcus* la actividad antimicrobiana de los compuestos geraniol y cariofileno.

Métodos: para evaluar la acción antimicrobiana de geraniol y cariofileno, fue utilizada la cepa MRSA *Staphylococcus aureus* 358. Por el método de microdilución en caldo se evaluó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la actividad moduladora de los compuestos solos o asociados con los antibióticos aminoglucósidos gentamicina, kanamicina, amikacina y neomicina.

Resultados: los resultados demostraron que el geraniol aumentó el efecto del antibiótico kanamicina, pero el cariophyllene ha mejorado la resistencia de la bacteria contra la neomicina.

Conclusiones: los resultados demostraron que las dos sustancias presentaron modulación de la actividad antibiótica.

Palabras clave: actividad antimicrobiana, cariophyllene, geraniol, resistencia bacteriana, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Introduction: the essential oils of medicinal plants are typically composed by a complex of chemical compounds, mainly derivatives of terpenes as geraniol and caryophyllene. The Geraniol is found in many species of flowers, including roses. The caryophyllene is a common sesquiterpene occurring in many essential oils.

Objective: assay against Gram positive bacteria from the *Staphylococcus* genus the antimicrobial activity of the compounds geraniol and caryophyllene.

Methods: to verify the antimicrobial effect of the geraniol and caryophyllene, was used a MRSA strain *Staphylococcus aureus* 358. Using the microdilution method was determined the minimum inhibitory concentration (MIC) and the modulatory activity of both compounds alone or associated with the aminoglycoside antibiotics gentamicin, kanamycin, amikacin and neomycin.

Results: the results demonstrated that the geraniol enhanced the kanamycin antibiotic effect, but the caryophyllene enhanced the resistance of the bacterium against the neomycin.

Conclusions: the results demonstrated that both compounds have modulatory effect when associated with antibiotics.

Key words: antimicrobial activity, cariophyllene, geraniol, bacterial resistance, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva encontrada na microbiota do corpo humano; pode causar infecções superficiais e até algumas disseminadas com elevada gravidade, e a sua importância clínica se deve à incidência de infecções hospitalares graves causadas por amostra multirresistente.¹

Encontrada na nasofaringe e fossas nasais, pode causar desde infecções simples na pele até infecções graves em pacientes debilitados por doenças crônicas, traumas físicos, queimaduras e enfermidades imunossupressoras. Indivíduos que carregam o *S. aureus* e não apresentam sintomatologia são genericamente conhecidos como "portadores sãos ou assintomáticos", sendo considerados dentre as principais fontes de transmissão tanto da infecção nosocomial, quanto da comunidade.^{2,3}

O uso desenfreado de antibióticos sem uma cuidadosa avaliação das suas indicações apropriadas pode levar ao crescimento de cepas resistentes, ou seja, acarretar numa mutação seletiva.⁴ Apesar das indústrias farmacêuticas produzirem um expressivo número de novos antibióticos nas últimas três décadas, a resistência microbiana a essas drogas também aumentou. Em geral, as bactérias têm a habilidade genética de adquirir e de transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos.⁵

Nos últimos anos, há um grande interesse e aumento na procura de produtos naturais como recursos terapêuticos. O fato de que amplas camadas da população mundial não têm acesso aos medicamentos e à medicina institucionalizada, a consciência ecológica e a crença popular de que o natural é inofensivo, contribuem para o aumento da resistência desses microrganismos.⁶

Os óleos essenciais das plantas medicinais são tipicamente constituídos por um complexo de compostos químicos (principalmente de terpenos) que podem agir individualmente, aditivamente ou sinergicamente para melhorar a saúde. Além de serem utilizadas como agentes terapêuticos, as substâncias bioativas isoladas dos óleos essenciais das plantas podem servir como moléculas protótipos para novos compostos sintéticos e, também, como ferramentas para estudos fisiológicos.⁷

O geraniol é encontrado em muitas espécies de flores, inclusive rosas, sendo estruturalmente parecido com o citronelol, diferindo pela presença de uma ligação dupla adicional.⁸ Por serem hidrofóbicos, os terpenóides como o geraniol podem aderir aos lipídios da membrana celular, destruindo estruturas e tornando-as mais permeáveis.⁹ A perda de componentes celulares podem indicar danos graves e irreversíveis à membrana celular.¹⁰

O cariofileno é um sesquiterpenóide de ocorrência comum em muitos óleos essenciais e, em especial, no óleo de cravo na sua forma isômera (b-cariofileno). Ocorre na natureza como mistura dos isômeros: isocariofileno, a-cariofileno (humuleno) e b-cariofileno. Algumas dessas substâncias apresentam atividades biológicas (b-cariofileno), com efeitos espasmolítico, anestésico local e anti-inflamatório.¹¹

Neste contexto, esta investigação objetiva testar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais geraniol e cariofileno, contra *S. aureus*, adotando para realização do *screening*, o método de microdiluição em caldo e a determinação da sua concentração inibitória mínima (CIM).

MÉTODOS

Cepas utilizadas

A cepa bacteriana utilizada foi a linhagem MRSA *Staphylococcus aureus* 358. A cepa foi mantida em *slant* em *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco) e antes do ensaio, foi cultivada durante a noite a 37 °C em *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco) (tabela 1).

Tabela 1. Sítio de isolamento e perfil de resistência a antibióticos

Bacteria	Sítio de isolamento	Perfil de resistência a antibióticos
<i>S. aureus</i> 358	Ferida Cirúrgica	Oxa, Gen, Tob, Ami, Can, Neo, Para, But, Sis, Net

Ami: amicacina; Can: canamicina; Tob: tobramicina; Oxa: oxadilina; Gen: gentamicina; Neo: neomicina; Para: paramomicina; But: butirosina; Sis: sisomicina; Net: netilmicina.

Substâncias testadas

As substâncias geraniol e cariofileno (Fig.) foram obtidos da Sigma Chemical Co.

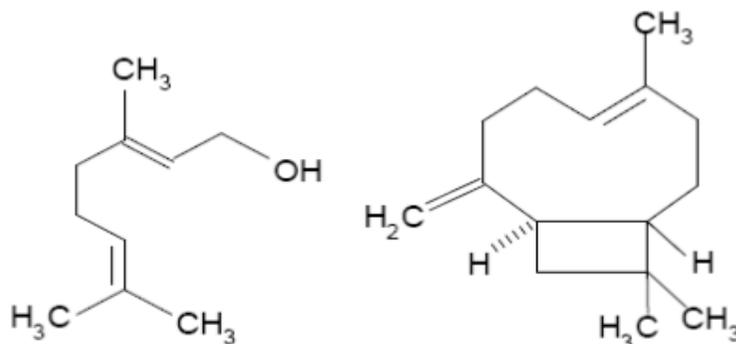


Fig. Estrutura química do geraniol e do cariofileno, respectivamente.

Drogas

Os antibióticos canamicina, gentamicina, neomicina e amicacina, foram obtidos através da Sigma Chemical Co. Todas as drogas foram dissolvidas em água estéril na concentração de 5 000 µL/mL.

Teste de suscetibilidade

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 *Brain Heart Infusion*- BHI 10 %, usando uma suspensão de 10⁵ UFC/mL em placas de microdiluição com 96 poços, com diluições em série 1/1, utilizando um inóculo de 100 µL e uma quantidade de 100 µL do produto, que foi diluída de maneira seriada variando em 1 024 – 8 µg/mL.¹² O teste de concentração inibitória mínima foi realizado utilizando as cepas de *Staphylococcus aureus*.

Para avaliação do geraniol e cariofileno como modificadores de resistência microbiana, a CIM dos antibióticos foi determinada na presença e na ausência do produto, sendo que o mesmo estava em concentração subinibitória (MIC/8), as concentrações adicionais das drogas antimicrobianas usadas nesse ensaio variaram de 5 000 µg/mL – 2,4 µg/mL para os antibióticos. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C.

A leitura dos resultados para bactérias foi feita com resazurina sódica (Sigma), um indicador colorimétrico de óxido-redução.¹³ Esse corante foi diluído em água destilada e realizada a leitura, onde 20 µL da solução indicadora foram adicionadas em cada cavidade e as placas foram mantidas por uma hora em temperatura ambiente. Os resultados para determinação da CIM bacteriana foram considerados positivos para os poços que permaneceram com a coloração azul e negativos para os que obtiveram coloração vermelha.¹⁴

RESULTADOS

Os testes realizados mostraram resultados significativos, tanto para a canamicina quanto, quando combinada com o geraniol. Verificou-se que a atividade antimicrobiana da canamicina contra *S. aureus* foi reforçada com a presença do geraniol, com redução da concentração de inibição de 19,53 para 2,44 µg/mL, caracterizando um sinergismo (tabela 2). Segundo Katzung,¹⁵ o sinergismo é marcado por uma redução de quatro vezes ou mais na CIM de cada fármaco quando usado em combinação *versus* isoladamente.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana do geraniol e do cariofileno combinadas com a gentamicina, amicacina, canamicina e neomicina sobre *Staphylococcus aureus* 358

Antibióticos	Geraniol	Cariofileno	Controle
Gentamicina	4,88	4,88	4,88
Amicacina	78,12	78,12	78,12
Canamicina	2,44	19,53	19,53
Neomicina	9,76	39,06	9,76

Em se tratando do resultado com a Neomicina pode ser observado um antagonismo, pois quando associada ao carofileno o potencial de inibição foi reduzido, sendo comprovado pelo aumento da concentração de inibição de 9,76 para 39,06. Efeitos antagonísticos já foram relatados sobre a combinação de antibióticos entre si e com produtos naturais. Tal efeito tem sido atribuído à quelação mútua das drogas.¹⁶ Para os demais antibióticos não foram comprovados resultados clinicamente relevantes para as concentrações testadas.

DISCUSSÃO

Estudos já realizados confirmam que um produto natural pode potencializar a ação de um produto natural, seja ele de origem animal, seja ele de origem vegetal, demonstrando que a interação das drogas podem indicar um novo caminho para a composição de fármacos produzidos em associação.^{17,18}

O principal mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos em estafilococos é a inativação das drogas por enzimas celulares modificadoras dos aminoglicosídeos e bombas de efluxo.¹⁷⁻¹⁹

Diversos trabalhos enfatizam o efeito de óleos essenciais quando, ao interagir com a membrana plasmática, favorecem a sua permeabilização, aumentando a entrada de antibióticos e ocasionando a morte celular.¹⁷⁻¹⁹

Segundo Novacosk e Torres,²⁰ óleos essenciais mais ativos apresentam um teor relativamente importante em álcoois, fenóis e aldeídos (eugenol, timol, carvacrol, geraniol) poderosos agentes antisépticos, bem como de terpenos (alfa e beta pinenos e limoneno), assim comprovando a existência de propriedades antimicrobianas conhecidas nestes grupamentos químicos. Os resultados obtidos indicam que o geraniol colaborou com a ação do antibiótico canamicina ao ser utilizado contra cepas de bactérias de *S. aureus* 358. Por sua vez, o carofileno modifica a ação do antibiótico neomicina, aumenta a resistência do mesmo contra cepas de *S. aureus* 358.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Trabulsi LR. Aspectos médicos da resistência bacteriana a drogas. Revista de Microbiologia. 1973;1(1):1-30.
2. Lu P, Chin LC, Peng CF, Chiang YH, Chen TP, Ma L, et al. Risk factors and molecular analysis of community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. Journal of Clinical Microbiology. 2005;43(1):132-9.
3. Ononuga A, Oyi AR, Pnaolapo JA. Prevalence and susceptibility pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates among healthy women in Zaria, Nigéria. African Journal of Biotechnology. 2005;4(11):1321-4.
4. Nicolini P, Nascimento JW, Greco KV, Menezes FG. Fatores relacionados à prescrição médica de antibióticos em farmácia pública da região Oeste de São Paulo. Ciência e Saúde Coletiva. 2008;13(sup):689-96.

5. Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a postantimicrobial era. *Science*. 1992;257(5073):1050-5.
6. Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon*. 2001;39(5):603-13.
7. Neves DP. *Estudo farmacológico do timol e Carvacrol sobre a contratilidade da aorta isolada de rato*. Dissertação (mestrado em ciências fisiológicas), Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará. 2009:94
8. Höschle B, Jendrossek D. Utilization of geraniol is dependent on molybdenum in *Pseudomonas aeruginosa*; evidence for different metabolic routes for oxidation of geraniol and citronelol. *Microbiology*. 2005;151(pt. 7):2277-83.
9. Sikkema J, Bont JAM, Poolman B. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology Review*. 1995;59(2):201-22.
10. Carson CF, Mee BJ, Rillea TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree Oil) on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Journal of Antibiotic and Chemotherapy*. 2002;46(6):1914-20.
11. Martin S, Padilla E, Ocete MA, Galvez J, Jiménez J, Zarzuelo A. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum fruticosum*. *Planta Medica*. 1993;59(6):533-6.
12. Javadpour MM, Juban MM, Lo WC, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM, et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1996;39(16):3107-13.
13. Salvat AA, Antonnacci L, Fortunato RH, Suarez EY. Screening of some plants from northern Argentina for their antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*. 2001;32(5):293-7.
14. Mann CM, Cox SD, Markham JL. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC6749 contributes to its tolerance to the essential oil *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology*. 2000;30(4):294-7.
15. Katzung BG. *Farmacologia básica e clínica*. 10ª ed. São Paulo: McGraw-Hill; 2007.
16. Ferreira SF, Brito SV, Costa JGM, Alves RRN, Coutinho HDM, Almeida WO. Is the body fat of lizard *Tupinambis merrianae* effective against bacterial infections? *Journal of Ethnopharmacology*. 2009(2);126:233-7.
17. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Jr JP. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2009;9(13):1-4.
18. Coutinho HDM, Costa JGM, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP, Lima EO. Potentiation of antibiotic activity by *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum*. *Journal of Medicinal Food*. 2010;13(4):1024-6.

19. Paulsen IT, Firth N, Skarray RA. Resistance to antimicrobial agents other than β -lactams. In: *Staphylococci in human disease*. New York: Churchill Livingstone; 1997.

20. Novacosk R, Torres RSL. Atividade Antimicrobiana sinérgica entre óleos essenciais de lavanda (*Lavandula officinalis*), Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), Cedro (*Juniperus virginiana*), Tomilho (*Thymus vulgaris*) e Cravo (*Eugenia caryophyllata*). *Revista Analytica*. 2006;(1)35:36-9.

Recibido: 11 de enero de 2014.

Aprobado: 12 de enero de 2015.

PhD. Henrique D.M. Coutinho. Laboratorio de Microbiología e Biología Molecular, Universidade Regional do Cariri, 63105-000, Crato-CE, Brasil.
Correo electrónico: hdmcoutinho@gmail.com