

ESTUDO *IN VITRO* DE SENSIBILIDADE MICROBIANA FRENTE A SUBSTÂNCIAS ALTERNATIVAS

Kelli S. G. Oliveira¹, Cristina Pacheco Soares², Kenio de Gouvêa Cabral³

¹Universidade do Vale do Paraíba – IP&D – e-mail: ksgoliver@yahoo.com.br

²Universidade do Vale do Paraíba – IP&D – e-mail: cpsoares@univap.br

³QUINABRA - Química Natural Brasileira Ltda – e-mail: kcabral@quinabra.com.br

Resumo- O presente estudo teve por objetivo avaliar a ação antimicrobiana *in vitro* da Papaína (6000 UI/mg) e de uma matéria prima à base de bioflavonóides cítricos associados a ácidos orgânicos (FCAO) frente às cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922. Foram realizadas diluições ao dobro de ambas as substâncias, partindo das concentrações de 16% e 4000 ppm até um mínimo de 0,5% e 125 ppm para a Papaína e para a FCAO, respectivamente. Foram empregados os testes de susceptibilidade pelos métodos de difusão de disco, utilizando-se papel de filtro, e o de diluição. Em ambas as metodologias utilizadas não foi possível observar efeito inibidor tanto da Papaína como da FCAO nas diferentes diluições frente às bactérias testadas. Conclui-se pela incompatibilidade dos métodos utilizados no presente experimento em relação aos produtos testados para análise de sensibilidade microbiana.

Palavras-chave: antibióticos, bioflavonóides, ácidos orgânicos, papaína.

Área do Conhecimento: II - Ciências Biológicas - Microbiologia

Introdução

O uso de antibióticos, quimioterápicos e desinfetantes foi e é fundamental para o desenvolvimento da humanidade, pois é a base para a diminuição nas taxa de mortalidade em todas as faixas etárias pelo controle das diversas doenças de origem microbiológica que afetam os seres vivos. Pode-se afirmar, então, que a aplicação correta dos esquemas de tratamento e desinfecção tem uma participação significativa no grau de desenvolvimento humano, pois abrangem desde a produção de alimentos, tanto de origem animal como vegetal, até processos na indústria alimentícia, bem como todos os setores da saúde pública.

Os primeiros medicamentos contra agentes vivos foram os anti-sépticos e desinfetantes. Desinfecção descreve o método capaz de eliminar, em uma determinada superfície, a maioria ou todos os microorganismos patogênicos, com exceção dos esporos. As características ideais de um desinfetante são: amplo espectro, ação rápida, não ser afetado por fatores ambientais, deve ser ativo na presença de matéria orgânica, ser compatível com sabões, detergentes e outros produtos químicos, atóxico, compatível com diversos tipos de materiais, efeito residual na superfície, fácil manuseio, inodoro ou de odor agradável, econômico, solúvel em água, estável em concentração original ou diluído e não poluente (COATES & HUTCHINSON, 1994). Segundo Waksman (1942), os antibióticos podem ser definidos como substâncias produzidas originalmente pelo metabolismo de certas

espécies, principalmente, de fungos e bactérias, com propriedade bactericida ou bacteriostática, considerando as diferentes condições. São drogas utilizadas no tratamento de doenças infecciosas, assim como os quimioterápicos que, de acordo com Ehrlich (1913), são drogas que apresentam toxicidade apenas para o microorganismo invasor, resguardando a integridade do paciente (GREENWOOD, 1997).

A partir de 1950, quando os antibióticos passaram a ser amplamente utilizados, tanto na medicina humana como animal, iniciou-se o fenômeno de resistência bacteriana. Este fenômeno ocorre de forma extremamente eficiente, inviabilizando a ação antibiótica. Cepas de bactérias resistentes ou multi-resistentes são freqüentemente descritas na literatura. Sendo assim, de tempos em tempos, gerações novas de quimioterápicos, antibióticos e desinfetantes têm sido desenvolvidos para substituir àquelas contra os quais foram desenvolvidos meios de resistência (FLUIT, 2001; FDA, 2005). Para os desinfetantes, o termo tolerância é mais apropriado que o termo resistência, cuja ocorrência ou o desenvolvimento é dependente da concentração de uso do germicida (FAVERO, 2002).

Este fenômeno fez com profissionais ligados à área de produção animal, indústria alimentícia e saúde pública, voltassem sua atenção a substâncias naturais, ou de origem natural, com potencial para uso nestas áreas. Dentre elas, pode-se destacar os ácidos orgânicos, polifenóis, própolis, quitosana, óleos essenciais, ervas, entre outras (GARCIA et al., 2000; CHEN et al, 2002; SANTOS et al., 2002; WALLACE, 2004). A

vantagem dessas substâncias reside no fato de, muitas vezes, possuírem baixo grau de toxicidade; serem compostas, em alguns casos, por um *pool* de substâncias, que agem em sinergismo, dificultando, desta maneira, a formação de resistência (SANTOS et al., 2002); bem como a possibilidade de associação com outras substâncias, visando a potencialização e/ou, complementação da ação antimicrobiana.

Tendo em vista estes aspectos, o presente estudo objetiva-se avaliar a sensibilidade antimicrobiana “in vitro” frente às bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922, por vários métodos, de um produto à base de bioflavonóides cítricos associados a ácidos orgânicos (FCAO - Quinabra) e papaína pura (6000UI/mg – Via Farma), nas várias concentrações.

Materiais e Métodos

A determinação da sensibilidade microbiana no presente estudo foi realizado através de metodologias distintas para ver a viabilidade de crescimento bacteriano. No primeiro protocolo descrito por JORGENSEN & TURNIDGE (2003) foi avaliada a sensibilidade microbiana através da turbidez após crescimento bacteriano pelo método de Concentração inibitória mínima (MIC). No segundo protocolo foi avaliada a sensibilidade microbiana através do método de difusão em disco, colocando-se a solução-teste sobre os discos de papel ou embebendo o disco de papel na solução-teste. Os meios de cultura utilizados em todos os protocolos foram Ágar Tripticase de Soja (TSA) e Caldo de Infusão Cérebro-Coração (BHI), ambos da DIFCO.

Preparo dos inoculos

Para o preparo do inóculo de trabalho, cultivou-se as cepas de *S. Aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922 em meio líquido estéril de BHI e incubou-se por 24 horas a 37°C, em ambiente aeróbico. O inóculo de trabalho foi obtido pela determinação da densidade óptica após crescimento, obtendo-se uma concentração de bactérias entre 10^6 até 10^8 CFU/mL de meio, com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Um cultivo em TSA desta diluição, foi incubado por 24 horas a 37°C, em ambiente aeróbico, para se inferir sobre a qualidade do inóculo.

Preparo das soluções teste

Para cada substância, utilizou-se uma concentração inicial de 4000 ppm para o FCAO e 16% para a Papaína Pura que foi o ponto de partida para diluições seriadas ao dobro até a

concentração mínima de 125 ppm para o FCAO e 0,5% para a Papaína Pura. Essas soluções foram preparadas momentos antes do início do teste. O controle negativo foi a água deionizada pura estéril e o controle positivo os antibióticos Sulfato de Gentamicina 50 mg/mL e Garamicina 80 mg/mL.

Concentração inibitória mínima (MIC) - Turbidez após crescimento microbiano

Para a determinação do MIC, as soluções-teste foram preparadas em tubos contendo meio BHI estéril. Os tubos foram incubados por 24 horas a 37°C, em meio aeróbico. Após este período, os foram avaliados quanto a turbidez, que indicou o crescimento microbiano, ou ainda, pela formação de botão sedimentar ≥ 2 mm ou ainda vários botões sedimentares com diâmetros menores.

Difusão em Disco de Papel – Adição da solução-teste

Para o teste de difusão em disco de papel, colocou-se 20 μ L do inóculo de trabalho na parte central de uma placa petri de vidro de 140x15mm. Foi adicionado 40mL de TSA fundido e homogeneizou-se em movimentos circulares. Após a solidificação do agar, colocou-se os discos de papel de filtro estéreis, de modo que não houvesse sobreposição dos halos na placa após o crescimento bacteriano. Pipetou-se 10 μ L de solução-teste em cada disco de papel. Um disco, contendo apenas o inóculo, e outro sem qualquer substância, foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente, utilizando o mesmo volume na pipetagem.

As placas foram incubadas 24h à 37°C para verificação da formação dos halos de inibição. Uma outra metodologia para verificação da difusão em disco de papel foi usada, executando-se o embebedimento dos discos de papel na solução-teste já preparada anteriormente. O restante do procedimento foi exatamente igual ao anteriormente citado.

Resultados

Em ambas os testes de sensibilidade *in vitro* utilizadas no presente experimento não foi possível observar efeito inibidor tanto da Papaína como da FCAO nas diferentes diluições frente às bactérias testadas. Nas Figura 1 e 2 pode-se comprovar a ausência de halos de inibição para ambos os produtos testados.



Figura 1: Resultado do teste de sensibilidade *in vitro* pelo método de difusão em disco das cepas *S. aureus* ATCC 25922 (as duas placas superiores) e *E. coli* ATCC 25923 (as duas placas inferiores) frente à FCAO. Os discos contendo o antibiótico sulfato de gentamicina (controle positivo) apresentaram halo de inibição.



Figura 2: Resultado do teste de sensibilidade *in vitro* pelo método de difusão em disco das cepas *S. aureus* ATCC 25922 (as duas placas superiores) e *E. coli* ATCC 25923 (as duas placas inferiores) frente à papaína. Os discos contendo o antibiótico garamicina (controle positivo) apresentaram halo de inibição

Discussão

Baseado nos resultados observados no método de difusão em disco de papel pode-se afirmar que não houve uma difusão das soluções-teste no ágar. Os bioflavonóides são moléculas polifenólicas e que conferem estabilidade aos ácidos orgânicos encapsulando-os, formando, desta forma, complexos grandes. A papaína, por sua vez, é uma enzima proteolítica que apresenta uma estrutura tridimensional também muito grande. Sendo assim, pode-se inferir que para

ambos os casos houve uma retenção dessas moléculas nos discos, entre as fibras de celulose do papel de filtro, impossibilitando-as de se difundir pelo ágar. Sem a difusão, não houve contato com a bactéria, o que resultou na ausência de halos de inibição.

No método de diluição, a ausência de inibição pode ser explicada pela presença de elementos inibidores, tanto para a Papaína como para os bioflavonóides e ácidos orgânicos, presentes no meio de cultura utilizado, pois pela natureza tanto de uma substância como da outra era de se esperar algum efeito antimicrobiano.

Conclusão

Diante dos resultados observados e das condições em que as substâncias foram submetidas no presente experimento, pode-se concluir que as metodologias empregadas no experimento não são indicadas para se testar a sensibilidade microbiana frente a produtos compostos por bioflavonóides cítricos associados a ácidos orgânicos e a papaína pura. Metodologias específicas para as substâncias em questão devem ser desenvolvidas para se obter resultados fidedignos.

Agradecimentos

Aos professores Newton Soares da Silva e Maricília Silva Costa (IP&D – UNIVAP) pela colaboração para a realização deste trabalho.

Referências

- CHEN, Y.M., CHUNG, Y.C., WANG, L.W., CHEN, K.T., LI, S.Y. Antibacterial properties of chitosan in waterborne pathogen. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.*, v. 37, p.1379-90, 2002.
- COATES, D. & HUTCHINSON, D.N. How to produce a hospital disinfection policy. *J Hosp Infec.*,v. 26, p. 57-68, 1994.
- FAVERO, M.S. Products containing biocides: perceptions and realities. *J Appl Microbiol.*, v. 92 Suppl:72S-7S, 2002.
- FLUIT, A.C., SCHMITZ, F.Z., EUROPEAN SENTRY PARTICIPANTS. Multi-resistance to antimicrobial agents for the ten most frequently isolated bacterial pathogens. *Int J Antimicrob Agents.*, v. 18, p. 147-60, 2001.
- FOOD AND DRUG ASSOCIATION. Antimicrobial resistance: a growing threat. Disponível em

<http://www.fda.gov>. Acesso dia 29 de agosto de 2005.

- GARCIA, R.G., ARIKI, J., MORAES, V.M.B., KRONKA, S.N., BORGES, S.A., MURATA, L.S., CAMPOS, V.A. Ação Isolada ou Combinada de Ácidos Orgânicos e Promotor de Crescimento em Rações de Frangos de Corte. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, v. 2, 2000.

- GREENWOOD, D. Historical Introduction. In: *Antibiotic and Chemotherapy*, O'Grady, F., Lambert, H.P., Finch, R.G., Greenwood, D. (eds). Ed. Churchill Livingstone, cap. 1, p. 2-9, 1997.

- JORGENSEN, H.J., TURNIDGE, J.D. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In: *Manual for Clinical Microbiology*, MURRAY, P.R., BARON, E.J., JORGENSEN, J.H., PFALLER, M.A., YOLKEN, R.H., eds. ASM Press, Washington, 8ª ed., p. 1108-1127.

- PINTO, M. S.; FARIA, J. E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S. T. A.; PEREIRA, C. S.; GIOSO, M. M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci. São Paulo*, v. 38, n. 6, p. 278-283, 2001.

- SANTOS, F.A., BASTOS, E.M., UZEDA, M., CARVALHO, M.A., FARIAS, L.M., MOREIRA, E.S., BRAGA, F.C. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J Ethnopharmacol.*, v. 80, p.1-7, 2002.

- WALLACE, R.J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proc Nutr Soc.*, v. 63, p. 621-9, 2004.