

Estudio de la actividad antibacteriana de los monoterpenos timol y carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de amplio espectro

Study of the antibacterial activity of thymol and carvacrol monoterpenes against strains of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases

Dijaci Santos de Lima¹, Jade Cardôso Lima¹, Raqueline Maiara Costa Bezerra Calvacanti¹, Bernadete Helena Cavalcanti dos Santos², Igara Oliveira Lima³

¹ Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Unidade Acadêmica de Saúde, Cuité, Paraíba, Brasil

² Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, João Pessoa, Paraíba, Brasil

³ Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Unidade Acadêmica de Saúde, João Pessoa, Paraíba, Brasil

RESUMEN

OBJETIVOS: Estudiar la actividad antimicrobiana de los fitoconstituyentes timol y carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de amplio espectro (ESBL) y determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de timol y carvacrol. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología (J11) en el Centro de Educación y Salud de la Universidad Federal de Campina Grande, estado de Paraíba, Brasil. Para determinar la CIM de los fitoconstituyentes seleccionados, se utilizaron cepas bacterianas de *E. coli* ESBL (C-18, C-21, C-20, C-24, C-25, 24, 65) oriundas de pacientes de ambulatorio y la técnica de microdilución en placa de 96 orificios a través de la dilución seriada a una razón de dos, reservando la última columna para el control del crecimiento de los microorganismos. **RESULTADOS:** La CIM de carvacrol presentó concentraciones de 64 $\mu\text{g/mL}$ para la cepa 65 y 128 $\mu\text{g/mL}$ para las cepas C-18, C-20, C-21, C-24, C-25 y 24. Frente a la acción de timol, la CIM se determinó como: 1.024 $\mu\text{g/mL}$ para la cepa C-25; 512 $\mu\text{g/mL}$ para las cepas C-18, C-21, 24 y 65; 256 $\mu\text{g/mL}$ para la cepa C-24; y 128 $\mu\text{g/mL}$ para la cepa C-20. **CONCLUSIÓN:** Por intermedio de los experimentos, se puede afirmar que los fitoconstituyentes carvacrol y timol ejercen actividad bacteriostática sobre las cepas de *E. coli*.

Palabras clave: *Escherichia coli*; Betalactamasas; Terpenos.

ABSTRACT

OBJECTIVES: To study the antimicrobial activity of thymol and carvacrol phytochemicals against strains of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBL) and to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of thymol and carvacrol. **MATERIALS AND METHODS:** The experiments were carried out at the Microbiology Laboratory (J11) at the Education and Health Center of the Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba State, Brazil. In order to determine the MIC of the selected phytochemicals, bacterial strains of *E. coli* ESBL (C-18, C-21, C-20, C-24, C-25, 24, 65) from outpatients were used, and microdilution technique in 96-hole reaction plate by two-fold serial dilution, reserving the last column for growth control of microorganisms. **RESULTS:** MIC of carvacrol showed concentrations of 64 $\mu\text{g/mL}$ for strain 65 and 128 $\mu\text{g/mL}$ for strains C-18, C-20, C-21, C-24, C-25, and 24. In the thymol action, MIC was determined as: 1,024 $\mu\text{g/mL}$ for strain C-25; 512 $\mu\text{g/mL}$ for C-18, C-21, 24, and 65; 256 $\mu\text{g/mL}$ for C-24; and 128 $\mu\text{g/mL}$ for strain C-20. **CONCLUSION:** Through the experiments it was possible to affirm that the phytochemicals carvacrol and thymol have bacteriostatic effects on *E. coli* strains.

Keywords: *Escherichia coli*; Beta-lactamases; Terpenes.

Correspondencia / Correspondence:

Dijaci Santos de Lima

Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Unidade Acadêmica de Saúde

Olho D'água da Bica, s/n – CEP: 58175-000 – Cuité, Paraíba, Brasil

E-mail: dijaci.lima@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli habita normalmente el intestino de la mayoría de los animales, incluyendo a los seres humanos. Algunas cepas de *E. coli* pueden provocar una amplia variedad de enfermedades intestinales y extraintestinales, tales como diarrea, infecciones del tracto urinario, septicemia y meningitis neonatal¹. Es de fácil manipulación en laboratorio con alta facilidad en su cultivo, es bastante conocida en relación al tema genético, y puede ser empleada como indicador de contaminación fecal del agua².

Las β -lactamasas de amplio espectro (*extended-spectrum β -lactamase* – ESBL) son enzimas capaces de hidrolizar el grupo farmacóforo (anillo betalactámico) de los antibióticos betalactámicos, como cefalosporinas, penicilinas y monobactámicos, siendo consideradas una forma terapéutica primaria para el control de infecciones. Esas enzimas se codifican en genes presentes principalmente en los plásmidos, transposones e integrones, elementos que presentan capacidad de cargar otros tipos de genes de resistencia, confiriendo así a ese microorganismo resistencia a las demás clases de fármacos³.

Por mucho tiempo, las bacterias Gram negativas eran controladas a través de tratamiento con cefalosporinas; sin embargo, esa realidad ha venido cambiando, una vez que han surgido cepas que expresan la ESBL, siendo uno de los principales mecanismos de resistencia en la familia Enterobacteriaceae^{4,5,6}.

Debido al constante aumento de los medios de resistencia bacterianos, siendo una parte considerable originada en la automedicación, el combate a la resistencia microbiana acaba volviéndose una gran preocupación de la Organización Mundial de Salud. Se necesitan inversiones no apenas en el área de la salud, sino también, de suma importancia, en el área de la educación para el desarrollo de diferentes formas de control y prevención de la multiresistencia bacteriana⁷.

El apareamiento de la resistencia por parte de los microorganismos es derivado de mutaciones genéticas espontáneas u oriundas de estímulos y recombinación de genes, resultando en una amplia variedad genética, adecuándolos a la sobrevivencia en ocasiones adversas; de esas, las más comúnmente enfrentadas por ellos son la acción de antimicrobianos o la resistencia adquirida por el contacto con organismos ya resistentes. Esas alteraciones son posibles porque el genoma bacteriano es muy dinámico, con las actividades de defensa y transferencia génica desempeñadas por estructuras móviles, como integrones y plásmidos, que posibilitan, entonces, el amplio intercambio y modificación de datos genéticos^{8,9}.

La detección de especies portadoras de las ESBL se hace necesaria para identificar esas cepas y definir la terapéutica apropiada para un tratamiento eficaz¹⁰. Sin embargo, hay fallos en la terapéutica medicamentosa y los programas de investigación han propiciado

el descubrimiento y la viabilidad de alternativas terapéuticas frente a los mecanismos de resistencia. Así, productos naturales han demostrado gran eficiencia en las infecciones bacterianas; así siendo, no es sorpresa el hecho de que exista una gran variedad de drogas originadas de tales productos¹¹. En esa perspectiva, han sido desarrolladas investigaciones con el objetivo de investigar nuevos fármacos con acción antimicrobiana o, aún, moléculas que modulan la actividad de antibióticos^{11,12}.

Lo aceites esenciales y los terpenos han presentado diversas actividades biológicas, entre ellas acciones antimicrobianas, cuando probados en presencia de bacterias como *E. coli*. El carvacrol y el timol son isómeros y han sido señalados por algunos autores como moléculas prometedoras en el estudio de alternativas terapéuticas para el tratamiento de infecciones^{12,13,14}.

Los terpenos corresponden a una clase de sustancias químicas derivadas del metabolismo secundario de los vegetales, cuyo origen biosintético deriva de unidades de isopreno (C_5H_8), existiendo, en su mayor parte, bajo la forma de estructura cíclica, formada a partir del ácido mevalónico¹⁵. Estudios han mostrado que los aceites esenciales del orégano y del tomillo presentan actividad antimicrobiana y tienen carvacrol, timol y eugenol como constituyentes mayoritarios, siendo que la concentración de esos fitoconstituyentes puede variar de región para región¹⁶.

El timol, también conocido por 2-isopropil-5-metilfenol, es un monoterpeno, siendo isomérico con carvacrol; es extraído como una sustancia aromática, de coloración cristalina blanca y de aroma agradable, poco soluble en agua, pero extremadamente soluble en algunos solventes orgánicos; presenta pH neutro. El timol también presenta características alcalinas en soluciones acuosas debido a la desprotonación del fenol¹⁷.

El carvacrol, o 2-metil-5-1-metiletil fenol, es también un monoterpeno y presenta característica picante y olor suave de orégano. Debido a esas características y al aroma agradable, se utiliza como aditivo alimentario¹⁸. Se cree que es la ruptura de la membrana de las bacterias la causa de las propiedades antimicrobianas del carvacrol¹⁹.

Frente a esas premisas, el objetivo de este trabajo fue de investigar la acción antibacteriana del timol y el carvacrol contra cepas de *E. coli* ESBL.

MATERIALES Y MÉTODOS

LOCAL DE TRABAJO

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología (J11) del Centro de Educación y Salud de la Universidad Federal de Campina Grande, estado de Paraíba, Brasil.

CEPAS BACTERIANAS

Se utilizaron cepas bacterianas de *E. coli* ESBL (C-18, C-21, C-20, C-24, C-25, 24, 65), cedidas por

la farmacéutica Bernadete Helena Cavalcanti Santos (Laboratorio de Microbiología Clínica, Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Universidad Federal de Paraíba), oriundas de pacientes de ambulatorio.

FITOCOSTITUYENTES

Los fitoconstituyentes en prueba fueron el timol y el carvacrol (Sigma Aldrich).

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA

La determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los fitoconstituyentes seleccionados fue realizada por la técnica de la microdilución en placa de 96 orificios y fondo en "U" para cada una de las cepas. Por medio de la dilución seriada a una razón de 2, se obtuvieron las concentraciones de 1.024 a 1 µg/mL, efectuadas en la propia placa, de la columna 1 a la 11. La última columna (12) fue reservada para el control de crecimiento del microorganismo (Caldo Mueller-Hinton, sin el producto probado). Además se realizaron los siguientes controles: para evaluar la toxicidad del vehículo, la esterilidad del medio y la viabilidad del inóculo bacteriano^{20,21,22}.

A continuación, se añadieron 10 µl del inóculo (bacteria a 0,5 McFarland) en cada una de las cavidades. El ensayo se realizó en triplicado y fue incubado a 37 °C en un período de 24 horas para *E. coli* ESBL. Después del tiempo de incubación adecuado, se añadieron 20 µl de resazurina al 1% (SIGMA), indicador colorimétrico de óxido-reducción para bacterias; se procedió a la lectura, visualmente, por ausencia o presencia de crecimiento del microorganismo, observándose el cambio de la coloración de la solución de azul a rosa/rojo, resultante del crecimiento del microorganismo.

Por lo tanto, se determinó como CIM la menor concentración del producto capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo probado, verificado por un no cambio de la coloración del colorante indicador^{20,21,22}.

RESULTADOS

Los resultados referentes a la acción bacteriostática del carvacrol y el timol contra cepas de *E. coli* ESBL están en la tabla 1, en la que se determinó la CIM de carvacrol como siendo 64 µg/mL para la cepa 65 y 128 µg/mL para las cepas C-18, C-20, C-21, C-24, C-25 y 24. Para el timol, la CIM fue determinada como 1.024 µg/mL para la cepa C-25; 512 µg/mL para las cepas C-18, C-21, 24 y 65; 256 µg/mL para la cepa C-24; y 128 µg/mL para la cepa C-20.

DISCUSIÓN

Los aceites esenciales que contienen constituyentes como el carvacrol y el timol han sido observados como agentes antibacterianos, antivirales, antidiabéticos y antioxidantes en enfermedades cardiovasculares. Estos fitoconstituyentes son relatados como posibles agentes antimicrobianos, principalmente frente a las bacterias Gram positivas²³. Sin embargo, se mostraron activos contra la mayoría de las cepas probadas, en particular el carvacrol.

Los estudios realizados a partir de extractos producidos de hojas adultas de *Ficus benjamina* confirmaron la actividad antibacteriana de los constituyentes de esta planta y obtuvieron una CIM de 1.024 µg/mL contra cepas de *E. coli*²⁴, corroborando el resultado obtenido en la cepa *E. coli* 25 cuando se prueba la actividad del timol en el presente trabajo.

Tabla 1 – CIM en µg/mL de carvacrol y timol contra cepas de *E. coli*

	<i>E. coli</i> C-18	<i>E. coli</i> C-20	<i>E. coli</i> C-21	<i>E. coli</i> C-24	<i>E. coli</i> C-25	<i>E. coli</i> 24	<i>E. coli</i> 65
2.048 µg/mL	C(-)T(-)	C(-)T(-)	C(-)T(-)	C(-)T(-)	C(-)T(-)	C(-)T(-)	C(-)T(-)
1.024 µg/mL	C(-)T(-)	C(-)T(-)	C(-)T(-)	C(-)T(-)	C(-)T(-)	C(-)T(-)	C(-)T(-)
512 µg/mL	C(-)T(-)	C(-)T(+)	C(-)T(-)	C(-)T(-)	C(-)T(+)	C(-)T(-)	C(-)T(-)
256 µg/mL	C(-)T(+)	C(-)T(-)	C(-)T(+)	C(-)T(-)	C(-)T(+)	C(-)T(+)	C(-)T(+)
128 µg/mL	C(-)T(+)	C(-)T(-)	C(-)T(+)	C(-)T(+)	C(-)T(+)	C(-)T(+)	C(-)T(+)
64 µg/mL	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(-)T(+)
32 µg/mL	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)
16 µg/mL	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)
8 µg/mL	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)
4 µg/mL	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)
2 µg/mL	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)
1 µg/mL	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)

(+): Crecimiento bacteriano visible; (-): No hubo crecimiento bacteriano visible; C: Carvacrol; T: Timol.

De acuerdo con la literatura, la acción biológica de ambos fitoconstituyentes se puede atribuir a la inducción en las deformaciones de la membrana celular que ambos causan, alterando su permeabilidad. Además, es posible que los núcleos aromáticos presentes en su estructura y que contienen un grupo polar puedan establecer enlaces de hidrógeno con enzimas microbianas, lo que probablemente favorecería la actividad antimicrobiana^{25,26}. También se puede atribuir

la actividad antimicrobiana de esos fitoconstituyentes a su supuesta actividad prooxidante, pudiendo tornarlos, de esa manera, excelentes agentes antimicrobianos cuando en pequeñas concentraciones¹³.

CONCLUSIÓN

A través de los experimentos se puede afirmar que los fitoconstituyentes carvacrol y timol ejercen actividad bacteriostática frente a las cepas de *E. coli*.



REFERENCIAS

- 1 Ørskov F, Ørskov I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol*. 1992 Jul;38(7):699-704.
- 2 Cordeiro ACS, Leite SGF, Dezotti M. Inativação por oxidação fotocatalítica de *Escherichia coli* e *Pseudomonas* sp. *Quim Nova*. 2004 set-out;27(5):689-94.
- 3 Silva KC, Lincopan N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. *J Bras Patol Med Lab*. 2012 abr;48(3):91-9.
- 4 Lago A, Fuentefria SR, Fuentefria DP. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010 jul-ago;43(4):430-4.
- 5 Rawat D, Nair D. Extended-spectrum β -lactamases in Gram negative bacteria. *J Glob Infect Dis*. 2010 Sep;2(3):263-74.
- 6 Rath S, Dubey D, Sahu MC, Padhy RN. Surveillance of ESBL producing multidrug resistant *Escherichia coli* in a teaching hospital in India. *Asian Pac J Trop Dis*. 2014 Apr;4(2):140-9.
- 7 Wollheim C. Epidemiologia molecular de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado [dissertação]. Caxias do Sul (RS): Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia; 2009. 170 p.
- 8 Nijsten R, London N, van den Bogaard A, Stobberingh E. Antibiotic resistance of Enterobacteriaceae isolated from the faecal flora of fattening pigs. *Vet Q*. 1993 Dec;15(4):152-7.
- 9 Smith HW. Clinical problems of preventive medicine. Antibiotic-resistant bacteria in animals: the dangers to human health. *Br Vet J*. 1974 Mar-Apr;130(0):110-9.
- 10 Fernebro J. Fighting bacterial infections - Future treatment options. *Drug Resist Updat*. 2011 Apr;14(2):125-39.
- 11 Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. *In vitro* interference of *Momordica charantia* in the resistance to aminoglycosides. *Pharm Biol*. 2009;47(11):1056-9.
- 12 Veras HNH, Rodrigues FFG, Botelho MA, Menezes IRA, Coutinho HDM, Costa JGM. Enhancement of aminoglycosides and β -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. *Arab J Chem*. In Press 2013.
- 13 Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils: a review. *Food Chem Toxicol*. 2008 Feb;46(2):446-75.
- 14 Özkan A, Erdoğan A. A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (Lamiaceae) and its two major phenolic components. *Turk J Biol*. 2011;35:735-42.
- 15 Robbers, JE, Speedie MK, Tyler VE. *Farmacognosia e biotecnologia*. São Paulo: Premier; 1997. 372 p.
- 16 Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, et al. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Lett Appl Microbiol*. 1999 Aug;29(2):130-5.
- 17 Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (UK). *British Pharmacopoeia: Index, BP 2009* [Internet]. London: MHRA; 2009 [cited 2015 Aug 10]. Available from: http://www.pharmacopoeia.co.uk/pdf/2009_index.pdf.
- 18 Ultee A, Slump RA, Steging G, Smid EJ. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *J Food Prot*. 2000 May;63(5):620-4.
- 19 Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, et al. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *J Agric Food Chem*. 2007 Jul;55(15):6300-8.
- 20 National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard — second edition. Wayne: NCCLS; 2002. 29 p. (NCCLS document M27-A2; vol. 22, no. 15).
- 21 Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. 2007 Aug;42(4):321-4.

- 22 Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Sarker SD, Moore JE, Rao JR, et al. Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *Food Sci Technol*. 2011 May;44(4):1199-206.
- 23 Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res*. 2007 Apr;21(4):308-23.
- 24 Reschke A, Marques LM, Mayworm MAS. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). *Rev Bras Pl Med*. 2007;9(2):67-70.
- 25 Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol*. 2001 Sep;91(3):453-62.
- 26 Ultee A, Bennik MHJ, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Apr;68(4):1561-8.

Recibido en / Received: 10/3/2016
Aceptado en / Accepted: 13/10/2016

Se refiere al doi: 10.5123/S2176-62232017000100003, publicado originalmente en portugués.

Traducido por: Lota Moncada

Cómo citar este artículo / How to cite this article:

Lima DS, Lima JC, Calvacanti RMCB, Santos BHC, Lima IO. Estudio de la actividad antibacteriana de los monoterpenos timol y carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de amplio espectro. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2017 enero-marzo;8(1):1-5. Doi: <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232017000100003>