

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**

DIJACI SANTOS DE LIMA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS FITOCOMPOSTOS TIMOL E CARVACROL
FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* PRODUTORAS DE β -LACTAMASES DE
ESPECTRO ESTENDIDO**

CUITÉ – PB

2017

DIJACI SANTOS DE LIMA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS FITOCOMPOSTOS TIMOL E CARVACROL
FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* PRODUTORAS DE β -LACTAMASES DE
ESPECTRO ESTENDIDO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Campina Grande para
obtenção de título de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Igara Oliveira Lima

CUITÉ – PB

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

L732a Lima, Dijaci Santos de.

Atividade antibacteriana dos fitocompostos timol e carvacrol frente a cepas de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de espectro estendido. / Dijaci Santos de Lima. – Cuité: CES, 2017.

43 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2017.

Orientadora: Igara Oliveira Lima.

1. Medicamentos. 2. *Escherichia coli*. 3. Betalactamases. 4. Terpenos. I. Título.

DIJACI SANTOS DE LIMA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS FITOCOMPOSTOS TIMOL E CARVACROL
FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* PRODUTORAS DE β -LACTAMASES DE
ESPECTRO ESTENDIDO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Campina Grande para
obtenção de título de bacharel em Farmácia.

Aprovado em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Igara Oliveira Lima
(Orientadora) – UFCG/CES

Prof.^a Dr.^a. Francinalva Dantas de Medeiros
(Examinadora) – UFCG

Dr.^a. Heloísa Mara Batista Fernandes de Oliveira
(Examinadora) – HUAB

Dedico a Deus, pelo dom da sabedoria e da vida, aos meus pais, Francisco e Francisca a Minha Namorada Cicera, a vocês eu devo essa conquista, nossa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a **Deus** por todas as dádivas concedidas, por essa conquista e as futuras que estão por vir. Obrigada, pai!

Agradeço aos meus pais, **Francisco Assis de Lima** e **Francisca dos Santos de Lima**, pois sem o carinho e apoio, nada disso seria possível. Obrigado pai, mãe por serem o chão que eu piso, o ar que respiro, vocês são tudo na minha vida.

A minha namorada, **Cicera Maria da Silva Pinheiro**, pela paciência e por estar sempre ao meu lado, me ajudando e, dando forças, obrigado meu anjo. Agradeço muito por ter você, junto a mim.

Agradeço a minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Igara Oliveira Lima**, pela confiança e pelos valiosos ensinamentos, aos quais foram fundamentais para o meu desenvolvimento na área da iniciação científica e, por sempre confiar na minha capacidade, obrigado.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa o meu muito obrigado por toda a ajuda, e pelos ensinamentos repassados.

À farmacêutica da UFPB/ DCF/CCS/UFPB **Bernadete Helena Cavalcanti Santos**, por ter cedido as cepas do microrganismo testado, viabilizando este estudo.

Aos professores do curso de bacharelado em farmácia, agradeço por toda contribuição direta e indireta para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Agradeço a **Universidade Federal de Campina Grande – UFCG** em especial a todos os funcionários do **Centro de Educação e Saúde – CES**, pela infraestrutura, e por cuidar tão bem do campus, o mantendo sempre em condições favoráveis para nosso aprendizado.

À professora **Dr^a. Francinalva Dantas de Medeiros** e a Farmacêutica-Bioquímica **Dr^a. Heloísa Mara Batista Fernandes de Oliveira** por aceitarem o convite de compor a banca avaliadora e pelas contribuições para este trabalho.

A minha grande amiga, **Maria Alana Neres de Pontes**, a qual considero sua amizade como um grande presente que obtive durante esses 5 anos de curso, levarei essa amizade para o resto da vida. Obrigado, por todas as cobranças, pelo o encorajamento e, por ser essa grande pessoa.

Aos meus amigos de Cuité, **Jorge Paulo, Anderson Silva, Jonas Medeiros, Mateus Santana, Fernando Azevedo, Moises Vagner, Thaislanio, Rodrigo,**

Cezar, obrigado pela amizade e pelos momentos alegres compartilhados. Obrigado, por tudo!!

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo”.

(Martin Luther King)

RESUMO

Com o aumento da disseminação de mecanismos de resistência, o tratamento de infecções bacterianas vem se tornando cada vez mais problemático, uma vez que o número de antimicrobianos eficazes no tratamento destes microrganismos torna-se cada vez mais reduzido. Dentre as várias formas de adaptação bacteriana, a produção de betalactamases de espectro estendido (ESBL) é um importante mecanismo de resistência presente na família Enterobacteriaceae. Com base nas informações expostas o presente trabalho teve como objetivo estudar a atividade antimicrobiana dos fitoconstituintes timol e carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de betalactamases de espectro estendido e determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do timol e do carvacrol. A metodologia foi realizada no Laboratório de Microbiologia (J11) no Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, estado da Paraíba, Brasil. Para a determinação da CIM dos fitoconstituintes selecionados, foram utilizadas cepas bacterianas de *E. coli* produtoras de ESBL (C-18, C-21, C-20, C-24, C-25, 24, 65) oriundas de pacientes ambulatoriais e a técnica de microdiluição em placa de 96 orifícios por meio da diluição seriada a uma razão de dois, reservando a última coluna para o controle do crescimento dos microrganismos, sendo todos os procedimentos realizados em triplicata e a incubação das microplacas em estufa bacteriológica a uma temperatura de $\pm 37^{\circ}\text{C}$ com uma variação de 2°C . Após um período de incubação de 24 horas as placas foram retiradas da estufa e foi feita a leitura da CIM dos fitoconstituintes testados. Desta forma a CIM do carvacrol apresentou concentrações de $64\ \mu\text{g/mL}$ para a cepa 65 e $128\ \mu\text{g/mL}$ para as cepas C-18, C-20, C-21, C-24, C-25 e 24. Já frente à ação do timol, a CIM foi determinada como: $1.024\ \mu\text{g/mL}$ para a cepa C-25; $512\ \mu\text{g/mL}$ para as cepas C-18, C-21, 24 e 65; $256\ \mu\text{g/mL}$ para a cepa C-24; e $128\ \mu\text{g/mL}$ para a cepa C-20. Por meio da Concentração bactericida mínima (CBM), foi possível determinar o tipo de atividade apresentada pelo fitoconstituente sendo esta do tipo bacteriostática, uma vez que foi observado um crescimento acima de 3 UFCs em todas as placas.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; betalactamases; terpenos.

ABSTRACT

With the increasing spread of resistance mechanisms, the treatment of bacterial infections has become increasingly problematic, since the number of effective antimicrobials in the treatment of these microorganisms becomes increasingly reduced. Among the various forms of bacterial adaptation, the production of extended spectrum betalactamases (ESBL) is an important resistance mechanism present in the Enterobacteriaceae family. Based on the information presented, the present study aimed to study the antimicrobial activity of thymol and carvacrol phytochemicals against *Escherichia coli* strains producing extended spectrum betalactamases and to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of thymol and carvacrol. The methodology was carried out at the Microbiology Laboratory (J11) at the Education and Health Center of the Federal University of Campina Grande, state of Paraíba, Brazil. For the determination of the MIC of the selected phytochemicals, bacterial strains of ESBL (C-18, C-21, C-20, C-24, C-25, 24, 65) producing *E. coli* were used from outpatients and the 96-hole microdilution technique was performed by serial dilution at a ratio of two, reserving the last column for growth control of the microorganisms, all procedures being performed in triplicate and incubation of the microplates in a bacteriological oven at a temperature of ± 37 °C with a variation of 2 °C. After a 24 hour incubation period the plates were removed from the oven and the MIC of the tested phytochemicals was read. Carvacrol MIC showed concentrations of 64 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for strain 65 and 128 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for C-18, C-20, C-21, C-24, C-25 and 24 strains. thymol, the MIC was determined as: 1,024 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for the C-25 strain; 512 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for C-18, C-21, 24 and 65 strains; 256 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for strain C-24; and 128 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for the C-20 strain. By means of the Minimal bactericidal concentration (CBM), it was possible to determine the type of activity presented by the phytoconstituent being of the bacteriostatic type, since growth above 3 CFUs was observed in all the plaques.

Keywords: *Escherichia coli*; betalactamases; terpenes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura da <i>E. coli</i> em imagem de microscopia eletrônica.....	16
Figura 2: Características bioquímicas simplificadas da <i>E. coli</i> em porcentagem %.	17
Figura 3: Demonstração da estrutura dos fatores de virulência da <i>E. coli</i> .	18
Figura 4: Sítios de colonização dos sorotipos patogênicos de <i>E.coli</i> .	19
Figura 5: Representação estrutural dos monoterpenos timol e carvacol respectivamente.	26
Figura 6: Esquematização do preparo do inóculo..	28
Figura 7: Preparo da Emulsão contendo o fitoconstituente.	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Carvacrol e Timol contra cepas de <i>E.coli</i> produtoras de ESBL.	31
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Graus célsius

µg – Microgramas

µL – Microlitros

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CBM – Concentração bactericida mínima

CIM - Concentração inibitória mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

DAEC - *E. coli* que adere difusamente

E.coli - *Escherichia coli*

EAEC - *E. coli* enteroagregativa

EHEC - *E. coli* enterohemorágica

EIEC - *E. coli* enteroinvasora

EPEC - *E. coli* enteropatogênica

ESBL - Betalactamases de Espectro Estendido

et al., - e outros

ETEC - *E. coli* enterotoxigênica

K. pneumoniae - *Klebsiella pneumoniae*

mL – Mililitro

NMEC - *E. coli* meningite neonatal

SIGMA – Sigma Aldrich

UFC - Unidades formadoras de colônias

UPEC - *E. coli* uropatogênica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 <i>Escherichia coli</i>	16
3.2 Fatores de virulência e formas de <i>E.coli</i> patogênicas	17
3.3 Multirresistência bacteriana.....	20
3.4 Betalactamases de espectro estendido – ESBL.....	21
3.4.1 Ocorrência de cepas de <i>E. coli</i> produtoras de ESBL	22
3.4.2 Tratamento de infecções por bactérias produtoras de ESBL	23
3.5 Pesquisa de novos antimicrobianos	24
3.5.1 Fitoconstituintes timol e carvacrol	25
4. METODOLOGIA	28
4.1 Local de trabalho	28
4.2 Cepas bacterianas	28
4.3 Inóculo.....	28
4.4 Fitoconstituintes	29
4.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	29
4.6 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35
ANEXOS	42

1. INTRODUÇÃO

As enterobactérias são constituintes da flora microbiana humana sendo considerados relativamente inofensivos, mas podem vir a agir como agentes etiológicos de diferentes enfermidades, a exemplo de processos diarreicos, colecistite, bacteremia, meningite neonatal, pneumonia e destaca-se principalmente pelo grande acometimento de infecções do trato urinário. A família Enterobacteriaceae tem como grande representante a *Escherichia coli*, bactéria gram-negativa móvel, anaeróbica facultativa, que não possui capacidade de produção de esporos (RATH et al., 2014). A severidade das doenças causadas pelas cepas de *E. coli* está diretamente associada com a expressão e ação dos fatores de virulência, que contribuem para o aumento da patogenicidade, e como consequência, o uso indiscriminado de antimicrobianos faz com que as cepas de *E.coli* apresentem formas de resistência aos principais fármacos utilizados na terapêutica de infecções bacterianas (YUN et al., 2013).

Um exemplo tem sido o fenômeno de resistência aos betalactâmicos, através da produção de enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico de penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, como também a capacidade de conferir resistência contra outros fármacos antimicrobianos como: aminoglicosídeos, tetraciclinas, clorafenicol e quinolonas, devido ao fato de atuarem na inibição de uma vasta gama de classes farmacológicas, estas enzimas recebem a denominação de betalactamases de espectro estendido (ESBL) (ROSSOLINI et al., 2008; KUMAR; VARELA, 2013).

Com o constante aumento da expressão de ESBLs como forma de resistência pelos microrganismos pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Proteus* e *Klebsiella*, estudos tem indicado como um dos principais influenciadores nas taxas de mortalidade de pacientes acometidos por infecções bacterianas, causadas por estes microrganismos, uma vez que o número de antimicrobianos eficazes no tratamento tem se tornado cada vez mais limitado, acaba por gerar um substancial desafio no tratamento de infecções por bactérias produtoras de ESBL (TUMBARELLO et al., 2010).

Produtos naturais mostram-se promissores agentes no controle de infecções bacterianas, os óleos essenciais e os terpenos têm apresentado diversas atividades

biológicas, dentre elas ações antimicrobianas (FERNEBRO, 2011). Dentre estes, destacam-se o carvacrol e o timol que têm sido relatados por alguns autores como moléculas promissoras no estudo de alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções (BAKKALI et al., 2008; ÖZKAN; ERDOGAN, 2011; VERAS et al., 2013)

Nessa perspectiva a presente pesquisa foi desenvolvida no intuito de investigar novos fármacos com ação antimicrobiana por meio de moléculas de origem vegetal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Estudar a atividade antibacteriana dos fitoconstituintes timol e carvacrol frente cepas de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), C-18, C-21, C-20, C-24, C-25, 24, 65.

2.2 Objetivos específicos

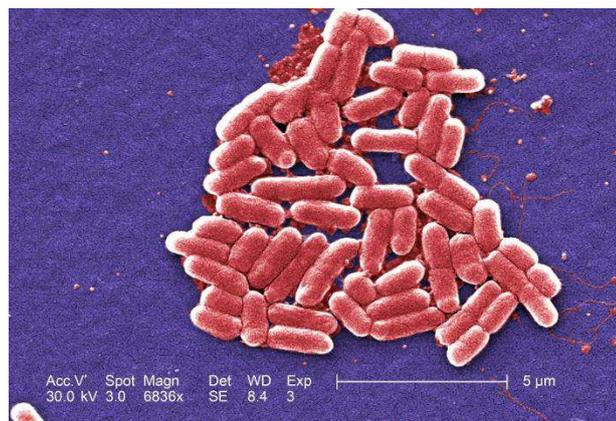
- Investigar a atividade antimicrobiana do timol e carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL);
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do timol e do carvacrol;
- Avaliar a concentração bactericida mínima (CBM) dos fitoconstituintes.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria classificada como bacilo gram-negativo móvel, anaeróbico facultativo, não apresenta capacidade de produção de esporos pertencente à família Enterobacteriaceae a qual engloba um grande número de microrganismos com características semelhantes tanto em habitat como em classificação, apresentam fácil manuseio em laboratório uma vez que suas exigências nutricionais são mínimas assim facilita no seu cultivo e em sua disseminação (figura 1) (MURRAY et al., 2015).

Figura 1: Estrutura da *E. coli* em imagem de microscopia eletrônica.



Fonte: <https://pixnio.com/free-images/science/microscopy-images/escherichia-coli/number-of-gram-negative-escherichia-coli-bacteria.jpg>.

As características bioquímicas são de suma importância para a identificação da *E. coli* uma vez que, permitem a diferenciação dos demais bacilos gram-negativos e dos que fazem parte da família Enterobacteriaceae (figura 2) (LEVY CE, 2004).

Figura 2: Características bioquímicas simplificadas da *E. coli* em porcentagem %.

<i>Escherichia coli</i>	Indol	Citrat	H₂S	Uréia	Fenil	Lisin	Argin	Ornit	Motil
	98%	1%	1%	1%	0%	90%	17%	65%	95%
	Malon	Glicose	Lactos	Sacarose	Esculina	DNase			
	0%	95%	95%	50%	35%	0%			

Fonte: Autor.

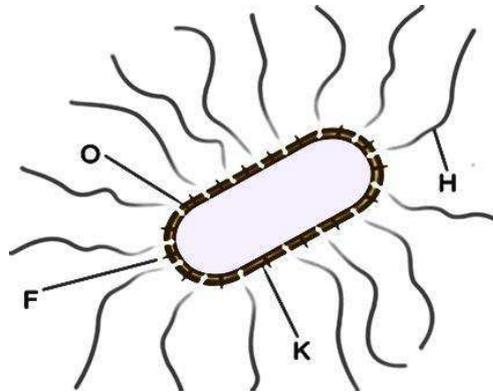
As cepas de *E. coli* são geralmente inofensivas uma vez que ocorrem na flora intestinal de indivíduos saudáveis, embora também possam causar infecções em várias partes do organismo, o que acaba por torná-los potenciais agentes patológicos, constantemente relacionadas com infecções urinárias (ITU), devido a proximidade da região perianal e da região uretral (BRASIL 2011; FENG et al., 2012; FORSYTHE, 2013).

Por fazer parte do grupo de coliformes fecais (a 45 °C) a *E.coli* é amplamente utilizada como indicador de contaminação fecal e possível presença de bactérias patogênicas, sendo esse seu uso favorecido pela fácil disseminação no ambiente (excretada nas fezes) e por conseguir sobreviver no ambiente em que foi excretada por semanas ou meses (SAVIOLLI, 2010; FENG et al., 2012).

3.2 Fatores de virulência e formas de *E.coli* patogênicas

Os fatores de virulência compõem grande parte da estrutura bacteriana a qual é formada por fatores antigênicos, sendo que estas contribuem diretamente para a caracterização dos sorogrupos de *E.coli*. Com base em estudos desenvolvidos por Kauffman em 1947, se torna possível determinar o sorotipo bacteriano com base em seus principais antígenos de superfície, tais como: antígenos somáticos (O), capsulares (K), Flagelares (H) e fimbriais (F) (figura 3) (ROCHA 2008; SAVIOLLI, 2010).

Figura 3: Demonstração da estrutura dos fatores de virulência da *E. coli*.



Fonte: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/20/Enterobacteriaceae_Antigen.svg/2000px-Enterobacteriaceae_Antigen.svg.png.

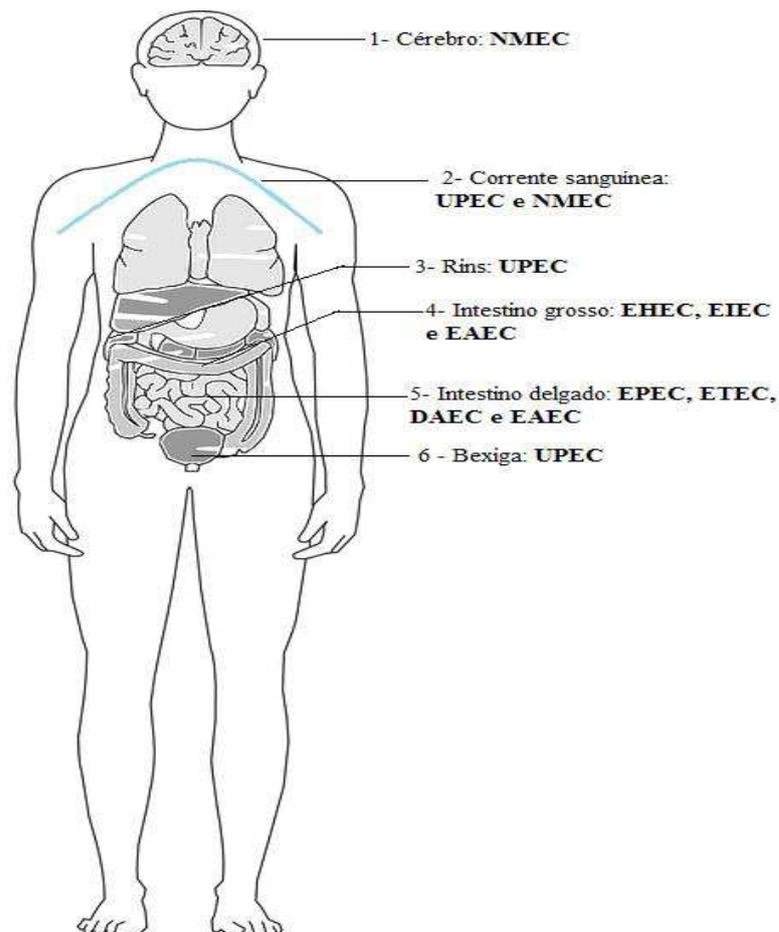
O antígeno somático (O) compõe uma das frações formadoras do lipopolissacarídeo (LPS), presente na parede celular de bactérias gram-negativas, este polissacarídeo apresenta termo estabilidade a 121° C por duas horas (MAGALHÃES et al., 2007). Já o antígeno capsular (K) compõe o grupo de polissacarídeos responsáveis por envolver a parede celular, que por sua vez são constituídos por um ácido polimérico composto por 2% de açúcares reduzidos (CALIMAN, 2005). O flagelar (H) apresenta natureza proteica a qual é conhecida como flagelina, considerado termo instável a 100 °C por 30 min (BERCHIERI JUNIOR et al., 2009). O antígeno frimbrial (F) é constituído por moléculas de natureza proteica, sua expressão *in vitro* pode ser influenciada por fatores como pH, temperatura de cultivo e osmolaridade do meio (CALIMAN, 2005).

Algumas vertentes afirmam que as cepas comensais de *E. coli*, aparentemente inofensivas quando presentes em seu habitat normal, podem vir a se transformar em cepas do tipo patogênicas, isso depende de múltiplos processos relacionados com a perda ou ganho de elementos genéticos, que por sua vez desempenham um papel crucial na codificação de fatores de virulência, capaz de gerar versões de *E.coli* capazes de desencadear diferentes processos patológicos (CROXEN & FINLAY, 2010; TORRES, 2010).

Segundo Croxen & Finlay (2010), estes patógenos podem ser classificados segundo suas características de virulência, em 8 grupos responsáveis por

desencadear processos infecciosos em humanos, dentre os quais: EPEC (*E. coli* enteropatogênica), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora), EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), EAEC (*E. coli* enteroagregativa), UPEC (*E. coli* uropatogênica), NMEC (*E. coli* meningite neonatal), DAEC (*E. coli* que adere difusamente). Os fatores de virulência também influenciam diretamente no espectro patológico destes sorogrupos de *E.coli* que variam desde a capacidade de adaptação e colonização de diferentes sítios alvos do hospedeiro, por estes microrganismos que, após passar pelo processo de aquisição de fatores de virulência apresentam seu espectro de patogenicidade aumentado (figura 4) (TORRES, 2010).

Figura 4: Sítios de colonização dos sorotipos patogênicos de *E.coli*.



Fonte: Autor

3.3 Multirresistência bacteriana

Atualmente a multirresistência bacteriana frente aos antimicrobianos é encarada como um grande problema de saúde pública, já que esta representa um risco a qualidade de vida humana, devido a redução no número de fármacos eficazes no tratamento e como consequência gera um aumento nos custos do tratamento, assim dificultando cada vez mais a melhora do paciente (KUMAR; VARELA, 2013).

O processo natural de resistência e adaptação bacteriano a condições adversas, que quando mencionadas podem ser atribuídas à interação fármaco-microrganismo (sítio de ação), sofrem um contínuo processo de evolução o qual foi e vem sendo estimulado por uma serie de más condutas relacionadas com a forma de utilização dos fármacos antimicrobianos. As formas como esses fármacos são utilizados desde em ambientes hospitalares, ambulatoriais, domésticos e até mesmo na agropecuária, acabam por influenciar diretamente na taxa de expressão de genes de resistência, uma vez que os antimicrobianos quando utilizados de maneira errada atuam como estimuladores da resistência bacteriana (SILVA et al., 2012).

O ambiente hospitalar pode ser considerado como um dos principais ambientes responsáveis pela seleção de patógenos resistentes, esta por muitas vezes associado a falhas nos procedimentos de biossegurança dentre os quais: o uso de equipamentos de proteção individual, lavagem das mãos, técnicas de assepsia. Quando se trata do ambiente doméstico, outro ambiente seletor, pode-se atribuir como os principais fatores a gerarem feedbacks negativos, a adesão incompleta ao tratamento e a automedicação, ou seja, em qualquer ambiente que seja quando se trata da utilização de fármaco antimicrobiano, se faz necessário orientação, sempre com o acompanhamento de profissionais capacitados, ressaltando cada vez mais a importância da execução de um bom serviço de dispensação onde a atuação do farmacêutico se torna indispensável, além disso a realização de culturas e antibiogramas pode eliminar grande parte dos erros cometidos durante o tratamento empírico (FERRACINI et al., 2014; ORÚS et al., 2015).

Como forma de resposta a grande pressão seletiva imposta pelos antibióticos, boa parte da população bacteriana desenvolveu estratégias de defesa capazes de garantir sua sobrevivência, as quais são denominadas de mecanismos de resistência bacterianos. Os mecanismos de resistência são classificados em:

alteração do sítio de ação, redução da permeabilidade da membrana, bomba de efluxo e inativação enzimática a qual é subdividida de acordo com o tipo de enzima bacteriana produzida (KUMAR; VARELA, 2013; COSTA, 2016).

Dentre os tipos de inativação enzimática, a produção de betalactamases de espectro estendido (ESBL) é considerada como a principal forma de resistência a betalactâmicos, pode vir também a conferir resistência a outros fármacos antimicrobianos tais como: aminoglicosídeos, tetraciclina, clorafenicol e quinolonas, o que acaba por dificultar o tratamento de patógenos que apresentem essa forma de resistência, uma vez que os principais antimicrobianos se mostram ineficazes no controle destes patógenos, acaba por gerar um aumento nas taxas de morbimortalidade e aumento no gasto com o tratamento (ROSSOLINI et al., 2008; KUMAR; VARELA, 2013).

3.4 Betalactamases de espectro estendido – ESBL

As ESBLs são consideradas como um conjunto de enzimas capazes de catalisar a hidrólise do anel betalactâmico, desta forma atuam na inativação do grupamento farmacofórico dos betalactâmicos. Estas enzimas recebem a denominação de espectro estendido por também apresentarem genes de resistência a outras classes de antimicrobianos (OLIVEIRA; SILVA, 2008; COSTA, 2016).

A produção de ESBLs ocorre tanto em bactérias gram-negativas como em gram-positivas, sendo predominante em gram-negativas tais como *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli*. Devido a influência da concentração sobre a ação enzimática as ESBLs produzidas por gram-negativas são consideradas as mais ativas, uma vez que a sua concentração no espaço periplasmático é beneficiada pelo mecanismo de excreção que é característico a esta espécie bacteriana (BLAIR et al., 2015).

Em relação ao mecanismo de inativação de antimicrobianos, as ESBLs podem agir através do processo de hidrólise favorecida pela presença de Zinco como cofator na quebra no anel betalactâmico, ou por meio da via éster serina. A via éster serina consiste na associação da enzima de forma não covalente ao anel betalactâmico do fármaco, depois o radical livre do resíduo de serina localizado no sítio ativo da ESBL ataca o anel betalactâmico, em que forma uma ligação covalente do tipo acil-éster, posteriormente a hidrólise desse grupamento éster que foi formado

irá libera a enzima ativa e o antimicrobiano hidrolisado se encontrará então inativo devido a quebra do seu grupo farmacofórico (BUSH, 2010).

3.4.1 Ocorrência de cepas de *E. coli* produtoras de ESBL

Infecções causadas por microrganismos multirresistentes são encaradas como um problema recorrente aos serviços de saúde, uma vez que estas se encontram relacionadas com o prolongamento de internações como também nas taxas de morbi-mortalidade e, como consequência aumento nos custos do tratamento. Dentre as formas de multirresistência, a produção de betalactamases de espectro estendido constitui um dos principais mecanismos de resistência aos principais antimicrobianos utilizados, destacando-se devido a sua grande prevalência em infecções nosocomiais e comunitárias por membros da família Enterobacteriaceae (SILVA; LINCOPAN, 2012).

Isolados de ESBLs são constantemente encontrados em diferentes microrganismos da família Enterobacteriaceae, sendo em sua maioria isolados de cepas de *Klebsiella spp.* e de *E. coli* o qual são consideradas como ponto de urgência clínica devido a sua alta disseminação (SILVA; LINCOPAN, 2012).

Em isolados de amostras oriundas de pacientes hospitalares, estas bactérias apresentam prevalência em torno de 30% à 35% das septicemias, está envolvida também com infecções intestinais e extraintestinais. Quando se trata de isolados de origem comunitária, estas bactérias destacam-se devido a sua alta relação com infecções urinárias, onde as cepas de *E. coli* apresentam prevalência de 70% dos isolados (SARTORI et al., 2013). Faz-se também a relação de prevalência entre microrganismos causadores de ITUs no âmbito hospitalar, a *E.coli* continua sendo o principal agente infeccioso (LO et al., 2010).

Por meio de levantamento realizado com isolados hospitalares, a fim de identificar microrganismos produtores de ESBL, a *E.coli* foi a espécie de maior prevalência na produção de ESBL, corresponde a cerca de 46,2%, já em estudos posteriores foi observado uma prevalência de 3% de isolados produtores de ESBL na qual os microrganismos de maior frequência foram *E.coli* e *K. pneumoniae* (WOLLHEIM et al., 2011).

Com a alta prevalência de ESBL em isolados tanto hospitalares como de origem comunitária e, sua constante relação com os membros da família Enterobacteriaceae, se faz necessário o desenvolvimento de programas educativos para a população em geral e programas de capacitação para os profissionais da área de saúde a fim de preparar para realização de notificações, em caso de descoberta de infecções causadas por bactérias multirresistentes e, como agir em tal situação, porque mesmo que a resistência bacteriana a antimicrobianos seja um problema antigo, muito pouco ainda se sabe tanto por parte da população como por parte da comunidade profissional. Por meio do monitoramento de dados epidemiológicos a respeito da distribuição de cepas produtoras de ESBL em cepas de interesse clínico, como é o caso das enterobactérias, as quais são consideradas como as principais produtoras de ESBLs, que contribuem com o delineamento do atual problema, de forma a facilitar a tomada de decisões frente a qual forma de tratamento a ser utilizada e, as medidas de contenção adequadas (LAGO et al., 2010).

3.4.2 Tratamento de infecções por bactérias produtoras de ESBL

O tratamento de infecções causadas por microrganismos produtores de ESBL consiste na associação dos antimicrobianos com agentes inibidores das enzimas de inativação bacteriana (ESBL), tais como: o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, porém a maioria das cepas produtoras de ESBL de origem hospitalar tende a ser multirresistentes onde torna a forma de tratamento citada ineficaz (MARTINS, 2012).

Segundo nota técnica n° 01/2013 divulgada pela ANVISA, a terapêutica empírica para enterobactérias multirresistentes consiste na utilização de polimixina B ou polimixina E (Colistina) em associação com dois a três antimicrobianos, onde um deles deve ser a Polimixina e o outro antimicrobiano qualquer um dos seguintes citados: gentamicina ou amicacina, meropenem ou doripenem, ou tigeciclina. Após a confirmação do perfil de sensibilidade do microrganismo, deve-se utilizar no mínimo dois fármacos com sensibilidade comprovada *in vitro*, quando a cepa resistente mostrar-se sensível apenas a um fármaco recomenda-se manter a terapia

combinada de polimixina com Carbapenêmicos (meropenem ou doripenem) ou tigeciclina.

3.5 Pesquisa de novos antimicrobianos

A crescente produção ESBLs por cepas bacterianas é considerada como um importante obstáculo na terapia antimicrobiana visto a contínua redução de antimicrobianos eficazes, onde torna-se cada vez mais necessário a descoberta de fármacos eficazes e de fácil acesso a população (SONG et al., 2009; LAGO et al., 2010; PITOUT, 2008).

Devido a crescente necessidade de novos fármacos destinados ao controle de infecções por cepas multirresistentes, muitas pesquisas tem focado na investigação de plantas medicinais como fonte de compostos bioativos, uma vez que os produtos naturais representam uma área de grande interesse científico devido à diversidade de seus constituintes e seu fácil emprego. Desta forma, vários estudos descrevem a atividade antimicrobiana dos produtos naturais, bem como a capacidade desses agentes serem utilizados em associação com antimicrobianos presentes no mercado como moduladores de ação (COUTINHO et al., 2009).

Dentre os produtos de origem vegetal os óleos essenciais estão relacionados a uma grande diversidade de funções necessárias à sobrevivência da planta, são originados a partir do metabolismo secundário destas, são formados através de uma mistura de compostos (fitoconstituintes), eles apresentam composição complexa, em que os terpenos são considerados como uma das classes de componentes majoritários (ZAGO et al, 2009). Os mesmos têm sido amplamente utilizados na produção de produtos alimentícios, bem como em preparações de perfumes, além de apresentarem atividade biológica, possibilita o seu uso na área farmacêutica (ÖZKAN; ERDOGAN, 2011).

Os terpenos, também chamados de terpenoides representam a principal classe de metabólitos presentes na composição dos óleos essenciais, estes são moléculas de ocorrência natural, oriundas do metabolismo secundário vegetal, sua biossíntese se dá a partir da combinação de átomos de carbono múltiplos unidades de isopreno. Embora os terpenos sejam considerados como moléculas estruturalmente simples, são atribuídas a estes um grande número de atividades farmacológicas sendo a atividade antimicrobiana uma das mais relatadas. A exemplo dos monoterpenos, o

timol e o carvacrol estão presentes na constituição de óleos essenciais de plantas do gênero *Origanum* e *Thymus*, os quais têm sido considerados como possíveis agentes antimicrobianos (SZENTANDRASSY et al., 2004; BAKKALI et al., 2008; ÜNDEGER et al., 2009; AKALIN; INCESU, 2011).

O estudo da atividade antimicrobiana dessas moléculas geralmente se baseia em ensaios realizados com microrganismos de importância epidemiológica, tais como *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, responsáveis por diferentes processos infecciosos, a realização da concentração inibitória mínima (CIM) é considerado como um dos principais ensaios *in vitro* destinados a testar o nível da ação antimicrobiana de determinadas moléculas (ANTUNES et al., 2006; CATÃO et al., 2010).

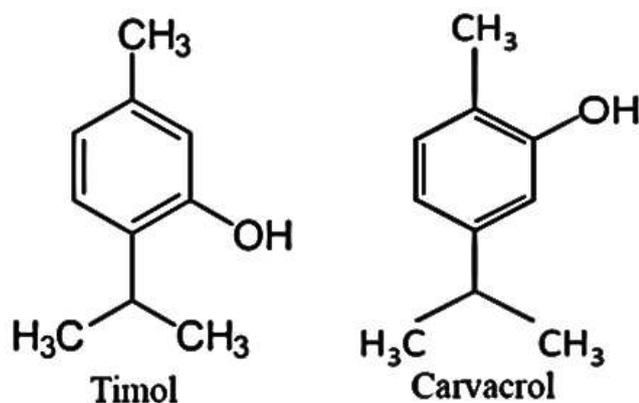
3.5.1 Fitoconstituintes timol e carvacrol

O timol ou 2-isopropil-5metilfenol é classificado como monoterpeneo, encontrado comumente no óleo essencial de plantas como orégano e tomilho, em que apresenta uma coloração cristalina branca quando extraído (FRIEDRICH, 2014). A respeito de suas características de solubilidade, este apresenta extrema solubilidade em álcoois e em alguns solventes orgânicos, e também solúvel em água. Este fitoconstituente foi descoberto em 1719 pelo pesquisador Caspar Neumann e, posteriormente sintetizado por M. Lallemand em 1842, em que pela primeira vez a proporção de carbono, hidrogênio e oxigênio constituintes na estrutura da molécula foram determinadas (NOSTRO & PAPALIA, 2012).

O carvacrol também chamado de cymophenol (2-metil-5-(1-metiletil)-fenol), é um monoterpeneo isômero de posição do timol, sua estrutura é bastante semelhante a do timol, diferente apenas na posição da hidroxila presente em seu anel aromático (figura 5) (NOSTRO & PAPALIA, 2012).

Dentre suas características organolépticas podem ser citadas: o odor que assemelha-se ao do orégano e, a característica picante. O carvacrol se encontra em seu estado líquido em temperatura ambiente, diferente do timol que, em temperatura ambiente se encontra em forma de cristais (HOLLAND et al., 2014).

Figura 5: Representação estrutural dos monoterpênicos timol e carvacrol respectivamente.



Fonte: Autor

Ambos os fitocompostos estão presentes principalmente no óleo essencial de plantas como orégano e tomilho, onde contém cerca de 5% e 75% de carvacrol variando muito a porcentagem de fitocompostos presentes no óleo essencial, isso se deve a variação de fatores como: clima, localização geográfica, tipo de solo dentre outros, o que difere de planta para planta, assim influencia na quantidade de elementos produzidos pelo metabolismo secundário vegetal (DE VINCENZI, 2004).

Quando se trata de suas aplicações biológicas, os dois compostos são considerados promissores em diversas áreas, devido a grande gama de atividades biológicas já relatadas na literatura, a exemplo de atividade antioxidante, promotor de permeação na pele, anti-inflamatória, ansiolítica e antidepressiva, ação inseticida, atividades antifúngica e antimicrobiana. Embora ambos os fitoconstituintes apresentem um grande número de aplicações de interesse farmacológico, a atividade antimicrobiana continua como a de maior interesse da comunidade acadêmica, tendo um maior número de estudos quando comparada com os relatos literários das demais atividades destes, devido a crescente preocupação com a resistência bacteriana aos fármacos tradicionalmente utilizados (MELO et al., 2010; RAO et al., 2010; GARCIA-GARCIA et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2012).

Estudos mostram que, o que possibilita ação antimicrobiana do timol e carvacrol, seja devido a sua interação com a membrana bacteriana, ou devido a presença da hidroxila em seu anel fenólico, a qual irá funcionar como um

transportador transmembranar de cátions monovalentes, que prejudica um dos processos essenciais para o desenvolvimento celular. Em pesquisa realizada por Micheels et al. (2007), foi estabelecida uma comparação da ação antimicrobiana do timol e carvacrol frente a cepas de *E.coli* e *Lactobacillus spp*, em que se fez o uso dos compostos isolados e em mistura de timol + carvacrol, possibilitou a visualização de um aumento da ação antimicrobiana utilizada a mistura binária, assim estabeleceu uma possível interação sinérgica, posteriormente em pesquisa de mesmo caráter realizada por Garcia-Garcia et al. (2011), foi feita a comprovação da teoria de ação sinérgica entre os dois monoterpênicos, relacionado o aumento de ação a maior interação dos compostos a membrana bacteriana quando em combinação.

Tanto o timol como carvacrol possuem diversos estudos contra diferentes microrganismos, em que tem sido registrada a ação antibacteriana do carvacrol contra 13 sorotipos de *E.coli*, e relatos de uma possível ação sinérgica entre o timol e aminoglicosídeos contra cepas de *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (DUARTE et al., 2007; VERAS et al., 2013).

4. METODOLOGIA

4.1 Local de trabalho

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia (J11) do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, estado da Paraíba, Brasil.

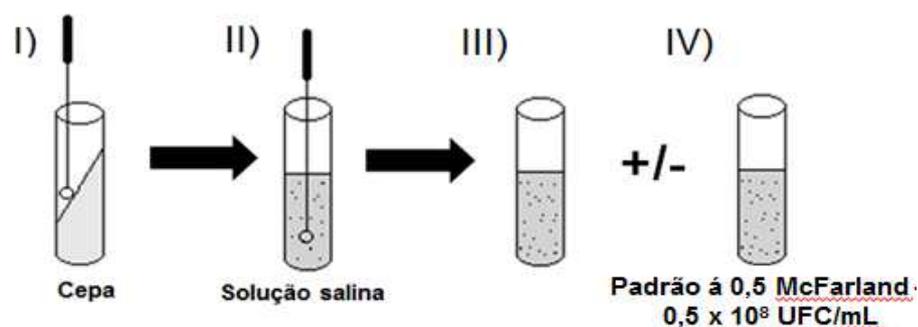
4.2 Cepas bacterianas

Foram utilizadas cepas bacterianas de *E. coli* ESBL (C-18, C-21, C-20, C-24, C-25, 24, 65), cedidas pela farmacêutica Bernadete Helena Cavalcanti Santos (Laboratório de Microbiologia Clínica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba), oriundas de pacientes ambulatoriais.

4.3 Inóculo

O inóculo foi ajustado de acordo com a escala de 0,5 Mc Farland ($0,5 \times 10^8$ UFC/ mL⁻¹) em uma suspensão composta pela bactéria e por uma solução salina à 0,85% (figura 6).

Figura 6: Esquematização do preparo do inóculo. Retirou-se uma alíquota de uma cepa de *Escherichia coli* recém repicada em Ágar Mueller Hinton (I), suspendeu-se em solução salina (II) e por fim foi ajustada através do parâmetro de turbidez com um padrão à 0,5 Mc Farland.

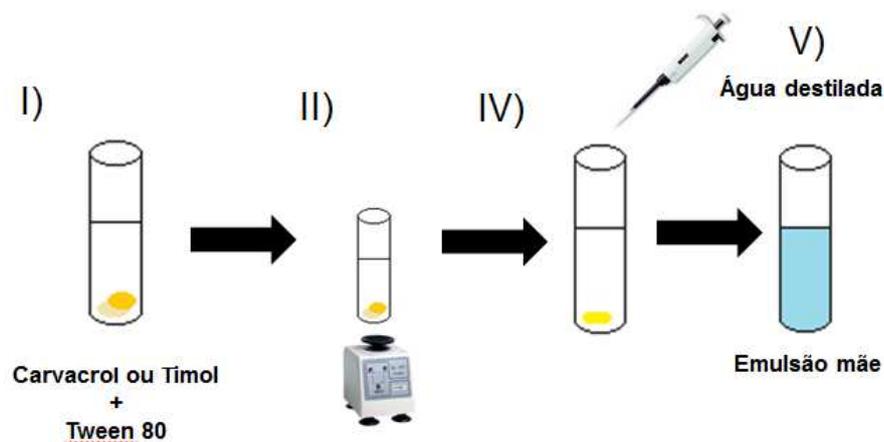


Fonte: Autor

4.4 Fitoconstituintes

Os fitoconstituintes testados foram o timol e o carvacrol (Sigma Aldrich) (figura 7).

Figura 7: Preparo da Emulsão contendo o fitoconstituente. Foi feita a adição do fitoconstituente e do Tween 80 em um tubo de ensaio (I) e homogeneizados com o auxílio de um vortex (II), posteriormente foi feita adição de água destilada (V) em pequenas quantidades até originas a Emulsão mãe.



Fonte: Autor

4.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos fitoconstituintes selecionados foi realizada pela técnica da microdiluição em placa de 96 orifícios e fundo em "U" para cada uma das cepas. Por meio da técnica de diluição seriada a uma razão de 2 efetuada na própria placa, da coluna 1 à 11, obteve-se as concentrações de 1.024 a 1 µg/mL. Em seguida, adicionou-se 10 µL do inóculo (bactéria a 0,5 McFarland) em cada uma das cavidades. A última coluna (12) foi reservada para a realização dos controles de: toxicidade do veículo (veículo, caldo Brain Heart Infusion e inóculo), esterilidade do meio (caldo) e o de viabilidade do inóculo bacteriano (inóculo e caldo) (CLSI, 2005; SARKER; NAHAR; KUMARASAMY, 2007; HUSSAIN et al., 2011).

O ensaio foi realizado em triplicata e incubado a ± 37 °C com uma variação de 2 °C por um período de 24 h para *E. coli* produtora de ESBL. Após o tempo de incubação adequado, foram adicionados 20 μ L de resazurina a 1% (SIGMA), indicador colorimétrico de óxido-redução para bactérias; procedeu-se a leitura, visualmente, pela ausência ou presença de crescimento do microrganismo, observando-se a mudança da coloração da solução de azul para rosa/vermelho, resultante do crescimento do microrganismo (CLSI, 2005; SARKER; NAHAR; KUMARASAMY, 2007; HUSSAIN et al., 2011).

Portanto, foi determinada como CIM a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento do microrganismo ensaiado.

4.6 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Para determinar a CBM, foi retirado 10 μ L de volume da cavidade em que não houve crescimento bacteriano (CIM, 2x CIM, 4x CIM) e este volume foi semeado em placas contendo Agar Mueller Hinton. Posteriormente as placas foram levadas para a estufa bacteriológica, onde foram encubadas a uma temperatura de 35°C durante 24 horas e em seguida, foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFCs). A CBM foi considerada como sendo a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano de até 3 UFCs (CELIKITAS et al., 2007; HUSSAIN et al., 2011).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Timol e carvacrol são dois componentes do óleo essencial do orégano e já foram descritos como possuindo ação antimicrobiana (LAMBERT et al., 2001). Estes são isômeros estruturais e possuem um grupo hidroxila em lugares diferentes no anel fenólico. A hidroxila aumenta sua afinidade hidrofílica o que pode auxiliar a sua solubilidade na membrana bacteriana e conseqüentemente, conseguir causar danos a esta estrutura (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995).

O resultado encontrado neste trabalho mostrou que a CIM do carvacrol apresentou concentrações de 64 µg/mL para a cepa 65 e 128 µg/mL para as cepas C-18, C-20, C-21, C-24, C-25 e 24. Já frente à ação do timol, a CIM foi determinada como: 1.024 µg/mL para a cepa C-25; 512 µg/mL para as cepas C-18, C-21, 24 e 65; 256 µg/mL para a cepa C-24; e 128 µg/mL para a cepa C-20. Nenhuma das linhagens testadas teve crescimento detectável na maior concentração testada, 2.048 µg/mL. Assim, a concentração mínima inibitória para timol e carvacrol, foi diferente entre si (tabela 1).

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Carvacrol e Timol contra cepas de *E.coli* produtoras de ESBL.

“+” Crescimento bacteriano visível; “-” Não houve crescimento bacteriano visível; “C” Carvacrol; “T” Timol.

	<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(+)

Após a obtenção dos valores da CIM para ambos os fitoconstituintes foi feita a leitura da concentração bactericida mínima (CBM), na qual foi possível se observar

um crescimento bacteriano maior que 3 UFCs nas concentrações testadas assim indicando que os monoterpenos timol e carvacrol apresentaram atividade do tipo bacteriostática, uma vez que a CBM é considerada como menor concentração na qual se observou o crescimento de no máximo 3 UFCs, sendo assim o contrario do que foi observado no presente estudo (CELIK TAS et al., 2007; HUSSAIN et al., 2011).

Em Xu et al. (2008), foi realizado um experimento de citometria de fluxo e com uso de corantes fluorescentes para investigar o efeito de timol e carvacrol na célula de *E. coli* AS190. Assim, como no trabalho aqui descrito, a concentração de 100 µg/mL de carvacrol e timol não foram suficientes para inibir o crescimento de *E. coli*. No entanto, conforme aumentou-se a concentração dos dois componentes, a quantidade de células viáveis diminuiu gradualmente.

Com 200 µg/mL foi possível verificar uma diminuição nas unidades formadoras de colônia (UFC) que representam as células viáveis. Tanto nas concentrações de 400 µg/mL e 800 µg/mL de timol e carvacrol, não foi identificado crescimento de *E. coli* (XU et al., 2008).

Em Rivas et al. (2010), diferentes concentrações de timol e carvacrol foram testadas em relação a linhagens verocitotóxicas de *E. coli* e para todas, a CIM variou entre 500 e 1000 µg/mL.

Assim como neste trabalho em Guarda et al. (2011), a CIM diferiu entre timol e carvacrol. Para o timol, todas as bactérias testadas, entre elas *E. coli* O157:H7 não toxigênica, a CIM foi 250 µg/mL, enquanto que, para carvacrol, a CIM foi maior, 375 µg/mL. Este resultado é diferente do que foi visto no presente trabalho.

Em Palareti et al. (2016), foi descrito que o óleo de orégano (77,8% carvacrol) e o óleo de timo vermelho (53,3% timol) foi capaz de inibir em até 60% a formação de biofilme da *E. coli* uropatogênica enquanto inibiu apenas em 15% o crescimento planctônico da mesma bactéria. Isto pode ter ocorrido, pois foi verificado que em células tratadas com timol e carvacrol, não houve a produção esperada de fímbrias, estruturas importantes para a formação de biofilme em *E.coli*.

Visando o desenvolvimento de uma metodologia de fácil aplicação para a desativação de microrganismos que contaminam alimentos, em Moon et al. (2017), foi testada a suplementação do molho teryaki com carvacrol e timol e seu efeito na contaminação por *E. coli* O157:H7. Ambas substâncias foram eficazes no controle bacteriano no alimento testados pelos pesquisadores (MOON et al., 2017).

Apesar de existir uma diferença estrutural entre o carvacrol e o timol, isto não parece ter um papel determinante em relação a seu efeito antimicrobiano (LAMBERT et al., 2001; XU et al., 2008). Os mecanismos de ação exato de como esses compostos conseguem inibir o crescimento de microrganismos ainda não foi totalmente elucidado, mas sabe-se que diferentemente dos antibióticos, esses constituintes hidrofóbicos de óleos essenciais conseguem alcançar o periplasma de bactérias gram-negativas por porinas presentes na membrana externa (LAMBERT et al., 2001).

Assim, são capazes de prejudicar a integridade da membrana plasmática bacteriana e, dessa forma aumenta a permeabilidade desta e faz com que ocorra vazamento de prótons e potássio, onde acarreta na perda do potencial de membrana da célula (XU et al., 2008).

Em relação aos resultados obtidos neste trabalho, quando comparados com o que é descrito na literatura, tem-se que tanto timol quanto carvacrol foram capazes de inibir o crescimento das diferentes linhagens de *E. coli* testadas. No entanto, diferente do que foi descrito na maior parte dos trabalhos aqui citados, a concentração inibitória mínima de carvacrol e timol diferiram entre as linhagens.

Além disso, em relação a timol, a CIM para a maior parte das linhagens utilizadas neste trabalho foi 512 µg/mL. Este resultado está de acordo com o que foi visto em Rivas et al. (2010) com as linhagens verocitotóxicas de *E. coli*.

Essas variações entre a concentração inibitória mínima de timol e carvacrol nas linhagens de uma mesma bactéria são esperadas e podem ocorrer devido ao coeficiente de partição das substâncias utilizadas nas membranas celulares (LAMBERT et al., 2001).

A área de produtos de origem vegetal se mostra cada vez mais promissora como uma possível fonte de métodos alternativos no combate de infecções por microrganismos, seja com o surgimento de um possível fármaco antimicrobiano ou com a descoberta de um agente modulador de ação dos antibióticos já existentes, existem inúmeras possibilidades.

6. CONCLUSÃO

Portanto através dos resultados da CIM e CBM de cada fitoconstituente, pôde-se afirmar que os monoterpenos carvacrol e timol exercem atividade antibacteriana do tipo bacteriostática frente a cepas de *E. coli* produtoras de ESBL nas concentrações e condições testadas. Porém, são necessários mais estudos com a utilização de diferentes metodologias a fim de elucidar os conhecimentos em relação ao mecanismo de ação destes compostos e a suas possíveis aplicações em formas farmacêuticas como agente antimicrobiano ou como agente sinérgico.

REFERÊNCIAS

- AKALIN, G.; INCESU, Z. The effects of carvacrol on apoptosis of H-ras and N-ras transformed cell lines. *Turk. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 8, n. 2, p. 105–116, 2011.
- ANTUNES, R. P. M E.; LIMA, O.; PEREIRA, M. S. V. et al. In vitro antimicrobial activity and determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of natural and synthetic compounds against bacteria and leveduriform fungi, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 16, n. 4, p. 517–524, 2006.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 2, p.446-475, 2008.
- BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves. Campinas: FACTA**, p.455-469. 2009.
- BLAIR, J. M.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Nature*, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.
- BRASIL. Ministerio da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Portaria Nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 14 dez.** 2011. Disponível em: <http://www.comitepcj.sp.gov.br/download/portaria_MS_2914-11.pdf> Acesso em: Julho de 2017.
- BRASIL. Ministerio da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. NOTA TÉCNICA Nº 01/2013 MEDIDAS DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE INFECÇÕES POR ENTEROBACTÉRIAS MULTIRESISTENTES, Brasília, DF, 17 abr. 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271858/Nota+técnica+nº+01+de+2013/5be89853-7eca-4b4b-98e4-5096b9f5a2ec>> Acesso em: Agosto de 2017> Acesso em: Julho de 2017.
- BUSH, K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Current Opinion in Microbiology*, v. 13, n. 5, p. 558-564, 2010.
- CALIMAN, M. C. W. **Estudo de Vigilância Bacteriológica: Isolamento, fatores de virulência e resistência antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* isoladas de gatos domésticos na região de Ribeirão Preto.** 2010.113 f. Tese (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal(SP), Brasil, 2010.
- CATAO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; SILVA, M. A. R.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 42, n. 1, p. 9-14, 2010.

CELIK TAS, O.Y.; KOCABAS, E.E.H.; BEDIR, E.; SUKAN, F.V.; OZEK, T.; BASER, K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 553–559, 2007.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos para Bactérias de Crescimento Aeróbio: Norma Aprovada**, method M7-A6, 6º ed. Wayne Ed., v. 23, n. 2, 2005.

COSTA, A. L. P. **Resistência Bacteriana aos Antibióticos: Uma Perspectiva Do Fenômeno Biológico, Suas Consequências e Estratégias De Contenção**. 63 f. Tese (Graduação em Biologia) – Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIFAP, Macapá, Brasil, 2016.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; FALCAO-SILVA, V. S., SIQUEIRA-JUNIOR, J. P. In vitro interference of *Momordica charantia* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n.11, p. 1056–1059, 2009.

CROXEN, M.A.; FINLAY, B. B.; Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 26, 2010.

DE VINCENZI, M.; STAMMATI, A.; DE VINCENZI, A.; SILANO, M.; Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, n. 7-8, p. 801-804, 2004.

DUARTE, M. C.; LEME, E. E.; DELARME LINA, C.; SOARES, A. A.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197-201, 2007.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; JINNEMAN, K. Diarrheagenic *Escherichia coli*. In: Chapter 4^a, Bacteriological Analytical Manual on line. **Food and Drug Administration – FDA/CFSAN** 2011. Disponível em : <<http://www.fda.gov/Food/SciencaResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070080.htm>> Acesso em: Julho de 2017.

FERNEBRO, J. Fighting bacterial infections—Future treatment options. **Drug Resistance Updates**, v. 14, n. 2, p. 125–139, 2011.

FERRACINI, F. T.; FILHO, W. M. B.; ALMEIDA, S. M. **Atenção à Prescrição Médica**, 1.ed. São Paulo, Atheneu, 2014.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos United Kingdon**. 2. ed. Brasília: Artmed, 2013. 496 p.

FRIEDRICH, C. Pharmacists in German Cultural History. An. **Real Acad Farm.**, v. 80, n. 3, p. 600-613, 2014.

GARCÍA-GARCÍA, R.; LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. 95-100, 2011.

GUARDA, A.; RUBILAR, J. F.; MILTZ, J.; GALOTTO, M. J. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 2, p. 144–150, mar. 2011.

GUIMARÃES, A. G.; XAVIER, M. A.; SANTANA, M. T.; CAMARGO E. A.; SANTOS, C. A.; BRITO, F. A.; BARRETO, E. O.; CAVALCANTI, S. C. H.; ANTONIOLLI, A. R.; OLIVEIRA, R. C. M.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol**, v. 385, n. 3, p. 253-263, 2012.

HOLLAND, R. D.; WILKES, J. G.; COOPER, W. M.; ALUSTA, P.; WILLIAMS, A.; PEARCE, B.; BEAUDOIN, M.; BUZATU, D. Thymol treatment of bacteria prior to matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis aids in identifying certain bacteria at the subspecies level. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 28, n. 23, p. 2617–2626, 2014.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; NIGAM, P. S.; SARKER, S. D.; MOORE, J. E. Antibacterial activity of some *Lamiaceae* essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 1199-1206, 2011.

KUMAR, S.; VARELA, M. F. Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **Chemotherapy**, v. 14, p. 18, 2013.

LAGO, A.; FUENTEFRIA, S. R.; FUENTEFRIA, D. P. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio Grande do Sul, v. 43, n. 4, p. 430-434, 2010.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453–462, 12 set. 2001.

LEVY CE. Módulo V- Detecção e identificação de bactérias de importância médica. In: **Levy CE. Manual de Microbiologia Clínica para o controle de infecção de serviços de saúde. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** p. 1-93, 2004.

LO, D. S.; RAGAZZI, S. L. B.; GILIO, A. E.; MARTINEZ, M. B. Infecção urinária em menores de 15 anos: etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana em hospital geral de pediatria. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 28, n. 4, p. 299-3023, 2010.

MAGALHÃES, P. O.; LOPES, A.M.; MAZZOLA, P. G.; RANGEL-YAGUI, C.; PENNA, T. C. V.; PESSOA, A. JR. Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations: A Review. **Journal Pharmaceutical Science**, v. 10, n. 3, p. 388-404, 2007.

MARTINS, A. C.; PICOLI, S. U. Métodos alternativos para detecção de betalactamase de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 47, n. 4, p. 421-426, 2011.

MARTINS, A. F. M. M. **Prevalência de resistência a antimicrobianos em isolados ambientais de *Escherichia coli* e enterococos**. 2012. 107 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímica em Saúde) - Instituto Politécnico do Porto, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Porto, Portugal, 2012.

MELO, F. H.; VENANCIO, E. T.; DE SOUSA, D. P.; DE FRANCA FONTELES, M. M.; DE VASCONCELOS, S. M.; VIANA, G. S.; DE SOUSA, F. C. Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: Involvement with GABAergic transmission. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 4, p. 437-443, 2010.

MICHIELS, J.; MISSOTTEN, J.; FREMAUT, D.; DE SMET, S.; DIERICK, N. *In vitro* dose- response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. **Livestock Science**, v.109, n. 1, p. 157-160, 2007.

MOON, H.; KIM, N. H.; KIM, S. H.; KIM, Y.; RYU, J. H.; RHEE, M. S. Teriyaki sauce with carvacrol or thymol effectively controls *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and indigenous flora in marinated beef and marinade. **Meat Science**, v. 129, p. 147–152, jul. 2017.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiología Médica**. Elsevier Brasil, 2015.

NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future prospectives. **Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery**, v. 7, n. 1, p. 28-35, 2012.

OLIVEIRA, A. C.; SILVA, R. S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 10, n. 1, p. 189-97, 2008.

ORÚS, P.; GOMEZ-PEREZ, L.; LERANOZ, S.; BERLANGA, M. Increasing Antibiotic Resistance in Preservative-Tolerant Bacterial Strains Isolated from Cosmetic Products. **International Microbiology**, v. 18, n.1, p. 51-59, 2015.

ÖZKAN, A.; ERDOGAN, A. A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (*Lamiaceae*) and its two major phenolic components. **Turkish Journal of Biology**, v. 35, n. 6, p. 735–742, 2011.

PALARETI, G.; LEGNANI, C.; COSMI, B.; ANTONUCCI, E.; ERBA, N.; POLI, D.; TOSETTO, A. Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: analysis of results obtained in the DULCIS study. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 38, n. 1, p. 42–49, fev. 2016.

PITOUT, J. D.; LAUPLAND, K. B. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. **Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 159–166, 2008.

RAO, A.; ZHANG, Y.; MUEND, S.; RAO, R. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5062-5069, 2010.

RATH, S.; DUBEY, D.; SAHU, M. C.; DEBATA, N. K.; PADHY, R. N. Surveillance of ESBL producing multidrug resistant *Escherichia coli* in a teaching hospital in India. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 2, p.140-149, 2014.

RIVAS, L.; MCDONNELL, M. J.; BURGESS, C. M.; O'BRIEN, M., NAVARRO-VILLA, A.; FANNING, S.; DUFFY, G. Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. 1–2, p. 70–78, 30 abr. 2010.

ROCHA, S. L. S. **Detecção de fatores de virulência de amostras de *Escherichia coli* isoladas de granjas avícolas do RS através do MultiplexPCR**. 2008. 68 f. Tese (Mestrado em Ciência Veterinária na área de Medicina Veterinária Preventiva, especialidade Sanitária Avícola) – Faculdade Veterinária, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2008.

ROSSELINI, G. M., D'ANDREA, M. M. and MUGNAIOLI, C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. s1, p. 33-41, 2008.

SARKER, S. D.; 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**, v.42, p. 321-324, 2007.

SARTORI, D. P.; VIANA, J. M.; CUNHA, F. A.; REIS, H. P. L. C.; VIEIRA, J. B.; MAGALHÃES, D. D. P.; FONSECA, D. B. D. Avaliação da resistência microbiana em hospitais privados de Fortaleza – Ceará. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 1, p. 83-87, 2013.

SAVIOLLI, J. Y. **Pesquisa e caracterização de *Escherichia coli* patogênica (*E. coli* produtora de toxina *Shiga* – STEC; *E. coli* aviária patogênica - APEC) de fragatas (*Fregata magnificens*) da Costa do Estado de São Paulo**. 2010. 83 f. Tese (Mestrado em Patologia Experimental e Comprada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2012.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 201–222, 1995.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.48, n.2, p.91-99, 2012.

SILVA, R. M.; SILVA, R. C.; RIBEIRO, A. B. Resíduos de Antibióticos em Leite. **Revista Saúde e Biologia**, v.7, n.1, p. 30-44, 2012.

SONG, K.H.; JEON, J.H.; PARK, W.B.; PARK, S.W.; KIM, H.B.; OH, M.D.; LEE, H.S.; KIM, N.J.; CHOE, K.W. Clinical outcomes of spontaneous bacterial peritonitis due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species: A retrospective matched case-control study. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 41, 2009.

SZENTANDRASSY, N.; SZIGETI, G.; SZEGEDI, C.; SARKOZI, S.; MAGYAR, J.; BANYASZ, T.; CSERNOCH, L.; KOVACS, L.; NANASI, P.P.; JONA, I. Effect of thymol on calcium handling in mammalian ventricular myocardium. **Life Science**, v. 74, n. 7, p. 909–921, 2004.

TORRES, A. G.; ARENAS-HERNÁNDEZ, M. M. P.; MARTÍNEZ-LAGUNA, Y. Overview of *Escherichia coli*. In: **Pathogenic Escherichia coli in Latin America**. Bentham Science e-books San Diego, p. 1-7, 2010.

TUMBARELLO, M.; SPANU, T.; DI BIDINO, R.; MARCHETTI, M.; RUGGERI, M.; TRECARICHI, E.M.; DE PASCALE, G.; PROLI, E.M.; CAUDA, R.; CICHETTI, A.; FADDA, G. Costs of bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and influence of extended-spectrum-beta-lactamase production and inadequate initial antibiotic therapy. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.54, n. 10, p. 4085–4091, 2010.

ÜNDEGER, A.; BASARAN, A.; DEGEN, G. H.; BASARAN, N. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol, **Food and Chemical Toxicology** v. 47, n. 8, p. 2037–2043, 2009.

VERAS, H. N. H.; RODRIGUES, F. F. G.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M. Enhancement of aminoglycosides and beta-lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. **Arabian Journal of Chemistry**, 2013.

WOLLHEIM, C.; GUERRA, I. M. F.; CONTE, V. D.; HOFFMAN, S. P.; SCHREINER, F. J.; DELAMARE, A. P. L.; DA COSTA, S. O. P. Nosocomial and community infections due to class A extended-spectrum beta-lactamase (ESBLA)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 138-143, 2011.

XU, J.; ZHOU, F.; JI, B. P.; PEI, R. S.; XU, N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 174–179, set. 2008.

YUN, K. W.; KIM, H. Y.; PARK, H. K.; KIM, W.; LIM, I. S. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. **Journal of Microbiology Immunology and Infection**, v. 47, n. 6, p. 455-461, 2014.

ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; JÚNIOR, A. F. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 19, p. 828-833, 2009.

ANEXOS

ANEXO A: Artigo original intitulado como: Estudo da atividade antibacteriana dos monoterpenos timol e carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro publicado na Revista Pan Amazônica de Saúde no ano de 2017.

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.5123/S2176-62232017000100003

Estudo da atividade antibacteriana dos monoterpenos timol e carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de amplo 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 Cardoso 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

RESUMO

OBJETIVOS: Estudar a atividade antimicrobiana dos fitoconstituintes timol e carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro (ESBL) e determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do timol e do carvacrol. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia (J11) no Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, estado da Paraíba, Brasil. Para a determinação da CIM dos fitoconstituintes selecionados, foram utilizadas cepas bacterianas de *E. coli* ESBL (C-18, C-21, C-20, C-24, C-25, 24, 65) oriundas de pacientes ambulatoriais e a técnica de microdiluição em placa de 96 orifícios por meio da diluição seriada a uma razão de dois, reservando a última coluna para o controle do crescimento dos microrganismos. **RESULTADOS:** A CIM do carvacrol apresentou concentrações de 64 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa 65 e 128 $\mu\text{g/mL}$ para as cepas C-18, C-20, C-21, C-24, C-25 e 24. Já frente à ação do timol, a CIM foi determinada como: 1.024 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa C-25; 512 $\mu\text{g/mL}$ para as cepas C-18, C-21, 24 e 65; 256 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa C-24; e 128 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa C-20. **CONCLUSÃO:** Por meio dos experimentos, pôde-se afirmar que os fitoconstituintes carvacrol e timol exercem atividade bacteriostática sobre as cepas de *E. coli*.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; Betalactamases; Terpenos.

ABSTRACT

OBJECTIVES: To study the antimicrobial activity of thymol and carvacrol phytochemicals against strains of *Escherichia*