

**Investigação *in vitro* e *in silico* da  
atividade antimicrobiana do  
cuminaldeído contra  
*Staphylococcus aureus* e  
*Escherichia coli***

Claudio Dias de Souza

**Investigação *in vitro* e *in silico* da atividade antimicrobiana do cuminaldeído contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade CEUMA para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Odontologia Integrada

Orientador: Profa. Dra. Elizabeth Soares Fernandes

Co-orientadores: Prof. Dr. Thiago Azevedo Feitosa Ferro

Prof. Dr. Saulo José Figueiredo Mendes

São Luís

2019

S725i Souza, Cláudio Dias de.

Investigação in vitro e in silico da atividade antimicrobiana do Cuminaldeído contra Staphylococcus Aureus e Escherichia Coli./Cláudio Dias de Souza. – São Luís: UNICEUMA, 2019.  
52f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Curso de Gestão Odontologia.  
Universidade CEUMA, 2019.

1. Escherichia coli. 2. Staphylococcus aureus. 3. Cuminaldeído. 4. Antimicrobiano. 5. Antibiofilme. 6. Terapia adjevante. 7. Ciprofloxacina. I. FERNANDES, Elizabeth Soares. (Orientador) III. BANDECA, Matheus Coelho. (Coordenador) III. Título.

Nome: Claudio Dias de Souza

Título: **Investigação *in vitro* e *in silico* da atividade antimicrobiana do cuminaldeído contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade CEUMA para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rudys Rodolfo J. Tavares

Instituição: Universidade CEUMA

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dra. M<sup>a</sup>. do Socorro S. Cartágenes

Instituição: UFMA

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dra. Ceci Nunes Carvalho

Instituição: Universidade CEUMA

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dra. Luciana Salles B. Almeida

Instituição: UFMA

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dra. Elizabeth S. Fernandes

Instituição: Universidade CEUMA

Assinatura: \_\_\_\_\_

Dedico esse trabalho aos meus pais, Paulo e Léa (in memoriam);  
minha esposa e grande companheira Ana Cristina; e aos meus  
filhos, Paulo Victor e Juliana. Neles, encontro minha força!

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por todas as conquistas.

Aos meus pais, Paulo e Léa, pelos princípios básicos da boa educação, pelas bases da moral forjadas a cada dia e pelo incentivo diário ao estudo e ao crescimento pessoal.

Em especial à minha orientadora, Profa. Dra. Elizabeth Soares Fernandes, por acreditar na minha capacidade, pela paciência e disponibilidade constante, principalmente nos momentos difíceis (que não foram poucos) e por todo o conhecimento transmitido.

À Universidade CEUMA, nas pessoas dos Professores Dr. Valério e Dr. Luís Claudio pela infraestrutura disponibilizada.

Aos meus co-orientadores Prof. Dr. Thiago Azevedo Feitosa Ferro e Prof. Dr. Saulo José Figueiredo Mendes, pela grande ajuda nos experimentos de laboratório.

Aos meus companheiros de laboratório, em especial, às alunas Nágila, Laoane, João, Saulo e Thiago; agradeço pela amizade, companheirismo e pela ajuda de todos vocês nas práticas laboratoriais e cálculos estatísticos.

Ao financiamento do projeto pela CAPES, FAPEMA, CNPQ e Programa INCT-INOVAMED.

Aos meus amigos de turma, que conheci ao longo da minha caminhada pelo Programa de Mestrado na Universidade CEUMA, Thiago, Paulo, Bruna, Lucila, Silvana, Daniel, , Daniela, Rosyara, Samuel, Gustavo, Lucas, Camila e Letícia; agradeço pelos momentos divertidos que passamos juntos, sejam eles em

disciplinas, congressos, laboratórios ou mesmo em barzinhos (porque ninguém é de ferro).

Aos meus amigos e docentes do UNICEUMA, em especial aos Professores Dra. Ceci, Dr. Rudys e Dr. Andres, pela disposição e contribuições na qualificação desta dissertação, por terem aceitado compor minha banca de defesa de dissertação e pelo embasamento necessário para amadurecimento do conhecimento científico.

Às professoras Doutoras Maria do Socorro S. Cartágenes e Luciana Salles B. Almeida pela disponibilidade em compor minha Banca de Defesa de Dissertação.

À Erymônica, pela paciência e ajuda administrativa que precisei junto à coordenação do Mestrado.

Aos funcionários da Biblioteca, da seção de pós-graduação e todos os outros, agradeço pela ajuda e disposição.

Aos meus amigos de farda e Controladores de Tráfego Aéreo, Cap. Claudio e Ten. Schmidt, Comandante e chefe da SO-SL do DTCEA-SL, respectivamente, meus incentivadores na eterna busca ao conhecimento; meu agradecimento às várias concessões recebidas.

Aos meus grandes amigos, Dr. Odilon e Nilton, pela amizade, respeito e companheirismo, além dos importantes ensinamentos da boa convivência e respeito ao próximo.

“A possibilidade de realizarmos um sonho é o que torna a vida interessante.”

Paulo Coelho



Claudio, CD. **Investigação *in vitro* e *in silico* da atividade antimicrobiana do cuminaldeído contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*** [dissertação]. São Luís. Universidade CEUMA; 2019.

#### RESUMO

Bactérias como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* são importantes agentes de infecções do trato urinário que podem evoluir para doenças infecciosas graves, como a sepse. O aumento das cepas de *E. coli* e *S. aureus* resistentes à antibioticoterapia tem impulsionado a busca por novas terapias que possam substituir o uso ou atuar como adjuvantes dos antibióticos. Neste contexto, os compostos derivados de plantas têm sido amplamente investigados. Um potencial antimicrobiano tem sido sugerido para o óleo essencial de sementes de cominho, rico em cuminaldeído. No entanto, pouco se sabe sobre as ações antimicrobianas desse composto. **Objetivo:** Investigamos as atividades *in silico* e *in vitro* deste composto contra *S. aureus* e *E. coli*. **Método:** A análise *in silico* foi realizada utilizando os programas PASS online, Osiris, PROTOX e SwissADME. Em seguida, os efeitos antimicrobianos *in vitro* de cuminaldeído (0,1-3,000 µg / ml) foram determinados pelo método de microdiluição e ensaios de formação de biofilme. Possíveis efeitos sinérgicos do composto com a ciprofloxacina também foram investigados em ensaios de formação de biofilme e time-kill. **Resultados:** efeitos antimicrobianos e boa

biodisponibilidade oral e escore de drogas foram previstos para o cuminaldeído. O cuminaldeído não apresentou efeitos antimicrobianos ou anti-biofilme nas concentrações testadas. No entanto, quando co-incubado com concentrações sub-inibitórias de ciprofloxacina, o composto aumentou as ações antibióticas antimicrobianas e anti-biofilme. **Conclusão:** As evidências aqui reunidas sugerem que o cuminaldeído pode ser útil como terapia adjuvante à ciprofloxacina em infecções induzidas por *S. aureus* e *E. coli*.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, cuminaldeído, antimicrobiano, antibiofilme, terapia adjuvante, ciprofloxacina.

## ABSTRACT

Bacteria such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* are important agents of urinary tract infections that can often evolve to severe infectious diseases such as sepsis. The rise of *E. coli* and *S. aureus* strains resistant to antibiotic therapy has driven the search for novel therapies that could either replace the use or act as adjuvants of antibiotics. In this context, plant-derived compounds have been widely investigated. An antimicrobial potential has been suggested to the essential oil of cumin seeds, rich in cuminaldehyde. However, little is known of the antimicrobial actions of this compound. **Objective:** Herein, we investigated the *in silico* and *in vitro* activities of this compound against *S. aureus* and *E. coli*. **Method:** *In silico* analysis was performed by using the PASS online, Osiris, PROTOX and SwissADME programs. Then, the *in vitro* antimicrobial effects of cuminaldehyde (0.1-3,000 µg/ml) were determined by using the microdilution method and biofilm formation assays. Possible synergistic effects of the compound with ciprofloxacin were also investigated in biofilm formation and time-kill assays. **Results:** Antimicrobial effects and good oral bioavailability and drug score were predicted for cuminaldehyde. Cuminaldehyde did not present

antimicrobial or anti-biofilm effects at the tested concentrations. However, when co-incubated with sub-inhibitory concentrations of ciprofloxacin, the compound enhanced the antibiotic antimicrobial and anti-biofilm actions.

**Conclusion:** The evidences gathered herein, suggest that cumminaldehyde may be useful as an adjuvant therapy to ciprofloxacin in *S. aureus* and *E. coli*-induced infections.

**Keywords:** *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, cumminaldehyde, antimicrobial, anti-biofilm, adjuvant therapy, ciprofloxacin.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativa da biodisponibilidade oral do cuminaldeído em comparação com a ciprofloxacina.....	41
Tabela 2 - Efeitos tóxicos previstos do cuminaldeído em comparação com a ciprofloxacina.....	42
Tabela 3 - Absorção estimada de cuminaldeído em comparação com ciprofloxacina .....	43
Tabela 4 - Solubilidade estimada e pontuação de semelhança medicamentosa do cuminaldeído em comparação com ciprofloxacina .....	44
Tabela 5 - Efeitos da ciprofloxacina na formação de biofilme por <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .....	45
Tabela 6 - Efeitos da co-incubação de cuminaldeído e ciprofloxacina na formação de biofilme por <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .....	46

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeito <i>in vitro</i> do cuminaldeído na viabilidade e metabolismo de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .....	47
Figura 2 - Efeito <i>in vitro</i> do cuminaldeído na formação de biofilme de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .....	48
Figura 3- Efeitos da co-incubação <i>in vitro</i> de cuminaldeído e ciprofloxacina na sobrevivência de biofilme de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> ..	49

## Sumário

1 INTRODUÇÃO .....	16
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1 Análise <i>in silico</i> .....	17
2.1.1 Predição de atividades biológicas .....	17
2.1.2 Predição da biodisponibilidade oral.....	18
2.1.3 Estimativa das características farmacocinéticas e efeitos tóxicos .....	18
2.2 Ensaio <i>in vitro</i> .....	20
2.2.1 Cepas bacterianas e cultura.....	20
2.2.2 Avaliação das concentrações inibitórias mínimas (CIM).....	20
2.2.3 Efeitos na formação do biofilme .....	21
2.2.4 Ensaio de sinergismo com ciprofloxacina na formação do biofilme .....	22
2.2.5 Ensaio de sobrevivência bacteriana (Time-Kill) .....	22
2.2 Análise estatística .....	23
3 RESULTADOS .....	23
3.1 Análise <i>in silico</i> do cuminaldeído .....	23
3.1.1 Identificação das atividades biológicas .....	23
3.1.2 Estimativa da biodisponibilidade oral .....	24
3.1.3 Predição de características farmacocinéticas e efeitos tóxicos .....	25
3.2 Ensaio antimicrobianos .....	26
3.2.1 Análise da atividade antimicrobiana do cuminaldeído em <i>S.</i> <i>aureus</i> e <i>E. coli</i> .....	26

3.2.2 Efeitos do Cuminaldeído na formação de biofilme por <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .....	26
3.2.3 Efeitos da associação de cuminaldeído e concentrações subinibitórias de ciprofloxacina na formação de biofilme por <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .....	27
3.2.4 Efeitos da associação de cuminaldeído e concentrações subinibitórias de ciprofloxacina na sobrevivência bacteriana.....	27
4. DISCUSSÃO .....	28
CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS .....	34
ANEXOS	



# Capítulo 1

## 1. INTRODUÇÃO

Bactérias como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* são importantes agentes de infecções do trato urinário [1-4]. De fato, ambas as bactérias são freqüentes em pacientes com dispositivos do trato urinário de demora [1,5-7]. Essas infecções primárias freqüentemente evoluem para doenças infecciosas graves, como a sepse, que apresenta alta morbidade e mortalidade. *E. coli* é um dos principais patógenos de tal infecção, causando bacteremia em mais de 6.000 por 100.000 pacientes por ano [8,9]. Além disso, os relatórios indicam que o *S. aureus* é responsável por 21 a 36 casos de bacteremia por 100.000 habitantes por ano [10,11], com taxas de mortalidade variando de 30 a 70% [12]. O manejo dessas infecções depende principalmente da antibioticoterapia, com a sobrevida e a recuperação do paciente dependendo, em grande parte, do tempo e da eficácia do tratamento. É de notar que a ciprofloxacina é o antibiótico fluoroquinolona mais comumente prescrito para infecções do trato urinário [13]; a qual tanto *S. aureus* como *E. coli* se tornaram resistentes [2,14]. De fato, o uso irrestrito e disseminado de antibióticos nas últimas décadas resultou em um aumento de cepas multirresistentes de *E. coli* e *S. aureus*, reduzindo assim as chances de um tratamento bem-sucedido de infecções causadas por esses microorganismos. Isso levou à busca de novas abordagens terapêuticas que poderiam substituir o uso ou atuar como adjuvantes dos antibióticos [15]. Nesse contexto, os compostos derivados de plantas têm sido amplamente investigados como antimicrobianos e

adjuvantes na antibioticoterapia [16,17]. As sementes de *Cuminum cyminum* L. (Apiaceae), popularmente conhecidas como cominho, têm sido amplamente utilizadas na culinária mundial [18]. Suas sementes também são usadas na medicina popular para tratar dor de dente, dispepsia, diarreia, epilepsia entre outras doenças [18,19]. Estudos recentes demonstraram que o óleo essencial obtido de sementes de cominho é antimicrobiano contra bactérias como *S. aureus* e *E. coli* [20-27]. Esta atividade foi atribuída ao alto conteúdo de cuminaldeído no óleo essencial de semente de cominho [18,28,29]. No entanto, pouco se sabe sobre o potencial antimicrobiano do cuminaldeído contra bactérias. Aqui, investigamos as atividades *in silico* e *in vitro* deste composto contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Análise *in silico***

#### **2.1.1 Predição de atividades biológicas**

Para avaliar o potencial biológico do cuminaldeído, utilizou-se o programa PASS (Predição de Espectros de Atividade para Substâncias) On-line. Esta ferramenta computacional calcula a probabilidade de uma determinada molécula orgânica apresentar uma atividade biológica, através da comparação de sua estrutura molecular com um banco de dados ([www.way2drug.com/passonline](http://www.way2drug.com/passonline)) composto por outras moléculas orgânicas com atividades biológicas definidas [30, 31]. Assim, o programa PASS on-line dá a

probabilidade de um composto ser ativo (Pa) ou inativo (Pi) em um determinado alvo biológico. Para comparação, a atividade biológica da ciprofloxacina também foi analisada.

### **2.1.2 Predição da biodisponibilidade oral**

O programa SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php#>, [32]) foi usado para prever, teoricamente, a biodisponibilidade oral do cuminaldeído. Para comparação, a biodisponibilidade oral da ciprofloxacina também foi avaliada. Informações sobre as seguintes propriedades foram obtidas: área de superfície polar total (TPSA), coeficiente de partição (água / óleo) - iLogP, peso molecular, número de receptores de hidrogênio - nALH e número de doadores de hidrogênio - nDLH do composto. Em seguida, uma análise baseada na "Regra dos Cinco" foi realizada conforme descrito anteriormente [31,33]. Por definição, para apresentar uma boa biodisponibilidade oral estimada, uma molécula precisa atender a pelo menos 3 requisitos dos 5 parâmetros analisados: I) área de superfície polar total (TPSA) < 140 Å<sup>2</sup>; II) LogP ≤ 5; III) peso molecular < 500 daltons; IV) número de ligações de hidrogênio aceitadoras (nALH) ≤ 10; e V) número de ligações de hidrogênio do doador (nDLH) ≤ 5.

### **2.1.3 Estimativa das características farmacocinéticas e efeitos tóxicos**

Para análise dos possíveis efeitos tóxicos e dos parâmetros farmacocinéticos teóricos (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) do cuminaldeído, foram utilizados os programas Osiris

([www.organic-chemistry.org/prog/peo/drugScore.html](http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/drugScore.html));[31] e SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php#>; [32]). Estes parâmetros e a toxicidade foram preditos pela comparação da estrutura química do cuminaldeído com uma base de dados contendo fármacos comercialmente disponíveis e compostos comercialmente disponíveis. Os efeitos tóxicos foram classificados como mutagênicos, tumorigênicos, irritantes e efeitos no sistema reprodutivo [31].

Valores de LD50, em miligrama por quilograma (mg / kg), foram estimados a partir do programa PROTOX ([http://tox.charite.de/protox\\_II/index.php?site=compound\\_input](http://tox.charite.de/protox_II/index.php?site=compound_input)); [34]), usado para classificar a toxicidade do cumialdeído da seguinte forma: classe I - fatal por ingestão com  $DL50 \leq 5$ ; classe II- fatal por ingestão quando  $5 < LD50 \leq 50$ ; classe III- tóxico por ingestão quando  $50 < LD50 \leq 300$ ; classe IV - prejudicial se ingerido quando  $300 < LD50 \leq 2000$ ; classe V- prejudicial se ingerido quando  $2000 < LD50 \leq 5000$ ; e classe V-não-tóxico quando  $LD50 > 5000$ . Estimativas de absorção gastrointestinal do cuminaldeído, permeabilidade através da barreira hematoencefálica e infiltração cutânea ( $\log K_p$  em centímetros (cm)/ s) foram avaliados pelo programa SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php#> [32]).

Além disso, a probabilidade do cuminaldeído se tornar um medicamento comercial ("drug-score") foi calculada no programa Osiris ([www.organic-chemistry.org/prog/peo/drugScore.html](http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/drugScore.html)) combinando os valores obtidos para o  $i\log P$ , semelhança da droga,

solubilidade (Log S; quanto mais próximo a pontuação for de 0, maior a solubilidade [32]) , massa molar e toxicidade em um único valor. Um valor de pontuação da droga de 0,1 a 1,0 foi tomado como um índice de adequação para comercialização [31].

## **2.2 Ensaios *in vitro***

### **2.2.1 Cepas bacterianas e cultura**

As cepas padrão de *S. aureus* ATCC 6538 e *E. coli* ATCC 042 foram gentilmente cedidas pela bacterioteca da Universidade CEUMA. As bactérias foram cultivadas em ágar Müller-Hinton (MH), a 37°C por 24h, conforme descrito previamente [35].

### **2.2.2 Avaliação das concentrações inibitórias mínimas (CIM)**

Os efeitos antimicrobianos de cuminaldeído (98% de pureza; Sigma-Aldrich, Brasil) foram investigados pelo método de microdiluição [36]. Resumidamente, as bactérias previamente cultivadas em ágar MH foram suspensas em solução salina ( $\sim 1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia (CFU) / mililitro (ml)). Para determinação das MICs, 10  $\mu$ l da suspensão bacteriana foram incubados em caldo de MH (190  $\mu$ l / poço) contendo diferentes concentrações de cuminaldeído (0,1-3,000  $\mu$ g / ml). Diluições em série de ciprofloxacina (0,0087-0,702  $\mu$ g / ml) foram utilizados como controles positivos, enquanto dimetil sulfóxido estéril (DMSO; 2% em solução salina) foi usado como controle negativo. As amostras foram então incubadas durante 24 horas a 37°C. A CIM foi definida como a menor concentração na qual nenhum crescimento bacteriano foi observado. Para determinar as concentrações bactericidas mínimas

(CBM), no final das experiências de CIM, as culturas foram semeadas em agar MH e incubadas a 37°C durante 24h. Em paralelo, os efeitos do cuminaldeído na viabilidade bacteriana e na taxa metabólica foram avaliados e calculados pela adição do reagente PrestoBlue® (1:10; Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. A viabilidade celular foi expressa como absorvância em nm.

### **2.2.3 Efeitos na formação do biofilme**

A formação de biofilme foi quantificada como descrito anteriormente [35]. Para isso, 10 µl de suspensão bacteriana (preparada como descrito acima) foram adicionados por poço em uma placa de cultura de 96 poços contendo cuminaldeído (0,1-3,000 µg / ml) ou ciprofloxacina (0,0087-0,702 µg / ml) em 190 µl de caldo MH. Veículo (2% DMSO em solução salina) com bactérias tratadas e caldo MH sem bactérias foram utilizados como controles positivos e negativos, respectivamente. As amostras foram incubadas a 37°C durante 24h e depois os poços foram lavados três vezes com PBS (tampão fosfato-salino). O biofilme foi corado com cristal violeta a 5% durante 10 minutos em temperatura ambiente e solubilizado imediatamente com metanol (200 µl, 100%). A absorvância foi lida a 570 nm. Os resultados da massa do biofilme foram expressos como absorvância em nm. Para análise da viabilidade do biofilme, o reagente PrestoBlue® (1:10; Life Technologies) foi utilizado conforme as instruções do fabricante; os resultados foram expressos como absorvância em nm.

#### **2.2.4 Ensaio de sinergismo com ciprofloxacina na formação do biofilme**

O potencial do cuminaldeído para interagir com a ciprofloxacina foi avaliado na formação de biofilme. A formação de biofilme foi quantificada (como descrito acima). Para isso, 10 µl de suspensão bacteriana (preparada como descrito acima) foram adicionadas por poço em uma placa de cultura de 96 poços contendo cuminaldeído (0,1-3,000 µg / ml) e ciprofloxacina (a 0,0087 µg / ml para *E. coli* e 0,026 µg / ml para *S. aureus*) em 190 µl de caldo MH. Veículo (2% DMSO em solução salina) contendo bactérias tratadas e caldo sem bactérias foram utilizados como controles positivos e negativos, respectivamente. A biomassa e a viabilidade do biofilme foram então avaliadas conforme descrito na seção 2.1.3.

#### **2.2.5 Ensaio de sobrevivência bacteriana (Time-kill)**

Uma amostra (200 µl) de cada suspensão bacteriana foi adicionada a 2 ml de caldo MH contendo apenas ciprofloxacina (a 0,0087 µg / ml para *E. coli* e 0,026 µg / ml para *S. aureus*) ou em combinação com cuminaldeído (3,0 ou 10,0 µg / ml para ensaios de *E. coli* e 30 ou 100 µg / ml para ensaios de *S. aureus*). O crescimento celular foi monitorado colocando em placas 2,5 µl de suspensões diluídas 10 vezes de cada amostra em diferentes pontos no tempo (0,15-8 h) em placas de agar MH. Após 24h de incubação a 37°C, as colônias foram contadas e, em seguida, foi calculado o log CFU / ml. Os efeitos combinatórios bactericidas foram avaliados



por variação em Log CFU / ml ( $\Delta$ LC) e os efeitos foram registados como sinérgicos se  $\Delta$ LC $\geq$ 2 log CFU / ml; aditivo se  $\Delta$ LC estiver entre 1 e 2 log CFU / ml); indiferente se  $\Delta$ LC =  $\pm$  1 log CFU / ml; ou antagonista se  $\Delta$ LC > -1 log CFU / ml [37]

### **2.3 Análise estatística**

Todos os experimentos *in vitro* foram realizados em triplicata e foram obtidos de quatro experimentos independentes. A análise estatística entre grupos foi realizada no software GraphPad Prism 5.0 através de análise de variância de 1-via seguida por teste Bonferroni.  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 Análise *in silico* do cuminaldeído**

#### **3.1.1 Identificação das atividades biológicas**

A análise das prováveis atividades biológicas do cuminaldeído mostrou que este composto apresenta probabilidade > 30% ( $P_a > 0,3$ ) de apresentar 726 atividades. Dessas, 198 têm probabilidade moderada ( $P_a > 0,5$ ) de ocorrência e 69, alta probabilidade de ocorrência ( $P_a > 0,7$ ). Do total de atividades identificadas, 15 eram antimicrobianas: i) inibidor da proteína Tpr de *Porphyromonas gingivalis* ( $P_a = 0,605$  e  $P_i = 0,012$ ); ii) potenciador da permeabilidade da membrana ( $P_a = 0,516$  e  $P_i = 0,012$ ); iii) antimicobacteriano ( $P_a = 0,507$  e  $P_i = 0,018$ ); iv) antiparasitário ( $P_a = 0,491$  e  $P_i = 0,017$ ); v) anti-helmíntico ( $P_a = 0,487$  e  $P_i = 0,006$ ); vi) antifúngico ( $P_a = 0,470$  e  $P_i = 0,036$ ); vii) anti -nematóide ( $P_a =$

0,445 e  $P_i = 0,028$ ); viii) anti-picornavírus ( $P_a = 0,406$  e  $P_i = 0,105$ ); ix) inibidor de DNA ligase (ATP) ( $P_a = 0,401$  e  $P_i = 0,016$ ); x) anti-*Helicobacter pylori* ( $P_a = 0,381$  e  $P_i = 0,011$ ); xi) antagonista da integridade da membrana ( $P_a = 0,380$  e  $P_a = 0,077$ ); xii) anti-infeccioso ( $P_a = 0,372$  e  $P_i = 0,058$ ); xiii) antiprotozoário ( $P_a = 0,352$  e  $P_i = 0,060$ ); xiv) anti-rinovírus ( $P_a = 0,349$  e  $P_i = 0,160$ ); e xv) antibacteriano ( $P_a = 0,336$  e  $P_i = 0,047$ ).

Para comparação, as atividades biológicas da ciprofloxacina também foram avaliadas. Quarenta e sete atividades com probabilidade de ocorrência  $> 30\%$  foram identificadas para ciprofloxacina. Destes, apenas 04 apresentaram alta probabilidade de ocorrência ( $P_a > 0,7$ ). A análise de todas as 47 atividades biológicas indicou que 12 delas eram antimicrobianas: I) antibacteriana oftálmica ( $P_a = 0,940$  e  $P_i = 0,000$ ); II) anti-infecciosa ( $P_a = 0,823$  e  $P_i = 0,005$ ); III) inibidor da síntese de DNA ( $P_a = 0,786$  e  $P_i = 0,004$ ); IV) inibidor da topoisomerase II ( $P_a = 0,759$  e  $P_i = 0,003$ ); V) antimicobacteriano ( $P_a = 0,638$  e  $P_i = 0,008$ ); VI) antibacteriano ( $P_a = 0,589$  e  $P_i = 0,009$ ); VII) antibiótico do tipo quinolona ( $P_a = 0,572$  e  $P_i = 0,001$ ); VIII) anti-citomegalovírus ( $P_a = 0,448$  e  $P_i = 0,004$ ); IX) anti-tuberculose ( $P_a = 0,452$  e  $P_i = 0,019$ ); X) inibidor da DNA-girase ( $P_a = 0,488$  e  $P_i = 0,001$ ); XI) antibiótico ( $P_a = 0,358$  e  $P_i = 0,010$ ); e XII) anti-adenovírus ( $P_a = 0,304$  e  $P_i = 0,086$ ).

### **3.1.2 Estimativa da biodisponibilidade oral**

Para prever a biodisponibilidade oral do cuminaldeído, foram analisados os valores de TPSA, iLogP, peso molecular, nALH e nDLH. A Tabela 1 demonstra que o cuminaldeído se encaixa nos critérios para apresentar boa biodisponibilidade oral estimada (TPSA = 17,07; LogP de 2,03; peso molecular de 148,20; nALH de 1,0 e nDLH de 0,0). A ciprofloxacina apresentou um TPSA de 74,57, iLogP de 2,24, peso molecular de 331,34, nDLH de 2,0 e nALH de 5,0 (Tabela 1).

### **3.1.3 Predição de características farmacocinéticas e efeitos tóxicos**

A Tabela 2 mostra os efeitos tóxicos previstos do cuminaldeído em comparação com os da ciprofloxacina. O cuminaldeído foi sugerido como irritante, sem efeitos mutagênicos, tumorigênicos, hepatotóxicos ou prejudiciais à reprodução. Por outro lado, a ciprofloxacina foi predita como mutagênica, sem ações tumorigênicas e sem efeitos no fígado ou no sistema reprodutivo. A LD50 estimada foi de 1.320 e 2.000 mg / kg para cuminaldeído e ciprofloxacina, respectivamente (Tabela 2). Ambas as drogas exibiram um escore de toxicidade de 4,0, indicando que são classificadas como nocivas se ingeridas em sua LD50 (Tabela 2).

Informações sobre as estimativas de absorção gastrointestinal, permeabilidade através da barreira hematoencefálica e infiltração cutânea (log Kp em centímetros (cm) / s) são mostradas na Tabela 3. Tanto o cuminaldeído quanto a ciprofloxacina foram considerados altamente absorvidos pelo trato

gastrointestinal; no entanto, apenas o cuminaldeído foi previsto para atravessar a barreira hematoencefálica (Tabela 3). Os valores estimados de Log Kp foram de -5,52 e -9,09 cm / s para cuminaldeído e ciprofloxacina, respectivamente (Tabela 3).

## **3.2 Ensaios antimicrobianos**

### **3.2.1 Análise da atividade antimicrobiana do cuminaldeído em *S. aureus* e *E. coli***

Os efeitos antimicrobianos do cuminaldeído foram avaliados contra *S. aureus* ATCC 6538 e *E. coli* ATCC 042. A ciprofloxacina apresentou valores de CIM de 0,234 e 0,026 µg / ml para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. Por outro lado, o cuminaldeído não apresentou efeitos inibitórios sobre estas bactérias, não apresentando CIM nas concentrações testadas. O composto não inibiu a viabilidade nem a taxa metabólica de *S. aureus* ou *E. coli* quando avaliado em concentrações mais baixas, mas aumentou essas respostas em 1.000 e 3.000 µg / ml (Figura 1A-D).

### **3.2.2 Efeitos do Cuminaldeído na formação de biofilme por *S. aureus* e *E. coli***

Os efeitos do cuminaldeído na formação de biofilme foram investigados pela análise da massa e viabilidade do biofilme. Nenhum efeito significativo foi observado para este composto em nenhuma massa de biofilme nem viabilidade (Figura 2A-D); embora a massa de biofilme de *S. aureus* tenha sido reduzida em 47% quando incubada com cuminaldeído a 0,3 µg / ml (Figura 2A). Os dados apresentados na Tabela 4 demonstram que a ciprofloxacina

(> 0,078 µg / ml) diminui a massa do biofilme de *S. aureus* (95-100%) e a viabilidade (76-92%). Além disso, o antibiótico (0,0087 µg / ml) causou reduções significativas da massa do biofilme de *E. coli* (68-100%) e viabilidade (35-100%) (Tabela 5).

### **3.2.3 Efeitos da associação de cuminaldeído e concentrações subinibitórias de ciprofloxacina na formação de biofilme por *S. aureus* e *E. coli***

Foram avaliados os efeitos da associação de cuminaldeído e concentrações sub-inibitórias de ciprofloxacina (0,026 µg / ml para *S. aureus* e 0,0087 µg / ml para *E. coli*) na formação de biofilme bacteriano (biomassa e viabilidade). A Tabela 6 demonstra que o cuminaldeído aumentou os efeitos da ciprofloxacina na viabilidade do biofilme de *S. aureus* (66-86%) e massa (61-76%). Observou-se uma atividade semelhante (Tabela 6) para viabilidade de biofilme de *E. coli* (72-100%) e massa (~ 100%).

### **3.2.4 Efeitos da associação de cuminaldeído e concentrações subinibitórias de ciprofloxacina na sobrevivência bacteriana (Time-kill)**

Os ensaios de sobrevivência bacteriana (Time-kill) foram realizados para avaliar os efeitos da associação de cuminaldeído com concentrações sub-inibitórias de ciprofloxacina (0,026 µg / ml para *S. aureus* e 0,0087 para *E. coli*) na sobrevivência bacteriana. Concentrações de cuminaldeído (3,0 ou 10,0 µg / ml para ensaios de *E. coli*; e 30 ou 100 µg / ml para ensaios de *S. aureus*) não inibiram o

crescimento e a sobrevivência bacteriana e nem inibiram a formação de biofilme pelas bactérias avaliadas.

A ciprofloxacina (0,026 µg / ml) não foi letal para *S. aureus*; no entanto, quando associada ao cuminaldeído a 100 µg / ml, observou-se uma depleção dessa população bacteriana (Figura 3A); i.e., uma ação sinérgica em todos os pontos de tempo ( $\Delta LC \geq 2 \log CFU / ml$ ;  $\Delta LC$  de 4,65 a 0,15h para 12,7 a 8h de incubação). Quando testado a 30 µg / ml, o cuminaldeído não influenciou a sobrevivência da bactéria tratada com ciprofloxacina (Figura 3A). A Figura 3B mostra que 50% da população de *E. coli* sobreviveram ao desafio com ciprofloxacina (0,0087 / ml). Quando incubada com cuminaldeído (3 e 10 µg / ml), a morte induzida pela ciprofloxacina em *E. coli* aumentou para 75% (Figura 3b). Observou-se um efeito sinérgico entre ciprofloxacina (0,0087 µg / ml) e cuminaldeído a 3 e 10 µg / ml, a partir de 2h e 4h de incubação, respectivamente ( $LCLC \geq 2 \log CFU / m$ ), atingindo um  $\Delta LC$  máximo de 5,4 no tempo de 4h para ambas as concentrações do composto.

#### **4. DISCUSSÃO**

Estudos com o óleo essencial de sementes de *C. cyminum* indicaram o seu potencial antimicrobiano contra uma série de bactérias, incluindo *S. aureus* e *E. coli* [20-27]. O cuminaldeído tem sido apontado como o principal composto associado às propriedades farmacológicas das sementes de *C. cyminum* [18, 28, 29], mas pouco se conhece sobre seu potencial antimicrobiano.

Em nosso estudo, a avaliação *in silico* do cuminaldeído indicou que este composto pode atuar como antimicrobiano. A avaliação da biodisponibilidade oral do cuminaldeído estimou que o composto é um bom candidato para a ingestão oral com uma classificação de 0,55 (o que indica a probabilidade de um composto se tornar uma droga comercial), semelhante à ciprofloxacina; no entanto, doses  $\geq 1.320$  mg / kg do composto seriam letais para os mamíferos, uma vez que o cuminaldeído foi classificado como nocivo se ingerido nesta LD50 (classe de toxicidade igual a 4.0). A análise *in silico* também revelou que o cuminaldeído é absorvido pelo trato gastrointestinal, e é uma barreira hematoencefálica e um permeante da pele. É de notar que, quanto mais negativo o log Kp, menos permeante da pele é a molécula. Por conseguinte, previu-se que o cuminaldeído seja menos absorvível pelas camadas da pele que a ciprofloxacina. É digno de nota que é comum o *S. aureus*, um patógeno resistente, colonizar as feridas da pele, muitas vezes de difícil tratamento [38, 39]. Ainda assim, o cuminaldeído pode ser útil como uma terapia adjuvante para infecções da pele em associação com a ciprofloxacina.

Estudos recentes demonstraram potencial antimicrobiano de cuminaldeído, pois apresentou CIM de 0,311 mg / ml e 0,650-4,98 mg / ml para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente [40, 41]. No entanto, em nosso estudo, o cuminaldeído não teve ação antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 6538 e *E. coli* ATCC 042. Pelo contrário, o composto aumentou a viabilidade e a taxa

metabólica dessas bactérias quando testadas em concentrações > 1.000 µg / ml. As discrepâncias entre nosso estudo e as anteriores podem ser devidas a diferenças nas cepas bacterianas e nas condições experimentais utilizadas.

De importância, compostos sem ação antimicrobiana, mas anti-biofilme, têm sido investigados como terapias alternativas para o tratamento de infecções bacterianas [42-44]. Portanto, os efeitos anti-biofilme do cuminaldeído foram investigados. Aqui, a ciprofloxacina, um antibiótico amplamente utilizado, apresentou ações antimicrobianas e anti-biofilme. Pelo contrário, nenhum efeito significativo foi observado para cuminaldeído na formação de biofilme, embora tenha sido observada uma redução na formação de massa de biofilme de *S. aureus* quando o composto foi avaliado a 0,3 µg/ ml. É de notar que o óleo essencial de sementes de *C. cyminum* reduz a formação de biofilmes de *Streptococcus mutans* e *S. pyogenes* [45]. Mais uma vez, este resultado pode estar associado à estirpe bacteriana e às condições experimentais utilizadas no estudo.

Embora o cuminaldeído não tenha apresentado importantes ações antimicrobianas e anti-biofilme contra *S. aureus* e *E. coli* em nosso estudo, investigamos a capacidade do composto em potencializar os efeitos da ciprofloxacina sobre a formação de biofilme bacteriano (viabilidade e massa) e sobrevida. Muitos compostos foram investigados como adjuvantes da terapia antibiótica para superar a resistência bacteriana [16, 17]. De acordo



com Borges et al. (2016), alguns mecanismos como prevenção do acesso ao alvo pela redução da permeabilidade, bombas de efluxo aumentadas, degradação e modificação de antibióticos e modificação do alvo molecular podem explicar a resistência bacteriana aos antibióticos. A fisiologia e o metabolismo bacteriano também são dois fatores importantes relacionados à sua tolerância a antibióticos. Além disso, células do biofilme são mais resistentes a antibióticos, biocidas e outros desafios químicos ou físicos comparados às mesmas células no estado planctônico. Também, bactérias gram-negativas, como *E.coli*, apresentam barreiras celulares mais eficazes em comparação às bactérias gram-positivas, apresentando de fora para dentro, uma membrana externa à parede celular com uma dupla camada de lipídios, contendo proteína, semelhante à membrana plasmática, além de polissacarídeos que diferem entre as diferentes cepas de bactérias, sendo importantes fatores que determinam a antigenicidade da bactéria. Isso poderia explicar o melhor resultado sobre *S.aureus*, bactéria gram-positiva, quando associados ciprofloxacina e cuminaldeído (100 µg/ ml). Curiosamente, nossos dados indicam que, embora não seja eficaz por si só, o cuminaldeído potencializou as ações antimicrobiana e anti-biofilme da ciprofloxacina contra *S. aureus* e *E. coli*.

## **5. CONCLUSÃO**

No geral, as evidências aqui reunidas sugerem que o cuminaldeído pode ser usado como terapia adjuvante da

ciprofloxacina. Com doses reduzidas, este antibiótico comercial pode ser utilizado em conjunto com o cuminaldeído no tratamento da infecção induzida por *S. aureus* e *E. coli*, diminuindo assim a probabilidade de ocorrência de resistência bacteriana.

#### CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

#### AGRADECIMENTOS

V. M.-N., L.C.N.S., S.J.F.M. e E.S.F. desenhou a pesquisa; CD. de S., N.C.F.S., L.F.G., J.P.P., D.M.S., W.C.M., J.F.V.P., A.R.C. Jr., T.S. de A., L.G.L-N, T.A.F.F. e S.J.F.M. realizaram os experimentos e coletaram dados; CD. de S., N.C.F.S., L.F.G., T.A.F.F., S.J.F.M. e E.S.F. analisaram os dados, C.D. S., S.J.F.M., V. M.N., L.C.N.S., T.A.F.F. e E.S.F. escreveram o manuscrito; L.C.N.S. e E.S.F. financiaram a pesquisa. Todos os autores deram aprovação final ao manuscrito. Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; concessão número 3325/2015; código financeiro 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; pedido número 309046 / 2016-5), Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA; outorga número 03207/18) e Programa INCT-INOVAMED. A.R.C.Jr., J.P.P. e N.C.F.S. são estudantes que recebem bolsas da FAPEMA. L.F.G. é aluno de graduação

recebendo bolsa do CNPq. D.M.S. é estudante de graduação  
recebendo bolsa do programa Santander Universidades.

## REFERENCIAS

- [1] Baraboutis, I.G.; Tsagalou, E.P.; Lepinski, J.L.; Papakonstantinou, I.; Papastamopoulos, V.; Skoutelis, A.T.; Johnson, S. Primary Staphylococcus aureus urinary tract infection: the role of undetected hematogenous seeding of the urinary tract. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2010, 29(9), 1095-1101.
- [2] Fasugba, O.; Gardner, A.; Mitchell, B.G.; Mnatzaganian, G. Ciprofloxacin resistance in community- and hospital-acquired Escherichia coli urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMC Infect Dis.*, 2015, 15:545.
- [3] Córdoba, G.; Holm, A.; Hansen, F.; Hammerum, A.M.; Bjerrum, L. Prevalence of antimicrobial resistant Escherichia coli from patients with suspected urinary tract infection in primary care, Denmark. *BMC Infect Dis.*, 2017, 17(1), 670.
- [4] Karakonstantis, S.; Kalemaki, D. Evaluation and management of Staphylococcus aureus bacteriuria: an updated review. *Infection*, 2018, 46(3), 293-301.
- [5] Kirmusaoglu, S.; Yurdugül, S.; Metin, A.; Vehid, S. The Effect of Urinary Catheters on Microbial Biofilms and Catheter Associated Urinary Tract Infections. *Urol. J.*, 2017, 14(2), 3028-3034.
- [6] Sabir, N.; Ikram, A.; Zaman, G.; Satti, L.; Gardezi, A.; Ahmed, A.; Ahmed, P. Bacterial biofilm-based catheter-associated urinary tract infections: Causative pathogens and antibiotic resistance. *Am. J. Infect. Control*, 2017, 45(10), 1101-1105.

- [7] Walker, J.N.; Flores-Mireles, A.L.; Pinkner, C.L.; Schreiber, H.L.4th; Joens, M.S.; Park, A.M.; Potretzke, A.M.; Bauman, T.M.; Pinkner, J.S.; Fitzpatrick, J.A.J.; Desai, A.; Caparon, M.G.; Hultgren, S.J. Catheterization alters bladder ecology to potentiate *Staphylococcus aureus* infection of the urinary tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2017, 114(41), E8721-E8730.
- [8] Lishman, H.; Costelloe, C.; Hopkins, S.; Johnson, A.P.; Hope, R.; Guy, R.; Muller-Pebody, B.; Holmes, A.; Aylin, P. Exploring the relationship between primary care antibiotic prescribing for urinary tract infections, *Escherichia coli* bacteraemia incidence and antimicrobial resistance: an ecological study. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2018, 52(6), 790-798.
- [9] Yusef, D.; Shalakhti, T.; Awad, S.; Algharaibeh, H.; Khasawneh, W. Clinical characteristics and epidemiology of sepsis in the neonatal intensive care unit in the era of multi-drug resistant organisms: A retrospective review. *Pediatr. Neonatol.*, 2018, 59(1), 35-41.
- [10] Bergin, S.P.; Holland, T.L.; Fowler, V.G. Jr.; Tong, S.Y.C. Bacteremia, Sepsis, and Infective Endocarditis Associated with *Staphylococcus aureus*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2017, 409, 263-296.
- [11] Jokinen, E.; Laine, J.; Huttunen, R.; Lyytikäinen, O.; Vuento, R.; Vuopio, J.; Syrjänen, J. Trends in incidence and resistance patterns of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infect. Dis.*, 2018, 50(1), 52-58.

- [12] Gobatto, A.L.; Besen, B.A.; Azevedo, L.C. How Can We Estimate Sepsis Incidence and Mortality? *Shock*, 2017, 47(Suppl 1), 6-11.
- [13] Schaeffer, A.J. The expanding role of fluoroquinolones. *Am. J. Med.*, 2002, 113 (Suppl 1A), 45S-54S.
- [14] Yousefi, M.; Pourmand, M.R.; Fallah, F.; Hashemi, A.; Mashhadi, R.; Nazari-Alam, A. Characterization of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation in Urinary Tract Infection. *Iran. J. Public Health*, 2016, 45(4), 485-493.
- [15] Chiang, C.Y.; Uzoma, I.; Moore, R.T.; Gilbert, M.; Duplantier, A.J.; Panchal, R.G. Mitigating the Impact of Antibacterial Drug Resistance through Host-Directed Therapies: Current Progress, Outlook, and Challenges. *MBio*, 2018, 9(1), e01932-17.
- [16] Borges, A.; Abreu, A.C.; Dias, C.; Saavedra, M.J.; Borges, F.; Simões, M. New Perspectives on the Use of Phytochemicals as an Emergent Strategy to Control Bacterial Infections Including Biofilms. *Molecules*, 2016, 21(7), E877.
- [17] Zacchino, S.A.; Butassi, E.; Liberto, M.D.; Raimondi, M.; Postigo, A.; Sortino, M. Plant phenolics and terpenoids as adjuvants of antibacterial and antifungal drugs. *Phytomedicine*, 2017, 37, 27-48.
- [18] Mnif, S.; Aifa, S. Cumin (*Cuminum cyminum* L.) from traditional uses to potential biomedical applications. *Chem. Biodivers.*, 2015, 12(5), 733-42.

- [19] Singh, R.P.; Gangadharappa, H.V.; Mruthunjaya, K. Cuminum cyminum – A Popular Spice: An Updated Review. *Pharmacogn. J.*, 2017, 9(3), 292-301.
- [20] Özcan, M.; Erkmen, O. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. *Eur. Food Res. Technol.*, 2001, 212, 658-660.
- [21] Allahghadri, T.; Rasooli, I.; Owlia, P.; Nadooshan, M.J.; Ghazanfari, T.; Taghizadeh, M.; Astaneh, S.D. Antimicrobial property, antioxidant capacity, and cytotoxicity of essential oil from cumin produced in Iran. *J. Food. Sci.*, 2010, 75(2), H54-H61.
- [22] Abd El Mageed, M.A.; Mansour, A.F.; El Massry, K.F.; Ramadan, M.M.; Shaheen, M.S.; Shaaban, H. Effect of microwaves on essential oils of coriander and cumin seeds and on their antioxidant and antimicrobial activities. *J. Essent. Oil Bear. Plants*, 2012, 15, 614–627.
- [23] Naveed, R.; Hussain, I.; Tawab, A.; Tariq, M.; Rahman, M.; Hameed, S.; Mahmood, M.S.; Siddique, A.; Iqbal, M. Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against *Salmonella* and other multi-drug resistant bacteria. *BMC Complement. Altern. Med.*, 2013, 13:265.
- [24] Hernández-Ochoa, L.; Aguirre-Prieto, Y.B.; Nevárez-Moorillón, G.V.; Gutierrez-Mendez, N.; Salas-Muñoz, E. Use of essential oils and extracts from spices in meat protection. *J. Food Sci. Technol.*, 2014, 51(5), 957-963.

[25] Rath, S.; Padhy, R.N. Monitoring in vitro antibacterial efficacy of 26 Indian spices against multidrug resistant urinary tract infecting bacteria. *Integr. Med. Res.*, 2014, 3(3), 133-141.

[26] Bag, A.; Chattopadhyay, R.R. Evaluation of Synergistic Antibacterial and Antioxidant Efficacy of Essential Oils of Spices and Herbs in Combination. *PLoS One.*, 2015, 10(7), e0131321.

[27] Reza, Z.M.; Atefeh, J.Y.; Faezeh, F. Effect of  $\gamma$ -Irradiation on the Antibacterial Activities of *Cuminum cyminum* L. Essential Oils In Vitro and In Vivo Systems. *J. Essent. Oil Bear. Plants.*, 2015, 18, 582-591.

[28] Kakarla, P.; Floyd, J.; Mukherjee, M.; Devireddy, A.R.; Inupakutika, M.A.; Ranweera, I.; Kc, R.; Shrestha, U.; Cheeti, U.R.; Willmon, T.M.; Adams, J.; Bruns, M.; Gunda, S.K.; Varela, M.F. Inhibition of the multidrug efflux pump LmrS from *Staphylococcus aureus* by cumin spice *Cuminum cyminum*. *Arch. Microbiol.*, 2017, 199(3), 465-474.

[29] Khalil, N.; Ashour, M.; Fikry, S.; Singab, A.N.; Salama, O. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oilsof selected Apiaceous fruits. *Fut. J. Pharm. Sci.*, 2018, 4, 88-92.

[30] Khurana, N.; Ishar, M.P.; Gajbhiye, A.; Goel, R.K. PASS assisted prediction and pharmacological evaluation of novel nicotinic analogs for nootropic activity in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 2011, 662(1-3), 22-30.

[31] Ferreira, S.B.; Dantas, T.B.; de Figuerêdo Silva, D.; Ferreira, P.B.; de Melo, T.R.; de Oliveira Lima, E. In Silico and In Vitro



Investigation of the Antifungal Activity of Isoeugenol against *Penicillium citrinum*. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2018, 18(25), 2186-2196.

[32] Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.*, 2017, 7, 42717.

[33] Lipinski, C.A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today Technol.*, 2004, 1(4), 337-341.

[34] Drwal, M.N.; Banerjee, P.; Dunkel, M.; Wettig, M.R.; Preissner, R. ProTox: a web server for the *in silico* prediction of rodent oral toxicity. *Nucleic Acids Res.*, 2014, 42, W53-58.

[35] Ferro, T.A.; Araújo, J.M.; dos Santos Pinto, B.L.; dos Santos J.S.; Souza, E.B.; da Silva, B.L.; Colares, V.L.; Novais, T.M.; Filho, C.M.; Struve, C.; Calixto, J.B.; Monteiro-Neto, V.; da Silva, L.C., Fernandes, E.S. Cinnamaldehyde Inhibits *Staphylococcus aureus* Virulence Factors and Protects against Infection in a *Galleria mellonella* Model. *Front. Microbiol.*, 2016, 7, 2052.

[36] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100., 2017.

[37] Zuo, G.Y.; Zhang, X.J.; Han, J.; Li, Y.Q.; Wang, G.C. In vitro synergism of magnolol and honokiol in combination with antibacterial agents against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *BMC Complement. Altern. Med.*, 2015, 15, 425.

[38] Ray, G.T.; Suaya, J.A.; Baxter, R. Microbiology of skin and soft tissue infections in the age of community-acquired methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2013, 76(1), 24-30.

[39] Cardona, A.F.; Wilson, S.E. Skin and soft-tissue infections: a critical review and the role of telavancin in their treatment. *Clin. Infect. Dis.*, 2015, 61(Suppl 2), S69-78.

[40] Gomes, I.B.; Malheiro, J.; Mergulhão, F.; Maillard, J.Y.; Simões, M. Comparison of the efficacy of natural-based and synthetic biocides to disinfect silicone and stainless steel surfaces. *Pathog. Dis.*, 2016, 74(4), ftw014.

[41] Owen, L.; Laird, K.; Wilson, P.B. Structure-activity modelling of essential oils, their components, and key molecular parameters and descriptors. *Mol. Cell Probes.*, 2018, 38, 25-30.

[42] Chen, M.; Yu, Q.; Sun, H. Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, 14(9), 18488-18501.

[43] Chung, P.Y.; Toh, Y.S. Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathog. Dis.*, 2014, 70(3), 231-239.

[44] Vollarò, A.; Catania, M.R.; Iesce, M.R.; Sferruzza, R.; D'Abrosca, B.; Donnarumma, G.; De Filippis, A.; Cermola, F.; DellaGreca, M.; Buommino, E. Antimicrobial and anti-biofilm properties of novel synthetic lignan-like compounds. *New Microbiol.*, 2019, 42(1).

[45] Shayegh, S.; Rasooli, I.; Taghizadeh, M.; Astaneh, S.D. Phytotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque. *Nat. Prod. Res.*, 2008, 22(5), 428-439.

## Lista de Tabelas

**Tabela 1. Estimativa da biodisponibilidade oral do cuminaldeído em comparação com a ciprofloxacina.**

		<b>Cuminaldeído</b>	<b>Ciprofloxacina</b>
<b>Avaliação da biodisponibilidade oral</b>	<b>iLogP</b>	<b>2.03</b>	<b>2.24</b>
	<b>MW</b>	<b>148.20</b>	<b>331.34</b>
	<b>TPSA</b>	<b>17.07</b>	<b>74.57</b>
	<b>nDLH</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
	<b>nADLH</b>	<b>1</b>	<b>5</b>

iLogP: partição coeficiente de água: índice de óleo - lipofilicidade;  
MW: peso molecular; TPSA: área de superfície polar total; nALH: número de ligações de hidrogênio aceitadoras; ndLH número de ligações de hidrogênio do doador

**Tabela 2. Efeitos tóxicos previstos do cuminaldeído em comparação com a ciprofloxacina.**

		<b>Cuminaldeído</b>	<b>Ciprofloxacina</b>
<b>Avaliação de toxicidade</b>	<b>Efeito Mutagênico</b>	<b>Nenhum</b>	<b>Alto</b>
	<b>Efeitos Tumorigênicos</b>	<b>Nenhum</b>	<b>Nenhum</b>
	<b>Efeito Irritantante</b>	<b>Alto</b>	<b>Nenhum</b>
	<b>Hepatotoxicidade</b>	<b>Nenhum</b>	<b>Nenhum</b>
	<b>Efeitos na reprodução</b>	<b>Nenhum</b>	<b>Nenhum</b>
	<b>LD50 (mg/kg)</b>	<b>1,320</b>	<b>2,000</b>
	<b>Classe de Toxicity</b>	<b>4</b>	<b>4</b>

LD50: 50% Dose Letal

**Tabela 3. Absorção estimada de cuminaldeído em comparação com ciprofloxacina.**

		<b>Cuminaldeído</b>	<b>Ciprofloxacina</b>
<b>Absorção prevista</b>	<b>Absorção GI</b>	<b>Alta</b>	<b>Alta</b>
	<b>Permeabilidade BBB</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
	<b>Log K<sub>p</sub></b>	<b>-5.52 cm/s</b>	<b>-9.09 cm/s</b>

GI: absorção gastrointestinal; BBB: barreira hematoencefálica; Log

K<sub>p</sub>: índice de permeabilidade

**Tabela 4. Solubilidade estimada e pontuação da semelhança medicamentosa do cuminaldeído em comparação com ciprofloxacina.**

		<b>Cuminaldeído</b>	<b>Ciprofloxacina</b>
<b>Semelhança de drogas</b>	<b>Log S</b>	<b>-2.81</b>	<b>-3.32</b>
	<b>DL</b>	<b>-11.1</b>	<b>2.07</b>
	<b>DS</b>	<b>0.55</b>	<b>0.55</b>

Log S: solubilidade; DL: semelhança de drogas, DS: pontuação de drogas.

**Tabela 5. Efeitos da ciprofloxacina na formação de biofilme por *S. aureus* e *E. coli*.** Diferentes concentrações de ciprofloxacina (0,0087-0,702 µg / ml) foram utilizadas. Bactérias tratadas com veículo foram usadas como controle.

	<b>Ciprofloxacina (µg/ml)</b>					
	<b>Controle</b>	<b>0.0087</b>	<b>0.026</b>	<b>0.078</b>	<b>0.234</b>	<b>0.702</b>
<b><i>S. aureus</i> viabilidade biofilme (Δ nm)</b>	0.79 ± 0.06	0.625 ± 0.15	0.6925 ± 0.24	0.1925 ± 0.09*	0.06 ± 0.07*	0.0675 ± 0.06*
<b><i>S. aureus</i> massa biofilme (nm)</b>	0.94 ± 0.02	0.78 ± 0.17	0.61 ± 0.60	0.336667 ± 0.57	0.003333 ± 0.05*	0.09 ± 0.16*
<b><i>E. coli</i> viabilidade biofilme (Δ nm)</b>	0.72 ± 0.16	0.23 ± 0.03 *	0.0 ± 0.0	0.024 ± 0.04*	0.035 ± 0.029*	0.0 ± 0.0
<b><i>E. coli</i> massa biofilme (nm)</b>	2.01 ± 0.1	1.29 ± 0.1 *	0.0 ± 0.0	0.005 ± 0.007*	0.005 ± 0.007*	0.0 ± 0.0

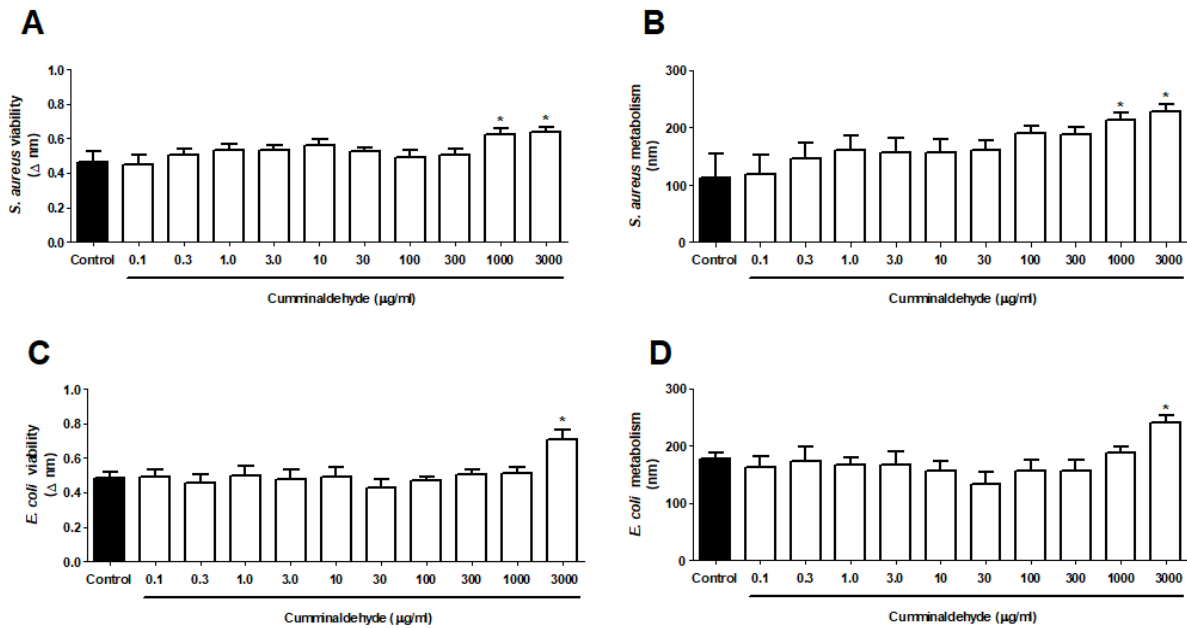
**Table 6. Efeitos da co-incubação de cuminaldeído e ciprofloxacina na formação de biofilme por *S. aureus* e *E. coli*.**

Diferentes concentrações de cuminaldeído (0,1-3,000 µg / ml) foram incubadas com ciprofloxacina (0,026 µg / ml para *S. aureus* e 0,0087 µg / ml para *E. coli*). Bactérias tratadas com ciprofloxacina foram usadas como controle.

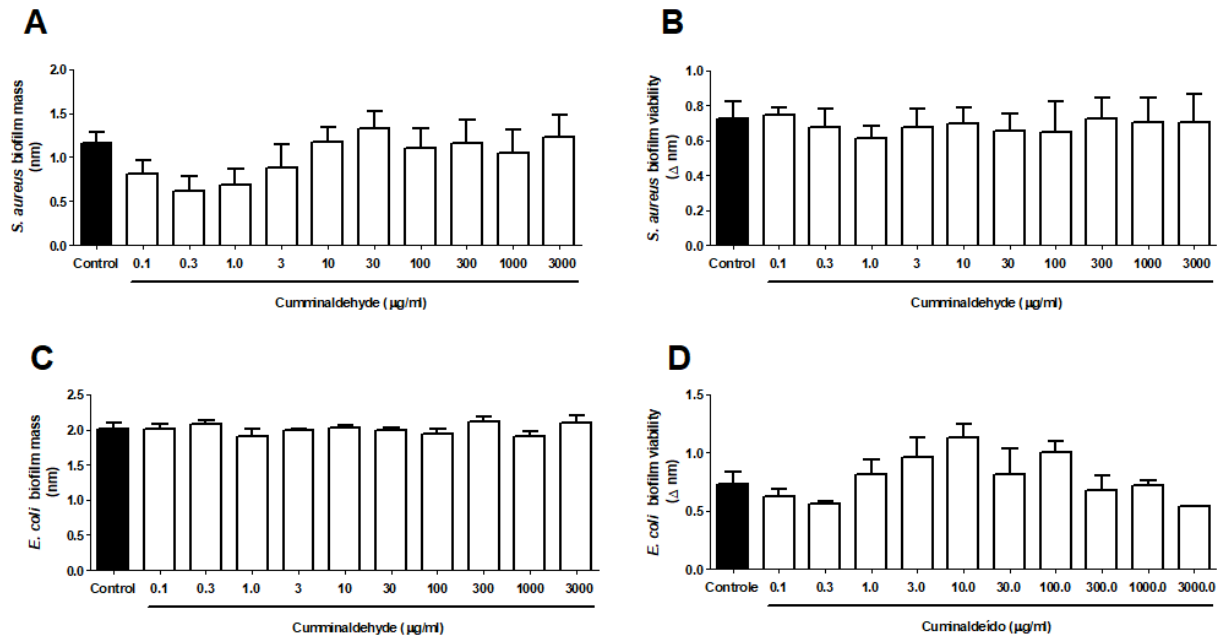
	Cuminaldeído (µg/ml)										
	Controle	0.1	0.3	1.0	3	10	30	100	300	1000	3000
<i>S. aureus</i> viabilidade biofilme (Δ nm)	0.693 ±0.24	0.095 + 0 .085 *	0.190 + 0.12 *	0.135 + 0.12 *	0.155 + 0.14 *	0.145 + 0.13 *	0.170 + 0.17 *	0.220 + 0.22* *	0.155 + 0.15 *	0.140 + 0.13 *	0.105 + 0.07 *
<i>S. aureus</i> massa biofilme (nm)	0.633 ±0.56	0.155 ±0.03 *	0.387 ±0.18 *	0.440 ±0.20 *	0.235 ±0.005 *	0.295 ±0.1 *	0.220 ±0.05 *	0.350 ±0.01* *	0.220 ±0.15 *	0.290 ±0.19 *	0.190 ±0.19 *
<i>E. coli</i> viabilidade biofilme (Δ nm)	0.230 ± 0.03	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.025 ± 0.04 *	0.020 ± 0.03 *	0.023 ± 0.04 *	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.064 ± 0.09 *
<i>E. coli</i> massa biofilme (nm)	1.290 ± 0.10	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.001 ± 0.001 *	0.002 ± 0.002 *	0.0003 ± 0.004 *	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.006 ± 0.008 *



## Lista de figuras



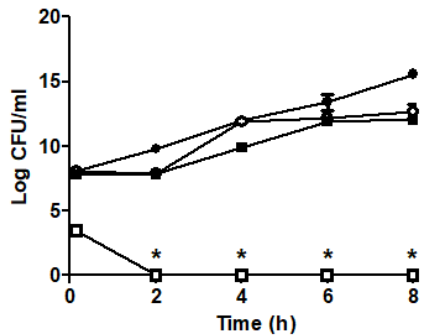
**Figura 1. Efeito in vitro do cuminaldeído na viabilidade e metabolismo de *S. aureus* e *E. coli*.** Diferentes concentrações de cuminaldeído (0,1-3,000 µg / ml) foram incubadas com *S. aureus* ATCC 6538 e *E. coli* ATCC 042, por 24h. Efeitos do cuminaldeído na viabilidade de *S. aureus* (A) e metabolismo (B); e a viabilidade de *E. coli* (C) e metabolismo (D) foram avaliadas. Bactérias tratadas com veículo (2% de DMSO em solução salina) foram utilizadas como controles. \* p < 0,05; difere do grupo controle.



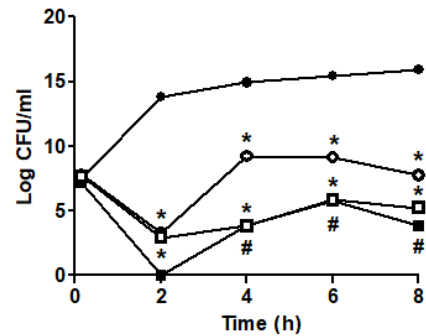
**Figura 2. Efeito in vitro do cuminaldeído na formação de biofilme de *S. aureus* e *E. coli*.** Diferentes concentrações de cuminaldeído (0,1-3,000 µg / ml) foram incubadas com *S. aureus* ATCC 6538 e *E. coli* ATCC 042, por 24h. Efeitos do cuminaldeído na viabilidade do biofilme de *S. aureus* (A) e massa (B); e viabilidade de biofilme de *E. coli* (C) e massa (D) foram avaliadas. Bactérias tratadas com veículo (2% de DMSO em solução salina) foram utilizadas como controles.

**A**

- Control
- Ciprofloxacin (0.026 µg/ml)
- Ciprofloxacin (0.026 µg/ml) + cuminaldehyde (30 µg/ml)
- Ciprofloxacin (0.026 µg/ml) + cuminaldehyde (100 µg/ml)

**B**

- Control
- Ciprofloxacin (0.0087 µg/ml)
- Ciprofloxacin (0.0087 µg/ml) + cuminaldehyde (3 µg/ml)
- Ciprofloxacin (0.0087 µg/ml) + cuminaldehyde (10 µg/ml)



**Figura 3. Efeitos da co-incubação in vitro de cuminaldeído e ciprofloxacina na sobrevivência de biofilme de *S. aureus* e *E. coli*.** Diferentes concentrações de cuminaldeído (foram incubadas com *S. aureus* ATCC 6538 (A) e *E. coli* ATCC 042 (B), por 8h. Bactérias tratadas com veículo (2% de DMSO em salina) foram usadas como controle. \* P <0,05 difere do grupo controle, difere do grupo ciprofloxacina.