

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL SINÉRGICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E ANTIBIÓTICOS FRENTE A CEPAS DE ENTEROBACTÉRIAS OBTIDOS ATRAVÉS DE ISOLADOS CLÍNICOS

MATHEUS HENRIQUE VARGAS¹; KAMILA FURTADO DA CUNHA²; ANGELITA MILECH²; DANIELA RODRIGUIERO WOZEAK²; BEATRIZ BOHNS PRUSKI²; GLADIS AVER RIBEIRO³

¹Universidade Federal de Pelotas – atf17.matheus@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – kamilafurtado1@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – angelitamilech@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – danielarwozeak@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – biapruski@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – gladisaver@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OE) são uns dos extratos vegetais mais utilizados para fins medicinais, sendo este produto natural com variável poder aromatizante, tendo seu uso estimulado pela presença de substâncias ativas biologicamente, de baixa toxicidade e com eficácia contra micro-organismos. As atividades, seja bactericida ou bacteriostática, são dadas por compostos terpenóides e fenilpropanóides e estão ganhando interesse pelo múltiplo uso e potencial biológico devido a sua atividade anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana e antifúngica. (PROBST, 2012)

A combinação de produtos naturais de plantas e drogas sintéticas ainda é limitada, mas os resultados são positivos. Com isso, a utilização de OE junto com antimicrobianos vem ser uma alternativa eficaz no controle de bactérias resistentes aos antibióticos, seja inibindo o micro-organismo ou na interação sinérgica com os antibióticos. (RIBEIRO, 2013)

Bactérias como *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*, pertencentes à família das enterobactérias, fazem parte da microbiota normal dos vertebrados e vivem em relação de comensalismo com o ser humano, porém algumas cepas de *E. coli* podem provocar grande variedade de doenças como diarreias, infecções do trato urinário e podem também causar infecções nosocomiais. (PASTORE, 2014). *Enterobacter aerogenes* é uma espécie comumente isolada de amostras biológicas. Encontra-se presente na água, no solo, no esgoto e está associado a várias infecções oportunistas que afetam as vias urinárias, trato respiratório, feridas cutâneas e podem levar a septicemia e meningite. (SILVA, 2005)

Com isso, o objetivo do trabalho foi verificar o potencial sinérgico entre OE e antibióticos frente a isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli*.

2. METODOLOGIA

Os óleos essenciais e as cepas padrões de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 e *Escherichia coli* ATCC 25922 pertenciam a Bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, do Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Pelotas e os isolados clínicos foram cedidos pelo Laboratório de Bacteriologia do Hospital-Escola da Universidade Federal de Pelotas.

Para a avaliação da sensibilidade das cepas bacterianas aos antibióticos foi utilizado o Teste de Difusão em Disco segundo KIRBY e BAUER (1966). Os

antibióticos utilizados foram: Tetraciclina (30 µg), Cloranfenicol (30 µg), Ácido Nalidíxico (30 µg), Imipenem (10 µg) e Ciprofloxacino (5 µg), os quais foram adicionados em placas contendo Ágar Muller Hinton semeadas previamente com o inóculo ($1,5 \times 10^8$ UFC. mL⁻¹) de cada cepa bacteriana. As placas foram incubadas a 36°C durante 24h. Após a incubação, os halos foram medidos com régua milimetrada e os resultados comparados com uma tabela padrão.

A verificação da atividade biológica dos OE foi realizada segundo o NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2015), com modificações, onde foram adicionados 10 µL dos OE de *Eugenia caryophyllus* S. (cravo botão), *Foeniculum vulgare* M. var. *dulce* (funcho doce), *Citrus reticulata* B. (tangerina cravo), *Eucalyptus citriodora* H. (eucalipto citriodora), *Cedrus atlantica* E. (cedro atlas) e *Elettaria cardamomum* L. (cardamomo) sobre discos de papel filtro estéreis de 6 mm colocados sobre as placas de Ágar Muller Hinton já semeadas com o inóculo. Como controle negativo, foram usados discos de papel filtro esterilizados contendo 10 µL de água destilada estéril e como controle positivo, discos do antibiótico Tetraciclina (30 µg). As placas foram incubadas durante 24h a 36°C e após este período, foi observada a presença ou não de halo ao redor dos discos embebidos com OE.

Para o teste de sinergismo, segundo KIRBY e BAUER (1966), com modificações, foram adicionados 10 µL do OE de *Eugenia caryophyllus* S. (cravo botão) sobre os discos de antibióticos utilizados no teste de antibiograma. Ao final do período de incubação, por 24h a 36°C, foi feita a medição do halo com régua milimetrada e o resultado foi comparado ao resultado do antibiograma a fim de verificar o efeito do OE.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no antibiograma estão indicados na Tabela 1.

Tabela 1: Perfil de sensibilidade dos isolados de *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli* frente aos antibióticos testados.

	NAL	CLO	CIP	IMP	TET
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	S	S	S	S	S
<i>E. aerogenes</i> I	R	I	R	R	S
<i>E. aerogenes</i> II	R	I	R	R	S
<i>E. coli</i> ATCC 25922	S	S	S	S	S
<i>E. coli</i> I	R	S	S	S	S
<i>E. coli</i> II	S	S	S	S	S

NAL: Ácido Nalidíxico (30 µg); CLO: Cloranfenicol (30 µg); CIP: Ciprofloxacino (5 µg); IMP: Imipenem (10 µg); TET: Tetraciclina (30 µg); S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente.

Os OE de *Eugenia caryophyllus* S. (cravo botão) e *Foeniculum vulgare* M. var. *dulce* (funcho doce) apresentaram atividade biológica frente as bactérias testadas, resultados semelhantes aos de PEREIRA *et al* (2014) onde o OE de cravo também apresentou atividade. Em nosso estudo, o OE de *Citrus reticulata* B. (tangerina cravo) não demonstrou atividade inibitória frente às enterobactérias testadas.

É importante salientar que no teste com OE houve a presença de colônias satélites nas cepas *E. aerogenes* I e *E. aerogenes* II, o que pode indicar a existência de uma diversidade populacional entre os isolados clínicos que foram testados. Os resultados do teste de sinergismo estão indicados na Tabela 2, abaixo representado.

Tabela 2: Resultado do potencial sinérgico do OE de *Eugenia caryophyllus* S. (cravo botão) frente a cepas de *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli*.

	NAL	CLO	CIP	IMP	TET
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	-	+	-	-	-
<i>E. aerogenes</i> I	X	+	+	+	-
<i>E. aerogenes</i> II	X	+	+	+	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	+	-	-	X
<i>E. coli</i> I	+	+	X	+	X
<i>E. coli</i> II	-	+	X	+	X

NAL: Ácido Nalidíxico (30 µg); CLO: Cloranfenicol (30 µg); CIP: Ciprofloxacino (5 µg); IMP: Imipenem (10 µg); TET: Tetraciclina (30 µg); +: Ação sinérgica; -: Ação antagônica; X: Ausência de ação.

Visto os resultados apresentados, podemos analisar que o OE de *Eugenia caryophyllus* S. (cravo botão) apresentou variação na atividade biológica demonstrando ação sinérgica quando usada em conjunto com o antibiótico Cloranfenicol frente às cepas testadas, potencializando a atividade antibacteriana e corroborando com o trabalho de MENDES (2011), o qual demonstrou que a utilização deste OE juntamente com este antibiótico, auxilia na inibição do micro-organismo. A ação inibidora desse óleo foi observada quando confrontado com Tetraciclina, cuja ação foi reduzida diante das enterobactérias testadas neste estudo. Devido à ação antagônica em algumas cepas, NASCIMENTO *et al* (2007) explica que devido a difusão irregular dos óleos no ágar, causa regiões com atividade antimicrobiana variável, devido aos seus componentes lipofílicos.

A composição dos OE pode variar de acordo com a espécie vegetal e com fatores ambientais. Além disso, acredita-se que devido à hidrofobicidade, pode-se ter ação terapêutica devido à ação na dupla camada lipídica da membrana, o que facilitaria a permeabilidade dos antibióticos à célula. (LUCENA, 2015)

A origem das linhagens bacterianas testadas pode influenciar a ação dos OE e na sua interação com os antibióticos, devido às características estruturais da bactéria. Geralmente bactérias gram-negativas apresentam menor sensibilidade quando expostas aos OE, acredita-se que seja devido à presença de membrana externa, composta por lipopolissacarídeos presente neste tipo de bactérias, pois confere certa impermeabilidade aos compostos antibacterianos atribuindo maior resistência dessas bactérias a ação antibacteriana. (PROBST, 2012)

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o OE de *Eugenia caryophyllus* S. (cravo botão) apresentou ação sinérgica, quando usada em conjunto com o Cloranfenicol e ação antagônica quando associada à Tetraciclina, frente às cepas testadas de *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli*. O uso de produtos naturais, em combinação com antibióticos, deve continuar sendo estudado com o intuito de aumentar o potencial antimicrobiano de fármacos, sendo necessária a realização de novos testes a fim de comprovar esta eficácia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUER, A.W.M.M.; KIRBY, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.3, p. 493-496, 1966.

LUCENA, B. F. F.; TINTINO, S. R.; FIGUEREDO, F. G.; OLIVEIRA, C. D. M.; AGUIAR, J. J. S.; CARDOSO, E. N. C.; AQUINO, P. E. A.; ANDRADE, J. C.; COUTINHO, H. D. M.; MATIAS, E. F. F. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Acta Biologia Colombiana**, Bogotá, v. 20, n.1, p. 39-45, 2015.

MENDES, J. M. **Investigação da Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de *Eugenia caryophyllata* Thunb. sobre cepas de *Candida tropicalis***. 2011. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Universidade Federal da Paraíba.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; JÚNIOR, A. M. B.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. São Paulo, v. 17, n.1, p. 108-113, 2007.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved standard M7-A10, 2015.

PASTORE, A. P. W. **Análise da resistência a antimicrobianos e determinação dos grupos filogenéticos em isolados de *Escherichia coli* de origem ambiental, humana e animal**. 2014. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PEREIRA, A. A.; PICCOLI, R. H.; BATISTA, N. N.; CAMARGOS, N. G.; OLIVEIRA, M. M. M. Inativação termoquímica de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica* Enteritidis por óleos essenciais. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.44, n. 11, p. 2022-2028, 2014.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação do potencial sinérgico**. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Curso de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista.

RIBEIRO, D. S.; VELOZO, E. S.; GUIMARÃES, A. G. Interação entre o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e drogas antimicrobianas no controle de bactérias isoladas de alimentos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. Gurupi, v.4, n.1, p.10-19, 2013.

SILVA, J. B. **Análise do perfil de sensibilidade a antimicrobianos, similaridade genética e adequação da terapia antimicrobiana em amostras de *Enterobacter* spp. resistentes à cefalosporina de quarta geração isoladas em hemoculturas no Hospital São Paulo**. 2005. Tese (Mestrado em Ciências Básicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Escola de Medicina, Universidade de São Paulo.