

## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL SINÉRGICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E ANTIBIÓTICOS FRENTE A ISOLADOS CLÍNICOS DE *Proteus* SPP.

ANGELITA MILECH<sup>1</sup>; KAMILA FURTADO DA CUNHA<sup>2</sup>; MATHEUS HENRIQUE VARGAS<sup>2</sup>; PRISCILA KRUGER VOIGT<sup>2</sup>; GLADIS AVER RIBEIRO<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – angelitamilech@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – kamilafurtado1@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – atf17.matheus@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – privoigt@hotmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – gladisaver@hotmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OEs) apresentam atividade contra uma ampla variedade de agentes infecciosos como vírus, fungos, protozoários e bactérias. Os compostos e suas concentrações presentes nos OE's variam de acordo com a espécie considerada, as condições de coleta e extração, e as partes da planta utilizadas. Os principais compostos isolados dos óleos essenciais são terpenos e seus derivados oxigenados, terpenoides, incluindo os compostos fenólicos (Solórzano-Santos e Miranda-Novales, 2011).

Bactérias do gênero *Proteus* são bacilos Gram- negativos pertencentes a família Enterobacteriaceae, encontrada na microbiota entérica de humanos e demais animais. Infecções do trato urinário (cistite, pielonefrites), particularmente de origem nosocomial oriundas de cateter urinário, são as principais manifestações clínicas descritas em humanos pelo gênero *Proteus*, sendo *P.mirabilis* a espécie isolada com maior frequência em humanos, principalmente em infecções urinárias e de feridas (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

Em razão ao aumento da resistência bacteriana à múltiplas drogas antimicrobianas surge a preocupação e a procura de novas alternativas terapêuticas, onde as plantas medicinais representam uma importante fonte para obtenção destes medicamentos. Neste caso, uma nova forma de terapia seria a combinação de terapia antimicrobiana sinérgica entre agentes antimicrobianos conhecidos e extratos de plantas bioativas. Segundo CHANDRA e RAKHOLIYA, (2011), a terapia da combinação entre extratos de plantas e antibióticos, pode expandir o espectro antimicrobiano, evitar o aparecimento de resistência mutante além de minimizar a toxicidade.

Embora haja vários estudos indicando a efetividade do uso destes OEs, a composição química, componentes majoritários e mecanismo de ação. Há uma escassez de informações sobre sinergismo envolvendo estes OEs. Visto isto, este estudo se faz importante e tem como o objetivo verificar o potencial sinérgico dos óleos essenciais de *Origanum majorana* L. e *Ocimum basilicum* L. frente a cepas de *Proteus spp.* de origem clínica.

### 2. METODOLOGIA

Os óleos essenciais de *Origanum majorana* L. (Manjerona) e *Ocimum basilicum* L. (Manjericão), pertenciam ao Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, do Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Pelotas e as três cepas de *Proteus mirabilis* (P1,P2,P3) oriundas de isolados clínicos foram cedidos pelo laboratório de Análises Clínicas do Hospital escola da Universidade Federal de Pelotas.

Os testes de Antibiógrama foram realizados de acordo com a Técnica de Difusão em Disco segundo KIRBY e BAUER (1966). Os antibióticos utilizados foram: Cefalexina (30 µg), Ceftazidima (30 µg), Sulfazotrim (25 µg), Aztreonam (30 µg), Ácido Nalidixico (30µg), Cloranfenicol (30 µg), Gentamicina (10 µg), Tetraciclina (30 µg), os quais foram adicionados em placas contendo Ágar Muller Hinton semeadas com o inóculo ( $1,5 \times 10^8$  UFC. mL<sup>-1</sup>) de cada cepa bacteriana.

A metodologia para a verificação da atividade biológica dos OEs foi realizada segundo "Clinical and Laboratory Standard Institute" (CLSI, 2016), com modificações, onde foram adicionados 10 µL do OE em estudo sobre discos de papel filtro de 6mm estéreis colocados sobre as placas de Ágar Muller Hinton já semeadas com o inóculo ( $1,5 \times 10^8$  UFC. mL<sup>-1</sup>), tendo como controle negativo, discos de papel filtro contendo 10 µL de água destilada estéril, e como controle positivo discos do antibiótico Cloranfenicol (30 µg).

Para o teste de sinergismo, a metodologia usada foi adaptada de KIRBY e BAUER (1966), onde foi adicionado 10 µL dos óleos essenciais sobre os discos de antibióticos utilizados. Porém, o óleo essencial de manjerona foi diluído com Tween 80 na proporção de 1/1 v/v (Nascimento et al., 2007) afim de diminuir sua concentração. Após isso, ambos os testes foram incubados por 24h a 36°C.

Ao fim do período de incubação, para a leitura do teste de antibiógrama, foi feita a medição do halo com régua milimetrada e o resultado foi comparado à tabela padrão para verificar o grau de sensibilidade das bactérias testadas. O teste de sinergismo foi comparado ao resultado do antibiógrama a fim de verificar a ação do OE.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o antibiógrama realizado, as três cepas testadas mostraram resistência a tetraciclina. P1 demonstrou resistência também ao Sulfazotrim e Ácido Nalidixico, sendo que à este último P3 não mostrou sensibilidade. As cepas P2 e P3 apresentaram resistência também à Cefalexina e ceftazidima. Aos demais antibióticos todos isolados demonstraram-se sensíveis ou intermediários.

Diante dos resultados apresentados na tabela 1, a combinação do OE de *O. basilicum* com antibióticos é possível notar que houve ação sinérgica do OE de manjerição com o antibiótico Tetraciclina, aumentando o halo de inibição, inclusive modulando sua sensibilidade frente às cepas. O gênero *Proteus*, particularmente *P. mirabilis* apresenta resistência intrínseca às tetraciclina e nitrofurantoínas (O'HARA et al., 2000). Este resultado positivo demonstra que a combinação de Tetraciclina e OE de *O. basilicum* tem ação sinérgica eficaz.

Estudos de Trajano et al (2009), com vários OEs de especiarias testados em micro-organismos, relataram que o OE de manjerição mostrou-se inibidor do crescimento de bactérias como *Escherichia coli* também pertencente a família enterobacteriaceae. O presente estudo onde tanto separadamente ou associado aos antibióticos, o OE de manjerição demonstrou resultados satisfatórios vai de encontro aos resultados obtidos aos dos autores acima.

Com o resultado exposto na tabela 2 referente ao uso do OE de *O. majorana* L. nota-se que os antibióticos Ceftazidima e Cloranfenicol combinados com este OE potencializaram a ação dos antibióticos, bem como a combinação destes antimicrobianos e o OE de *O. basilicum* L. Isso se deve provavelmente ao fato de *Origanum majorana* L. e *Ocimum basilicum* L. permanecerem a mesma família botânica Lamiaceae tendo similaridade em seus componentes.

Tabela 1: Potencial sinérgico do OE de *O. basiculim* L. (manjerição) sobre antibióticos frente à isolados de *Proteus* spp.

Antimicrobianos								
	CFE	CAZ	SUT	ATM	NAL	CLO	GEN	TET
<b><i>P. mirabilis</i> 1</b>	0	+	+	+	+	+	0	+
<b><i>P. mirabilis</i> 2</b>	0	+	-	+	0	+	+	+
<b><i>P. mirabilis</i> 3</b>	+	+	0	+	+	+	-	+

CFE= Cefalexina, CAZ= Ceftazidima, SUT= Sulfazotrim, ATM= Aztreonam, NAL= Ácido Nalidixico, CLO= Cloranfenicol, GEN= Gentamicina, TET= Tetraciclina; + = ação sinérgica; - = ação antagônica; 0 = sem ação.

Tabela 2: Potencial sinérgico do OE de *O. majorana* L. (manjerona) sobre antibióticos frente à isolados de *Proteus* spp.

Antimicrobianos								
	CFE	CAZ	SUT	ATM	NAL	CLO	GEN	TET
<b><i>P.mirabilis</i> 1</b>	0	+	+	+	+	+	+	0
<b><i>P.mirabilis</i> 2</b>	+	+	-	+	-	+	-	+
<b><i>P.mirabilis</i> 3</b>	+	+	-	-	0	+	0	0

CFE= Cefalexina, CAZ= Ceftazidima, SUT= Sulfazotrim, ATM= Aztreonam, NAL= Ácido Nalidixico, CLO= Cloranfenicol, GEN= Gentamicina, TET= Tetraciclina; + = ação sinérgica; - = ação antagônica; 0 = sem ação.

O resultado da combinação do OE de manjerona com os antibióticos utilizados é apresentado na tabela 2, onde podemos observar que este OE exerceu ação antagônica sobre as cepas P2 e P3, isso se deve possivelmente à diluição feita com Tween 80. Segundo Nascimento (2007) os emulsificadores podem agir antagônica ou sinergicamente aos componentes ativos do OE. Altas concentrações de Tween, por exemplo, podem aumentar a atividade antibacteriana produzindo resultados falso-positivos ou reduzir a bio-atividade do óleo, esse último efeito é, possivelmente, causado pela formação de micelas que dificultariam o contato direto do óleo com os microrganismos (Takarada et al., 2004;).

A maior parte das combinações dos antimicrobianos com os OEs potencializaram a ação dos antibióticos, por vezes, até modulando seu perfil de sensibilidade. Podemos retribuir este feito ao fato do OE de *O. majorana* L. ser rico em compostos bioativos como terpinen-4-ol, sabineno, acetato de linalol,  $\gamma$ -terpineno e linalol. Estes compostos exibem atividade antibacteriana elevada e amplo espectro de ação (Sellami, et al., 2009). Em adição o gênero *Ocimum* é conhecido por possuir uma gama de atividades biológicas, tais como repelente de insetos, inibidora de nematóides, antibacteriana, antifúngica e atividades antioxidantes (Lee et al., 2005).

#### 4. CONCLUSÕES

Com este estudo é possível inferir que os óleos essenciais de *Origanum majorana* L. e *Ocimum basilicum* L. combinados com antibióticos apresentam potencial antibacteriano frente a cepas de *Proteus* spp. testadas, demonstrando efeito modulador sinérgico. Porém, mais estudos são necessários para

compreender a associação adequada dos fármacos com os óleos, para assim utilizá-los como forma terapêutica eficaz no combate de infecções.

## 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.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE/NCCLS. (2011). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first informational supplement. **CLSI/NCCLS document M 100-S21** Wayne, PA.

CHANDA, S.; RAKHOLIYA. Combination therapy: Sinergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. **Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. V. 1, n.13, p. 520-529, 2011.

HOOD JR, WILKINSON JM, CAVANAGH HMA 2003. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. **J Essent Oil Res** 15: 428-433.

LEE, S.J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v.91, n.1, p.131-7, 2005.

NASCIMENTO PFC, NASCIMENTO AC, RODRIGUES CS, ANTONIOLLI AA, SANTOS PO, BARBOSA JUNIOR AM, TRINDADE R.C 2007. Antimicrobial activity of the essential oils: a multifactor approach of the methods. **Rev Bras Farmacogn** 17: 108- 113.

O'HARA, C.M.; BRENNER, F.W.; MILLER, J.M. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.4, p.534-546, 2000.

SELLAMI, I. H.; WANNES, W. A.; BETTAIEB, I.; BERRIMA, S.; CHAHED, T.; MARZOUK, B.; LIMAM, F. (2011). Qualitative and quantitative changes in the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves as affected by different drying methods. **Food Chemistry**. P. 691-697.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M.G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Curr Opin Biotech**. 23:1-6, 2011.

TAKARADA K, KIMIZUKA R, TAKAHASHI N, HONMA K, OKUDA K, KATO T 2004. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. **Oral Microbiol Immunol** 19: 61-64.

TRABULSI, L.R., ALTHERTHUM, F. (2005) **Microbiologia**. Editora Atheneu, São Paulo, 4ª edição.