

Toxicidade celular e efeito da associação de antibióticos com óleo essencial de *O. vulgare* em isolados de *Pseudomonas*

Eduarda Aléxia Nunes Louzada Dias Cavalcanti¹; Niele Verteg²; Karina Affeldt Guterres³; Cristine Cioato da Silva⁴; Silvia Regina Leal Ladeira⁵; Marlete Brum Cleff⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – nuneslouzadadias@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – niele.versteg@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – guterres.karina@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas– criscioato@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas– s.ladeira@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas– marletecleff@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Extratos de plantas e óleos essenciais (OE), são há muito tempo utilizados no tratamento de enfermidades (MAHESH; SATISH, 2008). Muitas propriedades das plantas vêm sendo analisadas em diversas áreas, tendo recebido atenção especial a atividade antimicrobiana, e o potencial frente a microrganismos resistentes aos antibióticos, como no caso da planta *Origanum vulgare*, também conhecida como orégano, utilizada frequentemente como condimento, e estudada quanto a atividade antimicrobiana (GUTERRES, 2015; SILVA, 2016).

As doenças causadas por bactérias na clínica veterinária são comuns, sendo o gênero *Pseudomonas*, frequentemente isolado de cães (ARAIS, 2013) e considerado a bactéria Gram negativa de maior prevalência em otites (OLIVEIRA et al., 2012). Segundo trabalhos da área, 34,9% dos isolados de *Pseudomonas* apresentam múltiplaresistência aos antimicrobianos utilizados (OLIVEIRA et al., 2012).

Dentre os antibióticos amplamente utilizados na clínica, estão os β-lactâmicos, como as penicilinas, entretanto esta classe de antimicrobianos vem demonstrando progressiva ineeficácia frente a microrganismos resistentes. Logo, se faz necessário a busca por alternativas terapêuticas eficazes frente às bactérias. Assim, o presente trabalho teve como objetivo verificar o possível sinergismo do óleo essencial de *Origanum vulgare* (OEOV) com antibióticos β-lactâmicos, utilizados em isolados de *Pseudomonas* spp. resistentes a estes antibióticos, e verificar a citotoxicidade do óleo essencial *in vitro*.

2. METODOLOGIA

Os isolados de *Pseudomonas* spp. foram coletados utilizando swab estéril de secreções de cães, atendidos no Hospital de Clínicas Veterinária e

Ambulatório Ceval da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). O material foi semeado em placas de Petri com Ágar Sangue e Ágar MacConkey e incubado em estufa a 37°C, por 24 horas, no Laboratório de Bacteriologia - UFPel. Foram identificados quanto ao gênero e espécie através de provas bioquímicas, e alguns isolados confirmados pelo método automatizado Vitek®. Após a identificação, foram realizados antibiogramas em Ágar Mueller-Hinton, na técnica de KIRBY-BAUER (1966), utilizando-se de 0,5 na Escala de McFarland de cada bactéria a ser analisada. A resistência ou suscetibilidade antimicrobiana foi analisada pela formação dos halos de inibição de crescimento e o seu diâmetro medido com auxílio de uma régua (mm). Os antibióticos utilizados para o teste de susceptibilidade *in vitro* foram cefalexina (30 mcg), ampicilina (10 mcg) e amoxicilina com clavulanato (20/10 mcg).

A obtenção do OEOV se deu a partir da obtenção da planta de distribuidores comerciais, com certificação de origem e qualidade. Sendo extraído através da submissão das folhas secas ao arraste de vapor em aparelho Clevenger, segundo a Farmacopéia Brasileira IV.

A técnica de KIRBY-BAUER (1966) também foi utilizada para avaliar a susceptibilidade dos isolados de *Pseudomonas* spp. ao OEOV e para avaliar a associação dos antimicrobianos com o óleo. Os mesmos antimicrobianos utilizados para determinação da resistência de *Pseudomonas* spp. foram utilizados, sendo que 20 µL de OEOV foram utilizados na concentração de 250 µg/mL, associados com discos de antibiótico distribuídos no meio sólido.

A citotoxicidade foi avaliada utilizando a linhagem celular MDBK (rim bovino) (Laboratório de Virologia/LABVIR – UFPel). As células foram mantidas em MEM (meio essencial mínimo), acrescido de antibiótico, antifúngico e soro fetal bovino e armazenadas a 37°C com atmosfera úmida com 5% de CO₂. Para os testes, as células foram semeadas em triplicata em placas de 96 poços, sendo adicionado o óleo nas concentrações seriadas de 250 a 0,2441 µg/mL.

Para emulsificação dos óleos com o meio de cultura foi utilizado Tween 20 em uma concentração de 1%. Mantido incubado por 24 horas a 37°C com 5% de CO₂, a viabilidade celular foi avaliada utilizando o MTT, com posterior leitura em espectrofotômetro (540 nm) (MOSMANN, 1983). As concentrações dos óleos foram classificadas de acordo com MAHMOUD et al. (2011), levando em consideração o potencial tóxico, sendo considerada citotoxicidade alta, quando a viabilidade celular estiver entre 1 e 50%; toxicidade moderada se a viabilidade

celular ficar entre 51 e 75% e baixa toxicidade, quando a viabilidade celular estiver entre 76 e 100%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 13 bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, destas, 11 foram classificadas como *Pseudomonas aeruginosa*. Estes isolados ao serem submetidos ao teste de antibiograma apresentaram percentual de resistência de 100% frente à Amoxicilina+Clavulanato e Cefalexina, 84,6% para Ampicilina.

Quando utilizado sozinho frente as bactérias o óleo essencial (OEOV) apresentou como média um halo de inibição de 11,61mm. Nas 3 associações do OEOV com os antibióticos houveram aumento de halo \geq 7,69mm, sendo as maiores diferenças observadas utilizando Ampicilina e Cefalexina, com aumento do halo de 7,85mm. O sinergismo entre os antibióticos e o OEOV promoveu aumento dos halos de 0mm para 7,85mm no caso de Cefalexina; 2,54mm para 10,39mm no uso de Ampicilina; 3,92mm para 11,61mm com Amoxicilina + Clavulanato.

Rotineiramente utilizados na clínica, os β -lactâmicos são indicados para uma gama de infecções bacterianas. Possui amplo espectro de ação, agindo assim sobre diversos microrganismos, incluindo os Gram negativos, como o gênero *Pseudomonas* (PEREIRA, 2009), porém apresenta crescente resistência a diferentes antibióticos, e uma sensibilidade frente aos óleos essenciais (GUTERRES, 2015), permitindo que associações sejam testadas a fim de se possibilitar um tratamento eficaz e aplicação prática destes.

O teste de toxicidade celular é importante para avaliar o potencial de aplicabilidade *in vivo*. Neste experimento, obteve-se para a maior concentração (250 μ g/mL) uma viabilidade celular de 11,16% e para a menor concentração (0,24 μ g/mL) uma viabilidade celular de 49,82%, sendo na maior concentração mais citotóxico que o Tween 20, comparando-se a média de células viáveis, podendo ser classificado como alta toxicidade.

Em experimento realizado por SILVA (2016), ao testar o OEOV, encontrou baixa toxicidade em células MDBK, sendo as concentrações efetivas e não tóxicas do óleo essencial de OEOV ficando entre 490 e 245 μ g/mL, concentrações muito superiores às utilizadas neste experimento, evidenciando a toxicidade elevada do óleo neste estudo, o que pode ser explicado pelo lote e consequentemente composição química diferentes.

4. CONCLUSÕES

A associação do OEOV e antibióticos β -lactâmicos apresentou sinergismo, potencializando suas ações, sendo observado pelo aumento dos halos inibitórios frente ao gênero *Pseudomonas*. Entretanto, o potencial citotóxico sugere novas pesquisas a fim de se obter um perfil que sirva como uma possível alternativa futura nos casos de microrganismos resistentes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAIS, L. R. Resistência aos antimicrobianos, pesquisa de exotoxinas e relação genética de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de otite externa e piôdermite canina. 2013. Tese (Doutorado em Clínica e Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense.
- GUTERRES, K. A. Microrganismos de lesões cutâneas de pequenos animais: Resistência a antimicrobianos e bioprospecção de extratos de plantas da família Lamiaceae e Fabaceae. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.
- MAHESH, B; SATISH, S. Antimicrobial activity of some important medicinal plants against plant and human pathogens. World J Agric Sci. 2008; 4: 839-843.
- MAHMOUD, T.S.; MARQUES, M.R.; PESSOA, C.O. et al. In vitro cytotoxic activity 1 Brazilian Middle West plant extracts. Rev. bras. farmac, v.21,3, p.456-464, 2011.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. J Immunol Methods, v.65, p.55-63, 1983.
- OLIVEIRA, V. B. et al. Etiologia, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e aspectos epidemiológicos na otite canina: estudo retrospectivo de 616 casos Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2367-2374, nov./dez. 2012.
- PEREIRA, D.M.; CLIMENI, B. S.O.; DELLIBERA, F.L.; MONTEIRO, M.V.; BAZAN, C.T. Cefalosporinas: Sua origem, uso e função em animais de grande e pequeno porte. Revista científica eletrônica de medicina veterinária. 2009 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça. Graça/ SP. n.12.
- SILVA, C. C. Estudo retrospectivo de melanomas cutâneos caninos e determinação da atividade citotóxica de produtos vegetais frente a células neoplásicas (B16F10) e não neoplásicas (MDBK). 2016. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.