

## ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEO ESSENCIAL FRENTE A BIOFILME FORMADO POR *Pseudomonas aeruginosa* EM SONDA HOSPITALAR

CRISTIANE TELLES BAPTISTA<sup>1</sup>; EDILA MARIA KICKHOFEL FERRER<sup>2</sup>; LUIZE  
GARCIA DE MELO<sup>2</sup>; ANALICE BARCELLOS BALHEGO<sup>2</sup>; JANICE LUEHRING  
GIONGO<sup>2</sup>; RODRIGO DE ALMEIDA VAUCHER<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – cris-baptista @outlook.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – edila.ferrer@gmail.com

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

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – cris-baptista @outlook.com

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

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

### 1. INTRODUÇÃO

Os biofilmes são responsáveis por cerca de 80% das infecções hospitalares resistentes aos antimicrobianos usuais. A grande maioria dos micro-organismos está associada a problemas relacionados a dispositivos médicos, como, cateteres e sondas (VERGIDIS; PATEL, 2012). Além disso, os custos com os tratamentos excedem \$ 350 milhões por ano, o que evidencia a urgência da situação (LO et al., 2014).

Alguns micro-organismos apresentam alta capacidade de formar biofilme, entre eles destaca-se *Pseudomonas aeruginosa*, um patógeno com extensa difusão detectado no meio ambiente, nas superfícies de plantas, no solo, na água e podem fazer parte da microbiota intestinal em seres humanos, ou seja, com vasta ubiquidade (DE FREITAS et al., 2018). Este agente apresenta resistência antimicrobiana natural ou adquirida, devido a fatores como a capacidade metabólica flexível e seu genoma que codifica uma série de genes de resistência como os sistemas de efluxo da família RND - resistance-nodulation-cell division (MULCAHY et al., 2014).

Ao longo dos anos, a busca por alternativas terapêuticas oriundas de plantas medicinais, vem aumentando gradativamente e, com isso, diversos estudos utilizando óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas e medicinais, vêm mostrando suas atividades antimicrobianas, como é o caso do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris L*) e seu constituinte majoritário timol (SANCHEZ et al., 2010).

Considerando que a resistência antimicrobiana como uma problemática de grande impacto na saúde pública, este estudo objetivou avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial de tomilho e seu constituinte majoritário (timol) frente a biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PA01 em material hospitalar.

### 2. METODOLOGIA

Para a realização deste estudo, foi utilizada cepa de *P. aeruginosa* pertencente à bacterioteca do Laboratório de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos (LaPeBBioM), Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

A quantificação da formação de biofilme através da coloração de cristal violeta foi realizada da seguinte forma: em cada tubo contendo o material médico

hospitalar adicionou-se 3 mL de caldo BHI, juntamente com 150  $\mu$ L de inóculo de cada suspensão de micro-organismo e adicionado o óleo e/ou constituinte majoritário nas concentrações correspondentes à CIM,  $\frac{1}{2}$  CIM e 2x CIM (14,50 $\mu$ g/ml, 29,01 $\mu$ g/ml, 58,02 $\mu$ g/ml, respectivamente, tanto para o tomilho quanto para o timol) para testar a eficácia dos mesmos na inibição de formação dos biofilmes. Os controles negativos foram tubos com caldos BHI apenas. Já os controles positivos, continham apenas inóculo e BHI caldo. Os tubos foram incubados a 37°C por 48 horas (SANDBERG et al., 2008 com adaptações).

Passado o tempo, a suspensão de micro-organismos foi aspirada e a sonda foi lavada 3 vezes com 2mL de solução fisiológica a 0,9% estéril e logo após foi transferida para outro tubo estéril. Após, foi realizada a fixação do biofilme em estufa a 60°C por 60 minutos. As sondas foram coradas com 2mL de solução de cristal violeta de Hucker 1% durante 15 minutos, lavadas 5 vezes com solução fisiológica a 0,9% estéril após foi adicionado 2mL de Etanol 95% por 10 minutos. Após foi feita a transferência em triplicata, de 200 $\mu$ L de cada tubo para placas de 96 poços e realizada a leitura da absorbância em leitor de microplacas (Rosys Anthos 2010) em comprimento de onda de 492nm (TOMARAS et al., 2003 com adaptações).

Para os ensaios as análises foram realizadas por ANOVA de 1 via, seguida pelo teste de Dunnett. O nível de significância foi fixado em 5%. Os gráficos foram realizados no software graphpad prism (Graphpad Software, INC).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antibiofilme para a espécie testada demonstrou que houve sensibilidade aos compostos utilizados e suas concentrações (CIM,  $\frac{1}{2}$  CIM e 2x CIM), isso pode ser evidenciado na **figura 1**.

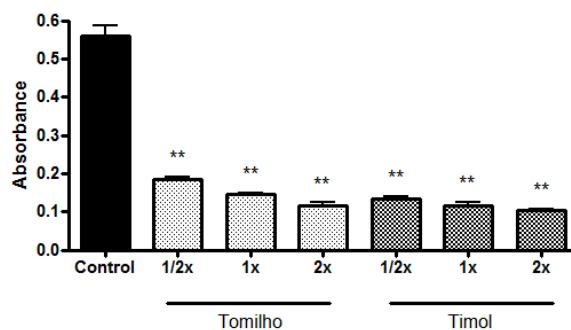


Figura 1: Índices de formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa PA01) após tratamento com óleo de tomilho e seu constituinte timol. O nível de significância de 5%. \*\* P < 0,01.

Previvamente, Kozics e colaboradores (2019), demonstraram a atividade antimicrobiana de dez óleos essenciais – orégano, tomilho, cravo, arborvitae, cássia, capim-limão, melaleuca, eucalipto, lavanda e sálvia – contra microrganismos resistentes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter koseri* e *Klebsiella pneumoniae* e duas leveduras resistentes (*Candida albicans* e *Candida parapsilosis*).

Mohsenipour et al., (2015), também examinaram o efeito de extratos de tomilho na forma planctônica e nas estruturas do biofilme de seis bactérias patogênicas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseu-*

domonas aeruginosa, sorotipo patogênico de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) e fungo *Candida albicans*. Os resultados encontrados pelos autores sugerem que os extratos de tomilho podem ser aplicados como agentes antimicrobianos contra as bactérias patogênicas, particularmente nos biofilmes formulários.

Assim como, estudos realizados por Sakkas et al., (2016) investigou a atividade antimicrobiana de cinco óleos essenciais de plantas sobre bactérias Gram-negativas multirresistentes. Dentre os óleos utilizados estão manjericão, azul de camomila, origanum, tomilho e óleo de melaleuca. As bactérias utilizadas foram *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Nossos estudos se assemelham aos de Mohsenipour et al., (2015) e Sakkas et al., (2016), visto que para *P. aeruginosa* o percentual de redução dos biofilmes foram bem significativos como mostra a figura 1. Tanto o óleo essencial de tomilho como seu constituinte majoritário timol apresentaram resultados bem promissores

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados mostram que óleos essenciais podem ser eficazes na prevenção do crescimento de microrganismos resistentes, assim como na formação de biofilme. Apesar de os resultados obtidos até o momento demonstrarem-se promissores, eles permitem apenas um entendimento preliminar acerca da atividade do óleo essencial e seu principal constituinte majoritário frente ao micro-organismo já citado.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VERGIDIS, P. ; PATEL, R. Novel Approaches to the Diagnosis, Prevention, and Treatment of Medical Device-Associated Infections. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, vol.26, n.1, pp. 173-186, 2012.

LO, J.; LANGE, D.; CHEW, B. Ureteral Stents and Foley Catheters-Associated Urinary Tract Infections: The Role of Coatings and Materials in Infection Prevention. **Antibiotics**, v. 3, n. 1, p. 87–97, 2014.

DE FREITAS, M. B., MOREIRA, E. A. M., TOMIO, C., MORENO, Y. M. F., DALTOE, F. P., BARBOSA, E., GUARINO, A. Altered intestinal microbiota composition, antibiotic therapy and intestinal inflammation in children and adolescents with cystic fibrosis. **PLOS ONE**, v. 13, n. 6, p. e0198457, 2018.

MULCAHY, L. R.; VINCENT, I.M.; LEWIS, K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. **Microbial ecology**, v. 68, n. 1, p. 1-12, 2014.

SANCHEZ, A.A. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when micro-encapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**, v.50, p.585-590, 2010.

SANDBERG, M.; MAATTANEN, A.; PELTONEN, J.; VUORELA, P. M.; FALARERO, A. Automating a 96-well microtitre plate model for *Staphylococcus au-*

reus biofilm: an approach to careening of natural antimicrobial compounds. **Int. J. Antimicrob. Agentes.** V. 32, 2008.

TOMARAS, A. P.; DORSEY, C. W.; EDELMANN, R. E.; ATIS, L. A. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. **Microbiology**. Dec, 149, p. 3473-84, pt. 12, 2003.

KOZICS, K.; BUČKOVÁ, M.; PUŠKÁROVÁ, A.; KALÁSZOVÁ, V.; CABICAROVÁ, T.; PANGALLO, D. The Effect of Ten Essential Oils on Various Drug-Resistant Skin Microorganisms and Their Cyto/Genotoxic and Antioxidant Properties. **Molecules**. Dec; 24(24): 4570, 2019.

MOHSENIPOUR Z, HASSANSHAHIAN M. The inhibitory effect of *Thymus vulgaris* extracts on the planktonic form and biofilm structures of six human pathogenic bacteria. **Avicenna J Phytomed.** Jul-Aug;5(4):309-18, 2015.

SAKKAS, H.; GOUSIA, P.; ECONOMOU, V.; SAKKAS, V.; PETSIOS, S.; PAPADOPOULOU, C. Atividade antimicrobiana in vitro de cinco óleos essenciais em isolados clínicos Gram-negativos multirresistentes. Jun-Aug; 5(3): 212–218, 2016.