

## ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cedrus atlantica*, *Eugenia caryophyllata* E *Eucalyptus citriodora* E SUA COMBINAÇÃO COM MEROPENEM CONTRA *Pseudomonas aeruginosa*

DÉBORAH TROTA FARIAS DE ALBERNAZ<sup>1</sup>; KAMILA FURTADO DA CUNHA<sup>2</sup>;  
SUZANE OLACHEA ALLEND<sup>3</sup>; DAIANE DRAWANZ HARTWIG<sup>4</sup>

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

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

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – suzane\_olachea@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a incidência de infecções nosocomiais associadas a bactérias multirresistentes têm aumentado, tornando-se um grave problema no âmbito hospitalar (KLOCKGETHER; TÜMMLER, 2017). Devido a pressão seletiva originada pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, *Pseudomonas aeruginosa* tornou-se um patógeno resistente as opções de drogas disponíveis, exigindo a busca de novas alternativas terapêuticas (SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015).

*P. aeruginosa* é considerado um patógeno oportunista, sendo um dos principais agentes envolvidos em infecções nosocomiais. Além de apresentar resistência intrínseca à diversos antimicrobianos, costuma adquirir-la também através de mutações cromossômicas ou aquisição de genes exógenos. Atualmente, *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos integra a categoria crítica destacada pela OMS de agentes patogênicos prioritários para pesquisa e desenvolvimento de novas drogas (PANG et. al., 2019).

Alternativas terapêuticas naturais, como os óleos essenciais (OE), que são compostos extraídos de plantas, têm sido avaliados na busca de novos antibióticos. Essas substâncias são constituídas de diversos metabólitos secundários, principalmente terpenos, dotados de atividade antimicrobiana, inibindo ou dificultando o crescimento de micro-organismos (SEMENIUC et al., 2017).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana dos OE de *Cedrus atlantica*, *Eugenia caryophyllata* e *Eucalyptus citriodora*, frente a cepa padrão ATCC 27853 de *P. aeruginosa*, bem como, avaliar o potencial sinérgico dos mesmos com o meropenem, um antibiótico da classe dos carbapenêmicos.

### 2. METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular de Micro-organismos, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas. Foi testada a cepa padrão de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e utilizados três OE, sendo eles: *Cedrus atlantica* (Cedro Atlas – Lote: 119), *Eugenia caryophyllata* (Cravo Botão – Lote: 208) e *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto – Lote: 108), adquiridos da empresa Ferquima®.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos OE e do meropenem (Sigma®), foi realizada segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017). Para isso foi utilizado Caldo Muller-Hinton (MH) com Tween 80 a 1% (Synth®) e as concentrações de OE testadas variaram de 0,01 a 0,35 µg.mL<sup>-1</sup>.

Como controle negativo, utilizou-se somente o caldo MH e para controle positivo foi utilizado este mesmo caldo acrescido do inóculo bacteriano ( $1,5 \times 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Foram realizados também controles de esterilidade dos OE e do meropenem. As placas foram incubadas por 24h a 37°C, e os procedimentos foram realizados em triplicata. Após o período de incubação, adicionou-se 10µL do indicador de viabilidade celular resazurina 0,02%, para a verificação dos resultados. A determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada a partir dos resultados da CIM, onde foi coletado material dos poços que apresentaram inibição do crescimento e inoculado em placas contendo Ágar MH. As placas foram incubadas à 37°C por 24h para avaliação do crescimento bacteriano.

Dentre os três OE avaliados, aquele que apresentou melhor desempenho nos ensaios de CIM e CBM, foi selecionado para avaliar seu efeito sinérgico com o meropenem, através do método de *checkerboard* (PILLAI, 2005; WEI e YANG, 2017). Para isso, foram adicionados 50µL do caldo MH com Tween 80 a 1% nos poços de placas de 96 cavidades e, em seguida, adicionados 50µL do meropenem na concentração inicial de 0,48 µg.mL<sup>-1</sup>, para realização da diluição seriada 1:2. Posteriormente, foram adicionados 50µL do OE na concentração inicial de 0,35 µg.mL<sup>-1</sup> e realizadas diluições seriadas 1:2. Após isso, adicionou-se 100 µL do inóculo bacteriano. As placas foram incubadas à 37°C por 24h e os resultados foram observados através da adição de resazurina 0,02%. Os testes foram realizados em triplicata. A interpretação dos resultados do *checkerboard* foi feita através do índice da concentração fracional inibitória (FICI), obtida pela seguinte fórmula:  $FICI = (CIM \text{ do OE combinada} / CIM \text{ do OE sozinho}) + (CIM \text{ do meropenem combinado} / CIM \text{ do meropenem sozinho})$ . Os resultados da FICI foram interpretados da seguinte forma:  $FICI \leq 0,5$  = Sinergismo;  $0,5 < FICI \leq 1$  = Aditividade;  $1 < FICI \leq 2$  = Indiferença e  $FICI > 2$  = Antagonismo. Além disso, o fator modulatório (FM) também foi calculado da seguinte forma: CIM do meropenem sozinho / CIM do meropenem em combinação com o OE. O resultado deste cálculo foi interpretado em quantas vezes o OE foi capaz de reduzir a CIM do meropenem.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os OE de Cravo Botão e Eucalipto, as CIM encontradas foram 0,03 µg.mL<sup>-1</sup> e 0,30 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A CBM foi obtida a partir dos OE que apresentaram CIM, onde o OE de Cravo Botão foi considerado bactericida, na concentração de 0,35 µg.mL<sup>-1</sup> e o OE de Eucalipto foi considerado bacteriostático na maior concentração de 0,30 µg.mL<sup>-1</sup>. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, não se observou ação do OE de Cedro Atlas sobre a cepa padrão de *P. aeruginosa*. Para o meropenem a CIM e CBM foram de 0,015 µg.mL<sup>-1</sup>. Estes resultados podem ser visualizados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Resultados da CIM e CBM dos OE e do meropenem frente a cepa padrão de *P. aeruginosa*.

|     | OE Cedro Atlas | OE Cravo Botão           | OE Eucalipto             | meropenem                 |
|-----|----------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| CIM | *              | 0,03 µg.mL <sup>-1</sup> | 0,30 µg.mL <sup>-1</sup> | 0,015 µg.mL <sup>-1</sup> |
| CBM | *              | 0,35 µg.mL <sup>-1</sup> | *                        | 0,015 µg.mL <sup>-1</sup> |

\*Não foram obtidas CIM e CBM nas concentrações testadas.

Resultados semelhantes foram encontrados por EL AMRANIA et al. (2018), que observaram atividade biológica do OE de Cravo Botão para cepa padrão de *P. aeruginosa*, determinando a CIM na concentração de 2,5  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ .

Dentre os compostos majoritários do OE de Cravo Botão destaca-se o eugenol, o qual apresentou potencial sinérgico em associação com antimicrobianos. Além disso, os autores inferem que essa sinergia pode estar relacionada ao modo de ação do eugenol sobre as membranas da célula bacteriana (HEMAISWARYA e DOBLE, 2009). No presente estudo, avaliamos o OE de Cravo Botão quanto à associação com o meropenem, visto que este OE apresentou menores valores de CIM. Contudo, foi observada indiferença nesta associação (FICI = 1 – 1,2) e na capacidade moduladora, reduzindo uma vez a CIM do meropenem (FM = 1).

Estudos realizados por NAKAMURA et al. (2014) e MONTERO et al. (2019) em pacientes com infecção por *P. aeruginosa* multirresistente, observaram a eficácia de terapias combinadas. Desta forma, ressalta-se a relevância de pesquisas com produtos naturais como OE, uma vez que os mesmos apresentam uma grande variedade de compostos bioativos e diversos sítios de ação na célula bacteriana, além de suas possíveis combinações com terapias antimicrobianas convencionais.

#### 4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que os OE de *Eugenia caryophyllata* (Cravo Botão) e *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto), apresentaram atividade antibacteriana frente a cepa padrão de *P. aeruginosa* ATCC 27853. Com relação a combinação do OE de Cravo Botão com meropenem, não foi observado efeito sinérgico, sendo indiferente. Também não foi observada atividade moduladora, reduzindo em uma vez a CIM do meropenem. O OE de *Cedrus atlantica* (Cedro Atlas) não apresentou efeito antibacteriano sob as condições avaliadas.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KLOCKGETHER, Jens; TÜMMLER, Burkhard. Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. **F1000Research**, v. 6, 2017.

PANG, Zheng et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 1, p. 177-192, 2019.

SANTOS, Ingrid de Arruda Lucena dos; NOGUEIRA, Joseli Maria da Rocha; MENDONÇA, Flávia Coelho Ribeiro. Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*. **Rev. Bras. Anal. Clin. (Rio de Janeiro)**, v. 47, n. 1-2, p. 5-12, 2015.

SEMENIUC, Cristina Anamaria; POP, Carmem Rodica; ROTAR, Ancuta Mihaela. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 2, p. 403 - 408, 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100 (ISBN 1-56238-804-5 [Print]; ISBN 1-56238-805-3 [Electronic]). **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2017.

PILLAI SK, MOELLERING RC, ELIOPOULOS GM. Antimicrobial combinations. **Antibiotics in laboratory medicine**. Lippincott Williams e Wilkins. New York, p. 365-440, v., 5 eds, 2005.

WEI, W. J.; YANG, H. F. Synergy against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* *in vitro* by two old antibiotics: colistin and chloramphenicol. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.49, p. 321–326, 2017.

S. El amrania, A. El Ouali Lalamib, Y. Ez zoubic, K. Moukhafia, R. Bouslamtia, S. Lairinia. Evaluation of antibacterial and antioxidant effects of cinnamon and clove essential oils from Madagascar. **Materials Today: Proceedings**, v.13, p.762–770, 2018.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. **Phytomedicine**. v.16, n.11, p. 997-1005, 2009.

NAKAMURA I., YAMAGUCHI T., TSUKIMORI A., SATO A., FUKUSHIMA S., MIZUNO Y.; MATSUMOTO T. Effectiveness of antibiotic combination therapy as evaluated by the Break-point Checkerboard Plate method for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in clinical use. **J. Infect. Chemother**, v.20, n. 4, p. 266-269, 2014.

MONTERO, María M. et al. Colistin plus meropenem combination is synergistic *in vitro* against extensively drug-resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa*, including high-risk clones. **Journal of global antimicrobial resistance**, v.18, p. 37-44, 2019.