

# VI SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA XXIV SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA URCA

13 a 17 de Dezembro de 2021

Tema: "Centenário de Paulo Freire: contribuição da divulgação científica e tecnológica em defesa da vida, da cidadania e da educação"

## POTENCIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DA GENTAMICINA E ERITROMICINA PELO ÓLEO ESSENCIAL DE *OCOTEA ODORIFERA* (VELL) ROWHER

Talysson Felismino Moura<sup>1</sup>, Ray Silva de Almeida<sup>2</sup>, Priscilla Ramos Freitas<sup>3</sup>, Ana Carolina Justino de Araújo<sup>4</sup>, Eduardo Lourenço dos Santos<sup>5</sup>, Saulo Relison Tintino<sup>6</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>7</sup>

### RESUMO:

Em estudo recente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o óleo essencial de *Ocotea odorifera* (E000) potencializaram a ação das fluoroquinolonas, modulando a resistência bacteriana possivelmente devido à inibição direta das bombas de efluxo. Assim, no presente estudo, investigamos se esses tratamentos poderiam aumentar a atividade da gentamicina e eritromicina contra bactérias multirresistentes (MDR). O E000 foi extraído por hidrodestilação, e a análise fitoquímica foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). O efeito de aumento de antibióticos do E000 e safrol contra cepas MDR de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* foi analisado pelo método de microdiluição em caldo. A análise química confirmou a presença de safrol como um componente principal entre os 16 compostos identificados no E000. Tanto o óleo essencial quanto o composto isolado mostraram atividades antibacterianas clinicamente relevantes contra *S. aureus*. Em relação à modulação da resistência aos antibióticos, o E000 mostrou aumentar a atividade da eritromicina contra as cepas de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, além de melhorar a ação da gentamicina contra *S. aureus*. Por outro lado, o safrol potencializou a atividade da gentamicina contra a cepa de *S. aureus* isoladamente. Conclui-se, portanto, que o E000 e o safrol podem potencializar a atividade de macrolídeos e aminoglicosídeos, e como tais são úteis no desenvolvimento de ferramentas terapêuticas para combater a resistência bacteriana a essas classes de antibióticos.

---

1 Universidade Regional do Cariri, email: talysson.f.moura@urca.br

2 Universidade Regional do Cariri, email: rayalmeidasilva2306@gmail.com

3 Universidade Regional do Cariri, email: priscilla.r.freitas@hotmail.com

4 Universidade Regional do Cariri, email: caroljustino@outlook.com

5 Universidade Regional do Cariri, email: eduardo.l.santos@kroton.com.br

6 Universidade Regional do Cariri, email: saulo.tintino@urca.br

7 Universidade Regional do Cariri, email: hdmcoutinho@gmail.com

# VI SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA XXIV SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA URCA

13 a 17 de Dezembro de 2021

Tema: "Centenário de Paulo Freire: contribuição da divulgação científica e tecnológica em defesa da vida, da cidadania e da educação"

**Palavras-chaves:** Macrolídeos. Aminoglicosídeos. Modulação da resistência aos antibióticos. Safrole. *Ocotea odorifera*

## 1. Introdução:

O Brasil é conhecido por sua grande biodiversidade, respondendo por cerca de 20% de todas as espécies de plantas do planeta, muitas das quais são utilizadas na medicina popular [1,2]. Os óleos essenciais são substâncias voláteis sintetizadas pelo metabolismo secundário da planta, compostas principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides [3]. É importante ressaltar que diversos estudos têm demonstrado que esta classe de compostos apresenta propriedades antiinflamatórias, antitumorais, antioxidantes e 5 antimicrobianas [4-6].

*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (Lauraceae) é uma espécie nativa do Brasil, onde é tradicionalmente utilizada no tratamento de feridas infectadas<sup>2</sup>. Esta espécie é fitoquimicamente caracterizada pela presença de flavonóides como o caempferol e a quercetina, além de produzir um óleo essencial contendo safrol como componente majoritário [7,8]. Pesquisas anteriores demonstraram que tanto o óleo essencial de *O. odorifera* (E000) quanto o safrol têm atividades antibacteriana, antileishmania e inseticida, justificando seu uso em pesquisas de desenvolvimento de medicamentos [8,10-12].

A resistência bacteriana é um problema de saúde global com impacto significativo nas taxas de mortalidade e custos de saúde [13]. As evidências indicam que as cepas bacterianas multirresistentes (MDR) podem se tornar cada vez mais virulentas, dificultando o tratamento de várias infecções [14,15]. Nesse sentido, o surgimento de cepas multirresistentes nessas espécies tem dificultado o tratamento com a maioria dos antibióticos convencionais e, portanto, o desenvolvimento de novos fármacos capazes de combater a resistência bacteriana tem se tornado uma prioridade na busca de novos antimicrobianos.

Nosso grupo demonstrou recentemente que o E000 apresentam atividade clinicamente relevante contra *S. aureus* e que o safrol modula a resistência aos antibióticos às quinolonas nas cepas de *S. aureus* SA1119B e K2068, possivelmente através da inibição direta das bombas de efluxo NorA e MepA, respectivamente [25]. No entanto, até o momento não se sabe se esses produtos são capazes de modular a resistência antibacteriana a outras classes de antibióticos.

## 2. Objetivo:

Avaliar a ação do óleo essencial de *Ocotea odorifera* (E000) na potencialização da gentamicina e eritromicina contra bactérias multirresistentes (MDR).

# VI SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA XXIV SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA URCA

13 a 17 de Dezembro de 2021

Tema: "Centenário de Paulo Freire: contribuição da divulgação científica e tecnológica em defesa da vida, da cidadania e da educação"

## 3. Metodologia:

### Coleta, extração e análise do material botânico:

O óleo essencial foi extraído de ramos terminais e inflorescências de plantas coletadas em um segmento de Mata Atlântica no Estado do Paraná, Sul do Brasil, preparada e registrada no Herbário das "Faculdades Integradas Espirita" (HFIE) (registro número 9.000).

A extração foi realizada por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger utilizando 500 g de folhas secas em 1L de água destilada à temperatura de ebulição por 2 h. Após a extração do óleo essencial, este foi combinado com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e armazenado sob refrigeração (-4 ° C). A composição química do óleo essencial foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).

### Culturas bacterianas:

As cepas bacterianas utilizadas no presente estudo foram: *S. aureus* 10, *E. coli* 06, *P. aeruginosa* 24.

Todas as cepas foram mantidas em ágar sangue (Laboratorios Difco Ltda., Brasil) e mantidas em meio de ágar Heart Infusion (HIA, Laboratorios Difco Ltda., Brasil) a 4 °C. As amostras foram transferidas do meio sólido para tubos de ensaio contendo soro fisiológico estéril, e a turbidez foi avaliada usando um valor de 0,5 na escala de McFarland, correspondendo a 10<sup>5</sup> UFC. Os antibióticos eritromicina e gentamicina foram obtidos na SIGMA Chemical Co. (St. Louis, EUA). O EOOO, e ambos os antibióticos foram dissolvidos em DMSO (10 mg / mL) e diluídos em água destilada para 1024 µg / mL.

### Determinação da concentração inibitória mínima (MIC):

A concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada em microplacas estéreis de 96 poços por diluição em série. Cada inóculo bacteriano foi preparado pela transferência de uma amostra da cultura bacteriana para o caldo BHI, seguida de incubação a 37 °C por 24 h. Após esse período, foi preparada uma solução 1:10 em tubos de ensaio, adicionando-se 100 µL de inóculo e 900 µL do meio BHI. Um total de 100 µL desta solução foi transferido para cada poço da placa. Em seguida, cada poço foi adicionado com 100 µL do tratamento correspondente diluído em série (1: 2) em concentrações variando de 1024 a 1 µg / mL. Controles positivos (meio + inóculo) foram adicionados no último poço da placa. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. Todos os testes foram realizados em triplicata para maior confiança nos resultados [47].

Após a incubação, cada poço foi adicionado com 20 µL de uma solução aquosa de resazurina sódica (0,01% p / v, SIGMA, EUA) e 1 h mais tarde, crescimento bacteriano observado pela mudança de cor de azul para rosa devido à redução da resazurina [ 48,49]. O MIC foi definido como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano.

# VI SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA XXIV SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA URCA

13 a 17 de Dezembro de 2021

Tema: "Centenário de Paulo Freire: contribuição da divulgação científica e tecnológica em defesa da vida, da cidadania e da educação"

## **Análise da modulação da resistência a antibióticos:**

A análise da modulação da resistência aos antibióticos foi realizada avaliando os MICs de gentamicina e eritromicina (aminoglicosídeo e macrolídeo, respectivamente) contra *P. aeruginosa* 24, *E. coli* 06 e *S. aureus* 10 foram determinados na presença ou ausência desses produtos naturais em concentrações equivalentes à sua MIC ÷ 8 (concentração subinibitória). Uma redução na MIC do antibiótico foi interpretada como aumento da atividade antibiótica (modulação da resistência aos antibióticos) [50]. Todos os testes foram realizados em triplicata para maior confiança nos resultados.

## **Análise estatística:**

Os dados são expressos como média aritmética ± erro padrão da média e foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni. Significância estatística foi considerada quando  $p < 0,05$ .

## **4. Resultados :**

### **Atividade de aumento de antibióticos do EOOO:**

A análise da atividade antibacteriana do EOOO encontrou valores de CIM acima de 1.024 µg / mL contra *P. aeruginosa* 24 e *E. coli* 06. Por outro lado, o óleo essencial apresentou CIM de 512 µg / mL contra *S. aureus* 10, indicando que o EOOO só tem atividade antibacteriana clinicamente relevante contra a cepa Gram-positiva. No entanto, quando uma concentração subinibitória do óleo essencial foi associada aos antibióticos convencionais para analisar o efeito potencializador, efeitos sinérgicos foram obtidos com a eritromicina contra *S. aureus*, reduzindo a CIM do controle de modulação (CM) de 8 µg / mL para 1 µg / mL quando associado. O CIM do antibiótico eritromicina contra a bactéria *P. aeruginosa* foi de 128 µg / mL, e quando associado ao EOOO diminuiu para 64 µg / mL. O mesmo ocorreu com a gentamicina, que apresentou redução da CIM de 256 µg / mL para 64 µg / mL, contra a cepa de *S. aureus*. No entanto, nenhum desses antibióticos teve atividade antibacteriana contra *E. coli* modulada pelo óleo essencial.

## **5. Conclusão :**

Em conclusão, este estudo trouxe novas evidências no que diz respeito à ação do EOOO e seu principal composto safrol como moduladores da resistência bacteriana contra cepas MDR. EOOO mostrou um efeito sinérgico com Eritromicina contra a cepa de *P. aeruginosa* e *S. aureus*. No entanto, não teve efeito significativo contra *E. coli*. A gentamicina associada ao EOOO mostrou atividade apenas contra *S. aureus*. O safrol associado à gentamicina apresentou atividade potencializadora contra *S. aureus*. A ação diferencial

# VI SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA XXIV SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA URCA

13 a 17 de Dezembro de 2021

Tema: "Centenário de Paulo Freire: contribuição da divulgação científica e tecnológica em defesa da vida, da cidadania e da educação"

observada nos testes com o EOOO e o composto isolado sugere fortemente que outros compostos presentes no óleo essencial podem estar contribuindo para suas propriedades potencializadoras de antibióticos e, portanto, pesquisas futuras utilizando componentes isolados desta espécie podem trazer contribuições importantes no desenvolvimento de novas moléculas úteis no combate à resistência bacteriana.

## 6. Agradecimentos:

Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Universidade Regional do Cariri (URCA).

## 7. Referências:

- 1.Sartoratto A.; Machado, A.L.M.; Delarmelina, C.; Figueira, G.M.; Duarte, M.C.T.; Rehder, V.L.G. Composição e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas aromáticas utilizadas no Brasil. *Rev Bras Microbiol.* 2004, 4, 275-280.
- 2.Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. *Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas.* Nova Odessa, Plantarum, 2002.
- 4.Salas-Oropeza, J.; Jimenez-Estrada, M.; Perez-Torres, A.; Castell-Rodriguez, A.E.; Becerril-Millan, R.; Rodriguez-Monroy, M.A.; Canales-Martinez, M.M. Wound Healing Activity of the Essential Oil of *Bursera morelensis*, in *Mice. Molecules*, 2020.,25, 8.
- 6.Pandini, J.A.; Pinto, F.G.S.; Scur, M.C.; Santana, C.B.; Costa, W.F.; Temponi, L.G. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant potential of the essential oil of *Guarea kunthiana* A. Juss. *Braz J Biol.* 2017, 1, 53-60.
- 7.Lordello, A.L.L.; Cavalheiro, A.J.; Yoshida, M.; Gottlieb, O.R. Phenylpropanoids, sterols and sesquiterpene from wood of *Ocotea odorifera* Lauraceae. *Revista Latinoamericana de Química.* 2000, 1, 35-39.
- 8.Alcoba, A.E.T.; Melo, D.C.; Andrade, P.M.; Dias, H.J.; Pagotti, M.C.; Magalhães, L.G.; Júnior, W.G.F.; Crotti, A.E.M.; Miranda, M.L.D. Chemical composition and in vitro antileishmanial and cytotoxic activities of the essential oils of *Ocotea dispersa* (Nees) Mez and *Ocotea odorifera* (Vell) Rohwer (Lauraceae). *Nat Prod Res.* 2018, 23, 2865-2868.
- 12.Mossi, A.J.; Zanella, C.A.; Kubiak, G.; Lerin, L.A.; Cansian, R.L.; Frandoloso, F.S.; Dal-Prá, V.; Mazutti, M.A.; Costa, J.A.V.; Treichel, H. Essential oil of *Ocotea odorifera*: an alternative against *Sitophilus zeamais*. *Renew Agr Food Syst.* 2013, 2, 161–166.
- 25.Almeida, R. A.; Freitas, P.R.; Araujo, A.C.J.; Menezes, I.R.A.; Santos, E.L.; Tintino, S.R.; Moura, T.F.; Ribeiro-Filho, J.; Ferreira, V.A.; Silva, A.C.A.; Silva, L.E.; Amaral, W., et al. GC-MS Profile and Enhancement of Antibiotic Activity by the Essential Oil of *Ocotea odorifera* and Safrole: Inhibition of *Staphylococcus aureus* Efflux Pumps. *Antibiotics.* 2020, 9, 247. doi:10.3390/antibiotics9050247.