

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
FARMACIE**

***SELECȚIE DE SUBSTANȚE FARMACEUTICE NATURALE CANDIDATE PENTRU
NOI MEDICAMENTE ANTIINFEȚIOASE INOVATIVE,
CU EFECT ANTIBACTERIAN ȘI ANTIBIOFILM***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. GÎRD CERASELA-ELENA

Student-doctorand:

Farm. NEAGU RĂZVAN

2024

Cuprins

1. Introducere.....	3
Justificarea alegerii temei	3
I. Partea generală.....	4
1. Uleiuri esențiale și interacțiunile cu antibiotice.....	4
1.1. Rezistența bacteriană la antibiotice – aspecte generale	4
1.2. Combaterea rezistenței la antibiotice și conceptul de sinergism de acțiune	5
II. Contribuții personale.....	6
2. Determinarea eficacității antibacteriene și antibiofilm a 5 uleiuri esențiale comercializate în România	6
2.1. Ipoteza de lucru și obiective specifice.....	6
2.2. Materiale și Metodă.....	6
2.2.1. Materiale.....	6
2.2.2. Metoda de determinare a activității antibacteriene	6
2.2.3. Metoda de determinare a activității antibiofilm	7
2.2.4. Cuantificarea și interpretarea activităților antibacteriene și antibiofilm	7
2.3. Rezultate și discuții.....	7
3. Determinarea eficacității antibacteriene și antibiofilm a combinațiilor de uleiuri esențiale disponibile în comerț asociate cu antibiotice	9
3.1. Ipoteza de lucru și obiective specifice.....	9
3.2. Material și metodă	9
3.2.1. Materiale.....	9
3.2.2. Analiza GC-MS.....	9
3.2.3. Analiza structurală RMN și IR a antibioticelor testate	10
3.2.4. Determinarea activității antibacteriene și antibiofilm prin metoda cu microplăci	10
3.2.5. Evaluarea in vitro a activității antibacteriene	12
4. Concluzii și contribuții personale	15
Bibliografie selectivă	20

Lista cu lucrările științifice publicate

Articole publicate în reviste cotate ISI Q1:

- **Răzvan Neagu**, Violeta Popovici, Lucia-Elena Ionescu, Viorel Ordeanu, Andrei Biță, Diana Mihaela Popescu, Emma Adriana Ozon și Cerasela Elena Gîrd: Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of Commercially Available Essential Oils Combinations with Conventional Antibiotics against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics* 2024, 13, 478;
- **Răzvan Neagu**, Violeta Popovici, Lucia Elena Ionescu, Viorel Ordeanu, Diana Mihaela Popescu, Emma Adriana Ozon și Cerasela Elena Gîrd: Antibacterial and Antibiofilm Effects of Different Samples of Five Commercially Available Essential Oils. *Antibiotics* 2023, 12, 1191;

1. Introducere

Justificarea alegerii temei

Terapia medicală s-a bazat din cele mai vechi timpuri pe medicamente, utilizând efectul farmacologic observat empiric și efectul psihologic (placebo) al acestora.

Medicamentele antiinfecțioase sunt utilizate pentru tratarea bolilor cauzate de bacterii, virusuri, fungi, protozoare și paraziți animalii, fiind considerate cea mai importantă grupă de medicamente. Antiinfecțioasele de uz sistemic sunt clasificate în nomenclatura internațională a medicamentelor (Anatomic, Terapeutic, Clinic) cu codul ATC J01. Aceasta se explică prin faptul că bolile infecțioase au grupa 1 de codificare a Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), fiind cele mai frecvente și mai grave boli, adesea cu caracter epidemic sau pandemic, cauzând cele mai multe cazuri de boală și deces la nivel mondial. Înainte de era antibioticelor peste 40% din populație murea din cauza infecțiilor microbiene.

Farmacologia clasifică chimioterapicele antimicrobiene în funcție de efect în felul următor: antibacteriene, antivirale și antiparazitare. În lista actuală de Medicamente Esențiale, OMS 23/2023, antimicrobienele reprezintă grupul cel mai numeros, deoarece și etiologia infecțioasă este foarte diversă și implicit și sensibilitatea microbiană față de medicamentele antiinfecțioase. Lipsa eficienței este agravată și de rezistența bacteriilor față de antibiotice. Unul dintre mecanismele de rezistență și de virulență ale bacteriilor patogene este formarea biofilmului, care le conferă o rezistență deosebită față de apărarea imunitară, precum și cel mai important, față de medicamentele antiinfecțioase, inclusiv antibiotice.

Istoricul medicamentelor antiinfecțioase se confundă cu istoria medicinei și farmaciei, în care fitoterapia avea rolul principal, iar culoarea simbol a farmaciei a rămas verdele plantelor. Foarte multe plante, cunoscute ca “medicinale” dar și altele, au proprietăți antimicrobiene sau imunostimulatoare, deoarece și regnul vegetal trebuie să se apere de invazia microbilor, care sunt ubicuitari. Există mii de plante medicinale cunoscute, sute de specii au monografie în Farmacopeele mai vechi sau mai noi din lume, iar alte mii de specii de plante sunt în studiu, reprezentând cel mai mare rezervor de substanțe active farmacologic, inclusiv pentru medicamente antiinfecțioase.

Ca urmare, este imperios necesar să descoperim medicamente inovative antiinfecțioase, ca tratament înlocuitor, complementar sau adjuvant al antibioterapiei, ca antibacteriene și/sau antibiofilm.

I. Partea generală

1. Uleiuri esențiale și interacțiunile cu antibiotice

1.1. Rezistența bacteriană la antibiotice – aspecte generale

Bolile infecțioase sunt boli cauzate de microorganisme patogene sau condiționat patogene, care parazitează alte ființe. Microbii patogeni au fost și continuă să fie principala cauză de morbiditate umană fiind responsabili de aproximativ 15 milioane de decese anual [1]. Medicamentele antiinfecțioase conțin substanțe antimicrobiene, în principal chimioterapice: antibacteriene, antivirale, antifungice și antiparazitare.

În prezent, terapia bolilor infecțioase cauzate de bacterii reprezintă o provocare pentru medicina modernă, din cauza extinderii fenomenului de rezistență bacteriană față de antibiotice, iar Organizația Mondială a Sănătății (OMS) a lansat avertismentul, încă din anul 2017, că riscăm să intrăm în *era postantibiotice* [2]. Răspândirea rezistenței la antibiotice este urmarea utilizării necorespunzătoare și excesive a acestora [3].

În momentul de față, multe dintre bacterii sunt rezistente la mai multe clase de antibiotic, nu doar la un singur antibiotic (bacterii polifarmacorezistente) [4]. La nivel Mondial, circa 50% din infecțiile dobândite în spitale sunt cauzate de bacterii polifarmacorezistente. Bacteriile polifarmacorezistente care cauzează cele mai multe probleme sunt enterococii vancomicino-rezistenți, tulpinile de *Staphylococcus aureus* metilino-rezistent (MRSA), tulpinile de *S. aureus* metilino- și vancomicino-rezistent, bacteriile producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins: unele tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae* și *Escherichia coli*. De asemenea sunt și alți patogeni polifarmacorezistenți importanți: *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae* penicilino-rezistent, *Legionella pneumophila*, *Salmonella* spp. și *Shigella* spp. [5]. În România, conform statisticilor, 40% din infecții sunt cauzate de patogeni rezistenți la antibiotice și aceștia au cauzat 1470 de decese pe an [6].

Antibioticele acționează asupra bacteriilor prin mecanisme bactericide (omorârea bacteriilor) sau bacteriostatice (inhibă multiplicarea bacteriană). Rezistența bacteriilor la antibiotice este capacitatea microorganismelor de a supraviețui și a se multiplica în prezența unui antibiotic. Rezistența poate fi naturală sau dobândită [7].

De asemenea unul dintre mecanismele de rezistență utilizate de bacterii este formarea biofilmului, care este și un mecanism de virulență [8]. Microorganismele unicelulare se pot organiza în structuri cvasi-multicelulare, trecând din forma de viață planctonică în cea de biofilm. Sub protecția biofilmului, celulele microbiene devin rezistente la acțiunea antibioticelor și a sistemului imunitar, ceea ce îngreunează tratamentul infecțiilor cu biofilm. Până la 80% din infecțiile bacteriene cronice sunt asociate formării biofilmului. Deoarece infecțiile cu biofilm contribuie semnificativ la mortalitatea pacienților și costurile asistenței medicale sunt ridicate, sunt necesare strategii noi de tratare a acestor infecții [9].

1.2. Combaterea rezistenței la antibiotice și conceptul de sinergism de acțiune

O abordare inovativă este reprezentată de utilizarea de combinații și asocieri sinergice rezultate din utilizarea a 2 sau mai multe antibiotice, sau între un antibiotic și o substanță care are capacitatea de a potența efectul farmacologic al antibioticului sau cu efect antibacterian prin alte mecanisme care acționează complementar, ceea ce potențează efectul și împiedică instalarea rezistenței bacteriene la antibioticul respectiv. Atunci când efectul combinației este mai mare decât suma efectelor individuale ale componentelor, atunci este vorba de sinergism de acțiune. O combinație care are efect aditiv este atunci când efectul acesteia este egal cu suma efectelor individuale. Dacă efectul combinației este mai mic decât suma efectelor individuale ale componentelor, atunci este vorba de antagonism. Indiferența este prezentă atunci când nu există interacțiuni între agenții combinației [10].

Numeroase date din literatura de specialitate ne indică faptul că uleiurile esențiale au capacitatea de a modula activitatea antibioticelor asupra bacteriilor patogene.

Beneficiile directe ale utilizării unei combinații sinergice sunt: lărgirea spectrului de acțiune antibacteriană, posibilitatea de reducere a dozelor cu diminuarea toxicității antibioticului, precum și scăderea posibilității de dezvoltare a rezistenței [11].

Un exemplu de asociere sinergică este utilizarea de agenți capabili să inhibe enzimele responsabile de degradarea antibioticelor prin inhibarea *situs*-urilor active ale acestor enzime. Inhibitorii de beta-lactamaze, așa cum sunt acidul clavulanic, sulbactamul și tazobactamul, în combinație cu amoxicilina, sunt exemplele binecunoscute ale acestei abordări. Utilizarea frecventă și necorespunzătoare a acidului clavulanic a dus la dezvoltarea rezistenței la combinațiile de antibioticele beta-lactamice și inhibitori de beta-lactamaze [12].

În actualul context, interesul pentru fundamentarea științifică a formulărilor fitofarmaceutice atât ca o alternativă cât și ca o componentă complementară a terapiei cu medicamente de sinteză reprezintă o temă de interes științific.

II. Contribuții personale

2. Determinarea eficacității antibacteriene și antibiofilm a 5 uleiuri esențiale comercializate în România

2.1. Ipoteza de lucru și obiective specifice

Prezentul studiu, **Neagu si colab.** [13], își propune să exploreze efectele antibacteriene și antibiofilm a cinci uleiuri esențiale comercializate în țara noastră. Patru dintre ele (uleiul de eucalipt, uleiul de rozmarin, uleiul de cuișoare și uleiul de mentă) sunt înregistrate de EMA ca HMP pentru uz uman și veterinar [14], având monografiile actualizate periodic [15].

Rezultatele au fost comparate cu cele mai cunoscute date din literatura de specialitate. În plus, a fost efectuată o analiză statistică complexă pentru a susține rezultatele obținute.

2.2. Materiale și Metodă

2.2.1. Materiale

Toate substanțele chimice și reactivii au fost de calitate analitică. Tulpinile bacteriene pe care s-a testat eficacitatea antibacteriană și antibiofilm sunt reprezentative pentru speciile bacteriene patogene: tulpini gram-pozitive (*S. aureus*) și gram-negative (*E. coli* și *P. aeruginosa*).

Testarea eficacității antibacteriene și antibiofilm s-a realizat pe cinci uleiuri esențiale cu câte 2-4 variante din fiecare, notate cu 1, 2, 3 și 4:

- *Origanum aetheroleum* 1, 2 (ulei esențial de oregano, OEO);
- *Eucalypti aetheroleum* 1, 2 (ulei esențial de eucalipt, EEO);
- *Rosmarini aetheroleum* 1, 2 (ulei esențial de rozmarin, REO);
- *Caryophylli aetheroleum* 1, 2, 3 (Ulei esențial de cuișoare, CEO);
- *Menthae aetheroleum* 1, 2, 3, 4 (ulei esențial de mentă, PEO).

Au fost alese ca standard antibiotice cu spectru larg de acțiune: Gentamicina, Streptomicina și Amoxicilina&Acidul clavulanic.

2.2.2. Metoda de determinare a activității antibacteriene

Metoda utilizată a fost adaptată din literatura de specialitate [16,17]. A implicat cultivarea bacteriilor în plăci cu 96 de godeuri cu mediu Muller-Hinton în contact cu probele de uleiuri esențiale și incubare la 37°C timp de 24 de ore.

Prepararea probelor

S-au preparat emulsii ulei în apă cu o concentrație de ulei esențial de 30% g/g; emulgatorul utilizat a fost Poloxamer 407, de concentrație 5% în apă, după cum a fost menționat anterior [18]. Fiecare emulsie a fost diluată cu apă dublu distilată pentru a obține concentrația finală a fiecărei soluții stoc de ulei esențial de 25 mg/ml.

Prepararea soluției standard de antibiotic

Toate soluțiile de antibiotice au fost preparate cu apă dublu distilată, concentrația finală a soluției stoc fiind de 0,5 mg/ml.

2.2.3. Metoda de determinare a activității antibiofilm

Metoda a fost adaptată din literatura de specialitate [19,20] și detaliată în articolul nostru publicat recent [21]. După incubare, producția de biofilm bacterian a fost evidențiată prin colorare cu violet de gențiana 0,1% după îndepărtarea mediului de cultură, spălare de două ori cu apă distilată sterilă și uscare la temperatura camerei sub flux de aer. După îndepărtarea colorantului, microplăcile au fost uscate la 50°C timp de 60 min. Colorantul încorporat în celulele bacteriene care au format biofilmul a fost solubilizat cu etanol de concentrație 95% timp de 10 minute sub agitare continuă la 450 rpm.

2.2.4. Cuantificarea și interpretarea activităților antibacteriene și antibiofilm

Efectul antibacterian și antibiofilm al uleiurilor esențiale a fost determinat prin citirea absorbanțelor separat, pe fiecare variantă experimentală folosind EnSight Multimode Plate Reader. În funcție de nevoile de măsurare, operatorul a selectat și modificat lungimile de undă (562 nm pentru efectul antibacterian și 570 nm pentru activitatea antibiofilm). Valoarea finală a absorbantei este media aritmetică a celor 100 de citiri pe secundă / per godeu realizate de software-ul cititorului multimodal [22]. Formula de calcul este prezentată în următoarea ecuație:

$$(1) \quad \text{Eficacitate \%} = 100 - \frac{\text{media valorilor absorbanțelor probelor}}{\text{valoarea absorbanței de referință}} \times 100$$

Rezultatele obținute au fost comparate cu cele realizate de antibioticele standard.

2.3. Rezultate și discuții

Toate datele înregistrate din rezultate sunt rezumate în Figura 2.1, evidențiind locul uleiurilor esențiale raportate atât la eficacitatea antibacteriană (*ABE*), cât și la eficacitatea antibiofilm (*ABfE*) împotriva tuturor bacteriilor testate la toate cele trei diluții.

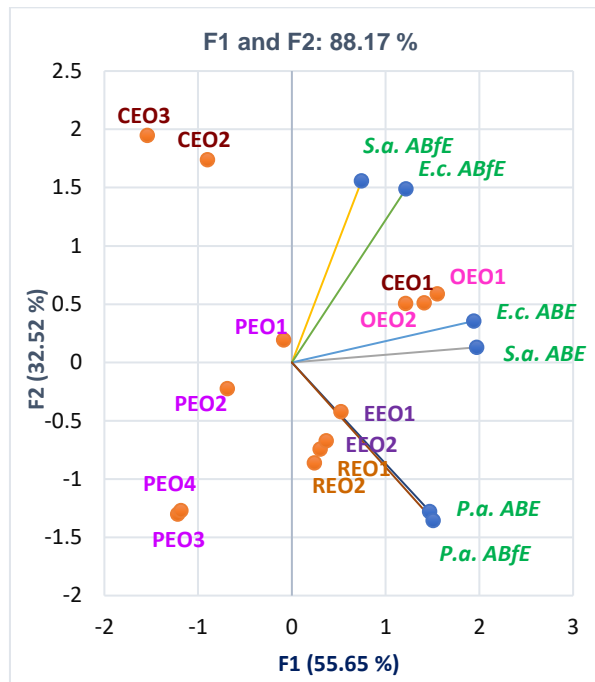


Figura 2.1. PCA-Biplot afișează eficacitatea antibacteriană și antibiofilm a uleiurilor esențiale împotriva bacteriilor gram-pozitive și gram-negative.

Ca o privire de ansamblu (vezi **Figura 2.1.**), probele de la diferiți producători ai aceleiași ulei esențial au prezentat activități similare; numai uleiurile de cuișoare și mentă au prezentat diferențe mai mari. În comparație cu rezultatele altor studii, diferențele mici dintre probele EEO1-2 și REO1-2 par să nu influențeze efectele antibacteriene. S-au înregistrat diferențe apreciabile în compoziția chimică a probelor de CEO1-3 și diferențe notabile în conținutul constituenților bioactivi din probele de PEO1-4, rezultând diferențe mari între efectele antibacteriene și antibiofilm.

Toate uleiurile esențiale au prezentat activități antibacteriene și antibiofilm la prima diluție zecimală împotriva tuturor bacteriilor gram-pozitive și gram-negative testate și o valoare a CMI > 25 mg/ml. *E. coli* a prezentat cea mai scăzută susceptibilitate la toate uleiurile esențiale disponibile comercial – pentru 15 probe de uleiuri esențiale nu au fost detectate efecte antibacteriene și antibiofilm la următoarele două diluții.

Doar uleiurile esențiale cu un conținut ridicat de metaboliți foarte activi au prezentat diferențe nesemnificative la toate diluțiile zecimale. Uleiurile esențiale cu mulți compuși bioactivi în conținut moderat au înregistrat o diminuare substanțială a potențialului antibacterian.

3. Determinarea eficacității antibacteriene și antibiofilm a combinațiilor de uleiuri esențiale disponibile în comerț asociate cu antibiotice

3.1. Ipoteza de lucru și obiective specifice

Studiul de față, **Neagu și colab.** [23], își propune să investigheze activitatea antibacteriană și antibiofilm, precum și potențialele interacțiuni pentru cinci uleiuri esențiale care au înregistrat cele mai bune eficacități antibacteriene și antibiofilm în etapa anterioară de testare - ulei esențial de lavandă (LEO), ulei esențial de cuișoare (CEO), ulei esențial de oregano (OEO), ulei esențial de eucalipt (EEO) și ulei esențial de mentă (PEO) – combinate în mod binar și asocieri triple cu medicamente antibiotice - tetraciclină (TET), neomicină (NEO) și bacitracină (BAC) testate împotriva *S. aureus*, *E coli* și *P. aeruginosa*.

3.2. Material și metodă

3.2.1. Materiale

Toate substanțele chimice și reactivii au fost de calitate analitică. Tulpinile bacteriene pe care s-a testat eficacitatea antibacteriană și antibiofilm sunt reprezentative pentru speciile bacteriene patogene și au fost achiziționate de la furnizori autorizați pentru comercializarea produselor ATCC: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) și *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

Cele 5 uleiuri esențiale care au fost analizate sunt: ulei esențial de cuișoare (CEO), ulei esențial de eucalipt (EEO), ulei esențial de lavandă (LEO), ulei esențial de mentă (PEO) și ulei esențial de oregano (OEO) iar antibioticele convenționale utilizate sunt: neomicină, clorhidrat de tetraciclină și bacitracină.

3.2.2. Analiza GC-MS

Materiale și metodă

A fost efectuată o analiză cu ajutorul cromatografiei de gaze cuplată cu un spectrometru de masă (GC/MS) pentru a identifica și cuantifica constituenții uleiurilor esențiale de cuișoare, eucalipt, lavandă, mentă și oregano prin elucidare perceptibilă, comparând spectrele lor de masă cu spectrele de referință (NIST Library 2020). A fost folosit un Thermo Scientific Focus GC (Norristown, PA, SUA) cu un autosampler AI/AS 3000 cuplat cu un detector de masă DSQ II și echipat cu o coloană TraceGOLD TG-624 60 × 0,25 × 1,4 (mm). Volumul de injectare a fost de 1 μl, la un debit de 1,3 ml/min și un raport de împărțire de 1:50 folosind heliu ca gaz purtător. Temperatura inițială a cuptorului a fost setată la 110°C și menținută timp de 5 minute. După aceea, a fost crescută la 220°C cu o viteză de 2°C/min și menținută timp de 15 minute.

Temperatura liniei de transfer MS a fost menținută la 240°C. Temperatura sursei de ioni a fost de 230°C, iar ionizarea cu impact de electroni a fost setată la 70 eV. Spectrele au fost analizate în modul de scanare completă în intervalul de masă de la 50 la 450 și au fost înregistrați timpii de retenție (RT) ai tuturor constituenților [24].

Rezultate și discuții

Toți constituenții uleiurilor esențiale au fost identificați și cuantificați.

3.2.3. Analiza structurală RMN și IR a antibioticelor testate

Materiale și metodă

Antibioticele convenționale au fost analizate din punct de vedere structural înainte de a intra în testare.

Pentru analiza RMN a fost utilizat aparatul Mercury 300 BB (Varian Medical Systems, Inc., Palo Alto, CA, USA) care a lucrat la frecvența de 300 MHz pentru spectrele ^1H și 75.075 MHz pentru spectrele ^{13}C . Solventul utilizat pentru solubilizarea probelor de pulberi antibiotice a fost apa deuterată (D_2O).

Pentru analiza IR a fost utilizat aparatul FT-IR Bruker Vertex 70 echipat cu un dispozitiv de reflectare (ATR) cu un cristal de diamant. Spectrele IR au fost procesate cu software-ul OPUS 5.5 (Bruker).

Rezultate și discuții

Spectrele RMN și IR au confirmat structurile chimice ale neomicinei, bacitracinei și clorhidratului de tetraciclina.

3.2.4. Determinarea activității antibacteriene și antibiofilm prin metoda cu microplăci

Materiale și metodă

Metoda utilizată a fost adaptată din literatura de specialitate [16,17] și testată cu succes în studiul prezentat în Capitolul 2 [13].

Prepararea probelor

Probele au fost emulsii ulei/apă preparate cu o concentrație de ulei esențial de 30% g/g; emulgatorul utilizat a fost Poloxamer 407, de concentrație 5% în apă, după cum a fost menționat anterior [13,25].

Fiecare emulsie a fost diluată cu apă dublu distilată pentru a obține concentrația finală a fiecărei soluții stoc de ulei esențial de 25 mg/ml.

Combi-națiile binare de uleiuri esențiale au fost preparate într-un raport de 1:1.

Medicamentele antibiotice (neomicina, bacitracina și tetraciclina) au fost dizolvate în apă dublu distilată cu concentrația finală a unei soluții stoc de 5120 µg/ml.

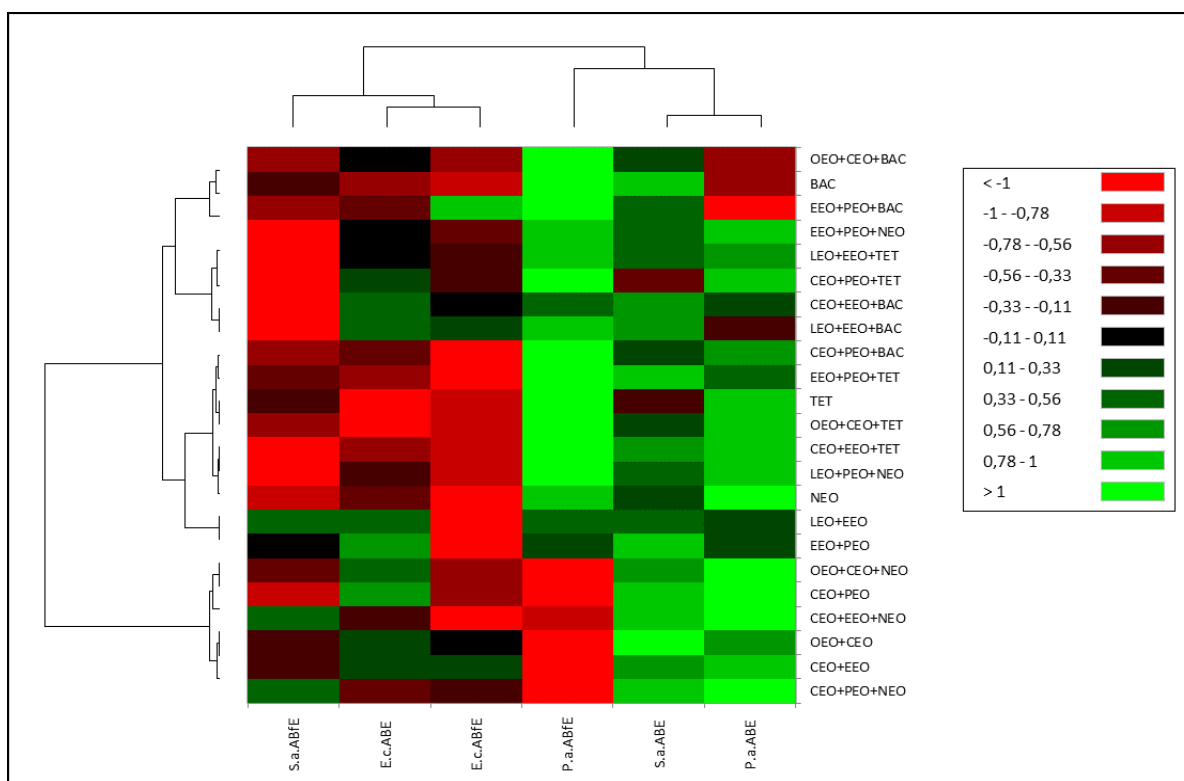
Triplele combinații au conținut părți egale din fiecare constituent (1:1:1).

Determinarea activității antibacteriene și antibiofilm

Protocolul de lucru este identic cel descris în Capitolul 2.

Rezultate și discuții

Cu ajutorul datelor obținute în urma testărilor a fost întocmită o hartă termică cu ajutorul căreia putem observa diferențele cu privire la activitatea antibacteriană și antibiofilm a uleiurilor esențiale în combinații binare și a triplelor combinații (uleiuri esențiale + antibiotice) așa cum se poate observa în **Figura 3.1**.



Notă: LEO - ulei esențial de lavandă; CEO – ulei esențial de cuișoare; OEO - ulei esențial de oregano; EEO - ulei esențial de eucalipt; PEO - ulei esențial de mentă; NEO - Neomicină; TET - Tetraciclina; și BAC - Bacitracină. Valorile ce indică synergism de acțiune sunt marcate cu verde, iar intensitatea culorii scade de la verde închis la verde deschis (indiferență), și intensitatea culorii crește de la roșu deschis (antagonism scăzut) la maro închis (antagonism foarte puternic).

Figura 3.1. Heatmap reprezentativ al efectelor antibacterian și antibiofilm, exprimate procentual, pentru combinații duble și triple.

După cum se poate observa pe heatmap, cele mai bune efecte antibacteriene au fost realizate asupra *S. aureus* și *P. aeruginosa*, iar cel mai bun efect antibiofilm a fost obținut asupra biofilmului de *P. aeruginosa*.

În ceea ce privește activitatea antibacteriană asupra *S. aureus*, *E. coli* și *P. aeruginosa*, 6 triple combinații (uleiuri esențiale + antibiotice) au obținut o valoare a eficacității antibacteriene mai mare decât cele obținute de combinațiile binare și antibioticele testate individual.

Referitor la activitatea antibiofilm asupra *S. aureus*, *E. coli* și *P. aeruginosa*, 12 triple combinații (uleiuri esențiale + antibiotice) au obținut o valoare a eficacității antibiofilm mai mare decât cele obținute de combinațiile binare și antibioticele testate individual.

3.2.5. Evaluarea in vitro a activității antibacteriene

Materiale și metodă

O evaluare *in vitro* a activității antibacteriene a soluțiilor testate a fost efectuată folosind o metodă semi-cantitativă (antibiograma difuzimetrică Kirby-Bauer adaptată [26]). Rezultatele - exprimate ca diametrul zonei de inhibiție IZD (mm) - au fost măsurate după 24 de ore de contact între soluțiile testate și bacteriile patogene. Protocolul de preparare a probelor este identic cu cel descris la 3.2.4.

Tehnica de lucru

Diametrele minime și maxime ale zonelor de inhibiție (IZD) au fost măsurate în mm, iar media aritmetică a fost calculată folosind o zecimală. Discurile de celuloză sterile cu diametrul Ø de 6 mm au fost impregnate cu 10 µl de soluții de probă și așezate pe plăcile Petri cu mediu de cultură. Cilindri sterili din sticlă borosilică cu diametrul Ø de 6 mm au fost plasați pe plăcile Petri cu mediu de cultură și încărcăți cu 100 µl de soluții de probă.

Apoi, plăcile Petri au fost incubate la 37°C și citite după 24 de ore. Concentrația minimă inhibitorie (CMI) a fost calculată din media aritmetică a IZD.

Martorii negativi au fost discuri de celuloză sterilă neimpregnate sau cilindri de sticlă neîncărcați.

Metoda indicativă de evaluare a corelației Cantitate/Efect (indice Q/Ef) specifică screening-ului agenților antimicrobieni constă în calculul valorii CMI:

$$Efect (CMI) = \frac{Q (\mu g)}{V (\mu l)}$$

Q - Cantitatea (µg) de soluție de probă aplicată.

V - Volumul mediului în care proba testată a difuzat și a inhibat multiplicarea microbială.

Indicele de Concentrație Inhibitorie Fraționată (FICI) a fost calculat pentru combinații duble și triple, după următoarele formule:

$$FICI_{AB} = (CMI_A \text{ asociat} / CMI_A \text{ singur}) + (CMI_B \text{ asociat} / CMI_B \text{ singur})$$

$$FICI_{ABC} = (CMI_A \text{ asociat} / CMI_A \text{ singur}) + (CMI_B \text{ asociat} / CMI_B \text{ singur}) + (CMI_C \text{ asociat} / CMI_C \text{ singur})$$

Rezultate și discuții

Calculul valorilor CMI din valorile IZD a condus la evaluarea interacțiunii dintre uleiurilor esențiale în combinații binare și uleiurilor esențiale și antibiotice convenționale în combinații triple prin analiza fiecărui indice FICI (vezi **Figura 3.2.**).

Studiul nostru a raportat o combinație binară sinergică (OEO+CEO) împotriva *P. aeruginosa*, o altă sinergie parțială (EEO+PEO) împotriva *S. aureus* și o altă combinație aditivă (CEO+PEO) împotriva *E. coli*. Observații similare cu privire la aceste efecte antibacteriene sunt disponibile pentru antibioticele convenționale combinate cu uleiuri esențiale. Combinațiile binare menționate anterior au condus la patru combinații triple parțial sinergice cu medicamente antibiotice (TET și NEO) care au fost relevate asupra *S. aureus* și *E. coli*, trei conținând TET.

Bacteria Proba	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	SaFICI1	SaFICI2	EcFICI1	EcFICI2	PaFICI1	PaFICI2
CEO+EEO	5.00	1.60	4.90	11.30	13.00	1.10
CEO+EEO+BAC	1.35		6.91	18.47		2.79
CEO+EEO+NEO	1.94	1.15	6.05	2.33	5.56	7.50
CEO+EEO+TET	3.52	8.52	1.97	2.46	2.93	3.54
CEO+PEO	6.00	2.20	1.00		1.80	
CEO+PEO+BAC	5.38		1.27			
CEO+PEO+NEO	9.33	2.52	1.11	2.16	1.29	
CEO+PEO+TET	3.09	0.74	0.92	1.59	1.49	2.62
EEO+PEO	0.80	1.40	3.70	7.00	9.80	4.20
EEO+PEO+BAC	1.25	3.54	8.14	10.51	18.35	3.22
EEO+PEO+NEO	1.66	0.53	3.78	3.93	2.56	3.68
EEO+PEO+TET	2.37	15.22	0.92	1.99	3.78	3.74
LEO+EEO	1.20	2.50	15.60	11.10	11.70	5.00
OEO+CEO	2.60	9.90	4.00	10.00	3.90	0.20
LEO+EEO+NEO	3.83	4.27	11.35	5.04	10.73	2.05
OEO+CEO+NEO	3.98	6.67	3.70			1.16
LEO+EEO+BAC	3.76	5.32	23.61	26.28		3.03
OEO+CEO+BAC	3.02	3.77	4.16	10.48		
LEO+EEO+TET	4.83	3.20	3.74	4.47	4.97	8.27
OEO+CEO+TET	4.87	1.80	4.42	4.96		14.23

Notă: LEO - ulei esențial de lavandă; CEO – ulei esențial de cuișoare; OEO - ulei esențial de oregano; EEO - ulei esențial de eucalipt; PEO - ulei esențial de mentă; NEO - Neomicină; TET - Tetracilină; și BAC - Bacitracină. FICI - Indicele de Concentrație Inhibitorie Fraționată. Dacă IZD = 0 mm, substanța nu are efect; nu exista CMI. $FICI \leq 0,5$ indică sinergism (S). $0,5 < FICI < 1$ înseamnă sinergism parțial (PS); $FICI = 1$ indică efecte aditive (AD); $1 < FICI \leq 4$ —indiferență (I); $FICI > 4$ este antagonism (ANT) [27]; $4 < FICI \leq 10$ - antagonism scăzut; $10 < FICI \leq 15$ —antagonism moderat; $15 < FICI \leq 20$ - antagonism puternic; $FICI > 20$ - antagonism foarte puternic. FICI1 - determinat prin tehnica discului (DDM); și FICI2 - determinat prin tehnica cilindrului (CT). Sa - *S. aureus*, Ec - *E. coli* și Pa - *P. aeruginosa*. Valorile $FICI \leq 4$ sunt marcate cu verde, iar intensitatea culorii scade de la verde închis (sinergism) la verde deschis (indiferență), valorile $FICI > 4$ sunt marcate cu maro și intensitatea culorii crește de la maro deschis (antagonism scăzut) la maro închis (antagonism foarte puternic).

Figura 3.2. Heatmap reprezentativ al valorilor FICI pentru combinații duble și triple.

4. Concluzii și contribuții personale

Concluzii generale

În cadrul studiilor a fost analizată eficacitatea antibacteriană/antibiofilm prin metoda cu microplăci pentru cele cinci tipuri de uleiuri esențiale disponibile pe piața din România. Au fost luate în lucru 2 până la 4 variante din fiecare ulei esențial, pentru a selecta în etapele următoare ale studiului variantele de ulei esențial care au prezentat cea mai bună eficacitate antibacteriană/antibiofilm. De asemenea, rezultatele obținute de uleiurile esențiale au fost comparate cu rezultatele unor antibioticelor cu spectru larg de acțiune: gentamicină, streptomycină și amoxicilină&acid clavulanic.

Înainte de a realiza asocierile în combinații binare (ulei esențial 1 + ulei esențial 2) și triple combinații (uleiuri esențiale + antibiotice), componentele au fost analizate din punct de vedere chimic. Testarea eficacităților antibacteriene/antibiofilm pentru combinațiile binare și triplele combinații a fost realizată atât prin metoda cu microplăci, cât și prin metoda antibiogrammei difuzimetrice, adaptată, cu două tehnici: tehnica discului și tehnica cilindrului.

În urma studiilor efectuate pot fi identificate următoarele concluzii:

- Toate uleiurile esențiale testate individual au prezentat efect antibacterian și antibiofilm asupra bacteriilor gram-pozitive și gram-negative cu o valoare a CMI > 25 mg/ml;
- Dintre bacteriile asupra cărora s-au realizat testările, *E. coli* a manifestat cea mai redusă susceptibilitate;
- Uleiurile esențiale cu un conținut moderat de compuși bioactivi au înregistrat o diminuare substanțială a potențialului antibacterian odată cu creșterea gradului de diluție. În schimb, uleiurile esențiale cu un conținut ridicat de metaboliți activi au prezentat diferențe ne semnificative la toate diluțiile zecimale;
- Probele aceluiși ulei esențial produs de firme diferite au prezentat în general activități similare cu excepția PEO. Cele 4 probe de PEO au înregistrat variații mari ale efectelor antibacteriene și antibiofilm, fapt datorat diferențelor semnificative în ceea ce privește conținutul în constituenți bioactivi;

- În etapa următoare de testare au fost selectate uleiurile esențiale (OEO, CEO, EEO, PEO și LEO) provenite de la „Laboratoarele Fares Biovital SRL” (Oraștie, România);
- Analizarea uleiurilor esențiale cu ajutorul cromatografiei de gaze cuplată cu un spectrometru de masă (GC/MS) a identificat și cuantificat constituenții acestora:
 - CEO:** Eugenol 86,23 %, Cariofilen 6,88 %, Acetat de eugenol 5,75 %;
 - EEO:** Eucaliptol 83,75 %, Limonen 5,45 %, o-Cimen 4,13%;
 - LEO:** Linalol 52,93 %, Acetat de Linalil 32,31 %, α -Pinen 3,16 %;
 - PEO:** Izomentonă 26,53 %, Eucaliptol 5,05 %, Limonen 2,09 %;
 - OEO:** p-Timol 72,10 %, o-Cimene 16,27 %, γ -Terpinen 2,98 %;
- Spectrele RMN, precum și spectrul IR confirmă structura chimică a Neomicinei și a clorhidratului de Tetraciclină. În ceea ce privește Bacitracina, spectrele RMN sunt indescifrabile datorită complexității moleculei sale însă spectrul IR confirmă structura chimică a Bacitracinei;
- Probele au fost formulate ca emulsii ulei/apă având o concentrație de ulei esențial de 30% g/g; emulgatorul utilizat a fost Poloxamer 407, de concentrație 5% în apă. Fiecare emulsie a fost diluată cu apă dublu distilată obținerea concentrației finale pentru fiecare soluție stoc de ulei esențial de 25 mg/ml. Combinațiile binare de uleiuri esențiale au fost preparate într-un raport de 1:1; Medicamentele antibiotice (neomicina, bacitracina și clorhidratul de tetraciclină) au fost dizolvate în apă dublu distilată cu concentrația finală a unei soluții stoc de 5120 μ g/ml. Triplele combinații au conținut părți egale din fiecare constituent (1:1:1). Atât combinațiile binare cât și triplele combinații au prezentat stabilitate și omogenitate corespunzătoare înainte de a intra în testare;
- În urma testărilor realizate prin intermediul metodei cu microplăci, cele mai bune efecte antibacteriene au fost realizate asupra *S. aureus* și *P. aeruginosa*, iar cel mai bun efect antibiofilm a fost obținut asupra biofilmului de *P. aeruginosa*;
- Metoda cu microplăci a evidențiat 6 triple combinații (EEO+PEO+TET, LEO+EEO+BAC, LEO+EEO+NEO, EEO+PEO+NEO, OEO+CEO+TET și CEO+PEO+TET) cu eficacitate antibacteriană asupra *S. aureus*, *E. coli* și *P. aeruginosa* mai mare decât a combinațiilor binare și a antibioticelor testate individual ceea ce indică sinergisme de acțiune;
- 12 triple combinații (EEO+PEO+BAC, CEO+EEO+NEO, LEO+EEO+BAC, EEO+PEO+BAC, LEO+EEO+NEO, EEO+PEO+NEO, OEO+CEO+TET,

CEO+PEO+TET, LEO+EEO+TET, EEO+PEO+TET, OEO+CEO+BAC și EEO+PEO+BAC) cu activitate antibiofilm asupra *S. aureus*, *E. coli* și *P. aeruginosa*, mai mare decât a combinațiilor binare de uleiuri esențiale și a antibioticelor testate individual au fost evidențiate prin metoda cu microplăci ceea ce indică synergisme de acțiune;

- Testările prin metoda antibiogramei difuzimetrice adaptate au evidențiat activitate antibacteriană semnificativă asupra *S. aureus* și *P. aeruginosa* a combinațiilor binare de uleiuri esențiale, precum și a celor triple cu antibiotice convenționale;
- Metoda antibiogramei difuzimetrice a evidențiat o combinație binară sinergică (OEO+CEO) împotriva *P. aeruginosa*, un synergism parțial (EEO+PEO) împotriva *S. aureus* și o acțiune antibacteriană aditivă (CEO+PEO) împotriva *E. coli*;
- Triplele combinații au prezentat efecte parțial synergice: EEO+PEO+NEO asupra *S. aureus* și EEO+PEO+TET asupra *E. coli*. Tripla combinație CEO+PEO+TET a manifestat synergism parțial atât pe *S. aureus* cât și pe *E. coli*.

Contribuții personale

Gradul de originalitate al tezei de doctorat a constat în:

- Design-ul inedit al primului studiu în care au fost selectate cinci uleiuri esențiale de la producători autohtoni. În etapa de pre-screening, pentru fiecare ulei esențial au fost analizate 2-4 produse comercializate în țara noastră, furnizate de companii românești. Pe baza buletinelor GC-MS puse la dispoziție de producători, s-a analizat compoziția chimică a acestora în conformitate cu reglementările prevăzute de EMA. Apoi, s-a evaluat eficacitatea antibacteriană/antibiofilm împotriva unor bacterii gram-pozitive și gram-negative cunoscute pentru rezistența lor multiplă la antibioticele convenționale. Aceasta a fost corelată cu conținutul în constituenți activi pentru fiecare probă analizată în parte și s-au selectat astfel cele mai active uleiuri esențiale produse în România;
- Constituenții bioactivi din uleiurile esențiale selectate au fost cuantificați prin analiză GC-MS utilizând standarde recunoscute la nivel internațional. În același timp, structura chimică a antibioticelor testate a fost confirmată cu ajutorul spectrelor RMN și IR;
- Uleiurile esențiale selectate au fost asociate în combinații binare precum și în triple combinații cu antibiotice convenționale care au fost foarte puțin analizate până acum în literatura de specialitate accesată;
- Testarea eficacităților antibacteriene/antibiofilm pentru combinațiile binare și triplele combinații a fost realizată atât prin metoda cu microplăci, cât și prin metoda antibiogrammei difuzimetrice, adaptată, cu două tehnici: tehnica discului și tehnica cilindrului;
- Multitudinea de metode utilizate conferă acuratețe rezultatelor obținute.

Perspective de cercetare

Rezultatele obținute în urma studiilor efectuate pe parcursul tezei de doctorat justifică continuarea cercetărilor în următoarele direcții:

- Asocierea în triple combinații a unor antibiotice de generație mai nouă utilizate în tratarea infecțiilor cutanate;
- Extinderea cercetărilor și pe alte specii de bacterii gram-pozitive și gram-negative;
- Evaluarea eficacității antibacteriene și antibiofilm a triplelor combinații prin metode *in vivo* (modele experimentale animale);
- Evaluarea toxicității triplelor combinații prin metode *in vivo* (modele experimentale animale);
- Încorporarea triplelor combinații într-o formă farmaceutică cu o biodisponibilitate crescută la administrare cutanată;
- Confirmarea eficacității antibacteriene/antibiofilm și stabilirea profilului de siguranță pentru triplele combinații prin intermediul studiilor clinice.

Bibliografie selectivă

1. Abat C, Chaudet H, Rolain JM. Traditional and syndromic surveillance of infectious diseases and pathogens. *Int J Infect Dis.* 48, 22-8, 2016.
2. Zucca M, Savoia D. The Post-Antibiotic Era: Promising Developments in the Therapy of Infectious Diseases. *Int J Biomed Sci.* 6 (2), 77-86, 2010.
3. Canton R, Morosini MI. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol Rev.* 35, 977-91, 2011.
4. Cheesman MJ, Ilanko A, Blonk B, Cock IE. Developing New Antimicrobial Therapies: Are Synergistic Combinations of Plant Extracts/Compounds with Conventional Antibiotics the Solution?. *Pharmacogn Rev.* 11, 57-72, 2017.
5. Abreu AC, McBain AJ, Simões M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Nat Prod Rep.* 29, 1007-21, 2012.
6. OECD. Antimicrobial Resistance Tackling the Burden in the European Union. 2019.
7. Negreș S, Cristea AN. Antibiotice și chimioterapice antimicrobiene. *Tratat de Farmacologie.* ed. I, 955-1057, Editura Medicală, București, 2006.
8. Cepas V, López Y, Muñoz E, Rolo D, Ardanuy C, Martí S, Xercavins M, Horcajada JP, Bosch J, Soto SM. Relationship Between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Microb Drug Resistance.* 25 (1), 72-79, 2019.
9. Romling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med.* 272, 541–561, 2012.
10. Bassolé IHN, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules.* 17, 3989-4006, 2012.
11. Laishram S, Pragasam AK, Bakthavatchalam YD, Veeraraghavan B. An update on technical, interpretative and clinical relevance of antimicrobial synergy testing methodologies. *Indian J Med Microbiol.* 35, 445-468, 2017.
12. Blazquez J, Baquero MR, Canton R. *et al.* Characterization of a new TEM-type beta-lactamase resistant to clavulanate sulbactam and tazobactam in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 37, 2059-63, 1993.
13. **Neagu R**, Popovici V, Ionescu LE, Ordeanu V, Popescu DM, Ozon EA, Gîrd CE. Antibacterial and Antibiofilm Effects of Different Samples of Five Commercially Available Essential Oils. *Antibiotics.* 12, 1191, 2023. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071191>.

14. Steinhoff B. Harmonised Assessment Criteria for Efficacy and Safety of Herbal Medicinal Products. *Rev. Fitoter.* 2, 47, 2002.
15. Yevale R, Khan N, Kalamkar P. Overview on “Regulations of Herbal Medicine”. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 7, 61–63, 2018.
16. Martinez A, Manrique-Moreno M, Klaiss-Luna MC, Stashenko E, Zafra G, Ortiz C. Effect of Essential Oils on Growth Inhibition, Biofilm Formation and Membrane Integrity of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics.* 10, 1474, 2021.
17. Gomez-Sequeda N, Caceres M, Stashenko EE, Hidalgo W, Ortiz C. Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Essential Oils against *Escherichia coli* O157:H7 and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Antibiotics.* 9, 730, 2020.
18. Popovici V, Bucur L, Gîrd CE, Rambu D, Calcan SI, Cuculea EI, Costache T, Ungureanu-Iuga M, Oroian M, Mironeasa S, et al. Antioxidant, Cytotoxic, and Rheological Properties of Canola Oil Extract of *Usnea barbata* (L.) Weber Ex F. H. Wigg from Călimani Mountains, Romania. *Plants.* 11, 854, 2022.
19. Guillin Y, Caceres M, Torres R, Stashenko E, Ortiz C. Effect of Essential Oils on the Inhibition of Biofilm and Quorum Sensing in *Salmonella Enteritidis* 13076 and *Salmonella Typhimurium* 14028. *Antibiotics.* 10, 1191, 2021.
20. Popovici V, Bucur L, Gîrd CE, Popescu A, Matei E, Caraiane A, Botnariuc M. Phenolic Secondary Metabolites and Antiradical and Antibacterial Activities of Different Extracts of *Usnea barbata* (L.) Weber Ex F. H. Wigg from Călimani Mountains, Romania. *Pharmaceuticals.* 15, 829, 2022.
21. Sandulovici RC, Carmen-Marinela M, Grigoriu A, Moldovan CA, Savin M, Ordeanu V, Voicu SN, Cord D, Costache GM, Galatanu ML, **Neagu R**, et al. The Physicochemical and Antimicrobial Properties of Silver/Gold Nanoparticles Obtained by “Green Synthesis” from Willow Bark and Their Formulations as Potential Innovative Pharmaceutical Substances. *Pharmaceuticals.* 16, 10048, 2023.
22. Hachlafi NEL, Aanniz T, El Menyiy N, El Baaboua A, El Omari N, Balahbib A, Shariati MA, Zengin G, Fikri-Benbrahim K, Bouyahya A. In Vitro and in Vivo Biological Investigations of Camphene and Its Mechanism Insights: A Review. *Food Rev. Int.* 39, 1799–1826, 2023.
23. **Neagu R**, Popovici V, Ionescu LE, Ordeanu V, Biță A, Popescu DM, Ozon EA, Gîrd CE. Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of Commercially Available Essential Oils Combinations with Conventional Antibiotics Against Gram-Positive

- and Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*. 13, 478, 2024.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics13060478>.
24. Luță EA, Biță A, Moroșan A, Mihaiescu DE, Ghica M, Mihai DP, Olaru OT, Deculescu-Ioniță T, Duțu LE, Popescu ML, et al. The Influence of Phytosociological Cultivation and Fertilization on Polyphenolic Content of *Menthae* and *Melissae Folium* and Evaluation of Antioxidant Properties through In Vitro and In Silico Methods. *Plants*. 11, 2398, 2022.
 25. Popovici V, Matei E, Cozaru GC, Bucur L, Gîrd CE, Schröder V, Ozon EA, Karampelas O, Musuc AM, Atkinson I, et al. Evaluation of *Usnea barbata* (L.) Weber Ex F.H. Wigg Extract in Canola Oil Loaded in Bioadhesive Oral Films for Potential Applications in Oral Cavity Infections and Malignancy. *Antioxidants*. 11, 1601, 2022.
 26. Hudzicki J, Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *Am. Soc. Microbiol.* 1–13, 2012. available online at <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-DiffusionSusceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf>, accessed on 3 March 2024.
 27. Popovici V, Bucur L, Calcan SI, Cucolea EI, Costache T, Rambu D, Schröder V, Gîrd CE, Gherghel D, Vochita G, et al. Elemental Analysis and In Vitro Evaluation of Antibacterial and Antifungal Activities of *Usnea barbata* (L.) Weber Ex F.H. Wigg from Călimani Mountains, Romania. *Plants*. 11, 32, 2022.