



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA – CAMPUS DE SOBRAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**LUDIMILA GOMES PINHEIRO**

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides*  
CONTRA BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS MULTIDROGA RESISTENTES**

**SOBRAL**

**2021**

LUDIMILA GOMES PINHEIRO

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides* CONTRA  
BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS MULTIDROGA RESISTENTES

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral, como requisito final para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto.

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa.

SOBRAL

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- P72p Pinheiro, Ludimila Gomes.  
Potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Lippia sidoides* contra bactérias Gram-negativas multidroga resistentes / Ludimila Gomes Pinheiro. – 2021.  
59 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2021.  
Orientação: Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto.  
Coorientação: Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa.
1. Fitoterápicos. 2. Produtos naturais. 3. Infecções nosocomiais. 4. Verbenaceae. 5. Beta-lactamases. I.  
Título.

CDD 660.6

---

**LUDIMILA GOMES PINHEIRO**

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides*  
CONTRA BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS MULTIDROGA RESISTENTES**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral, como requisito final para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais e Sintéticos.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará/*Campus* de Sobral

---

Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa (Coorientador)  
Universidade Federal do Ceará/*Campus* de Sobral

---

Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva  
Universidade Federal do Ceará/*Campus* de Sobral

---

Prof(a) Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle  
Universidade Estadual Vale do Acaraú/*Campus* de Sobral

À minha mãe, Angela Maria Gomes, por toda vida de dedicação e de ensinamentos em busca do melhor para mim.

## AGRADECIMENTOS

À DEUS, por todas as oportunidades colocadas em meu caminho, por sua proteção e amor infinitos revelados a mim todos os dias. À Nossa Senhora, por sua intercessão, proteção e colo de mãe.

Aos meus familiares: mãe, tias, avós que sempre confiaram e cuidaram de mim dedicando parte de suas vidas em prol do meu sucesso.

Ao meu marido Lourival Neto, seu amor, companheirismo, compreensão e apoio incondicional são fundamentais para minhas conquistas e para minha felicidade.

Ao Professor Dr. Francisco Cesar Barbosa por seu apoio, dedicação, sabedoria e humanidade que são realmente facilitadores dessa caminhada, por muitas vezes atribulada, cercada de dúvidas e de incertezas.

Aos Professores Drs.: Vicente Pinto, Raquel Fontenelle, Igor Iuco Castro pelos conhecimentos compartilhados e pela atenção prestada a esse trabalho, sempre dispostos a ajudar, com contribuições necessárias.

Aos amigos que torcem por mim, cito aqui: Guilherme Mendes, Maria José, Nayara Alves que, por conta do destino, estiveram presentes ao meu lado me ajudando com conhecimentos e parceria. Obrigada pelo apoio e pelas risadas que aliviaram essa jornada.

Aos alunos de iniciação científica Marina e Fernando pelos serviços prestados ao Laboratório de Microbiologia que são de grande ajuda durante o processo.

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade ofertada e pelos conhecimentos transmitidos por um grupo docente extremamente qualificado. À Universidade Federal do Ceará e à Universidade Estadual Vale do Acaraú pela estrutura e tecnologias cedidas ao longo do curso para que fosse possível a execução deste trabalho.

À Santa Casa de Misericórdia de Sobral pelo apoio, parceria e financiamento no âmbito da pesquisa científica.

A todos minha eterna Gratidão!

## RESUMO

A produção de enzimas específicas é uma das principais formas que garante a sobrevivência e a adaptação das bactérias frente aos antibióticos. Os óleos essenciais, originários de plantas aromáticas, são compostos por substâncias químicas as quais são atribuídos efeitos benéficos para quem os utiliza. *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) tem origem no semiárido do nordeste brasileiro e o extrato obtido a partir de suas folhas tem efeitos anti-inflamatório, inseticida, antibacteriano, larvicida, entre outros. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial (OE) de *L. sidoides* frente a bactérias Gram-negativas isoladas de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) com fenótipo de multirresistência e correlacionar os resultados obtidos com o perfil genético desses microrganismos. O referido óleo foi extraído das folhas dessa planta por arraste a vapor e condensação com equipamento de Clevenger, os componentes químicos da mistura foram identificados e quantificados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa e cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chama, respectivamente. Foi avaliado o potencial antibacteriano por valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente a cepas padrões ATCC e sessenta isolados nosocomiais multidroga resistentes (MDR) de *Escherichia coli* (n=20), *Klebsiella pneumoniae* (n=20) e *Pseudomonas aeruginosa* (n=20) coletados de hospitais localizados em Sobral/CE e pertencentes à coleção biológica do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia (FAMED – UFC/Sobral). Os resultados demonstraram que timol é o componente prevalente desse OE, sendo que na concentração de 312µg/mL o óleo foi efetivo na inibição de 52% das amostras de *E. coli* e em cerca de 38% de *K. pneumoniae*. Contudo, para *P. aeruginosa* foi preciso uma concentração de 2.500µg/mL, para obter inibição do crescimento de aproximadamente 38% dos espécimes. Todos os isolados clínicos analisados são produtores de β-lactamases de espectro estendido (ESBL) e dentre os genes de resistência detectados a maior prevalência foi de *bla*<sub>CTX-M1/2</sub>, assim o fenótipo de multirresistencia não impediu a ação antibacteriana do OE. Portanto, a substância se apresenta como um composto antibacteriano eficiente com potencial de uso no enfrentamento de infecções por bactérias MDR.

**Palavras-chave:** fitoterápicos; produtos naturais; infecções nosocomiais; Verbenaceae; beta-lactamases.

## ABSTRACT

The production of specific enzymes is one of the main ways that bacteria survive and adapt to antibiotics. Essential oils, originating from aromatic plants, are composed of chemical substances which are attributed beneficial effects for those who use them. *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) has its origins in the semiarid region of northeastern Brazil and the extract obtained from its leaves has anti-inflammatory, insecticidal, antibacterial, larvicidal effects, among others. Thus, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial potential of essential oil (EO) from *L. sidoides* against Gram-negative bacteria isolated from healthcare-related infections (HRI) with multidrug resistance phenotype and to correlate the results obtained with the genetic profile of these microorganisms. Said oil was extracted from the leaves of this plant by steam dragging and condensation with Clevenger equipment, the chemical components of the mixture were identified and quantified by gas chromatography coupled with mass spectrometry and gas chromatography coupled with the flame ionization detector, respectively. The antibacterial potential was evaluated by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (CBM) values against ATCC standard strains and sixty multidrug resistant (MDR) nosocomial isolates of *Escherichia coli* (n=20), *Klebsiella pneumoniae* (n=20) and *Pseudomonas aeruginosa* (n=20) collected from hospitals located in Sobral/ CE and belonging to the biological collection of the Laboratory of Microbiology and Parasitology (FAMED – UFC/Sobral). The results showed that thymol is the prevalent component of this EO, and at a concentration of 312µg/mL the oil was effective in inhibiting 52% of *E. coli* strains and about 38% of *K. pneumoniae*. However, for *P. aeruginosa* a concentration of 2.500µg/mL was needed to obtain growth inhibition of approximately 38% of the specimens. All clinical isolates analyzed are producers of extended-spectrum β-lactamases (ESBL) and among the resistance genes detected, the highest prevalence was bla<sub>CTX-M1/2</sub>, so the multi-resistance phenotype did not prevent the antibacterial action of the EO. Therefore, the substance presents itself as an efficient antibacterial compound with potential for use in fighting MDR bacterial infections.

**Keywords:** phytotherapeutics; natural products; nosocomial infections; Verbenaceae; beta-lactamases.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CTX-M	Cefotaximase
ESBL	<i>Extended Spectrum Beta Lactamase</i>
FAMED	Faculdade de Medicina
FC	Fibrose Cística
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GES	<i>Guiana Extended Spectrum</i>
IMP	Imipenemase
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LAMP	Laboratório de Microbiologia e Parasitologia
MBLs	Metallo $\beta$ -lactamases
MCR	<i>Mobile Colistin Resistance</i>
MDR	Resistentes a Múltiplas Drogas
NDM	<i>New Delhi Metalobetalactamase</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	<i>Active on Oxacillin</i>
PDR	Pan-resistentes
SHV	<i>Sulphydryl-Variable <math>\beta</math>-Lactamase</i>
TEM	Temoniera $\beta$ -Lactamase
UFC	Universidade Federal do Ceará
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
USA	<i>United States of América</i>
UVA	Universidade Estadual Vale do Acaraú
VIM	<i>Verona Integron-encoded Metallo-<math>\beta</math>-lactamase</i>
XDR	Extensivamente Resistente a Medicamentos

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
µl	Microlitro
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
β	Beta
h	Horas
p	Nível de significância

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1	<b>Resistência bacteriana aos <math>\beta</math>-lactâmicos</b> .....	13
2.2	<b>Antimicrobianos <math>\beta</math>-lactâmicos e <math>\beta</math>-lactamases de espectro estendido (ESBL)</b> .....	15
2.3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	16
2.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	17
2.5	<i>Escherichia coli</i> .....	18
2.6	<b>Fitoterápicos contra infecções</b> .....	19
2.7	<b>Óleos essenciais</b> .....	20
2.8	<i>Lippia sidoides</i> .....	21
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
3.1	<b>Objetivo geral</b> .....	23
3.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	23
4	<b>METODOLOGIA</b> .....	24
4.1	<b>Aspectos éticos</b> .....	24
4.2	<b>Aspectos legais</b> .....	24
4.3	<b>Espécimes do estudo</b> .....	24
4.4	<b>Obtenção do óleo essencial</b> .....	24
4.5	<b>Determinação da composição química</b> .....	25
4.6	<b>Reativação dos isolados bacterianos</b> .....	26
4.7	<b>Ensaio da Microdiluição em Caldo</b> .....	26
4.7.1	<i>Preparação da placa de 96 poços</i> .....	27
4.8	<b>Ensaio da Concentração Bactericida Mínima (CBM)</b> .....	27
4.9	<b>Análise do perfil de resistência pela presença de ESBL</b> .....	27
5	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	28
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	37
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	38
	<b>ANEXO A</b> .....	43
	<b>ANEXO B</b> .....	45

<b>ANEXO C .....</b>	<b>46</b>
----------------------	-----------

## 1 INTRODUÇÃO

Bacilos Gram-negativos são uma ampla classe de microrganismos difundidos nos mais diversos ambientes. Organismos que compõem e participam do equilíbrio dos habitats os quais estão relacionados, porém quando submetidos a situações desfavoráveis têm a notável capacidade de usufruir de estratégias de sobrevivência com mecanismos moleculares sofisticados codificando proteínas responsáveis por garantir a persistência e a resistência. Bactérias multirresistentes são motivo de preocupação na área da saúde global, por afunilar ou até mesmo zerar as opções terapêuticas, principalmente nos casos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). A problemática relaciona-se principalmente com os bacilos Gram-negativos (FERNÁNDEZ; BERT; NICOLAS-CHANOINE, 2016).

Em casos de infecções severas por bactérias Gram-negativas multidroga resistentes (MDR), os carbapenêmicos são a opção terapêutica de escolha, porém esses microrganismos podem apresentar diversos mecanismos de resistência, como: produtos enzimáticos, alteração das proteínas membranares, além de que, deve-se considerar que o material genético pode ser facilmente transmitido entre células bacterianas através de estrutura celular específica. A prevalência infecciosa está atrelada a fatores de risco do paciente, principalmente se este já esteve em contato com terapias antimicrobianas anteriores com carbapenêmicos (TING; LEE; LIU, 2018).

A ação das enzimas  $\beta$ -lactamases produzidas por Gram-negativas é mais propícia e eficiente, visto que, estas se encontram distribuídas no espaço periplasmático inativando o antimicrobiano antes que este tenha contato com o alvo de ação presente na membrana citoplasmática (PRAGASAM *et al.*, 2016).

Dessa forma, pesquisadores são desafiados a desenvolver compostos capazes de combater a ação de microrganismos e conter os mecanismos biológicos de sobrevivência que estes detêm. O uso de plantas e de seus constituintes apresentam relevância quando relacionados à medicina popular e ao desenvolvimento de novos produtos com características direcionadas ao controle microbiano (BALDIM *et al.*, 2019).

Devido ao uso amplo e difundido de maneira histórica, os produtos naturais têm destaque por proporcionar efeitos positivos na medicina popular por abranger inúmeras propriedades interessantes, como: anti-inflamatórias, antioxidantes, antitumorais e

antimicrobianas, fatores enaltecidos quando utilizados em organismos vivos, pois os riscos associados com contraindicações são reduzidos ou inexistentes (BALDIM *et al.*, 2019). Esses fatores promovem interesse científico impulsionando as pesquisas em muitas áreas, envolvendo as indústrias: farmacêutica, cosmética, alimentícia, biotecnológica, entre outras (TOBOUTI *et al.*, 2017).

Os óleos essenciais (OE) obtidos de constituintes vegetais são um complexo de substâncias químicas orgânicas voláteis produzidos por metabólitos secundários responsáveis pelas atividades biológicas das plantas. Terpenos, compostos aromáticos e alifáticos como álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis e éteres fenólicos estão entre os componentes mais prevalentes nessas substâncias (PUSKÁROVÁ *et al.*, 2017).

Oriunda do semiárido do nordeste brasileiro a *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) é uma planta aromática de interesse da indústria farmacêutica, de alimentos e de cosméticos por apresentar comprovadamente propriedades inseticida, antibacteriana, larvicida, acaricida, anti-inflamatória entre outras (BALDIM *et al.*, 2019). Timol e carvacrol são compostos em destaque no óleo essencial extraído das folhas desse vegetal popularmente denominado de “alecrim pimenta”. Com efeitos positivos no tratamento de ferida de pele, este óleo pode ser incluído em produtos como antisséptico oral e outros com finalidade dermatológica (BALDIM *et al.*, 2019).

Os constituintes dos óleos essenciais, como timol e carvacrol, têm como alvo a membrana celular afetando o equilíbrio eletrostático e outras funções vitais causando consequentes danos à estrutura celular. A eficiência desses extratos está relacionada exatamente a complexidade dos compostos que se comportam de maneira sinérgica (KHAN; AHMAD, 2011).

Na expectativa de descobrir novos agentes antimicrobianos vários OE de plantas da espécie Verbenaceae foram testados *in vitro* e apresentaram atividade efetiva contra ampla variedade de microrganismos (PÉREZ ZAMORA; TORRES; NUÑEZ, 2018). Entretanto, não há relatos da ação de compostos oriundos desse vegetal frente a espécimes nosocomiais MDR. Ressaltando-se assim, a necessidade de ampliar a investigação da atividade antimicrobiana de *L. sidoides* Cham contra bactérias com fenótipo de multirresistência, visando atenuar a situação alarmante que essas causam em níveis sociais relacionados à saúde e à economia.

Esta conjuntura revela a necessidade de novas abordagens comportamentais da comunidade hospitalar, mais pesquisa e aperfeiçoamento de novos métodos viáveis no controle e no combate desses microrganismos. Dessa forma, resultados relacionados com a capacidade de inibição ou atividade bactericida são promissores e tornam-se ferramentas fundamentais para o desenvolvimento de novos produtos farmacológicos e químicos em geral.

Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial (OE) de *Lippia sidoides* frente a bactérias Gram-negativas isoladas de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) com fenótipo de multirresistência e correlacionar os resultados obtidos com o perfil genético desses microrganismos.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Resistência bacteriana aos $\beta$ -lactâmicos**

Microrganismos Gram-negativos, geralmente, são patógenos oportunistas capazes de provocar infecções graves em organismos imunocomprometidos. Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) têm um índice de ocorrência crescente com alta taxa de mortalidade, sendo um agravante para pacientes em tratamento e um transtorno oneroso para os setores de saúde (ADLER *et al.*, 2016). A capacidade dos Gram-negativos de adquirir resistência é ampla e a síntese de enzimas, como  $\beta$ -lactamases, garante o êxito dos processos infecciosos por mais tempo anulando o efeito de muitas drogas ou tornando o tratamento tóxico, traçando assim, uma preocupação epidemiológica (ADLER *et al.*, 2016).

Conforme o perfil de resistência os microrganismos podem ser classificados como: Resistentes a Múltiplas Drogas (MDR); Extensivamente Resistente a Medicamentos (XDR) ou Pan-resistentes (PDR), sendo este, resistentes a todos os agente antimicrobianos disponíveis (NISHIDA; ONO, 2020). A produção de enzimas  $\beta$ -lactamases, responsáveis por hidrolisar o anel dos medicamentos  $\beta$ -lactâmicos, garante resistência a uma ampla gama de antibióticos como penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas e carbapenêmicos (NASSER; GAYEN; KHARAT, 2020).

Infecções causadas por patógenos pan-resistentes têm como tratamento o uso de colistina intravenosa com um custo de aproximadamente US\$120 por dia. A resistência à

colistina está associada ao uso intensivo na agropecuária que, dessa forma, manifestou nos animais tratados o gene *mcr-1*, originário de plasmídeo, portanto facilmente disseminado entre células via conjugação (VALENZUELA-VALDERRAMA; GONZÁLEZ; PALAVECINO, 2019).

Adler *et al.* (2016) citaram os patógenos que formam o grupo denominado “ESKAPE” que contêm bactérias Gram-negativas consideradas pela Sociedade de Doenças Infecciosas da América como as mais relacionadas com infecções hospitalares, sendo elas: *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* sp. e *Escherichia coli*.

A transferência horizontal de plasmídeos garante a disseminação de genes vantajosos abrangendo ampla gama de bactérias de maneira célere. Bactérias resistentes a carbapenêmicos sinalizam a utilização de polimixinas, porém há relatos da disseminação de isolados portadores de plasmídeos com gene *mcr-1* que confere resistência à colistina. Esse gene foi descoberto em *E. coli* e logo após, identificado em cepas de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* (SILVA, 2018).

As  $\beta$ -lactamases segundo a Classificação Ambler são divididas em quatro classes: Classe A:  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs); classe B: metalo  $\beta$ -lactamases (MBLs); classe C: AmpC e Classe D: tipo OXA. As ESBLs são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e aztreonam, com exceção das cefamicinas ou carbapenêmicos (AL DAWODEYAH *et al.* 2018).

Tsai, Liu e Su (2018) identificaram amostras de *K. pneumoniae* multirresistente produtoras de carbapenemase como colonizadora predominante em pacientes internados, principalmente a longo prazo, em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), portadoras de *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>IMP</sub>.

Neubeiser *et al.* (2020) destacaram infecções bacterianas por cepas resistentes, ressaltando *E. coli* resistente à cefalosporina de terceira geração (3-GCR-*E.coli*) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) como sendo os principais responsáveis por tratamentos difíceis e traumáticos.

Vargas-Alzate *et al.* (2018) descreveram como crescente a resistência a antibióticos carbapenêmicos na Colômbia sendo de 10% em *Enterobacter cloacae*, 21,8% em



*K. pneumoniae*, 26,5% em *P. aeruginosa* e 36,8% em *A. baumannii*. Estes microrganismos protagonizam infecções graves em pacientes imunocomprometidos, geralmente com outros riscos associados e submetidos a procedimentos médicos invasivos.

## 2.2 Antimicrobianos $\beta$ -lactâmicos e $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL)

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são amplamente utilizados em quadros infecciosos, porém a utilização indiscriminada é uma das principais responsáveis pelo surgimento e disseminação de enzimas que garantem a resistência prejudicando assim, o tratamento. A codificação de “genes *bla*” proporciona um amplo espectro de resistência às bactérias, sendo a detecção dessas enzimas ferramenta importante no controle de infecções (BELLO-LÓPEZ; ROJO-MEDINA, 2017).

O contato de pacientes hospitalizados com superfícies, com os profissionais de saúde ou com outros pacientes favorecem o surgimento e a disseminação de cepas resistentes, visto que muitos mecanismos desenvolvidos a partir do material genético são transmitidos via plasmídeos. Portanto, a higienização das mãos, desinfecção dos ambientes, medidas de isolamento devem ser parte de uma ampla política capaz de controlar os altos índices de infecções originadas, principalmente, em UTI (TING; LEE; LIU, 2018).

ESBL são responsáveis pela hidrólise de penicilinas, cefalosporinas de terceira e quarta geração, além de cefamicinas e aztreonam, sendo TEM, SHV, CTX-M e OXA os principais agrupamentos representantes desse grupo, que podem ser inibidas por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (BELLO-LÓPEZ; ROJO-MEDINA, 2017).

GES, PER e VEB são ESBL plasmidiais mais incomuns, mas têm sido relatadas em isolados de *E. coli*. A disseminação e a detecção dessas enzimas no mundo estão diretamente relacionadas com fatores como: economia, condições sociais, disponibilidade de antimicrobianos, métodos de detecção disponíveis, entre outros. *Enterobacter*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Serratia marcescens*, *Proteus* e *P. aeruginosa* também são relevantes quanto à produção de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido e estão associadas a altos índices de mortalidade (GHADERI *et al.*, 2020).

De acordo com sua classificação, as  $\beta$ -lactamases podem ser categorizadas por homologia de proteínas segundo Ambler que divide em classes A, B, C e D, sendo A, C e D denominadas de serina  $\beta$ -lactamases, enquanto enzimas de classe D são metalo- $\beta$ -lactamases. Grande parte das ESBL fazem parte da classe A com exceção de OXA que são parte da classe D (PATERSON; BONOMO, 2005).

Na classificação que considera as semelhanças funcionais, relacionadas com substrato e inibidor, por Bush-Jacoby-Medeiros, as ESBL pertencem ao grupo 2be (enzimas do tipo TEM, SHV e CTX-M) ou ao grupo 2d (ESBL do tipo OXA) e tem maior significância em nível de laboratório de análises clínicas. Essa classificação divide as enzimas em quatro grupos: Grupo 1- cefalosporinas; grupo 2- serina  $\beta$ -lactamases; grupo 3- metalo- $\beta$ -lactamases (MBLs) e grupo 4-  $\beta$ -lactamases com enzimas ainda não categorizadas totalmente (RASMUSSEN; BUSH, 1997).

### ***2.3 Klebsiella pneumoniae***

Trata-se de um bacilo Gram-negativo fermentativo integrante da família Enterobacteriaceae estritamente relacionada a IRAS e infecções adquiridas na comunidade, como: bacteremias, infecções no sistema urinário e pneumonias. Pode habitar o intestino e a região da nasofaringe como saprófita. Tem capacidade de aumentar o nível de colonização conforme maior for o tempo de internação, este é um fator associado aos inúmeros fatores de virulência que este microrganismo possui. Presença de fímbria, cápsula e a produção de biofilme são características comuns desses espécimes. Genes tipo 1 pili (T1P) e tipo 3 pili (T3P) são responsáveis pela codificação do *pilus*, estrutura envolvida no processo de colonização inicial das células hospedeiras (FAUVET *et al.*, 2019).

A característica mucoide de algumas cepas torna os quadros infecciosos mais graves. Fauvet *et al.* (2019) relatam que KP hipermucoviscas geralmente são susceptíveis a antibioticoterapia usual, porém são capazes de migrar, facilmente, para outras regiões do corpo causando infecções com múltiplas metástases sépticas tornando o cenário clínico crítico, persistente e prolongando o uso de antibióticos.

Essa bactéria tem capacidade de adquirir resistência a diversas classes de antibióticos por produção de  $\beta$ -lactamases, sendo naturalmente resistente à ampicilina por

genes plasmidiais como SHV-1 e em alguns casos TEM-1 e TEM-2 (VALENZUELA-VALDERRAMA; GONZÁLEZ; PALAVECINO, 2019). Cepas produtoras de carbapenemases, capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos, são cada vez mais comuns no ambiente clínico sendo a resistência atribuída aos genes *bla*<sub>KPC-2</sub> e NDM-1 (SATLIN *et al.*, 2013).

*K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) geralmente é resistente a múltiplas drogas. Metalo- $\beta$ -lactamases do tipo imipenemase (IMP), superexpressão de cefalosporinases AmpC mais mutações em porinas são os principais meios que garantem resistência aos carbapenêmicos (NISHIDA; ONO, 2020). Valenzuela-Valderrama, González e Palavecino (2019) citam que os primeiros casos de *K. pneumoniae* com o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> na América latina ocorreram na Colômbia e no Chile, em pacientes vindos da Itália. É frequente, quando em ambiente hospitalar, que KPC também adquira resistência a outros antibióticos como quinolonas e aminoglicosídeos.

## 2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* é uma Gram-negativa não fermentativa, oportunista, não esporulada, oriunda e amplamente distribuída no ambiente com alta capacidade de patogênese, principalmente em pacientes imunocomprometidos podendo causar inúmeras infecções de natureza aguda e crônica, sendo a principal causadora de morbidade em pacientes portadores de fibrose cística (FC). Esta bactéria possui um genoma grande, que garante inúmeros mecanismos diante de adversidades e conseqüentemente o sucesso nas diferentes etapas de processos patogênicos (MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

A formação de biofilme mucoide é característica típica desse microrganismo favorecendo a resistência antimicrobiana. Possui também flagelos e *pili* que são utilizados no processo de colonização de ambientes bióticos ou abióticos, propiciando a ocorrência de infecções crônicas de forma prolongada. A membrana externa, como componente estrutural, mais a produção de  $\beta$ -lactamases periplasmáticas e a expressão de genes que codificam bombas de efluxo tornam a *P. aeruginosa* intrinsecamente resistente a vários antibióticos (MARTEGANI *et al.*, 2020).

Moradali, Ghods e Rehm (2017) explicam que antimicrobianos anti-pseudomonas convencionais têm ação comprometida pela resistência intrínseca codificada no próprio genoma que propiciam redução da permeabilidade da membrana através do aumento da especificidade das porinas, garantindo proteção contra carbapenêmicos e cefalosporinas; bombas de efluxo multidrogas e codificação de  $\beta$ -lactamase induzível (AmpC) que bloqueia a ação de aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Os mecanismos de resistência adquiridos estão relacionados com mutações de genes inerentes e aquisição horizontal entre células, sendo estável e transmissível.

O uso de aminoglicosídeos, carbapenêmicos e colistina de forma atrelada representa o tratamento vigente antipseudomonal (BRESSAN *et al.*, 2020). Nasser, Gayen e Kharat (2020), concluíram que *P. aeruginosa* sofreu alterações significativas no perfil de resistência aos antibióticos durante o período de 2011 a 2018 com crescente tolerância para os  $\beta$ -lactâmicos e fluoroquinolonas, como ceftazidima, aztreonam, cefepime, imipenem, piperacilina + tazobactam, ticarcilina, ciprofloxacina e cefotaxima.

*Pseudomonas* resistente a carbapenêmicos são comuns e disseminadas no ambiente hospitalar e possuem no genoma  $\beta$ -lactamases do tipo KPC, GES e metalo  $\beta$ -lactamases (MBLs), sendo mais prevalentes as do tipo VIM, IMP e NDM (BOUSLAH, 2020).

## **2.5 *Escherichia coli***

Bastonete Gram negativo, membro da família Enterobacteriaceae presente no trato intestinal de humanos e de mamíferos. Cepas virulentas são associadas com elevados casos de infecções no sistema urinário e recorrentes casos de surtos alimentares, sendo crescente o número de isolados portadores de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) (WALKTY *et al.*, 2020).

Algumas cepas patogênicas possuem fatores de virulência que são fundamentais à colonização dessa bactéria no sítio infeccioso. No caso de infecções urinárias, a produção de adesinas e toxinas contribuem com a aderência e acúmulo desses microrganismos, dificultando sua remoção através da urina. Fatores de virulência associados ao tipo de

patógeno e à condição imunológica do hospedeiro vão determinar o grau da infecção (KAKIAN *et al.*, 2019).

Avaliando o perfil de susceptibilidade de isolados de *E. coli* de um hospital de ensino no Irã, Zaniani *et al.* (2019) constataram um alto nível de resistência a trimetoprim / sulfametoxazol, fato preocupante visto que estes são elencados no tratamento imediato de infecções no sistema urinário. Assim, é importante considerar os testes de sensibilidade antes da prescrição clínica.

Valadbeigi *et al.* (2020) citaram estudos compreendidos entre 2011 e 2013 apontando que 10% a 24,5% de *E. coli* isoladas de urina eram produtoras de ESBL, enquanto que no período de 2016 e 2017 essa taxa ascendeu para 54,8% e 67,5% respectivamente. Em seus resultados metade das amostras analisadas foram produtoras de ESBL com maior prevalência de *bla*<sub>TEM</sub> seguido por *bla*<sub>CTX-M</sub>.

## 2.6 Fitoterápicos contra infecções

Por definição, fitoterapia é o uso de plantas com finalidade terapêutica, podendo ser a planta íntegra, partes dessa ou extratos obtidos por métodos físicos ou químicos. As plantas apresentam moléculas ativas tidas como responsáveis por efeitos benéficos para quem as utiliza (LACCOURREYE *et al.*, 2017).

Recursos terapêuticos com apelo natural promovendo ausência de efeitos colaterais alavancam o mercado de fitoterápicos, tornando este cada vez maior. O mercado global de fitoterápicos foi avaliado em US\$ 71,19 bilhões em 2016 com perspectivas crescentes (MANCARZ *et al.*, 2019).

A gradativa utilização de fitoterápicos deve-se a vários fatores como baixa toxicidade, eficiência diante da problemática a qual se destinam e disponibilidade no meio ambiente, com destaque para o Brasil detentor de vasta flora, possibilitando maior biodisponibilidade. Esses fatores, mais a utilização tradicional por populações ao longo da história com resultados positivos, atraem cada vez mais estudos científicos e interesse biotecnológico para produtos naturais (TOBOUTI *et al.*, 2017).

As plantas são compostas por um conjunto que compreende várias substâncias químicas reconhecidamente atuantes como antimicrobianos, servindo como estratégias de defesa inerentes ao vegetal, reconhecidos como pesticidas botânicos. Com mais de 200.000 metabólitos naturais, as plantas medicinais são atrativos da indústria farmacêutica sendo matéria-prima para mais de um terço (39,1%) de todos os medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) (BOY *et al.*, 2018).

## 2.7 Óleos essenciais

Óleos essenciais são compostos secundários voláteis produzidos por diferentes partes de uma planta visando estratégias de defesa e de reprodução. São abundantes em compostos bioativos de amplo espectro que contribuem para o desenvolvimento da planta atuando de diversas maneiras. Com a crescente e permanente resistência bacteriana, além do surgimento de novas patologias, o uso de antibióticos é reavaliado e novos recursos são buscados, incluindo o uso de compostos vegetais, propondo à ciência novas pesquisas relacionadas à exploração de componentes da flora (BOY *et al.*, 2018).

Originários de plantas aromáticas: fenol, terpenos e terpenóides são constituintes tidos como responsáveis pela bioatividade. As propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antifúngicas, antibacterianas, analgésicas, aromatizantes entre outras tornam esses compostos matérias primas de interesse para vários ramos industriais: farmacêutica, alimentos, cosméticos e química (AMALRAJ *et al.*, 2020).

A composição e o rendimento desses produtos estão diretamente relacionados com fatores intrínsecos à planta, no caso, a informação genética; e fatores externos relacionados ao meio ambiente e cultivo, como variação climática, solo, presença de pragas, colheita, técnicas de extração, etc. (TOHIDI; RAHIMMALEK; TRINDADE, 2019).

Em sua composição os óleos essenciais apresentam até três constituintes predominantes enquanto os demais se apresentam de forma residual. O caráter lipofílico das moléculas dos óleos contribui para o acesso dos constituintes na célula bacteriana, afetando dessa forma mecanismos moleculares importantes e portanto, inviabilizando a existência da célula. Os mecanismos de ação ainda não são bem elucidados, pois a atividade advém de múltiplos modos de ação (MANCARZ *et al.*, 2019).

A caatinga, bioma predominantemente localizado no nordeste brasileiro, possui vasta vegetação sendo, portanto, provedor de inúmeras sementes oleaginosas das quais é possível extrair óleos e ácidos graxos. Favela (*Cnidoscolus quercifolius*) e pinhão-bravo (*Jatropha mollissima Pohl Baill*) são exemplos de plantas originárias da caatinga pertencentes à família Euphorbiaceae. São tolerantes à seca e com propriedades medicinais, popularmente utilizadas no tratamento de processos inflamatórios, anemias e micoses entre outros (LISBOA *et al.*, 2020).

Compostos extraídos das cascas do caule de *C. quercifolius* foram nocivos contra cepas de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Serratia marcescens*. Constatou-se também que o óleo extraído das sementes de *J. mollissima* é vasto em ácido oleico e linoleico (LISBOA *et al.*, 2020).

## 2.8 *Lippia sidoides*

*Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae), figuras 1 e 2, é uma planta pertencente à divisão das Angiospermae, aromática oriunda do semiárido nordestino brasileiro e do norte do estado de Minas Gerais, utilizada em muitos estudos científicos em função de atividades biológicas comprovadas, caracterizando-a como uma planta medicinal com potencial de gerar produtos e que está incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS Espécies vegetais - RENISUS (BALDIM *et al.*, 2019; BRASIL, 2009).

**Figura 1** - *Lippia sidoides* em condições de cultivo.



Fonte: adaptado de Melo *et al.* (2020).

**Figura 2** - *Lippia sidoides* sob condições naturais.



Fonte: Brasil (2014).

Popularmente é conhecida como alecrim-pimenta, alecrim-bravo, estrepa-cavalo e alecrim-grande, foi descrita por Soares *et al.* (2017) como um arbusto bem ramificado e fragmentado, típico do semiárido, comum na caatinga do nordeste brasileiro. As folhas são aromáticas e picantes, flores e frutos pequenos e as diminutas sementes eventualmente germinam. Popularmente as folhas são utilizadas frente a dores de garganta, inflamações gengivais, lesões na pele e preparação de cosméticos com o extrato obtido a partir da maceração das folhas com álcool ou a partir do óleo essencial (VERAS *et al.*, 2017).

Plantas pertencentes a uma mesma família contêm metabólitos secundários com ações biológicas similares. A maioria dos estudos envolvendo plantas da família Verbenaceae, têm como fonte de OE as folhas e flores, com relação ao gênero *Lippia* os compostos químicos mais comuns dos OE são limoneno, citral, carvacrol,  $\beta$ -mirceno, cânfora e timol (PÉREZ ZAMORA, 2018).

Os estudos apontam prevalência de timol e de carvacrol nos óleos obtidos das folhas, outras substâncias também compõe e auxiliam nos efeitos benéficos atribuídos. O fitocomplexo é formado por substâncias portadoras de grupamentos fenólicos, alcoólico, aldeídos e cetonas (VERAS *et al.*, 2017). A composição é variável, por exemplo, o principal componente do óleo essencial de *L. sidoides* originado do nordeste brasileiro é o timol, enquanto os principais componentes de *L. sidoides* de Lavras, Minas Gerais e São Gonçalo do



Abaeté, Minas Gerais são carvacrol e 1,8-cineol, isoborneol e acetato de bornila (MORAIS *et al.*, 2016).

Plantas do gênero *Lippia* têm intenso potencial bioativo, pois são abundantes em timol, flavonóides e quinonas, substâncias consideradas responsáveis pela eficaz atividade antimicrobiana. Compostos como carvacrol, p-cimeno,  $\beta$ -cariofileno e 1,8-cineol também foram detectados em menores concentrações nos estudos que trabalharam com esse vegetal (BETANCOURT *et al.*, 2019).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Lippia sidoides* frente a bactérias Gram-negativas isoladas de infecções relacionadas à assistência à saúde com fenótipo de multirresistência e correlacionar os resultados obtidos com o perfil genético desses microrganismos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Obtenção do óleo extraído das folhas de *L. sidoides* e análise da composição química;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial da *L. sidoides* frente a espécimes nosocomias de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*.
- Associar os valores de CIM e CBM com a presença de genes que codificam beta-lactamases.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Aspectos éticos

Para atender aos aspectos éticos da pesquisa envolvendo seres humanos e partindo da compreensão que para o desenvolvimento de estudos em saúde requer rigor metodológico e ético, a pesquisa foi orientada conforme a Resolução N° 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), que estabelece as normas e diretrizes de pesquisa científica em seres humanos. Foram obedecidos os princípios éticos do respeito pela pessoa (autonomia e proteção de grupos vulneráveis), beneficência, não maleficência e justiça. É importante ressaltar que a pesquisa obteve **Parecer Aprovado** pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual Vale do Acaraú (N° 4.633.262/2021 – Anexo A).

### 4.2 Aspectos legais

Esta pesquisa, visando seguir os critérios estabelecidos pela Lei n° 13.123/15 e seus regulamentos, que dispõem sobre o acesso e a utilização de todo material biológico considerado patrimônio genético, encontra-se cadastrada no banco de dados do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado sob o N° AEBF288 (Anexo B).

### 4.3 Espécimes do estudo

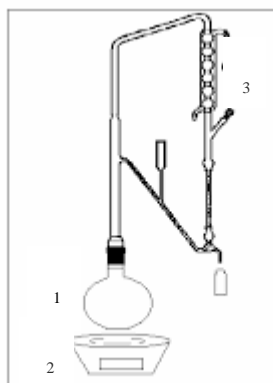
Sessenta isolados oriundos de IRAS, mais uma cepa padrão de cada espécie (*E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*) foram utilizados nos experimentos. Estes fazem parte de uma coleção biológica do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia da FAMED (UFC/Sobral) e são oriundos de hospitais localizados na cidade de Sobral/CE.

### 4.4 Obtenção do óleo essencial

As folhas frescas de *L. sidoides*, exsicata HUVA n° 23.372, foram higienizadas com água corrente seguida de água destilada. O óleo foi obtido por

hidrodestilação, este procedimento consistiu no arraste a vapor e condensação com equipamento de Clevenger, figura 3. Por, aproximadamente 3 horas de fervura, obtém-se o hidrolato desejado (EHLERT *et al.*, 2006). Para ter a concentração almejada nos testes o óleo essencial foi diluído em uma solução de tween 80 a 0,02%.

**Figura 3** - Esquema do processo de extração por hidrodestilação utilizando Clevenger. (1) balão de fundo redondo, (2) manta de aquecimento e (3) condensador.



Fonte: Gomes (2003).

#### 4.5 Determinação da composição química

A análise qualitativa dos óleos foi realizada por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS) utilizando um Agilent modelo GC-7890B / MSD-5977A (quadrupolo), com impacto de elétrons a 70 eV, coluna HP-5MS de metilpolisiloxano (30 mx 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m, Agilent), gás portador de hélio com taxa de fluxo de 1,00 mL.min<sup>-1</sup> (8,8 psi) e velocidade linear constante de 36,8 cm.s<sup>-1</sup>, temperatura do injetor 250°C, temperatura do detector 150°C, temperatura da linha de transferência 280°C. Programação do forno cromatográfico: temperatura inicial de 70°C, com rampa de aquecimento de 4° C.min<sup>-1</sup> a 180°C e adição de 10°C/min a 250°C ao final da corrida (34,5 min). A identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação dos padrões de fragmentação exibidos nos espectros de massa e aqueles presentes no banco de dados fornecido pelo equipamento (NIST versão 2.0 de 2012 - 243.893 compostos) e dados da literatura.

A análise quantitativa foi realizada por Cromatografia Gasosa Acoplada ao Detector de Ionização de Chama (CG-DIC) usando um Shimadzu modelo CG-2010 Plus, RTX-5 coluna de metilpolisiloxano (30 mx 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m), modo de injeção com divisão de fluxo de 1:30, transportador de nitrogênio gasoso com fluxo 1,00 mL.min<sup>-1</sup> (84,1 kPa) e velocidade linear constante de cm.s<sup>-1</sup>, temperatura do injetor 250°C, temperatura do

detector 280°C. Programação do forno cromatográfico: temperatura inicial de 70°C com rampa de aquecimento de 4°C.min<sup>-1</sup> a 180°C por 27,5 min, seguida de rampa de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup> a 250°C, ao final do corrida (34,5 min). A identificação dos compostos foi realizada comparando seus índices de retenção com os de compostos conhecidos, obtidos pela injeção de uma mistura de padrões contendo uma série homóloga de alcanos C7-C30 e dados da literatura.

#### **4.6 Reativação dos isolados bacterianos**

A reativação dos espécimes armazenados em freezer -80 °C foi realizada acrescentando-se uma alíquota 50 µl da cultura em um tubo de ensaio contendo 5,0 mL de caldo BHI (Himedia®, Mumbai, Índia) que posteriormente foi incubado em estufa bacteriológica por 18h a 35 °C. Após crescimento, o inóculo foi semeado em placa com Ágar MacConkey (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) utilizando-se uma alça bacteriológica estéril e incubado novamente a 35 °C, por 24h. Após crescimento, foi confirmada a pureza da amostra com a observação das características morfo-tintoriais através da coloração de Gram.

#### **4.7 Ensaio da Microdiluição em Caldo**

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de *L. sidoides* foi realizada em triplicata segundo metodologia de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços padronizada de acordo com o documento M7-A 10ª edição, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, norma desenvolvida mediante o processo conceitual do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), com adaptações (CLSI, 2018). Posteriormente, as placas foram analisadas pelo leitor de Elisa (BIO Trak II – Plate Reader®).

#### **4.7.1 Preparação da placa de 96 poços**

O preenchimento da placa de 96 poços seguiu da seguinte forma: primeiramente houve a adição de 100µL de BHI caldo nos poços das colunas 1 a 11, logo após foi colocada 100µL da solução teste na concentração de 10mg/mL nos poços da coluna 1 seguida de diluição seriada, ou seja, retira-se 100µL dos poços da coluna 1 passando para os poços das colunas subsequentes fazendo movimento de “*up and down*” para obtenção das demais concentrações decrescentes desejadas. Por fim, cada poço recebeu 100µL da suspensão bacteriana ajustada a aproximadamente  $5 \times 10^7$  UFC/mL. A última coluna (12) foi reservada para os controles: negativo (apenas meio de cultura), positivo (suspensão bacteriana mais meio de cultivo), toxicidade (cultura bacteriana mais o diluente - tween 80 a 0,02%). As linhas D e H foram para controle de turbidez, no caso, meio de cultura mais o óleo essencial nas respectivas diluições.

Em seguida a microplaca foi incubada a 35°C por 24h e após esse período foi realizada uma leitura com auxílio do leitor de ELISA (BIO Trak II – Plate Reader®) com um comprimento de onda de 620nm para quantificar o crescimento bacteriano através da turbidez.

#### **4.8 Ensaio da Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada conforme método proposto por Hafidh *et al.* (2011). Após a determinação da CIM, transfere-se 10µL dos poços onde não houve crescimento microbiano visível para placas de Petri contendo meio Ágar Muller Hinton, que em seguida foram incubadas a 35°C por 24h na estufa de crescimento em aerobiose. A CBM foi considerada a menor concentração do composto onde não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado (99,9% de morte microbiana).

#### **4.9 Análise do perfil de resistência pela presença de ESBL**

As amostras utilizadas foram previamente identificadas e tiveram o perfil de sensibilidade definido pelo método automatizado VITEK® 2 no hospital de origem, depois foram enviadas ao laboratório de microbiologia da FAMED (UFC/Sobral) onde foram feitas

avaliações macro e microscópicas para confirmação da pureza, seguido de reativação dos espécimes que posteriormente foram armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa do referido laboratório, investigaram nessas amostras a presença de genes de resistência. De forma que CTX-M, TEM, SHV, GES, KPC e IMP foram identificados em alguns isolados bacterianos por reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR). Esses dados, referentes ao perfil de resistência e presença de genes que codificam beta-lactamases, foram associados aos valores obtidos de CIM e CBM para buscar relacionar os diferentes valores de inibição com a presença desses genes, ressaltando as características próprias de cada cepa.

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A diferença entre as médias das replicatas foram avaliadas por teste One-way ANOVA com Bonferroni post-test, com o auxílio do programa GraphPad® Prism versão 5.04 para Windows (Software GraphPad, San Diego California USA). Diferenças com  $p < 0,05$  foram consideradas significativas.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os constituintes do OE de *L. sidoides* são apresentados na Tabela 1. Observa-se que o composto químico que se apresenta, em altas concentrações, como constituinte majoritário é o timol (87,37%), seguido do p-cimeno (4,45%) e do  $\beta$ -cariofileno (3,11%).

**Tabela 1** – Composição química do óleo essencial de *L. sidoides*

Composto	<sup>1</sup> IK <sub>calc</sub>	<sup>2</sup> IK <sub>lit</sub>	Area (%)
$\alpha$ -Pineno	941	939	0,54
Mirceno	998	990	0,44
p-Cimeno	1030	1024	4,45
Eucaliptol	1038	1031	0,65
Terpinen-4-ol	1183	1177	0,52
$\alpha$ -Terpineol	1198	1188	0,21
Timol metil éter	1240	1235	0,36

Timol	1296	1290	87,37
$\beta$ -Cariofileno	1423	1419	3,11
Aromandendrene	1443	1441	0,36
$\alpha$ -Cariofileno	1458	1454	0,18
$\gamma$ -Muurolene	1480	1479	0,06
Biciclogermacreno	1497	1500	0,29
$\delta$ -Cadineno	1527	1523	0,21
Espatulenol	1582	1578	0,15
Óxido de cariofileno	1586	1583	0,98
Composição total			99,89

<sup>1</sup>Valor IK calculado; <sup>2</sup>valores IK da literatura (ADAMS, 2007).

O timol é um dos fenóis monoterpênicos presente significativamente nos OEs de plantas da família Verbenaceae (*Aloysia triphylla*, *Laosaurus gracilis*, *Lasius grandis*, *Lippia organoides*, *L. sidoides*). Biologicamente, tem atuação antioxidante, anti-inflamatória, anestésica local, cicatrizante, antisséptica e com destaque para propriedades antibacterianas e antifúngicas. Álcoois, também são componentes químicos comuns presentes nos óleos essenciais, com uma estrutura de intensa afinidade de ligação com diversas moléculas como proteínas ou glicoproteínas. Assim, demonstram alto potencial para permear as paredes celulares, levando à perda de material citoplasmático (PÉREZ ZAMORA; TORRES; NUÑEZ, 2018).

Todos os isolados utilizados neste estudo são produtores de ESBL de acordo com o perfil de susceptibilidade traçado de forma automatizada no momento em que foram identificados. Dentre os genes que foram investigados, em estudos anteriores deste grupo de pesquisa por Braga (2016) e Alves (2020), é possível constatar que o gene *bla*<sub>CTX-M1/2</sub> é o mais prevalente em todas as amostras. Contudo, esse fato não impediu a ação bactericida do óleo em questão. O resultado com o isolado de *E. coli* (EC 42) portador de *bla*<sub>CTX-M 1/2</sub> e *bla*<sub>TEM</sub> é o mesmo quando comparamos com a cepa padrão ATCC 25922, percebendo-se uma ação inibitória e bactericida a uma concentração de 312 $\mu$ g/mL para ambas.

O óleo essencial teve ação inibitória e bactericida em 10 (50%) das amostras de *E. coli* analisadas numa concentração de 625 $\mu$ g/mL. Nessa mesma concentração foi observado efeito bactericida em 8 (40%) isolados de *K. pneumoniae*. Frente aos isolados de *P.*

*aeruginosa*, o composto se mostrou menos eficaz para a maioria, uma vez que apresentou efeito bactericida para apenas 6 (30%) isolados nosocomiais e para a cepa padrão, mas com a maior concentração testada do composto (2.500µg/mL) para 5 (71,4%) desses, sendo que em 2 (33,3%) isolados e na cepa padrão a CIM foi igual a CBM (2.500µg/mL). Além disso, em 4 (20%) espécimes o composto, nas concentrações testadas, não apresentou efeito inibitório. Os valores podem ser observados nas tabelas 2, 3 e 4. A maior resistência de *P. aeruginosa* pode ser atribuída a exímia capacidade de formar biofilme e à ação de bombas de efluxo, características intrínsecas dessa espécie (MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

**Tabela 2** - CIM, CBM, CBM:CIM do óleo essencial de *L. sidoides* frente a isolados de *E. coli* e cepa ATCC 25922, e presença ou ausência dos genes ESBL investigados

Amostras <i>E. coli</i>	Óleo essencial de <i>L. sidoides</i> µg/mL			Genes ESBL/KPC
	CIM	CBM	Efeito	
<b>EC 03</b>	625	625	cida	-
<b>EC 04</b>	625	625	cida	-
<b>EC 08</b>	625	625	cida	CTX-M 1/2
<b>EC 10</b>	625	625	cida	-
<b>EC 11</b>	625	625	cida	-
<b>EC 12</b>	625	625	cida	CTX-M 1/2
<b>EC 16</b>	312	312	cida	-
<b>EC 18</b>	625	625	cida	CTX-M 1/2
<b>EC 22</b>	625	625	cida	-
<b>EC 23</b>	312	1250	cida	CTX-M 1/2
<b>EC 29</b>	625	625	cida	-
<b>EC 31</b>	625	625	cida	-
<b>EC 32</b>	312	312	cida	-
<b>EC 33</b>	312	312	cida	-
<b>EC34</b>	312	312	cida	CTX-M 1/2
<b>EC37</b>	312	625	cida	-
<b>EC 38</b>	312	312	cida	-
<b>EC 39</b>	312	312	cida	-
<b>EC 40</b>	312	625	cida	CTX-M 1/2 TEM SHV
<b>EC 42</b>	312	312	cida	CTX-M 1/2 TEM
<b>ATCC 25922</b>	312	312	cida	-

CIM: concentração inibitória mínima (µg/mL); CBM: concentração bactericida mínima (µg/mL); ESBL: betalactamase de espectro estendido; (-): ausência dos genes investigados.



**Tabela 3** - CIM, CBM, CBM:CIM do óleo essencial de *L. sidoides* frente a isolados de *K. pneumoniae* e cepa ATCC 70063, e presença ou ausência dos genes ESBL investigados

Amostras <i>K. pneumoniae</i>	Óleo essencial de <i>L. sidoides</i> µg/mL			Genes ESBL/KPC
	CIM	CBM	Efeito	
<b>KP 01</b>	312	312	cida	- CTX-M 1/2
<b>KP 02</b>	312	312	cida	TEM SHV
<b>KP 05</b>	312	312	cida	-
<b>KP 06</b>	312	312	cida	-
<b>KP 07</b>	312	312	cida	-
<b>KP 09</b>	312	625	cida	-
<b>KP 13</b>	312	312	cida	-
<b>KP 14</b>	1250	1250	cida	-
<b>KP 17</b>	1250	1250	cida	-
<b>KP 19</b>	1250	1250	cida	-
<b>KP 20</b>	1250	1250	cida	-
<b>KP 21</b>	1250	1250	cida	-
<b>KP 24</b>	625	625	cida	-
<b>KP 25</b>	625	625	cida	-
<b>KP 26</b>	625	625	cida	-
<b>KP 28</b>	625	625	cida	-
<b>KP 35</b>	625	625	cida	-
<b>KP 36</b>	625	1250	cida	CTX-M 1/2
<b>KP 41</b>	625	625	cida	CTX-M 1/2
<b>KP 49</b>	312	625	cida	-
<b>ATCC 70063</b>	2500	2500	cida	-

CIM: concentração inibitória mínima (µg/mL); CBM: concentração bactericida mínima (µg/mL); ESBL: betalactamase de espectro estendido; (-): ausência dos genes investigados.

**Tabela 4** - CIM, CBM, CBM:CIM do óleo essencial de *L. sidoides* frente a isolados de *P. aeruginosa* e cepa ATCC 15442, e presença ou ausência dos genes de resistência investigados

Amostras <i>P. aeruginosa</i>	Óleo essencial de <i>L. sidoides</i> µg/mL			Efeito	Genes ESBL/KPC/IMP
	CIM	CBM			
<b>PA 02</b>	625	2500		cida	SHV CTX-M 1/2 KPC
<b>PA 04</b>	625	2500		cida	-
<b>PA 06</b>	312	625		cida	CTX-M 1/2 CTX-M 1/2
<b>PA 08</b>	2500	2500		cida	TEM GES CTX-M 1/2
<b>PA 09</b>	1250	-		estático	TEM IMP-1
<b>PA 12</b>	2500	-		estático	CTX-M 1/2 GES
<b>PA 13</b>	-	-		-	CTX-M 1/2 GES
<b>PA 14</b>	1250	-		estático	CTX-M 1/2
<b>PA 15</b>	2500	-		estático	-
<b>PA 16</b>	625	-		estático	SHV
<b>PA 17</b>	312	1250		cida	SHV
<b>PA 20</b>	1250	-		estático	-
<b>PA 22</b>	1250	-		estático	-
<b>PA 23</b>	-	-		-	CTX-M 1/2
<b>PA 28</b>	2500	-		estático	-
<b>PA 30</b>	2500	-		estático	GES
<b>PA 31</b>	-	-		-	-
<b>PA 32</b>	-	-		-	-
<b>PA 33</b>	2500	2500		cida	TEM
<b>PA 34</b>	2500	-		estático	TEM
<b>ATCC 15442</b>	2500	2500		cida	-

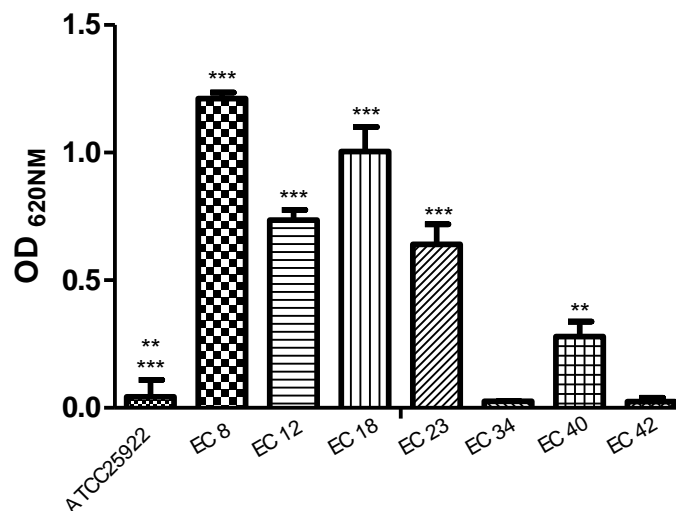
CIM, concentração inibitória mínima; CBM: concentração bactericida mínima; ESBL: betalactamases de espectro estendido; (-): não houve inibição de crescimento detectada.

Estudos evidenciam que a composição química dos óleos essenciais é preponderante nos resultados finais dos objetivos propostos, e o conhecimento gerado direciona para novas descobertas e melhorias. Pandini *et al.* (2017) utilizaram o óleo essencial de *Guarea kunthiana* abundante em  $\alpha$ -zingibereno que mostrou atividade bactericida contra cepas padrões de *Salmonella enterica* ATCC 14028, *Proteus mirabilis* ATCC 25933 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, porém não foi eficiente frente a *E. coli* ATCC 25922 e *K.*

*pneumoniae* ATCC 13883, mesmo diante de uma concentração de 7.000µg/mL tanto na CIM quanto na CBM.

Nos gráficos a seguir, podemos visualizar a ação do óleo essencial de *L. sidoides* frente às bactérias analisadas, evidenciando a ação inibitória do óleo essencial. De modo que, o OE na concentração de 312µg/mL apresentou efeito bactericida contra o isolado de *E. coli* EC 34 que albergava o gene *bla*<sub>CTX-M 1/2</sub>, assim como frente à cepa ATCC 25922 que não apresentava esses genes de resistência, semelhante comportamento foi observado na EC 42, portadora de mais de um gene ESBL (Gráfico 1).

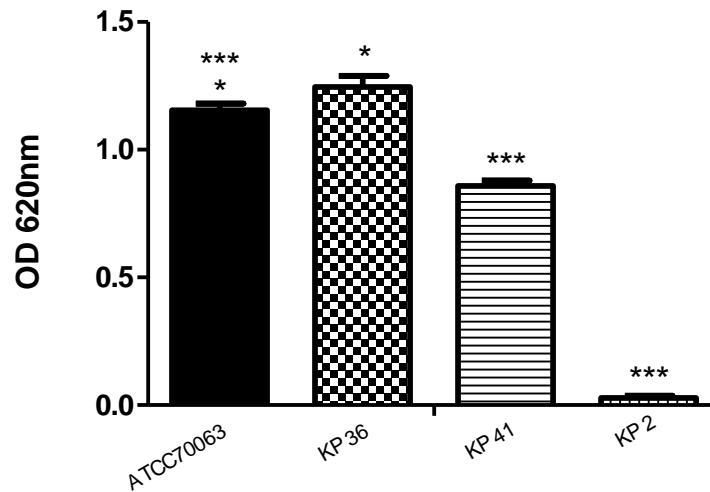
**Gráfico 1** – Crescimento celular de *E. coli*. Cepa controle ATCC 25922, isolados com pelo menos 1 gene ESBL identificado (EC8, EC12, EC23 e EC34) e isolados com mais de 1 gene ESBL identificado (EC40 e EC42) frente ao óleo essencial de *L. sidoides* a 312 µg/mL.



Fonte: dados da pesquisa. Os valores são expressos como média. Valores estatisticamente significativos pelo teste One-way ANOVA - \*\*\* ( $p \leq 0,001$ ) e \*\* ( $p \leq 0,01$ ) em comparação com o controle.

Em relação aos isolados de *K. pneumoniae*, o OE apresentou efeito bactericida mesmo naqueles que albergavam genes ESBL, inclusive foi necessário uma menor CBM (312µg/mL) para eliminar a KP 2, portadora de três genes de resistência, do que a cepa ATCC 70063 que não apresentava esses genes ( $p \leq 0,001$ ) (Gráfico 2).

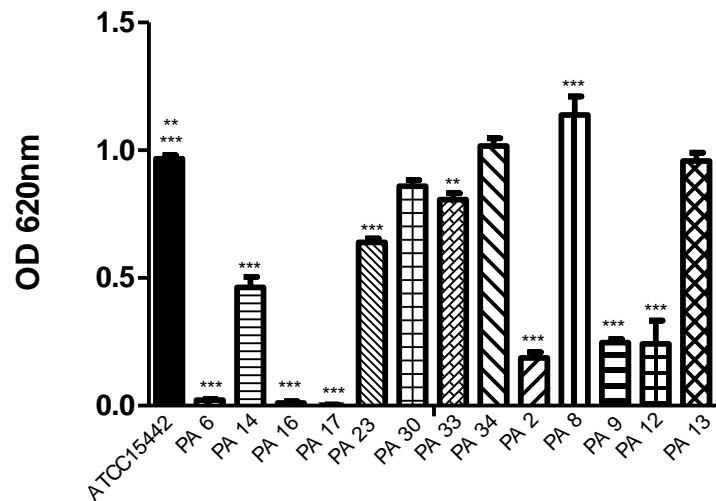
**Gráfico 2** - Crescimento celular de *K. pneumoniae* Cepa controle ATCC 70063, isolados com pelo menos 1 gene ESBL identificado (KP36 e KP41) e isolados com mais de 1 gene ESBL identificado (KP2) frente ao óleo essencial de *L. sidoides* a 312  $\mu\text{g/mL}$ .



Fonte: dados da pesquisa. Os valores são expressos como média. Valores estatisticamente significativos pelo teste One-way ANOVA \* ( $p \leq 0,05$ ) e \*\*\* ( $p \leq 0,001$ ) em comparação com o controle.

Os resultados obtidos com *P. aeruginosa* também seguiram os mesmos comportamentos (Tabela 4 e gráfico 3). Tendo sido necessário concentrações de 625 $\mu\text{g/mL}$  e 1250 $\mu\text{g/mL}$  do OE para se obter efeito bactericida frente aos isolados PA06 e PA17, respectivamente, e ambos albergavam genes ESBL. Todavia, para se observar o mesmo efeito na cepa ATCC 15442 não-portadora desses genes, foi necessária uma concentração de duas a quatro vezes maior ( $p \leq 0,001$ ).

**Gráfico 3** - Crescimento celular de *P. aeruginosa*. Cepa controle ATCC 15442, isolados com pelo menos 1 gene ESBL identificado (PA6, PA14, PA16, PA17, PA23, PA30, PA33 e PA34) e isolados com mais de 1 gene ESBL identificado (PA2, PA8, PA9, PA12 e PA13) frente ao óleo essencial de *L. sidoides* a 1250 µg/mL.



Fonte: dados da pesquisa. Os valores são expressos como média. Valores estatisticamente significativos pelo teste One-way ANOVA \*\* ( $p \leq 0,01$ ) e \*\*\* ( $p \leq 0,001$ ) em comparação com o controle.

Imane *et al.* (2020) testaram seis óleos essenciais: *Rosmarinus officinalis* L., *Zingiber officinale* Roscoe, *Melaleuca alternifolia* Cheel, *Cymbopogon winterianus*, *Salvia sclarea* L. e *Syzygium aromaticum* contra bactérias multirresistentes como *E. coli* ESBL positiva e obtiveram bons resultados bactericidas constatando que a ação dos compostos naturais não depende do perfil de susceptibilidade aos antibióticos. A vasta composição química das substâncias tem destaque na ação biológica. O CIM e CBM da *S. aromaticum* frente a *E. coli* ESBL foi de 210µg/mL sendo o mesmo resultado para cepa ATCC 25922 e para *K. pneumoniae* ATCC 70063. Estes resultados são semelhantes com os apresentados no presente estudo, visto que, a CIM e a CBM obtidas para amostras de *E. coli*, por exemplo, foram de 312µg/mL para a ATCC 25922 e também para 35% dos isolados com genes de resistência ESBL.

Ribeiro *et al.* (2020) testaram diversos óleos essenciais contra isolados de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* resistentes a antibióticos e evidenciaram a ação da canela chinesa e do orégano (*Cinnamomum cassia* e *Origanum compactum*) com os melhores resultados de CIM, sendo 250µg/mL para amostras de *E. coli* e *K. pneumoniae* e

500µg/mL para *P. aeruginosa*. Os demais compostos testados tiveram uma CIM a partir de 1000µg/mL. As atividades destacadas foram relacionadas com a prevalência de cinamaldeído na canela chinesa e de carvacrol no orégano. O autor descreve que a penetração dos óleos é mais dificultosa nos Gram-negativos pela presença da membrana externa, o que não impede que os compostos tenham acesso às células bacterianas mesmo que lentamente, por meio das porinas ou desestruturando os ácidos graxos insaturados que compõem a estrutura externa e por consequência desordenando-as. Os principais mecanismos de ação desses óleos são desestabilização da membrana, inibições enzimáticas, como atividade de ATPase, interrupção da divisão celular ou falha da atividade de bombas de efluxo.

Freitas *et al.* (2020) testaram óleo essencial extraído das folhas de *Baccharis coridifolia* contra *E. coli* e *P. aeruginosa* multirresistentes e obtiveram resultados extremamente positivos para *P. aeruginosa* com CIM de 128µg/mL. Entretanto, não foi observado inibição do crescimento de *E. coli*. Diferentemente, dos resultados obtidos nessa pesquisa, uma vez que o OE de *L. sidoides* foi bem mais efetivo frente a isolados de *E. coli* do que de *P. aeruginosa*. Os autores relatam que os efeitos do OE de *B. coridifolia* são atribuídos a sesquiterpenos, como germacreno D e  $\alpha$ -cariofileno, componentes principais desse OE.

Veras *et al.* (2017) analisaram o comportamento do óleo essencial de *L. sidoides* contra alguns microrganismos e obtiveram CIM de 256µg/mL para *K. pneumoniae* ATCC 10031 e de 512µg/mL para *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 15442, valores mais uma vez, semelhantes aos estudos já citados e ao dessa pesquisa, sendo que os principais constituintes identificados também foram timol (84,9%), etil-metil-carvacrol (5,33%) e p-cimeno (3,01%).

Enquanto Moraes *et al.* (2016) trabalhando com óleo essencial de *L. sidoides* coletadas de São Gonçalo do Abaeté, no estado de Minas Gerais Brasil, encontraram CIM de 2.000µg/mL para amostras de *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *E. coli* ATCC 11229, o composto da planta originária dessa região tinha isoborneol (14,66%), acetato de bornil (11,86%),  $\alpha$ -humuleno (11,23%) como componentes prevalentes. O rendimento e a composição química de óleos essenciais são determinados por uma combinação de fatores naturais e genômicos, sendo, portanto, variáveis e estas variações vão determinar propriedades físicas, químicas, biológicas e organolépticas definindo a finalidade usual e comercial da substância (SARAIVA, 2020).

Além disso, os componentes secundários dos óleos essenciais, mesmo em baixas concentrações, podem contribuir na eficiência global da atividade antimicrobiana por meio da interação sinérgica com os demais constituintes. Assim, os componentes principais, representando muitas vezes mais de 85% do total, não são responsáveis isolados frente à alta performance de uma atividade antibacteriana (PANDINI *et al.*, 2017).

Uma revisão publicada por Pérez Zamora, Torres e Nuñez (2018) evidenciou resultados de testes com óleo essencial de *L. sidoides* que apresentaram valores de CIM de 256µg/mL para *K. pneumoniae* e 512µg/mL para *P. aeruginosa* e também para *E. coli*, resultados próximos aos encontrados no presente estudo. Além disso, o óleo essencial de *L. sidoides* foi ativo frente a cepas de *Candida sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Providencia rettigeri*, *Enterobacter cloacae* e *Enterococcus faecalis*. Todavia, as pesquisas analisadas nessa revisão utilizavam microrganismos oriundos de cepas padrões e isolados de alimentos como leites e queijos.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados dessa pesquisa mostraram que o óleo essencial extraído das folhas de *L. sidoides* tem ação inibitória e bactericida contra patógenos Gram-negativos ESBL positivos, ação esta que pode ser atribuída pela prevalência de timol além de outros terpenos secundários na sua composição, e que essa ação não é coibida pela presença de genes de resistência que codificam beta-lactamases que conferem vantagens na virulência dos microrganismos. A ação antibacteriana frente a isolados nosocomiais torna o composto promissor para o desenvolvimento de fármacos utilizados no tratamento de IRAS.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Carol Stream: Allured, 2007. 800p.
- ADLER, A. *et al.* Dissemination of the *bla*KPC gene by clonal spread and horizontal gene transfer: comparative study of incidence and molecular mechanisms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 8, p. 2143-2146, 2016.
- AL DAWODEYAH, H. Y. *et al.* Antimicrobial resistance and putative virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with respiratory tract infection. **Germes**, v. 8, n. 1, p. 31-40, 2018.
- ALVES, Stephanie de Almeida. **Diversidade genômica de isolados nosocomiais de *Pseudomonas aeruginosa* multidroga resistentes**. 2020. 89 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Universidade Federal do Ceará, *Campus* de Sobral, Sobral, 2020.
- AMALRAJ, A. *et al.* Preparation, characterization and antimicrobial activity of polyvinyl alcohol/gum arabic/chitosan composite films incorporated with black pepper essential oil and ginger essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 366-375, 2020.
- BALDIM, I. *et al.* *Lippia sidoides* essential oil encapsulated in lipid nanosystem as an anti-*Candida* agent. **Industrial Crops and Products**, v. 127, p. 73-81, 2019.
- BELLO-LÓPEZ, J. M.; ROJO-MEDINA, J. Detection of antibiotic resistance genes - lactamics in bacterial strains isolated from Umbilical Cord Blood Units for transplant. **Revista Médica del Hospital General de México**, v. 80, n. 1, p. 31-36, 2017.
- BETANCOURT, L. *et al.* Effects of Colombian oregano essential oil (*Lippia origanoides* Kunth) and *Eimeria* species on broiler production and cecal microbiota. **Poultry Science**, v. 98, n. 10, p. 4777-4786, 2019.
- BOUSLAH, Z. Carba NP test for the detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 50, n. 6, p. 466-479, 2020.
- BOY, H. I. A. *et al.* Recommended Medicinal Plants as Source of Natural Products: a review. **Digital Chinese Medicine**, v. 1, p. 131-142, 2018.
- BRAGA, Jisbaque Melo. **Prevalência e sensibilidade antimicrobiana de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de infecções nosocomiais no hospital regional norte em Sobral/CE e detecção genética de *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M e *blages* em espécimes produtores de betalactamase de espectro estendido (ESBL)**. 2017. 100 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade Federal do Ceará, *Campus* de Sobral, Sobral, 2016.
- BRASIL. MONOGRAFIA DA ESPÉCIE LIPPID SIDOIDES (ALECRIM-PIMENTA). MINISTÉRIO DA SAÚDE E ANVISA, BRASÍLIA, 2014.



BRESSAN, A. *et al.* In vitro activity of Fosfomycin against mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 20, p. 328-331, 2020.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLSI document M100-S28. Wayne: CLSI; 2018.

EHLERT, P. A. D. *et al.* Tempo de hidrodestilação na extração de óleo essencial de sete espécies de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.2, p.79-80, 2006.

FAUVET, T. *et al.* Mucoviscous characteristics of *Klebsiella pneumoniae* strains: A factor of clinical severity? **Medicine et Maladies Infectieuses**, v. 50, n. 6, p. 500-506, 2019.

FERNÁNDEZ, J.; BERT, F.; NICOLAS-CHANOINE, M.-H. The challenges of multi-drug-resistance in hepatology. **Journal of Hepatology**, v.65, n.5, p. 1043-1054, 2016.

FREITAS, P. R. *et al.* Characterization and antibacterial activity of the essential oil obtained from the leaves of *Baccharis coridifolia* DC against multiresistant strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 145, p. 104223, 2020.

GHADERI, R. S. *et al.* The prevalence of genes encoding ESBL among clinical isolates of *Escherichia coli* in Iran: A systematic review and meta-analysis. **Gene Reports**, v. 18, p. 100562, 2020.

GOMES, Fabiana. **Estudo dos compostos voláteis do alecrim utilizando as técnicas de microextração em fase sólida (SPME), hidrodestilação e extração com fluido supercrítico (SFE)**. 2003. Dissertação (Mestrado em Química) Departamento de Química Inorgânica e Analítica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

HAFIDH, R. R. *et al.* Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, p. 96-106, 2011.

IMANE, N. I. *et al.* Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of some essential oils against multidrug resistant bacteria. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 35, p. 101074, 2020.

KAKIAN, F. *et al.* Evaluating the prevalence of virulence genes of *Escherichia coli* in patients affected by urinary tract infection. **Gene Reports**, v.16, p. 100433, 2019.

KHAN, M. S. A.; AHMAD, I. In vitro antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of *Cinnamomum*-, *Syzygium*- and *Cymbopogon*-species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. **Phytomedicine**, v. 19, n. 1, p. 48-55, 2011.

LACCOURREYE, O. *et al.* La phytothérapie en pratique clinique en otorhinolaryngologie: apport, limites et risques. **Annales françaises d'Otorhinolaryngologie et de Pathologie Cervico-faciale**, v. 134, n. 2, p. 90-95, 2017.

LISBOA, M. C. *et al.* Oleochemistry potential from Brazil northeastern exotic plants. **Biochimie**, v. 178, p. 96-104, 2020.

M. Brasil, S. da RENISUS - Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS Espécies vegetais, 2009.

MANCARZ, G. F. F. *et al.* Chemical composition and biological activity of *Liquidambar styraciflua* L. leaf essential oil. **Industrial Crops and Products**, v.138, p. 111446, 2019.

MARTEGANI, E. *et al.* Effect of blue light at 410 and 455 nm on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 204, p. 111790, 2020.

MELO, A. R. B. *et al.* Essential oils from *Lippia sidoides* and *Lippia origanoides* affect the viability, motility and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **Micron**, v. 129, p. 102781, 2020.

MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 39, 2017.

MORAIS, S. R. *et al.* Essential Oil Composition, Antimicrobial and Pharmacological Activities of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) From São Gonçalo do Abaeté, Minas Gerais, Brazil. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. 48, p. 262-270, 2016.

NASSER, M.; GAYEN, S.; KHARAT, A. S. Prevalence of  $\beta$ -lactamase and antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Arab region. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 152-160, 2020.

NEUBEISER, A. *et al.* Mortality attributable to hospital acquired infections with multidrug-resistant bacteria in a large group of German hospitals. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 2, p. 204-210, 2020.

NISHIDA, S.; ONO, Y. Genomic analysis of a pan-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 identified in Japan in 2016. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n. 4, p. 105854, 2020.

PANDINI, J. A. *et al.* Chemical composition, antimicrobial and antioxidant potential of the essential oil of *Guarea kunthiana* A. Juss. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, p. 53-60, 2017.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews.**, v. 18, n. 4, p. 657-686, 2005.

PÉREZ ZAMORA, C. M.; TORRES, C. A.; NUÑEZ, M. B. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Verbenaceae species growing in South America. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 544, 2018.

PRAGASAM, A.K. *et al.* Molecular characterisation of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* during 2014 and 2015 collected across India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 433-441, 2016.

PUSKÁROVÁ, A. *et al.* The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

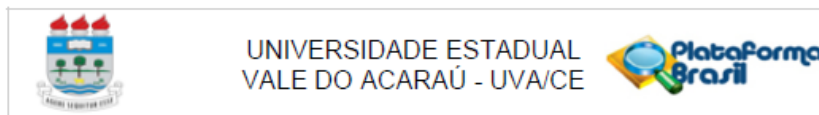
- RASMUSSEN, B. A.; BUSH, K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 2, p. 223-232, 1997.
- RIBEIRO, S. O. *et al.* Antibacterial and cytotoxic activities of ten commercially available essential oils. **Antibiotics**, v. 9, n. 10, p. 717, 2020.
- SATLIN, M. J. *et al.* Emergence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae as causes of bloodstream infections in patients with hematologic malignancies. **Leukemia and Lymphoma**, v. 54, n. 4, p. 799-806, 2013.
- SARAIVA, A. G. Q. *et al.* Chemical analysis and vibrational spectroscopy study of essential oils from *Lippia sidoides* and of its major constituent. **Vibrational Spectroscopy**, v. 110, p. 103111, 2020.
- SILVA, G. J. Resistência à colistina e sua disseminação: implicações em saúde pública. **Revista Portuguesa de Farmacoterapia**, v. 10, n. 1, p. 47-52, 2018.
- SOARES, B. V. *et al.* Antiparasitic activity, histopathology and physiology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed to the essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae). **Veterinary Parasitology**, v. 234, p. 49–56, 2017.
- TING, S-W.; LEE, C-H.; LIU, J-W. Risk factors and outcomes for the acquisition of carbapenem-resistant Gram-negative bacillus bacteremia: a retrospective propensity-matched case control study. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 51, n. 5, p. 621-628, 2018.
- TOBOUTI, P. L. *et al.* Antimicrobial activity of copaiba oil: A review and a call for further research. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 94, p. 93–99, 2017.
- TOHIDI, B.; RAHIMMALEK, M.; TRINDADE, H. Review on essential oil, extracts composition, molecular and phytochemical properties of *Thymus* species in Iran. **Industrial Crops and Products**, v. 134, p. 89–99, 2019.
- TSAI, Y-W.; LIU, Y-H.; SU, H-H. Bacteriology of peritonsillar abscess: the changing trend and predisposing factors. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 84, n. 5, p. 532-539, 2018.
- VALADBEIGI, H. *et al.* Molecular characteristics, antimicrobial resistance profiles, and antibiotic resistance determinants in uropathogenic fluoroquinolone resistant- *Escherichia coli* isolates. **Gene Reports**, v.18, p. 100584, 2020.
- VALENZUELA-VALDERRAMA, M.; GONZÁLEZ, I. A.; PALAVECINO, C. E. Photodynamic treatment for multidrug-resistant Gram-negative bacteria: Perspectives for the treatment of *Klebsiella pneumoniae* infections. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 28, p. 256–264, 2019.
- VARGAS-ALZATE, C. A. *et al.* High excess costs of infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in an endemic region. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.51, n. 4, p. 601-607, 2018.

VERAS, H. N. H. *et al.* Enhancement of aminoglycosides and  $\beta$ -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S2790-S2795, 2017.

WALKTY, A. *et al.* Fosfomycin resistance mediated by fos genes remains rare among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* clinical isolates recovered from the urine of patients evaluated at Canadian hospitals (CANWARD, 2007–2017). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 96, n. 3, p. 114962, 2020.

ZANIANI, F. R. *et al.* Distribution of fosfomycin and AmpC  $\beta$ -lactamase resistance genes in urinary *Escherichia coli* isolates obtained from patients admitted to an educational hospital in Ahvaz, southwest Iran. **Gene Reports**, v.17, p. 100533, 2019.

## ANEXO A - PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP) DA UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE COMPOSTOS BIOATIVOS FRENTE A MICRORGANISMOS MULTIDROGA RESISTENTES

**Pesquisador:** LUDIMILA GOMES PINHEIRO

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 44524921.9.0000.5053

**Instituição Proponente:** Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.633.262

#### Apresentação do Projeto:

Este estudo tem a pretensão de avaliar a ação antimicrobiana de óleos essenciais extraídos da Moringa oleífera, da Lippia sidoides, do Cymbopogon citratus e do C. winterianus frente a microrganismos multidroga resistentes oriundos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). Será realizada a coleta dos referidos vegetais para obtenção de óleos essenciais a partir das folhas de L. sidoides, C. citratus, C. winterianus e das sementes de M. oleífera, além de posterior análise da composição química desses óleos por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa.

Adicionalmente, será avaliado o perfil de resistência dos microrganismos analisados e será determinado a Concentração Inibitória Mínima (CIM), a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos óleos essenciais da M. oleífera, L. sidoides, C. citratus e C. winterianus frente aos espécimes coletados.

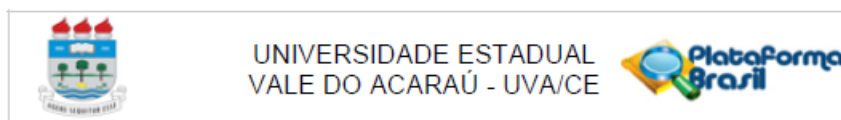
#### Objetivo da Pesquisa:

##### Objetivo Primário:

Avaliar a ação antimicrobiana dos óleos essenciais extraídos das folhas da L. sidoides, C. citratus e C. winterianus e do óleo fixo das sementes de M. oleífera contra bactérias e fungos multidroga resistentes isoladas de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).

##### Objetivo Secundário:

**Endereço:** Av Comandante Maurocêlio Rocha Ponte, 150  
**Bairro:** Derby **CEP:** 62.041-040  
**UF:** CE **Município:** SOBRAL  
**Telefone:** (88)3677-4255 **Fax:** (88)3677-4242 **E-mail:** uva\_comitedeetica@hotmail.com



Continuação do Parecer: 4.633.262

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado do CEP/UVA, após apresentação e discussão do parecer pelo relator, acatou a relatoria que classifica como aprovado o protocolo de pesquisa. O(a) pesquisador(a) deverá atentar para as recomendações listadas neste parecer.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1692271.pdf	05/03/2021 16:46:31		Aceito
Cronograma	CRONOGRAMADOPROJETO.pdf	05/03/2021 16:43:37	LUDIMILA GOMES PINHEIRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOCEP.pdf	05/03/2021 16:43:18	LUDIMILA GOMES PINHEIRO	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	SolicitacaodeDispensadeTCLE.pdf	28/01/2021 18:38:42	LUDIMILA GOMES PINHEIRO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	MATERIALBIOLOGICO.pdf	28/01/2021 18:37:29	LUDIMILA GOMES PINHEIRO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaDeAnuencia.pdf	28/01/2021 17:31:54	FRANCISCO CESAR BARROSO BARBOSA	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	28/01/2021 17:22:16	FRANCISCO CESAR BARROSO	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	28/01/2021 17:19:51	FRANCISCO CESAR BARROSO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Av Comandante Maurocílio Rocha Ponte, 150  
 Bairro: Derby CEP: 62.041-040  
 UF: CE Município: SOBRAL  
 Telefone: (88)3677-4255 Fax: (88)3677-4242 E-mail: uva\_comitedeetica@hotmail.com

## ANEXO B – COMPROVANTE DE CADASTRO NO SISGEN



Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso  
 Cadastro nº AEBF288

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: AEBF288  
 Usuário: Universidade Federal do Ceará  
 CPF/CNPJ: 07.272.636/0001-31  
 Objeto do Acesso: Patrimônio Genético  
 Finalidade do Acesso: Pesquisa

### Espécie

Lippia sidóides Cham

Título da Atividade: POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE Lippia sidóides  
 CONTRA BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

### Equipe

FRANCISCO CESAR BARROSO BARBOSA	Universidade Federal do Ceará
LUDIMILA GOMES PINHEIRO	Universidade Federal do Ceará
Vicente de Paulo Teixeira Pinto	Universidade Federal do Ceará

Data do Cadastro: 21/07/2020 19:39:13  
 Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 16:38 de 11/06/2021.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - **SISGEN**

## ANEXO C – ARTIGO

Microbial Pathogenesis

**ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF *Lippia sidoides* ESSENTIAL OIL AGAINST MULTIDRUG RESISTANT GRAM-NEGATIVE BACTERIA**

**Ludimila Gomes Pinheiro<sup>a\*</sup>, Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle<sup>b</sup>, Tigressa Helena Soares Rodrigues<sup>c</sup>, Vicente de Paulo Teixeira Pinto<sup>a</sup>, Francisco Cesar Barroso Barbosa<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Microbiology Laboratory, FAMED, Federal University of Ceará, Av. Comandante Maurocéllo Rocha Pontes 100, 62.042-280 Sobral, Ceará, Brazil.

<sup>b</sup>Biological Sciences Course, Center for Agricultural and Biological Sciences, State University Vale do Acaraú, Campus da Betânia, 62040-370, Sobral, CE, Brazil.

<sup>c</sup>Chemistry Course, Center for Exact Sciences and Technology, State University Vale do Acaraú, Campus da Betânia, 62040-340, Sobral, CE, Brazil.

Corresponding author: Ludimila Gomes Pinheiro

Adress: Av. Comandante Maurocéllo Rocha Ponte, 100, Sobral, CE, 62042-280, Brazil

Telephone: + 55 85 986395808

E-mail: ludimilagomes\_ce@hotmail.com

## ABSTRACT

Research is investigating solutions to contain the resistance mechanisms developed and acquired by microorganisms. The essential oil (EO) obtained from the leaves of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) has anti-inflammatory, antibacterial effects, among others. Thus, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial potential of EO from *L. sidoides* against Gram-negative bacteria with multidrug resistance (MDR) phenotype and to correlate the results obtained with the genetic profile of these microorganisms. The oil was extracted from the leaves of this plant by steam dragging and condensation with Clevenger equipment, the chemical components were identified and quantified by gas chromatography coupled with mass spectrometry and gas chromatography coupled with the flame ionization detector. The antibacterial potential was evaluated by tests of Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration. Thymol is the prevalent component (87,37%), with EO at a concentration of 312µg/mL effective in inhibiting 52% of *E. coli* strains and about 38% of *K. pneumoniae*. However, for *P. aeruginosa* a concentration of 2.500µg/mL was needed to obtain growth inhibition of approximately 38% of the specimens. Among the resistance genes detected, the highest prevalence was *bla*<sub>CTX-M 1/2</sub>, however, even with the presence of these genes, an antimicrobial action of this EO was observed. Therefore, the substance presents itself as an efficient antibacterial compound with potential for use in fighting MDR bacterial infections.

**Keywords:** Phytotherapeutics; natural products; infections; Verbenaceae; β-lactamases.



## 1. Introduction

Gram negative bacilli are organisms present in various environments and that participate in the balance of the habitats to which they are related, but when subjected to unfavorable situations they have the remarkable ability to take advantage of survival strategies. Multidrug-resistant bacteria are a matter of preoccupation in the global health area, as they narrow or even eliminate the existing therapeutic options [1].

These microorganisms can resist by several mechanisms such as: enzymatic products, alteration of membrane proteins, in addition to that, the genetic material can be easily transmitted between bacterial cells through specific cell structure [2]. The action of  $\beta$ -lactamases on Gram negatives is more favorable and efficient, since they are distributed in the periplasmic space, inactivating the antimicrobial before it has contact with the target of action present in the cytoplasmic membrane [3].

Essential oils are a complex of volatile organic chemicals produced by secondary metabolites responsible for the biological activities of plants. Terpenes, aromatic and aliphatic compounds such as alcohols, esters, ethers, aldehydes, ketones, lactones, phenols and phenolic ethers are among the most prevalent components in these substances [4].

From the semi-arid region of northeastern Brazil, *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) is an aromatic plant with insecticidal, antibacterial, larvicide, acaricide, and anti-inflammatory properties, among others [5]. Thymol and carvacrol, commonly found in the essential oil of *Lippia* leaves, target the cell membrane, affecting electrostatic balance and other vital functions. The efficiency of these extracts is related exactly to the complexity of the compounds that behave synergistically [6].

Given the above, there are hypotheses about the possible antibacterial activity of *L. sidoides* essential oil against resistant multidrug nosocomial strains of *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *E. coli* and that the results obtained may be related to the profile genetic of these microorganisms.

## 2. Materials and methods

The research, guided by Resolution N° 466/12 of the Brazil National Health Council, complies with ethical aspects and obtained a favorable opinion by the Research Ethics Committee of the State University of Vale do Acaraú, Sobral, Ceará, Brazil (4,633,262/2021). In order to follow the criteria established by Law N° 13.123/15 and its regulations, *Lippia sidoides* was registered in the database of the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge under N° AEBF288.

### 2.1. Bacterial strains

Sixty isolates, one more standard strain from each specimen (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*), were used in the experiments. These are part of a biological collection formed at

Laboratory of Microbiology and Parasitology of the FAMED (UFC/Sobral) and come from hospitals located in the city of Sobral/CE Brazil.

## 2.2. *Obtaining essential oil*

Fresh leaves of *L. sidoides*, HUVA exsicate n° 23.372, were cleaned with flowing water followed by distilled water. The oil was obtained by hydrodistillation, this procedure consisted of steam dragging and condensation with Clevenger equipment. For approximately 3 hours of boiling, the hydrolate is obtained [7]. To obtain the starting of the tests, 2,500µg/mL, the essential oil was diluted in a 0.02% tween 80 solution.

## 2.3. *Determination of chemical composition*

### 2.3.1 Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS):

The qualitative analysis of the oils was performed by GC-MS using an Agilent model GC-7890B/MSD-5977A (quadrupole), with electron impact at 70 eV, HP-5MS methylpolysiloxane column (30 mx 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent), helium carrier gas with flow rate 1,00 mL.min<sup>-1</sup> (8,8 psi) and constant linear velocity of 36,8 cm.s<sup>-1</sup>, injector temperature 250 °C, detector temperature 150 °C, transfer line temperature 280 °C. The identification of the compounds was performed by analyzing the fragmentation patterns displayed in the mass spectra with those present in the database provided by the equipment (NIST version 2.0 of 2012 – 243.893 compounds) and literature data.

### 2.3.2 Gas chromatography coupled to the flame ionization detector (CG-DIC):

The quantitative analysis was performed by CG-DIC using a Shimadzu model CG-2010 Plus, RTX-5 methylpolysiloxane column (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), injection mode with 1:30 flow division, gas nitrogen carrier with flow 1,00 mL.min<sup>-1</sup> (84,1 kPa) and constant linear velocity of cm.s<sup>-1</sup>, injector temperature 250 °C, detector temperature 280 °C. Identification of compounds was performed by comparing their retention indices with those of known compounds, obtained by injecting a mixture of standards containing a homologous series of C<sub>7</sub>-C<sub>30</sub> alkanes and literature data.

## 2.4. *Reactivation of bacterial isolate*

The reactivation of specimens stored in a freezer at -80 °C was added by adding a 50µl aliquot of the culture in a test tube containing 5.0 mL of Brain Heart Infusion broth, which was subsequently incubated for 18 h at 35 °C. After growth, the inoculum was seeded on a plate with MacConkey Agar using a sterile bacteriological loop and incubated again at 35 °C for 24 hours. After growth, the purity of the sample was confirmed with the observation of the morpho-tintorial characteristics through the Gram stain.

## 2.5. *Broth Microdilution Test.*

The determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of *L. sidoides* oil was performed in triplicate according to microdilution methodology in 96-well polystyrene plates standardized in accordance with the document M7-A 10th edition, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, a standard developed through the conceptual process of CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), with adaptations [8].

The wells of columns 1 to 11 were filled with culture medium, the essential oil at an initial concentration of 2,500µg/mL was added to column 1 and following the microdilution process, the other desired decreasing concentrations were obtained. Finally, each well received 100µL of bacterial suspension adjusted to approximately  $5 \times 10^7$  CFU/mL. The last column was reserved for the controls: negative (only culture medium), positive (bacterial suspension more culture medium), toxicity (bacterial culture more diluent - tween 80 to 0.02%). Lines D and H were turbidity control, in this case, culture medium more essential oil in their respective dilutions.

Then, the microplate was incubated at 35°C for 24h and after this period it was analyzed by an ELISA reader (BIO Trak II – Plate Reader®) with a wavelength of 620nm to quantify bacterial growth through turbidity.

#### 2.6. Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

The determination of the Minimum Bactericidal Concentration (CBM) was performed according to the method proposed by Hafidh *et al.* [9]. After determining the MIC, 10µL from the wells where there was no visible microbial growth were transferred to Petri dishes containing Muller Hinton Agar medium, which were then incubated at 35°C for 24 h in the aerobic growth oven. CBM was considered the lowest concentration of the compound where there is no cell growth on the surface of the inoculated agar (99.9% microbial death).

#### 2.7. Resistance profile analysis by the presence of ESBL

The bacterial samples used were previously identified and have a susceptibility profile defined by an automated method in the hospital of origin, arriving at the laboratory, macro and microscopic evaluations are made for confirmation and reactivation, which are later stored at -80 °C. Previous studies carried out by the present research group investigated the presence of some resistance genes in these samples (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> and *bla*<sub>KPC</sub>), and some of these genes were identified in some bacterial isolates by conventional polymerase chain reaction (cPCR). These data, referring to the resistance profile due to the presence of ESBL genes, were associated with the values obtained for MIC and MBC to try to relate the different inhibition values with the presence of certain genes.

#### 2.8. Statistical analysis

The difference between the means of the replicates was evaluated by One-way ANOVA test with Bonferroni post-test, with the support of the GraphPad® Prism version

5.04 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Differences with  $p < 0.05$  were considered significant.

### 3. Results and discussion

The constituents of the essential oil of *L. sidoides* are shown in Table 1. It is observed that the chemical compound that presents, in high concentrations, as the major constituent is thymol (87.37%), followed by p-cymene (4, 45%) and  $\beta$ -Caryophyllene (3.11%).

**Table 1**

Chemical composition of the essential oil of *Lippia sidoides*. <sup>1</sup>Calculated IK values. <sup>2</sup>IK values of the literature [10]

Compound	<sup>1</sup> IK <sub>calc</sub>	<sup>2</sup> IK <sub>lit</sub>	Area (%)
$\alpha$ -Pinene	941	939	0,54
Myrcene	998	990	0,44
p-Cymene	1030	1024	4,45
Eucalyptol	1038	1031	0,65
Terpinen-4-ol	1183	1177	0,52
$\alpha$ -Terpineol	1198	1188	0,21
Thymol methyl ether	1240	1235	0,36
Thymol	1296	1290	87,37
$\beta$ -Caryophyllene	1423	1419	3,11
Aromandendrene	1443	1441	0,36
$\alpha$ -Caryophyllene	1458	1454	0,18
$\gamma$ -Muurolene	1480	1479	0,06
Bicyclogermacrene	1497	1500	0,29
$\delta$ -Cadinene	1527	1523	0,21
Spathulenol	1582	1578	0,15
Caryophyllene oxide	1586	1583	0,98
Total Composition			99,89

Thymol is one of the monoterpenic phenols significantly present in essential oils of plants included in the Verbenaceae family (*Aloysia triphylla*, *Laosaurus gracilis*, *Lasius grandis*, *Lippia organoides*, *L. sidoides*). Biologically, it has an antioxidant, anti-inflammatory, local anesthetic, healing and antiseptic action, with an emphasis on antibacterial and antifungal properties [11]. Alcohols are also common chemical components present in essential oils, with a structure of intense binding affinity with various molecules such as proteins or glycoproteins. Thus, they demonstrate a high potential to permeate cell walls, leading to the loss of cytoplasmic material [12].

All isolates used in this study were beta-lactamase producers according to the susceptibility profile automatically drawn at the time they are identified. Among the genes that were investigated in previous studies of this research group, it is possible to see that *bla<sub>CTX-M1/2</sub>* is the most prevalent in all samples. However, this fact did not prevent the

bactericidal action of the oil in question. The result with the *E. coli* (EC 42) sample that have *bla*<sub>CTX-M 1/2</sub> and *bla*<sub>TEM</sub> is the same when compared with the standard sample ATCC 25922 having an inhibitory and bactericidal action at a concentration of 312µg/mL for both.

The essential oil had an inhibitory and bactericidal action in 10 (50%) of the *E. coli* samples analyzed at a concentration of 625µg/mL. At this same concentration, a bactericidal effect was observed in 8 (40%) isolates of *K. pneumoniae*. Compared to *P. aeruginosa* isolates, the compound proved to be less effective for most, as it showed a bactericidal effect for only 6 (30%) nosocomial isolates and for the standard strain, but with the highest tested concentration of the compound (2,500µg /mL) for 5 (71.4%) of these, and in 2 (33.3%) isolates and in the standard strain, MIC was equal to CBM (2,500µg/mL). Furthermore, in 4 (20%) specimens the compound, at the concentrations tested, did not show an inhibitory effect. The values can be seen in tables 2, 3 and 4. The greater resistance of *P. aeruginosa* can be attributed to the excellent ability to form biofilm and the action of efflux pumps, intrinsic characteristics of this species [13].

**Table 2**

CIM, CBM, CBM: CIM of *L. sidoides* essential oil against *E. coli* isolates and ATCC 25922 strain, and presence of the investigated resistance genes

<i>E. coli</i> samples	Essential oil of <i>L. sidoides</i> µg/mL		ESBL/KPC genes
	MIC	MBC	
EC 03	625	625	
EC 04	625	625	
EC 08	625	625	CTX-M 1/2
EC 10	625	625	
EC 11	625	625	
EC 12	625	625	CTX-M 1/2
EC 16	312	312	
EC 18	625	625	CTX-M 1/2
EC 22	625	625	
EC 23	312	1250	CTX-M 1/2
EC 29	625	625	
EC 31	625	625	
EC 32	312	312	
EC 33	312	312	
EC 34	312	312	CTX-M 1/2
EC 37	312	625	
EC 38	312	312	
EC 39	312	312	
EC 40	312	625	CTX-M 1/2 TEM SHV
EC 42	312	312	CTX-M 1/2 TEM

ATCC 25922	312	312	-
Geometric mean	461	536	

**Table 3**

CIM, CBM, CBM: CIM of *L. sidoides* essential oil against *K. pneumoniae* isolates and ATCC 70063 strain, and presence of the investigated resistance genes

<i>K. pneumoniae</i> samples	Essential oil of <i>L. sidoides</i> µg/mL		ESBL/KPC genes
	MIC	MBC	
KP 01	312	312	
KP 02	312	312	CTX-M 1/2 TEM SHV
KP 05	312	312	
KP 06	312	312	
KP 07	312	312	
KP 09	312	625	
KP 13	312	312	
KP 14	1250	1250	
KP 17	1250	1250	
KP 19	1250	1250	
KP 20	1250	1250	
KP 21	1250	1250	
KP 24	625	625	
KP 25	625	625	
KP 26	625	625	
KP 28	625	625	
KP 35	625	625	
KP 36	625	1250	CTX-M 1/2
KP 41	625	625	CTX-M 1/2
KP 49	312	625	
ATCC 70063	2500	2500	
Geometric mean	744	803	

**Table 4**

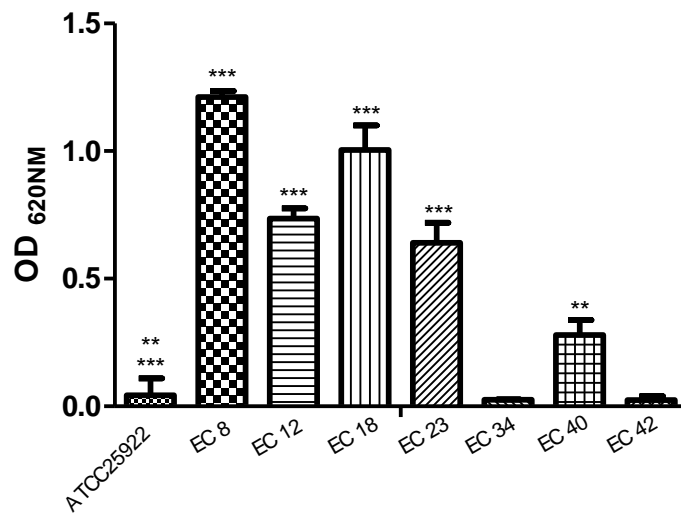
CIM, CBM, CBM: CIM of *L. sidoides* essential oil against *P. aeruginosa* isolates and ATCC 15442 strain, and presence of the investigated resistance genes

<i>P. aeruginosa</i> samples	Essential oil of <i>L. sidoides</i> µg/mL		ESBL/KPC/IMP detected
	MIC	MBC	
PA 02	625	2500	SHV CTX-M 1/2 KPC
PA 04	625	2500	
PA 06	312	625	CTX-M 1/2
PA 08	2500	2500	CTX-M 1/2 TEM

			GES
			CTX-M 1/2
PA 09	1250	-	TEM
			IMP-1
PA 12	2500	-	CTX-M 1/2
			GES
PA 13	-	-	CTX-M 1/2
			GES
PA 14	1250	-	CTX-M 1/2
PA 15	2500	-	
PA 16	625	-	SHV
PA 17	312	1250	SHV
PA 20	1250	-	
PA 22	1250	-	
PA 23	-	-	CTX-M 1/2
PA 28	2500	-	
PA 30	2500	-	GES
PA 31	-	-	
PA 32	-	-	
PA 33	2500	2500	TEM
PA 34	2500	-	TEM
ATCC 15442	2500	2500	
Geometric mean	1309	685	

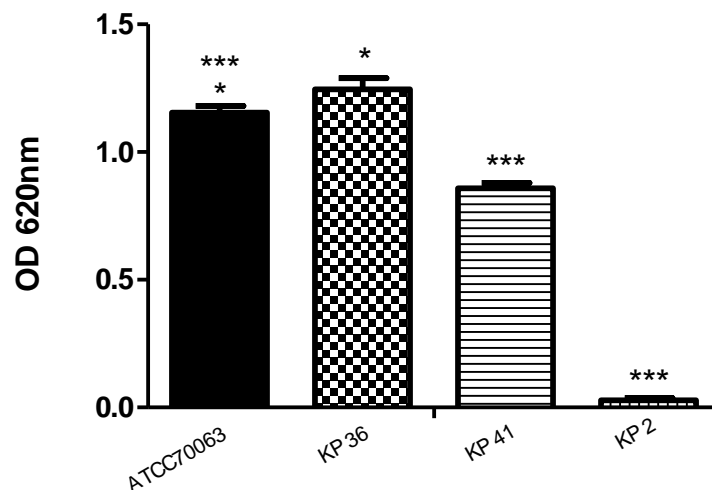
Studies show that the chemical composition of essential oils are preponderant in the final results of the proposed objectives, and the knowledge generated promote to new discoveries and improvements. Pandini *et al.* [14] used the essential oil of *Guarea kunthiana* abundant in  $\alpha$ -zingiberene, which showed bactericidal activity against standard strains of *Salmonella enterica* ATCC 14028; *Proteus mirabilis* ATCC 25933 and *P. aeruginosa* ATCC 27853, but it was not efficient against *E. coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* ATCC 13883 even with a concentration of 7,000 $\mu$ g/mL for both MIC and MBC.

In the figures below, we can visualize the action of *L. sidoides* essential oil against the bacteria studied, showing that the presence of the resistance genes studied did not impair its inhibitory capacity. So, EO at a concentration of 312 $\mu$ g/mL had a bactericidal effect against the *E. coli* EC 34 isolate that harbored the *bla*<sub>CTX-M 1/2</sub> gene, as well as against the ATCC 25922 strain that did not have these resistance genes, a similar behavior was observed in EC 42, which carries more than one ESBL gene (Figures 1).



**Fig. 1.** *E. coli* bacterial cell growth. ATCC 25922 control strain and isolates with at least 1 ESBL gene identified (EC8, EC12, EC23 and EC34) and isolates with more than 1 ESBL gene identified (EC40 and EC42) against *L. sidoides* essential oil at 312 µg/mL. Statistically significant values \*\*\* ( $p \leq 0.001$ ) and \*\* ( $p \leq 0,01$ ) compared to control.

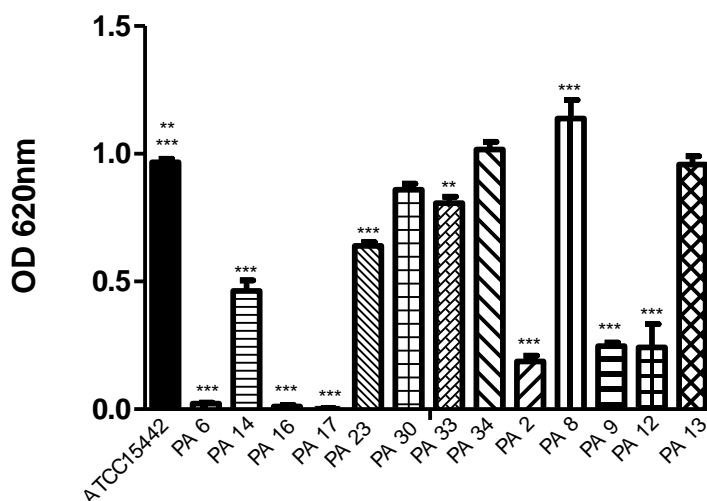
In relation to *K. pneumoniae* isolates, OE had a bactericidal effect even in those that harbored ESBL genes, including a smaller MBC (312µg/mL) to eliminate KP 2, which carries three resistance genes, than the ATCC strain 70063 who did not have these genes ( $p \leq 0.001$ ) (Figures 2).



**Fig. 2.** *K. pneumoniae* bacterial cell growth. ATCC 70063 control strain and isolates with at least 1 ESBL gene identified (KP36 and KP41) and isolates with more than 1 ESBL gene identified (KP2) against *L. sidoides* essential oil at 312 µg/mL. Statistically significant values \* ( $p \leq 0.05$ ) and \*\*\* ( $p \leq 0,001$ ) compared to control.



The results obtained with *P. aeruginosa* also followed the same behaviors (Table 4 and figures 3). It was necessary concentrations of 625µg/mL and 1,250µg/mL of the EO to obtain a bactericidal effect against isolates PA06 and PA17, respectively, and both harbored ESBL genes. However, to observe the same effect in the ATCC 15442 strain that does not carry these genes, a concentration of two to four times greater was necessary ( $p \leq 0.001$ ).



**Fig. 3.** *P. aeruginosa* bacterial cell growth. ATCC 15442 control strain and isolates with at least 1 ESBL gene identified (PA6, PA14, PA16, PA17, PA23, PA30, PA33 and PA34) and isolates with more than 1 ESBL gene identified (PA2, PA8, PA9, PA12 and PA13) against *L. sidoides* essential oil at 1250 µg/mL. Statistically significant values \*\* ( $p \leq 0.01$ ) and \*\*\* ( $p \leq 0,001$ ) compared to control.

Imane *et al.* [15] tested six essential oils: *Rosmarinus officinalis* L., *Zingiber officinale* Roscoe, *Melaleuca alternifolia* Cheel, *Cymbopogon winterianus*, *Salvia sclarea* L. and *Syzygium aromaticum* against multiresistant bacteria such as *E. coli* ESBL and obtained good bactericidal results, noting that the action of the compounds does not depend on the antibiotic susceptibility profile. The vast chemical composition of substances stands out in biological action. The MIC and MBC of *S. aromaticum* against *E. coli* ESBL was 210µg/mL, with the same result for strain ATCC 25922 and for *K. pneumoniae* ATCC 70063. These results are similar with the present study, since the MIC and the MBC obtained for *E. coli* samples, for example, were 312µg/mL for ATCC 25922 and also for 35% of the resistance profile samples tested.

Ribeiro *et al.* [16] tested several essential oils against antibiotic-resistant *E. coli*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* isolates and showed the action of Chinese cinnamon and oregano (*Cinnamomum cassia* and *Origanum compactum*) with the best MIC results, with 250µg/mL for *E. coli* and *K. pneumoniae* samples and 500µg/mL for *P. aeruginosa*. The other compounds tested had a MIC from 1,000µg/mL. The highlighted activities were related to the prevalence of cinnamaldehyde in Chinese cinnamon and carvacrol in oregano. The authors described that penetration of oils is more difficult in Gram negatives due to the presence of the outer membrane, which does not prevent the compounds from gaining access to the cells,

even if slowly, through porins or by destructuring the unsaturated fatty acids that make up the external structure and therefore disordering the cell. The main mechanisms of action described are: membrane destabilization, enzymatic inhibitions, such as ATPase activity, interruption of cell division or failure of efflux pump activity.

Freitas *et al.* [17] tested essential oil extracted from the leaves of *Baccharis coridifolia* against *E. coli* and *P. aeruginosa* multiresistant and obtained divergent results from the findings in this study, since, for *P. aeruginosa* there was an inhibitory effect with a MIC of 128 $\mu$ g/mL, while there was no effect for *E. coli*. The effects are attributed to sesquiterpenes such as germacrene D and  $\alpha$ -caryophyllene as main components.

Veras *et al.* [18] analyzed the behavior of *L. sidoides* essential oil against some microorganisms and obtained MIC of 256 $\mu$ g/mL for *K. pneumoniae* ATCC 10031 and 512 $\mu$ g/mL for *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 15442, values one more time, similar to the studies already mentioned and close to this research. The main constituents identified were thymol (84.9%), ethyl-methyl-carvacrol (5.33%), and p-cymene (3.01%).

While Morais *et al.* [19] working with essential oil of *L. sidoides* collected from São Gonçalo do Abaeté, in the state of Minas Gerais, Brazil, found MIC of 2,000 $\mu$ g/mL for samples of *P. aeruginosa* ATCC 9027 and *E. coli* ATCC 11229, the plants compound originating from this region had isoborneol (14.66%), bornyl acetate (11.86%),  $\alpha$ -humulene (11.23%) as prevalent components. The yield and chemical composition of essential oils are determined by a combination of natural and genomic factors, being therefore variable and these variations will determine physical, chemical, biological and organoleptic properties, defining the usual and commercial purpose of the substance [20].

A review published by Pérez Zamora *et al.* [12] evidenced results of tests with essential oil of *L. sidoides* that presented MIC values of 256 $\mu$ g/mL for *K. pneumoniae* and 512 $\mu$ g/mL for *P. aeruginosa* and *E. coli*, results similar to those found in the present study. In addition, *L. sidoides* essential oil was active against strains of *Candida* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Providencia rettigeri*, *Enterobacter cloacae* and *Enterococcus faecalis*. The studies mentioned in the review above used microorganisms from standard strains and isolated from foods such as milk and cheese.

The secondary components of essential oils, even at low concentrations, can contribute to the overall efficiency of antimicrobial activity through synergistic interaction with other constituents. Thus, the main components, representing many times more than 85% of the total, are not responsible for the high performance of an antibacterial activity alone [14].

#### 4. Conclusion

The results of this research showed that the essential oil extracted from the leaves of *L. sidoides* has an inhibitory and bactericidal action against ESBL-positive Gram-negative pathogens, an action that can be attributed to the prevalence of thymol and other secondary terpenes in its composition, and that this action is not restricted by the presence of resistance genes that encode beta-lactamases that confer advantages in the virulence of microorganisms.

The antibacterial action against nosocomial isolates makes the compound promising for the development of drugs used in the treatment of nosocomial infections.

### **CRedit authorship contribution statement**

**Ludimila Gomes Pinheiro:** methodology, data curation, writing-original draft. **Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle:** investigation, conceptualization, supervision. **Tigressa Helena Soares Rodrigues:** methodology. **Vicente de Paulo Teixeira Pinto:** resources, supervision. **Francisco Cesar Barroso Barbosa:** conceptualization, supervision.

### **Declaration of competing interest**

Competing financial interests or personal relationships that may have influenced the work are unknown.

### **References**

- [1] J. Fernández, F. Bert, M. H. Nicolas-Chanoine, The challenges of multi-drug-resistance in hepatology, *J. Hepatol.* 65 (5) (2016) 1043-1054.
- [2] S. W. Ting, C. H. Lee, J. W. Liu, Risk factors and outcomes for the acquisition of carbapenem-resistant Gram-negative bacillus bacteremia: a retrospective propensity-matched case control study, *J Microbiol Immunol Infect.* 51 (5) (2018) 621-628.
- [3] A. K. Pragasam, S. Vijayakumar, Y. D. Bakthavatchalam, A. Kapil, B. K. Das, P. Ray, V. Gautam, S. Sistla, S. C. Parija, K. Walia, V. C. Ohri, S. Anandan, B. Veeraraghavan, Molecular characterisation of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* during 2014 and 2015 collected across India, *Indian J. Med. Microbiol.* 34 (4) (2016) 433-441.
- [4] A. Puškárová, M. Bučková, L. Kraková, D. Pangallo, K. Kozics, The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 1-11.
- [5] I. Baldim, L. Tonani, M. R. Z. Kress, W. P. Oliveira, *Lippia sidoides* essential oil encapsulated in lipid nanosystem as an anti-*Candida* agente, *Ind Crop Prod.* 127 (2019) 73-81.
- [6] M. S. A. Khan, I. Ahmad, In vitro antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of *Cinnamomum*, *Syzygium* and *Cymbopogon* species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*, *Phytomedicine.* 19 (1) (2011) 48-55.
- [7] P. A. D. Ehlert, A. F. Blank, M. D. F. Arrigoni-Blank, J. W. A. D. Paula, D. D. A. Campos, C. S. Alviano, Hydrodistillation time in essential oil extraction from seven species of medicinal plants, *Rev. Bras. Pl. Med.* 8 (2) (2006) 79-80.
- [8] CLSI. 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 28 th ed; Clinical and Laboratory Standards Institute, document Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

- [9] R. R. Hafidh, A. S. Abdulmir, L. S. Vern, F. A. Bakar, F. Abas, F. Jahanshiri, Z. Sekawi, Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product, *Open Microbial. J.* 5 (2011) 96-106.
- [10] R. P. Adams. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, Fourth Ed. Carol Stream: Allured. (2007) 800.
- [11] A. Amalraj, J. T. Haponiuk, S. Thomas, S. Gopi, Preparation, characterization and antimicrobial activity of polyvinyl alcohol/gum arabic/chitosan composite films incorporated with black pepper essential oil and ginger essential oil, *Int. J. Biol. Macromol.* 151 (2020) 366-375.
- [12] C. M. Pérez Zamora, C. A. Torres, M. B. Nuñez, Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Verbenaceae species growing in South America, *Molecules.* 23 (3) (2018) 544.
- [13] M. F. Moradali, S. Ghods, B. H. Rehm, *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7 (2017) 39.
- [14] J. A. Pandini, F. G. S. Pinto, M. C. Scur, C. B. Santana, W. F. Costa, L. G. Temponi, Chemical composition, antimicrobial and antioxidant potential of the essential oil of *Guarea kunthiana* A. Juss, *Braz. J. Biol.* 78 (2017) 53-60.
- [15] N. I. Imane, H. Fouzia, L. F. Azzahra, E. Ahmed, G. Ismail, D. Idrissa, K-H. Mohamed, F. Sirine, O. L'Houcine, B. Noureddine, Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of some essential oils against multidrug resistant bacteria, *Eur J Integr Med.* 35 (2020) 101074.
- [16] S. O. Ribeiro, V. Fontaine, V. Mathieu, A. Zhiri, D. Baudoux, C. Stévigny, F. Souard, Antibacterial and cytotoxic activities of ten commercially available essential oils, *Antibiotics.* 9 (10) (2020) 717.
- [17] P. R. Freitas, A. C. J. de Araújo, C. R. dos Santos Barbosa, D. F. Muniz, J. E. Rocha, J. B. de Araújo Neto, M. M. C. Silva, R. L. S. Pereira, L. E. Silva, W. Amaral, C. Deschamps, S. R. Tintino, J. Ribeiro-Filho, H. D. M. Coutinho, Characterization and antibacterial activity of the essential oil obtained from the leaves of *Baccharis coridifolia* DC against multiresistant strains, *Microb. Pathog.* 145 (2020) 104223.
- [18] H. N. Veras, F. F. Rodrigues, M. A. Botelho, I. R. Menezes, H. D. Coutinho, J. G. Costa, Enhancement of aminoglycosides and  $\beta$ -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the thymol, *Arab. J. Chem.* 10 (2017) S2790-S2795.
- [19] S. R. Morais, T. L. S. Oliveira, L. P. de Oliveira, L. M. F. Tresvenzol, E. C. da Conceição, M. H. Rezende, T. S. Fiuza, E. A. Costa, P. H. Ferri, J. R. Paula, Essential oil composition, antimicrobial and pharmacological activities of *Lippia sidoides* Cham.(Verbenaceae) from São Gonçalo do Abaete, Minas Gerais, Brazil, *Pharmacogn Mag.* 12 (48) (2016) 262-270.
- [20] A. G. Q. Saraiva, G. D. Saraiva, R. L. Albuquerque, C. E. S. Nogueira, A. M. R. Teixeira, L. B. Lima, B. G. Cruz, F. F. Sousa, Chemical analysis and vibrational spectroscopy

study of essential oils from *Lippia sidoides* and of its major constituent, Vib Spectrosc. 110 (2020) 103111.