



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

ANA JESSYCA ALVES MORAIS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CINAMALDEÍDO EM
ISOLADOS NOSOCOMIAIS DE *Acinetobacter baumannii* RESISTENTES A
CARBAPENÊMICOS**

SOBRAL-CE

2018

ANA JESSYCA ALVES MORAIS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CINAMALDEÍDO EM
ISOLADOS NOSOCOMIAIS DE *Acinetobacter baumannii* RESISTENTES A
CARBAPENÊMICOS**

Dissertação submetida à coordenação ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Vicente de Paulo
Teixeira Pinto

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco César
Barroso Barbosa

SOBRAL

2018

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)

Alves Morais, Ana Jessyca.

Avaliação da atividade antimicrobiana do cinamaldeído em isolados nosocomiais de acinetobacter baumannii resistentes a carbapenêmicos / Ana Jessyca Alves Morais. – 2018.
78 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2018.

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

Coorientação: Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa.

1. Acinetobacter baumannii;. 2. Multidroga-resistente;. 3. Cinamaldeído;. 4. Infecção nosocomial;. 5. Hospital de ensino;. I. Título.

CDD 660.6

ANA JESSYCA ALVES MORAIS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CINAMALDEÍDO EM
ISOLADOS NOSOCOMIAIS DE *Acinetobacter baumannii* RESISTENTES A
CARBAPENÊMICOS**

Dissertação submetida à coordenação ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia. Área de Concentração: Microbiologia Aplicada.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa (co-orientador)
Universidade Federal do Ceará/*Campus* Sobral

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

Prof. Dr.^a Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle
Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA/*Campus* Sobral

DEDICATÓRIA

A Deus, por sempre está presente em minha vida, além de me guiar para os melhores caminhos, por nunca desistir de mim, principalmente nos dias difíceis. A Ele toda a gratidão!

Aos meus pais, Everardo e Francis, que sentem orgulho de mim e que sempre me deram forças para não desistir dos meus sonhos, além de me apoiarem em tudo.

Aos meus irmãos, Pedro Lucas que hoje mora no céu e está acompanhando tudo lá de cima, e Vanessa, por sempre me ajudar em tudo e me incentivar a querer sempre o melhor.

Aos meu namorado, Sávio Sousa, por todo o cuidado e atenção comigo durante essa caminhada.

As minhas amigas, pelo incentivo, motivação e orgulho que sentem de mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e à Nossa Senhora, que me conduziram todo o tempo, dando-me serenidade e certeza ao meu coração que eu estava no lugar certo.

Ao professor Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto, meu orientador, que me aceitou e me apresentou pessoas essenciais para minha caminhada ao longo desses 24 meses. Obrigada pelos conselhos e encaminhamentos. Agradeço imensamente por me aceitar como sua orientanda, foi uma honra conhecê-lo!

Ao professor Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa, meu co-orientador, que considero meu orientador também. Obrigada por tudo, por aceitar o pedido de ser meu co-orientador, por sua paciência quando está orientando, confiança e por ter acreditado em mim.

A professora Dr^a. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle, obrigada pela disponibilidade de sempre, por todas as vezes que precisei do compartilhamento dos seus conhecimentos quanto a metodologias, você estava sempre de braços abertos.

A Mestranda Izabelly Linhares, obrigada por sempre ser meu braço direito na rotina laboratorial e na vida de mestranda, você foi essencial desde o dia que nos conhecemos, muito grata pelos ensinamentos no mundo da microbiologia.

Aos meus colegas da vida acadêmica que tanto colaboraram para concretização dessa pesquisa: Izabelly Linhares, Rondinely Lima, Xhaulla Fonseca, Ludmilla Gomes, Renato Freitas, Janara Aguiar e Rosineida Rodrigues.

As amigas da minha turma do mestrado, Carolina Linhares e Nayara Cardoso minhas parceiras de sala de aula e que me ajudaram muito a desvendar coisas que eu não sabia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade que tive de aprender e por poder colaborar com produção científica.

À Santa Casa de Misericórdia de Sobral pelo suporte financeiro (Edital DEPE 02/2017), foi extremamente importante para que esta pesquisa fosse realizada.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado.

A todos vocês, minha gratidão!

RESUMO

O surgimento de *Acinetobacter baumannii* multidroga-resistente (MDRAB) tornou-se um problema clínico crítico mundial devido à limitação das opções terapêuticas para o tratamento de infecções por MDRAB. O crescente interesse em novas terapias baseadas em produtos naturais é a fonte básica e primária para o surgimento de novos antimicrobianos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do cinamaldeído frente a 47 espécimes nosocomiais de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos isolados de pacientes em quatro hospitais de ensino do Estado do Ceará, Brasil. A identificação fenotípica e a sensibilidade antimicrobiana foram determinadas pelo sistema automatizado VITEK®2. Além disso, reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar o gene *bla_{OXA-51}* foi realizada para confirmação da identidade dos isolados de *A. baumannii* e suas características clínicas foram analisadas. A concentração inibitória mínima (CIM) do cinamaldeído foi determinada pelo método de microdiluição em caldo de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* e a concentração bactericida mínima (CBM) foi considerada a menor concentração do composto que preveniu o crescimento e reduziu o inóculo em mais de 99,9% dentro de 24 h após incubação à 37°C. Os resultados mostraram que a CIM do cinamaldeído frente aos 47 isolados nosocomiais de *A. baumannii* analisados variou de 125 a 500 µg/mL (média = 210,93 ± 58,55) e a CBM variou de 250 à 1000 µg/mL (média = 510,41 ± 230,39). Observou-se que a corrente sanguínea era o local de isolamento mais frequente, e a maioria das cepas foram isoladas das Unidades de Terapia Intensiva. Portanto, esses dados demonstraram um potente efeito inibitório e bactericida do cinamaldeído contra espécimes nosocomiais de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos, sugerindo a prospecção deste composto para o desenvolvimento de uma nova substância antibacteriana, seja como medicamento ou em novos produtos destinados à desinfecção final de ambientes hospitalares.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*; Multidroga-resistente; Cinamaldeído; Infecção nosocomial; Hospital de ensino.

ABSTRACT

The emergence of *A. baumannii* multidrug-resistant (MDRAB) has become a worldwide critical clinical problem due to the limitation of therapeutic options for the treatment of MDRAB infections. The growing interest in new therapies based on natural products is the basic and primary source for the emergence of new antimicrobials. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of cinnamaldehyde against 47 nosocomial strains of *A. baumannii* resistant to carbapenems isolated from patients in four teaching hospitals in the State of Ceará, Brasil. Phenotypic identification and susceptibility to antimicrobials were determined by the VITEK®2, additionally polymerase chain reaction (PCR) to amplify the blaOXA-51 gene was performed on all presumptively identified as *A. baumannii* and the clinical characteristics were analyzed. The minimum inhibitory concentration (MIC) of cinnamaldehyde was determined by the broth microdilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute recommendations, and the minimum bactericidal concentration (MBC) was considered the lowest concentration of cinnamaldehyde which prevented growth and reduced the inoculum by in more than 99.9% within 24 h after incubation at 37°C. The results showed that the MIC of the cinnamaldehyde against 47 *A. baumannii* nosocomial isolates ranged from 125 to 500 µg/mL (Mean = 210.93 ± 58.55) and the MBC ranged from 250 to 1000 µg / mL (Mean = 510.41 ± 230.39). It was observed that bloodstream was the most frequent isolation site, and most of the strains were isolated from Intensive Care Units. Therefore, these data demonstrated a potent inhibitory and bactericidal effect of cinnamaldehyde against carbapenem-resistant *A.baumannii* nosocomial strains, suggesting the prospection of this compound for the development of a new antibacterial substance, either as a medicament or in new products destined to the final disinfection of hospital environments.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; Multidrug-resistance; Cinnamaldehyde; Nosocomial infection; Teaching hospital.

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 -	Primers para amplificação do gene <i>bla</i> _{OXA51}	28
Tabela 2 -	Distribuição dos isolados de <i>A.baumannii</i> resistentes aos carbapenêmicos da SCMS de acordo com amostra clinica e setor de internação.....	32
Tabela 3 -	Distribuição dos isolados de <i>A.baumannii</i> resistentes aos carbapenêmicos do HGF de acordo com amostra clinica e setor de internação.....	33
Tabela 4 -	Distribuição dos isolados de <i>A.baumannii</i> resistentes aos carbapenêmicos do HGCC de acordo com amostra clinica e setor de internação.....	33
Tabela 5 -	Distribuição dos isolados de <i>A.baumannii</i> resistentes aos carbapenêmicos do HUWC de acordo com amostra clinica e setor de internação.....	34
Tabela 6 -	Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de <i>A.baumannii</i> nosocomiais resistentes aos carbapenêmicos da SCMS.....	37
Tabela 7 -	Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de <i>A.baumannii</i> nosocomiais resistentes aos carbapenêmicos do HGF.....	38
Tabela 8 -	Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de <i>A.baumannii</i> nosocomiais resistentes aos carbapenêmicos do HGCC.....	39
Tabela 9 -	Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de <i>A.baumannii</i> nosocomiais resistentes aos carbapenêmicos do HUWC	40
Tabela 10-	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do cinamaldeído frente isolados clínicos analisados da SCMS	50
Tabela 11-	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do cinamaldeído frente isolados clínicos analisados do HGF.....	50
Tabela 12-	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do cinamaldeído frente isolados clínicos analisados do HGCC.....	51
Tabela 13-	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do cinamaldeído frente isolados clínicos analisados do HUWC.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mecanismos de resistência de <i>Acinetobacter baumannii</i>	18
Figure 2 -	Estrutura química dos antibióticos β -lactâmicos	19
Figura 3 -	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (tipo A) e <i>Cinnamomum cassia</i> (tipo B).....	24
Figura 4 -	Estrutura química do cinamaldeído.....	24
Figura 5 -	Ensaio da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	30
Figura 6 -	Gel de agarose contendo fragmentos do gene <i>bla</i> _{OXA-51} de espécimes nosocomiais de <i>A.baumannii</i> isolados da SCMS e HGF amplificados por PCR - PM 100 pb (Invitrogen, EUA).....	35
Figura 7 -	Gel de agarose contendo fragmentos do gene <i>bla</i> _{OXA-51} de espécimes nosocomiais de <i>A.baumannii</i> isolados do HGCC e HUWC amplificados por PCR - PM 100 pb (Invitrogen, EUA).....	36
Figura 8 -	CIM do cinamaldeído frente a isolados nosocomiais de <i>A.baumannii</i> resistentes aos carbapenêmicos da SCMS: (AB1LAMPR), (AB2LAMPR), (AB5LAMPR), (AB10LAMPR), (AB12LAMPR) e (AB16LAMPR). * significativo $P < 0,01$	42
Figura 9 -	CIM do cinamaldeído frente a isolados nosocomiais de <i>A.baumannii</i> resistentes aos carbapenêmicos da SCMS: (AB18.1LAMPR), (AB18.2LAMPR),(AB20LAMPR), (AB23LAMPR), (AB25LAMPR) e (AB35LAMPR). * significativo $P < 0,01$	43
Figura 10 -	CIM do cinamaldeído frente a isolados nosocomiais de <i>A.baumannii</i> resistentes aos carbapenêmicos do HGF: (AB52LAMPR), (AB57LAMPR), (AB60LAMPR), (AB62LAMPR), (AB66LAMPR) e (AB68LAMPR). * significativo $P < 0,01$	44
Figura 11-	CIM do cinamaldeído frente a isolados nosocomiais de <i>A.baumannii</i> resistentes aos carbapenêmicos do HGF: (AB75LAMPR), (AB78LAMPR), (AB79LAMPR), (AB80LAMPR), (AB81LAMPR) e (AB125LAMPR). * significativo $P < 0,01$	45

Figura 12 - CIM do cinamaldeído contra isolados nosocomiais de <i>A.baumannii</i> resistentes aos carbapenêmicos do HGCC: (AB48LAMPR), (AB83LAMPR), (AB84LAMPR), (AB87LAMPR), (AB88LAMPR) e (AB90LAMPR). * significante $P < 0,01$	46
Figura 13 - CIM do cinamaldeído frente a isolados nosocomiais de <i>A.baumannii</i> resistentes aos carbapenêmicos do HGCC: (AB93LAMPR), (AB100LAMPR), (AB102LAMPR), (AB105LAMPR), (AB108LAMPR) e (AB110LAMPR). * significante $P < 0,01$	47
Figura 14 - CIM do cinamaldeído frente a isolados nosocomiais de <i>A.baumannii</i> resistentes aos carbapenêmicos do HUWC: (AB140LAMPR), (AB141LAMPR), (AB142LAMPR), (AB143LAMPR), (AB145LAMPR) e (AB146LAMPR). * significante $P < 0,01$	48
Figura 15 - CIM do cinamaldeído frente a isolados nosocomiais de <i>A.baumannii</i> resistentes aos carbapenêmicos do HUWC: (AB147LAMPR), (AB148LAMPR), (AB149LAMPR), (AB150LAMPR), (AB151LAMPR) e (AB216CEPADEREFERÊNCIA) * significante $P < 0,01$	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Frequência da distribuição por amostra clínica de espécimes de <i>A.baumannii</i> isolados entre novembro de 2016 e abril de 2017 de pacientes com infecção nosocomial nos hospitais de ensino analisados.....	34
Gráfico 2 -	Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de isolados nosocomiais de <i>A. baumannii</i> dos diferentes hospitais de ensino analisados.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Ampicilina
AMP/SUB	Ampicilina Sulbactam
ANOVA	Análise de Variância
Abs	Absorbância
BHI	Brain Heart Infusion
CAZ	Ceftazidima
CFO	Cefoxitina
CLSI	Clinical Laboratory Standards Intitute
COL	Colistina
CRO	Ceftriaxona
CRX	Cefuroxima
CRX/AXETIL	Cefuroxima/Axetil
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPM	Cefepima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacino
CBM	Concentração Bactericida Mínima
dATP	desoxiAdenosina Trifosfatada
dCTP	desoxiCitidina Trifosfatada
dGTP	desoxiGuanosina Trifosfatada
dTTP	desoxiTimidina Trifosfatada
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESBL	Beta-lactamases de Espectro Ampliado
GEN	Gentamicina
HGCC	Hospital Geral César Cals
HGF	Hospital Geral de Fortaleza
HRN	Hospital Regional Norte
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio
I	Intermediário
IH	Infecção Hospitalar

IMP	Imipenem
LAMP	Laboratório de Microbiologia e Parasitologia
MDR	Multidroga resistentes
OXA	Oxacilinase
OEs	Óleos essenciais
PBP	Proteínas de ligação a penicilina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
SCMS	Santa Casa de Misericórdia de Sobral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	17
2.2 Antibióticos β -lactâmicos.....	18
2.3 Resistência bacteriana aos carbapenêmicos.....	19
2.4 β -lactamases/ carbapenemases.....	20
2.5 Fitoterápicos como alternativa para tratamento das infecções bacterianas.....	21
2.6 Óleos essenciais e substâncias isoladas com atividade antimicrobiana.....	22
2.7 Cinamaldeído.....	23
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Espécimes do estudo.....	27
4.2 Detecção e identificação dos genes <i>bla_{OXA}</i> por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)...	27
4.3 Preparo da solução de Cinamaldeído.....	28
4.4 Preparo da suspensão bacteriana.....	29
4.5 Ensaio da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	29
4.6 Ensaio da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	31
4.7 Análise Estatística.....	31
5 RESULTADOS.....	32
6 ARTIGO.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXO I.....	77
ANEXO II.....	78

1. INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii é um coco bacilo gram-negativo, aeróbio, imóvel, catalase positivo, oxidase negativo e não fermentador que está frequentemente associado a infecções nosocomiais, uma vez que possui vasta capacidade de sobrevivência por longos períodos em hospitais. Anteriormente, *A. baumannii* era conhecida como uma bactéria que possuía baixa virulência, porém com o passar dos anos veio adquirindo resistência aos antibióticos, tornando-se um patógeno bem sucedido (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; VIEIRA; PICOLI, 2015).

Estes microrganismos são conhecidos como patógenos oportunistas, pois são isolados de pacientes imunossuprimidos que foram submetidos a procedimentos cirúrgicos, terapias com antibióticos, que sofreram queimaduras, ou que estão fazendo uso de dispositivos médicos, principalmente ventilação mecânica. Assim, pode haver uma supercolonização desta bactéria resultando em infecções gravíssimas (COELHO *et al.*, 2004; PRAGASAM *et al.*, 2016).

Nos últimos anos os isolados de *Acinetobacter* sp. passaram a ser associados a severas infecções hospitalares (SIENIAWSKI *et al.*, 2013). Esses microrganismos são os principais responsáveis por causar surtos de infecções no trato urinário, em feridas cirúrgicas, pneumonia e meningite. A velocidade com que *A. baumannii* tem adquirido resistência às várias classes de antibióticos é preocupante, pois à medida que esse se torna resistente, as opções de tratamento com antibióticos encontram-se cada vez mais limitadas (MARAGAKIS; PERL, 2008).

As taxas de infecção hospitalar em hospitais de ensino frequentemente são maiores do que em outros equipamentos de saúde, ressalta-se ainda que infecções hospitalares causadas por bactérias multirresistentes estão associadas com aumento dos custos de internação, hospitalização prolongada e, principalmente, aumento das taxas de morbidade e mortalidade (EVANS *et al.*, 2007; PRAGASAM *et al.*, 2016).

Segundo Tartari *et al.* (2016) nos últimos 30 anos, isolados de *Acinetobacter* sp., têm progressivamente acumulado resistência às penicilinas, cefalosporinas de segunda geração e terceira geração, quinolonas e aminoglicosídeos. A resistência ocorre através da presença de enzimas chamadas oxacilinasas, que são β -lactamases, capazes de hidrolisar os carbapenêmicos, imipenem e meropenem, que são antibióticos comumente utilizados para tratar infecções por microrganismos produtores de β -lactamases (NORDMANN; POIREL, 2002).

Tendo em vista este contexto, faz-se necessária a busca de novas abordagens terapêuticas, dentre as quais está à prospecção de compostos que possuam atividade contra bactérias multirresistentes, como, por exemplo, compostos e moléculas isolados de plantas. O potencial terapêutico de plantas medicinais, a partir da utilização dos extratos ou dos óleos essenciais, tem crescido graças ao desenvolvimento de ensaios farmacológicos e aumento do interesse pela pesquisa de novos medicamentos com ação antimicrobiana (LEITE, 2009; PERRICONE *et al.*, 2015).

Os óleos essenciais (OEs) e seus metabólitos secundários, desde a Idade Média, são utilizados como bactericidas, inseticidas, antissépticos e fungicidas. Devido suas múltiplas propriedades, atualmente estes compostos são vastamente empregados na indústria farmacêutica e de alimentos, e em cosméticos, dentre outras (BAKKALI *et al.*, 2008; PERRICONE *et al.*, 2015).

Estudos revelaram que o cinamaldeído é o composto majoritário dentre os componentes do óleo de canela (*Cinnamomum* sp.), representando 83,6% (SHAN *et al.*, 2007). Na literatura, já existem relatos acerca da atividade antibacteriana do cinamaldeído contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (LÓPEZ *et al.*, 2007; PRABUSEENIVASAN *et al.*, 2006; UTCHARIYAKIAT *et al.*, 2016), entretanto, estudos da atividade desta substância contra microrganismos multidroga resistentes (MDR) são escassos. Dessa forma, é extremamente importante a verificação da atividade antimicrobiana deste composto frente ao *A. baumannii* MDR.

Recentemente, Kaskatepe *et al.* (2016) demonstraram que o óleo de canela tinha atividade antibacteriana contra *A. baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Entretanto, não verificaram a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e não avaliaram o composto majoritário de forma isolada. Ressaltando-se a importância da análise do potencial antimicrobiano do cinamaldeído.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do cinamaldeído frente a espécies de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos isolados de pacientes com diagnóstico de infecção hospitalar em diferentes hospitais no Estado do Ceará.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter sp. pode colonizar seres humanos fazendo parte da microbiota transitória, podendo ser encontrado na pele, mais precisamente nas regiões axilares e inguinais, e nas mãos de manipuladores de alimentos e profissionais de saúde. Esporadicamente, este microrganismo pode ser encontrado na cavidade bucal e no trato respiratório de adultos saudáveis, apresentando uma taxa de colonização insignificante (ABBOTT *et al.*, 2013; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

O interesse em realizar mais estudos sobre *A. baumannii* cresceu rapidamente ao longo das duas últimas décadas, principalmente como resultado do surgimento e surto de cepas MDR em ambiente hospitalar (PEREZ *et al.*, 2007). A resistência de *A. baumannii* aos carbapenêmicos foi relatada no início dos anos 1990, desde então, ocorreram diversos surtos de *A. baumannii* multirresistentes descritos na literatura (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; PEREZ *et al.*, 2007).

Acinetobacter sp. tem a capacidade de sobreviver em ambientes úmidos e secos e é comumente encontrado no ambiente hospitalar causando infecções geralmente em pacientes hospitalizados por um longo período de tempo com doenças graves, imunodeprimidos ou submetidos a procedimentos invasivos e tratados com antibióticos de amplo espectro (ABBOTT *et al.*, 2013; KEMPF; ROLAIN, 2012; PEREZ *et al.*, 2007; TUON *et al.*, 2015).

A. baumannii causa pneumonia, principalmente em pacientes que estão submetidos ao uso de ventilação mecânica. Colonizações bacterianas podem ocorrer nos cateteres urinários e dispositivos intravenosos inseridos no paciente, como também em locais que foram realizados cirurgias (EVEILLARD *et al.*, 2009). Além disso, esta bactéria tem a capacidade de crescer em diferentes pH e condições de temperatura e utiliza vários tipos de substratos para o seu crescimento (TIWARI; MOGANTY, 2014).

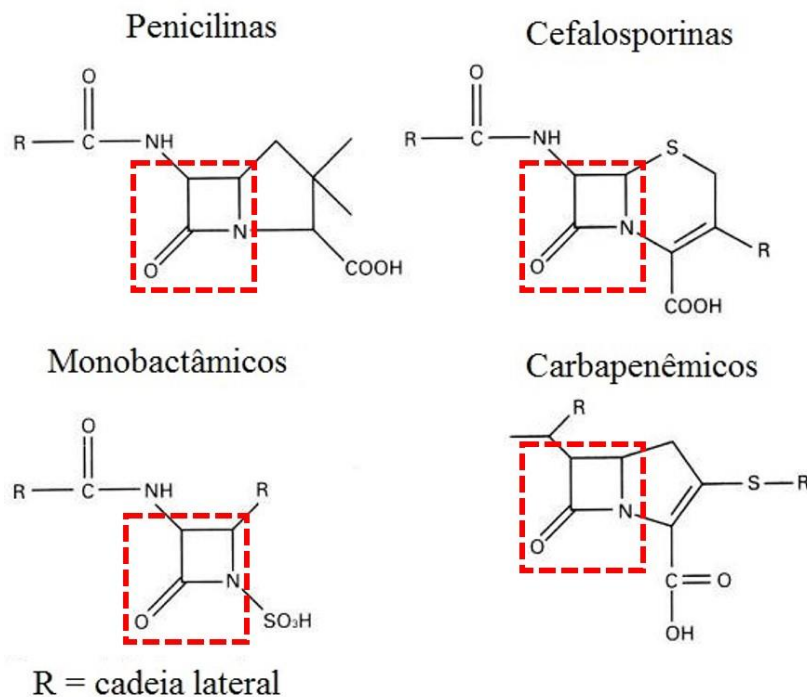
Diversos mecanismos de resistência são responsáveis por várias características, tais como a produção de β -lactamases, bombas de efluxo, alteração na permeabilidade da membrana, além de mutações nos alvos dos antibióticos e produção de enzimas que inativam aminoglicosídeos (KARAGEORGOPOULOS; FALAGAS, 2008). A resistência de *A. baumannii* a múltiplas drogas, pode ser adquirida através de modificações genéticas que ocorrem através de plasmídeos, transposons e inserção de sequências promotoras no gene, dificultando as opções terapêuticas no tratamento de infecções por esse microrganismo (BLAIR *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2015; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

2.2 Antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos classificados como β -lactâmicos são o grupo mais importante de fármacos com ação antimicrobiana, caracterizados assim devido ao seu amplo espectro de ação e baixa toxicidade, sendo comumente utilizados em casos de infecções comunitárias e hospitalares. Os antibióticos β -lactâmicos apresentam em sua estrutura molecular um anel β -lactâmico, cuja ação é efetiva quando se liga na célula bacteriana, interferindo na síntese da parede celular bacteriana (KONG; SCHNEPER; MATHEE, 2010).

Os β -lactâmicos incluem penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos que atuam inativando as transpeptidases, proteínas de ligação às penicilinas (PBP) que tem como função sintetizar o peptidoglicano, que é o principal componente estrutural da parede celular bacteriana, inibindo dessa forma a síntese da parede celular bacteriana (MARÍN; GUDIOL, 2003; BUSH; BRADFORD, 2016).

Os β -lactâmicos diferem entre si pela substituição de um radical na cadeia lateral do anel β -lactâmico (**Figura 1**), exceto os monobactâmicos que têm apenas um anel na sua estrutura. Todos os β -lactâmicos são bactericidas e agem interferindo na síntese do peptidoglicano, quando as bactérias estão em multiplicação (KONG; SCHNEPER; MATHEE, 2009; MARÍN; GUDIOL, 2003).



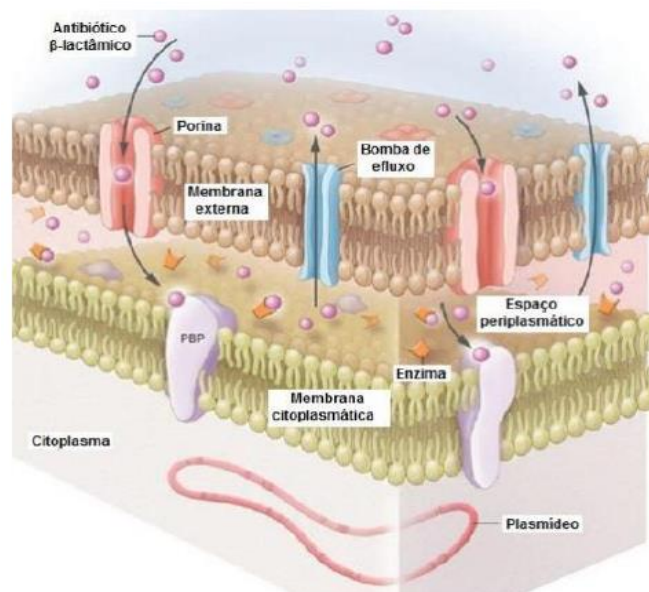
Fonte: Adaptado de Williams *et al.*, 1999

Figura 1: Estrutura química dos antibióticos β -lactâmicos

2.3 Resistência bacteriana aos carbapenêmicos

O surgimento de bactérias MDR tornou-se um grave problema de saúde pública, sendo atualmente o grande desafio a busca e o desenvolvimento de novas opções de tratamento contra estes patógenos (FERNÁNDEZ; BERT; NICOLAS-CHANOINE, 2016). As infecções bacterianas estão cada vez mais difíceis de serem tratadas, pois as espécies causadoras vêm adquirindo mecanismos comuns que conduzem à resistência aos antibióticos, que incluem a presença de enzimas inativadoras de drogas, modificação dos locais de ligação ao fármaco, mudanças nos mecanismos de influxo e efluxo e alterações nas vias enzimáticas (XIA; GAO; TANG, 2016).

Os mecanismos de resistência de *A. baumannii* podem ter origem intrínseca ou adquirida e são mediados por diversos fatores, como perda da permeabilidade da membrana e, mais expressivamente, produção de β -lactamases, enzimas que degradam antibióticos β -lactâmicos, sendo a principal causa de resistência bacteriana (**Figura 2**) (MEDEIROS; LINCOPAN, 2013).



Fonte: (MUNOZ-PRICE; WEINSTEIN, 2008).

Figura 2: Mecanismos de resistência de *Acinetobacter baumannii*

Deste modo, as cepas multirresistentes têm sido alvo de estudos frequente e a sua crescente disseminação tem sido observada como uma das questões mais alarmantes para o sistema de saúde global, resultando em altos níveis de morbidade e mortalidade (WILSON *et al.*, 2016).

A resistência bacteriana aos carbapenêmicos é frequentemente encontrada em microrganismos que causam infecções graves e é predominantemente causada pela presença de enzimas β -lactamases de espectro estendido (ESBL), o que permite a sua ampla disseminação mundial através da transmissão de genes plasmidiais (BRAUN *et al.*, 2014). Os carbapenêmicos fazem parte de uma classe de antibióticos de largo espectro, são β -lactâmicos que mostram efeito bactericida rápido, sendo largamente utilizados no tratamento de infecções causadas por bactérias patogênicas aeróbias e anaeróbias (SYDNOR; PERL, 2011).

O mecanismo mais comum destas bactérias adquirirem resistência a múltiplas drogas é a capacidade de hidrólise através das β -lactamases, incluindo metalo- β -lactamases de classe B e oxacilinases que são carbapenemases de classe D (SOARES *et al.*, 2012).

2.4 β -lactamases / carbapenemases

A inadequação, o uso abusivo de antibióticos e a falta de critérios na escolha do tratamento, são fatores determinantes para a seleção e surgimento de microrganismos resistentes principalmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (COUTO; PEDROSA; NOGUEIRA, 2003).

As β -lactamases são proteínas globulares que caracteristicamente possuem alfa hélices, folhas beta e compartilham estruturas semelhantes. As β -lactamases são categorizadas com base na semelhança na sequência de aminoácidos (classes Ambler A a D) ou no perfil do substrato e do inibidor (Grupos 1 a 4 de Bush-Jacoby-Medeiros) (AMBLER, 1980). As β -lactamases de espectro estendido (ESBL) são enzimas produzidas normalmente em microrganismos gram-negativos, da família *Enterobacteriaceae*, que atuam hidrolisando o anel β -lactâmico dos antibióticos (GISKE *et al.*, 2008).

A produção de carbapenemases, que são β -lactamases que podem inativar os carbapenêmicos e todos os outros antibióticos β -lactâmicos, tem sido constantemente detectada em patógenos gram-negativos (PATEL, BONOMO, 2011). Entre as carbapenemases adquiridas, enzimas do grupo OXA, que compõe a classe D e são denominadas de oxacilinases, são as mais comumente encontradas em todo o mundo e, apresentam mais de 400 variantes conhecidas (VIEHMAN *et al.*, 2015).

Pelo menos 121 variantes diferentes de classe D β -lactamases têm sido identificadas em nível de proteína e, 45 destas variantes hidrolizam carbapenêmicos. Atualmente, nove principais subgrupos de carbapenemases OXA foram identificados com base em homologias de aminoácidos. Quatro subgrupos de OXA com atividade de

carbapenemases, incluindo OXA-23, OXA-24, OXA-51 e OXA-58, são predominantes em *A. baumannii* (LIN; LAN, 2014). Desses, o grupo OXA-23 é amplamente disseminado e, é a causa mais frequente de resistência a carbapenêmicos clinicamente relevante em *A. baumannii* (DORTET *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2015).

2.5 Fitoterápicos como alternativa para tratamento das infecções

Os agentes fitoterapêuticos ou fitomedicantes são elaborados à base de plantas, que consistem em misturas complexas de uma ou mais plantas que são utilizadas na maioria dos países para o tratamento de várias doenças (CALIXTO, 2000).

As plantas medicinais são espécies vegetais que são constituídas por substâncias biologicamente ativas com propriedades terapêuticas, profiláticas ou paliativas (CARVALHO *et al.*, 2012). Devido às propriedades terapêuticas das plantas, há produção de medicamentos e avanços no tratamento de doenças em uma escala maior e mais eficiente. Notavelmente, 60% dos medicamentos antimicrobianos e antitumorais atualmente disponíveis são derivados de plantas (CALIXTO, 2000).

Deste modo, os fitoterápicos não possuem seus princípios ativos isolados. Porém, quando ocorre o isolamento da substância ativa, geralmente encontrada no óleo essencial ou em extratos das diversas partes vegetais, tem-se o desenvolvimento de um fitomedicamento ou fitofármaco (BRASIL, 2010). O mercado farmacêutico tradicional cresce, mundialmente, de 3% a 4% ao ano, enquanto o de fitoterápicos sobe de 6% a 7% (BOTSARIS, 2010).

A atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas tem sido comprovada em vários estudos realizados em países que possuem uma flora diversificada como o Brasil (CHEN-LUNG *et al.* 2012; MULYANINGSIH *et al.* 2011).

Segundo Michelin *et al.* (2005) os antibióticos à base de produtos naturais possuem uma estrutura química que difere da composição química dos antibióticos disponíveis, o que faz com que estas substâncias naturais atuem no metabolismo desses patógenos, ativando ou bloqueando reações e síntese enzimática, além disso podendo alterar a estrutura de membranas.

Rahmatullah *et al.* (2009) relatam que plantas medicinais podem ser usadas como alimentos funcionais, apontando que o consumo de algumas espécies de canela pode ter efeitos benéficos na prevenção e manejo de doenças cardiovasculares, hipertensão e diabetes devido às suas propriedades antioxidantes.

2.6 Óleos essenciais e suas substâncias isoladas com atividade antimicrobiana

Os óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de compostos voláteis produzidos por plantas aromáticas (SOUSA *et al.*, 2015). Deste modo, os OEs são produzidos como metabólitos secundários nas plantas com composição complexa, contendo 20 a 60 componentes em diferentes concentrações. Caracterizam-se por apresentarem 2 ou 3 componentes em altas concentrações (20 a 70%) que são denominados de compostos majoritários (BASSOLE; JULIANI, 2012; PERRICONE *et al.*, 2015). Alguns se apresentam altamente voláteis, capazes de gerar sabores e/ou aromas, constituídos de dezenas a centenas de diferentes tipos de moléculas, destacando os monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, ésteres, álcool, aldeídos, fenóis e hidrocarbonetos. Fisicamente, se apresentam no estado líquido a temperatura ambiente, com aspecto incolor ou claro, lipofílico, com densidade geralmente inferior a da água e podem ser extraídos por processos mecânicos, ou por hidrodestilação, destilação a vapor, ou com a utilização de solventes orgânicos ou gorduras (DHIFI *et al.*, 2016; MALUF, 2008; NAVARRETE *et al.*, 2011).

Substâncias isoladas de óleos essenciais apresentam uma forte atividade antibacteriana. Contudo, esta propriedade é dependente da dosagem a ser utilizada (KALEMBA; KUNICKA, 2003). Há um crescente interesse em estudar compostos isolados de extratos de plantas objetivando a identificação, isolamento e caracterização de novos produtos com atividade antimicrobiana (KASKATEPE, *et al.*, 2016).

Os óleos essenciais e seus compostos isolados são utilizados pela razão de apresentarem atividade antibacteriana, antifúngica, inseticida, antioxidante, dentre outras, sendo extremamente importante para as indústrias farmacêuticas, agrônômica, alimentos, sanitários, cosméticos e perfumes (BAKKALI *et al.*, 2008).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais nas células bacterianas diz respeito, principalmente, aos danos estruturais e funcionais à membrana citoplasmática (OKOH *et al.*, 2016; SIKKEMA *et al.*, 1994). Como são tipicamente lipofílicos, os óleos essenciais se acumulam na bicamada lipídica da membrana citoplasmática, conferindo característica de aumento da permeabilidade (SIKKEMA *et al.*, 1994; BAKKALI *et al.*, 2008).

A maioria dos OEs também exerce seu efeito antimicrobiano sobre a parede celular microbiana, o que leva à destruição dos microrganismos. Além disso, tem sido relatado que OEs inativam as bactérias sem desenvolverem resistência antimicrobiana (ALI *et al.*, 2005; OHNO *et al.*, 2003). Deste modo, a disponibilidade de muitos OEs, a baixa toxicidade e a degradação rápida no ambiente os tornam agentes antimicrobianos seguros (ISMAN, 2000).

Os óleos essenciais de espécies do gênero *Cinnamomum* popularmente conhecido como canela possuem como constituinte mais abundante o cinamaldeído, que em bactérias, atua permeabilizando as membranas, levando à saída de íons e, assim, ocasionando uma alteração no mecanismo da bomba de prótons (TURINA *et al.*, 2006).

A canela pertence à família *Lauraceae* e ao gênero *Cinnamomum*, que é composto por cerca de 250 espécies, sendo também amplamente utilizada na medicina herbal tradicional de países como a China, Índia e Austrália (JAYAPRAKASHA; RAO; SAKARIAH, 2003). Quase todas as partes da planta têm algum uso culinário ou medicinal. Todavia, a composição dos OEs varia consideravelmente em relação aos seus componentes químicos, do mesmo modo que, seus efeitos farmacológicos também vão variar de acordo com a parte da planta que é utilizada. Na raiz o principal constituinte é a cânfora, nas folhas, eugenol e na casca, cinamaldeído (RANASINGHE *et al.*, 2013). O óleo de canela é um OE popular amplamente utilizado na indústria de alimentos por causa de seu aroma especial (CHANG *et al.*, 2001; GRUENWALD; FREDER; RMBRUESTER, 2010).

Deste modo, a canela oferece uma variedade de diferentes óleos com características diversas, cada um dos quais determina o seu valor para as diferentes aplicações. Portanto, a raiz que tem cânfora como principal constituinte, tem valor comercial mínimo ao contrário da folha e da casca (PARANAGAMA *et al.*, 2010).

2.7 Cinamaldeído

O cinamaldeído é o composto majoritário encontrado no óleo de canela da casca do caule de *Cinnamomum cassia*. Segundo Attokaran (2011) o produto presente na natureza é o trans-cinamaldeído, que consiste em um aldeído insaturado com um grupo fenil. O *trans-cinamaldeído* é o componente majoritário do óleo essencial de *Cinnamomum cássia*, e da casca da canela é o *Cinnamomum zeylanicum* (**Figura 3**), apresentando concentrações de 81 e 62 mg/100mL, respectivamente (FRIEDMAN *et al.*, 2000).



Cinnamomum tipo A



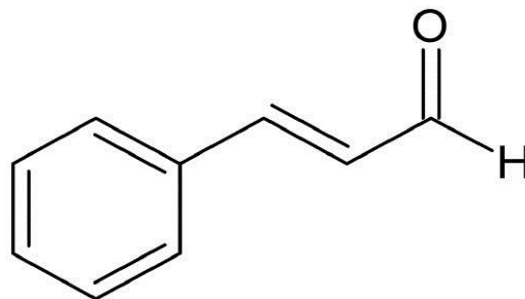
Cinnamomum tipo B

Fonte: Adaptado de Hamidpour *et al.*, 2015.

Figura 3: *Cinnamomum zeylanicum* (Tipo A) e *Cinnamomum cassia* (Tipo B). Pars Bioscience LLC, Leawood, KS, EUA).

O cinamaldeído é um líquido amarelo oleoso naturalmente encontrado no óleo essencial da casca da canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e de outras árvores/arbustos do gênero *Cinnamomum* (BURT, 2004).

Conforme Baratta *et al.* (1998) o cinamaldeído é o composto majoritário ativo encontrado no óleo de canela, sendo a atividade antibacteriana do óleo de canela provavelmente atribuída ao cinamaldeído. Além disso, o óleo de canela não é prejudicial quando consumido em produtos alimentares e inibiu o crescimento de leveduras e bactérias (MATAN *et al.*, 2006). O cinamaldeído tem uma ampla variedade de bioatividades como antimicrobiano e esta característica pode estar relacionada principalmente com seus grupos carboxila e aldeído (**Figura 4**) (VISVALINGAM *et al.*, 2013).



Fonte: Chan *et al.*, 2016

Figura 4: Estrutura química do cinamaldeído

As ações antimicrobianas do cinamaldeído estão relacionadas com a inibição da divisão celular através de FtsZ (proteína filamentar sensível à temperatura Z) (DOMADIA *et al.*, 2007), redução da geração de energia e captação ou gasto de glicose (GILL; HOLLEY, 2004), além de efeitos sobre a permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana (GILL; HOLLEY, 2004 ; SHEN *et al.*, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana do cinamaldeído frente a espécimes de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos isolados de pacientes com diagnóstico de infecção hospitalar em diferentes hospitais de ensino no Estado do Ceará.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as características clínicas e o perfil de resistência de espécimes nosocomias de *A. baumannii* isolados da SCMS, HGF, HGCC e HUWC;
- Confirmar a identidade fenotípica dos isolados nosocomiais de *A.baumannii* pela presença do gene *oxa-51*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) de cinamaldeído frente a espécimes nosocomias de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos isolados da SCMS, HGF, HGCC e HUWC.

4 METODOLOGIA

4.1 Espécimes do estudo

Os 47 espécimes de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos que foram analisados neste estudo fazem parte do banco biológico do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia da FAMED (UFC/Sobral) e foram coletados durante o período de Novembro de 2016 a Abril de 2017 de pacientes com diagnóstico de infecção hospitalar na Santa Casa de Misericórdia de Sobral (SCMS), no Hospital Geral de Fortaleza (HGF), no Hospital Geral Cesar Cals (HGCC) e no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC).

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 Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), que estabelece as normas e diretrizes de pesquisa em seres humanos. Foram obedecidos os princípios éticos do respeito pela pessoa (autonomia e proteção de grupos vulneráveis), beneficência, não maleficência e justiça. Informamos ainda, que a pesquisa obteve **Parecer Favorável** do Departamento de Ensino, Pesquisa e Extensão (DEPE) da Santa Casa de Misericórdia de Sobral (Anexo I) e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA - 1.843.504/2016 – Anexo II).

4.2 Confirmação fenotípica dos isolados pela detecção do gene *bla*_{OXA-51}

A. baumannii apresenta a ocorrência natural de genes carbapenemases intrínsecos como o gene *bla*_{OXA-51} (TURTON *et al.*, 2006). Portanto, as espécies nosocomiais de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos foram analisadas para a detecção do gene *bla*_{OXA-51} por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os primers e protocolos previamente descritos por MA *et al.* (2015) foram usados para amplificar o gene *bla*_{OXA-51}. A sequência dos fragmentos que foram amplificados e o tamanho dos amplicons estão descritos na tabela 1.

Tabela 1- Primers para amplificação do gene *bla*_{OXA51}

Primer	Sequencia (5'-3')	Amplicon (pb)
	Amplificação de <i>bla</i> _{OXA51}	353
<i>bla</i> _{OXA51} F	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG	
<i>bla</i> _{OXA51} R	TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	

Fonte: MA *et al.*, 2015.

As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25µL, contendo uma unidade formadora de colônia da espécie a ser identificada, 12,5µL de Taq Pol - Master Mix (2x) Green (Cellco Biotec, São Paulo, Brasil) que contém dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), KCL, MgCl₂, corante, tampão de carga para o gel e estabilizadores. Tendo sido acrescentado 8,5 µL de H₂O e 2,0 µL de cada primer e tampão de reação 1x (concentração final).

Os parâmetros de ciclagem para amplificar o fragmento correspondente a região codificadora do gene *bla*_{OXA} incluíram os seguintes passos: uma desnaturação inicial (95°C por 1 min); seguido por 30 ciclos de desnaturação (94°C por 30 segundos e 53°C por 30 segundos), anelamento (72 °C por 45 segundos) e uma extensão final a 72°C por 4 min.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE 0,5X. A eletroforese foi realizada a 120 volts, por 40 minutos. A aplicação no gel de agarose foi feita com 8µl da reação, adicionados de 2µl de solução de azul de bromofenol. O marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, EUA) foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos.

4.3 Preparação da solução de cinamaldeído

O composto foi cedido do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, *Campus* Fortaleza e foi avaliada sua atividade antimicrobiana *in vitro* frente a bactérias nosocomiais produtoras de ESBL.

O cinamaldeído foi solubilizado em DMSO a 5% e diluído no meio BHI (Infusão de cérebro e coração/ KASVI, Curitiba, Brasil) para obtenção de uma concentração de 2.000 µg/mL. Partindo desta concentração foi realizada a diluição seriada em placa de 96 poços com concentração inicial de trabalho de 1000 µg/mL.

4.4 Preparo da suspensão bacteriana

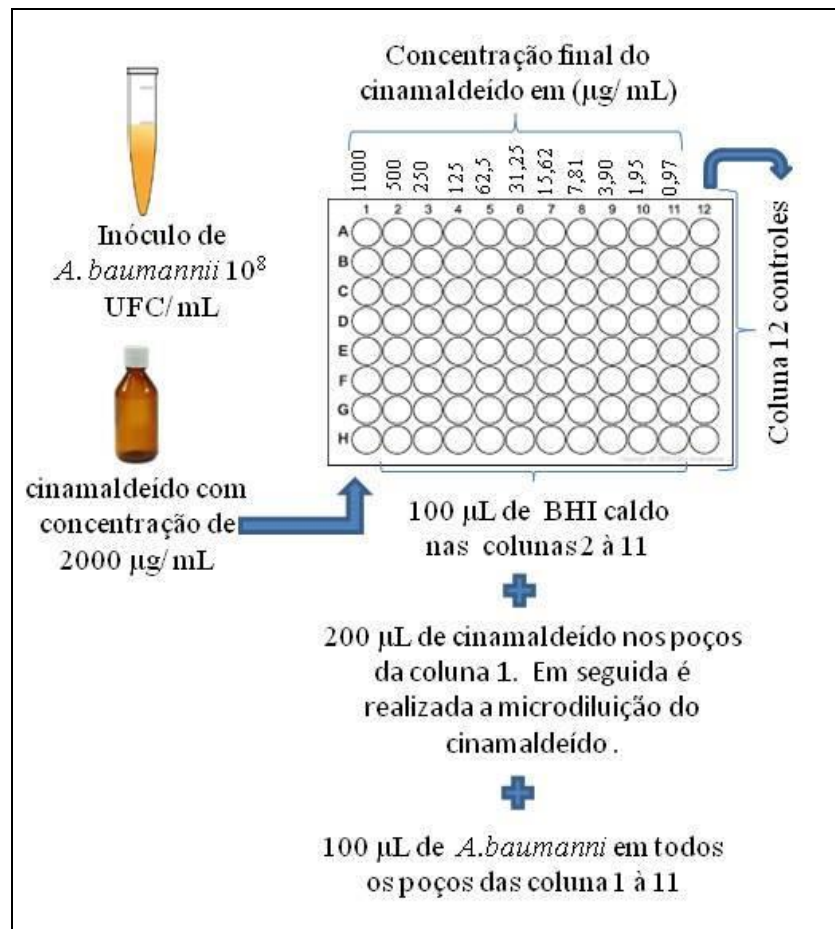
As bactérias foram reativadas a partir da inoculação de 50 µL de uma cultura estocada em um tubo de ensaio contendo 5mL de BHI caldo, posteriormente foram incubadas a 37°C por 18h em aerobiose. Após esse período, a cultura bacteriana foi transferida para quatro tubos eppendorfs, onde cada um recebeu 1 mL, em seguida os tubos foram centrifugados por 5min/5000rpm/4°C. Depois, o sobrenadante dos tubos foi descartado e o precipitado foi ressuspensão adicionando-se 1mL de BHI caldo somente no primeiro tubo e fazendo movimentos de “*up and down*” para homogeneizar, em seguida foi transferido todo o conteúdo do primeiro tubo para o seguinte e assim sucessivamente até unir todos os precipitados bacterianos em um único tubo. Em uma placa de 96 poços foi inserido em um único poço 200 µL do concentrado bacteriano e foi realizada a leitura da absorbância, onde a concentração foi ajustada com o auxílio de um espectrofotômetro (Abs = 620 nm) para 2×10^8 UFC/mL. Essas suspensões bacterianas foram utilizadas para as determinações de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).

4.5 Ensaio da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do cinamaldeído foi realizada segundo metodologia da 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*), (CLSI, 2018). Posteriormente, as placas foram analisadas pelo leitor de Elisa (BIO Trak II – Plate Reader®).

O teste foi realizado com 8 repetições para cada microrganismo, da seguinte forma, foi adicionado 100µL de BHI caldo nos poços das colunas 2 a 11, em seguida os poços da coluna 1 receberam 200 µL da solução de cinamaldeído na concentração de 2.000µg/ml, posteriormente foi realizada a diluição seriada, ou seja, foram retirados 100 µL dos poços da coluna 1 passando para os poços das colunas subsequentes fazendo movimento de “*up and down*” para obtenção das seguintes concentrações: 1.000µg/mL; 500 µg/mL; 250

$\mu\text{g/mL}$; 125 $\mu\text{g/mL}$; 62,5 $\mu\text{g/mL}$; 31,25 $\mu\text{g/mL}$; 15,62 $\mu\text{g/mL}$; 7,81 $\mu\text{g/mL}$; 3,90 $\mu\text{g/mL}$ e 1,95 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 5**). Ao finalizar esta etapa de diluição cada poço recebeu 100 μL da suspensão bacteriana já ajustada no caldo BHI (10^8 UFC/mL), o volume final em cada poço da placa foi de 200 μL . Na ultima coluna da placa de 96 poços ficaram os controles: negativo (suspensão bacteriana + meio), turbidez (meio+ substancia teste) e o controle de contaminação do meio.



Fonte: O autor, 2018

Figura 5: Ensaio da Microdiluição em caldo.

Após finalizar a montagem da placa foi realizada uma leitura inicial (tempo zero) através de um leitor de ELISA (BIO Trak II – Plate Reader[®]) com um comprimento de onda de 620 nm. Em seguida a microplaca foi incubada a 37°C por 24 horas e após esse período foi realizada uma nova leitura para avaliar o crescimento bacteriano através da turbidez com auxílio do ELISA.

4.6 Ensaio da concentração bactericida mínima (CMB)

A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada utilizando-se o método proposto por Courvalin *et al.* (1985). Após a determinação da CIM, foi transferido 10 µL dos poços onde não houve crescimento microbiano visível para placas de Petri contendo meio Ágar Muller Hinton, que em seguida foram incubadas a 37°C por 24 horas na estufa de crescimento em aerobiose. A CBM foi considerada a menor concentração do cinamaldeído onde não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado (99,9% de morte microbiana).

4.7 Análise Estatística

Todos os ensaios de atividade antimicrobiana do cinamaldeído foram realizados em oito repetições e os resultados foram demonstrados através de apresentação de gráficos. Os dados das medidas de absorvância foram expressos através de seu valor médio \pm desvio padrão. A diferença entre as médias das replicatas foram verificados através do teste One-way ANOVA com Bonferroni post-test, que foi executado também com o auxílio do programa GraphPad® Prism versão 5.04 para Windows (Software GraphPad, San Diego California USA). O nível de significância utilizado foi de 0,01 ($P \leq 0,01$).

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização clínica e perfil de sensibilidade dos isolados

As Tabelas 2, 3, 4 e 5 e o Gráfico 1 mostram a caracterização clínica de espécimes de *A. baumannii* isolados de pacientes com diagnóstico de infecção nosocomial da Santa Casa de Misericórdia de Sobral (SCMS), Hospital Geral de Fortaleza (HGF), Hospital Geral Cesar Cals (HGCC) e o Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), respectivamente. Todos os isolados foram previamente identificados e o perfil de sensibilidade antimicrobiano relatado pelo laboratório de microbiologia dos referidos hospitais através do sistema automatizado VITEK®2 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). As cepas foram categorizadas conforme amostra clínica e setor de internação de cada hospital.

Tabela 2 - Distribuição dos isolados de *A.baumannii* resistentes aos carbapenêmicos da SCMS de acordo com amostra clinica e setor de internação*

Cepas	Amostra clínica	Setor de internação
AB1LAMPR	Sangue	UTI adulta
AB2LAMPR	Secreção	São Joaquim
AB5LAMPR	Secreção	Traumato ortopedia
AB10LAMPR	Swab nasal	UTI neonatologia
AB12LAMPR	Sangue	Neurologia
AB16LAMPR	Sangue	UTI adulta
AB18.1LAMPR	Sangue	UTI adulta
AB18.2LAMPR	Sangue	UTI adulta
AB20LAMPR	Sangue	UTI adulta
AB23LAMPR	Fragmento de tecido	UTI adulta
AB25LAMPR	Secreção	Traumato ortopedia
AB35LAMPR	Secreção	UTI adulta

* Relatórios gerados pelo sistema de identificação automatizado bacilos Gram negativos GN, VITEK® 2 (*BioMérieux*, França). Fonte: o autor (2018).

Tabela 3 - Distribuição dos isolados de *A.baumannii* resistentes aos carbapenêmicos do HGF de acordo com amostra clínica e setor de internação*

Cepas	Amostra clínica	Setor de internação
AB52LAMPR	Aspirado traqueal	UTI adulta
AB57LAMPR	Aspirado traqueal	UTI adulta
AB60LAMPR	Aspirado traqueal	UTI adulta
AB62LAMPR	Urina	UTI adulta
AB66LAMPR	Sangue	UTI adulta
AB68LAMPR	Fragmento de tecido	Enfermaria cirúrgica
AB75LAMPR	Sangue	Enfermaria clínica
AB78LAMPR	Aspirado traqueal	UTI adulta
AB79LAMPR	Aspirado traqueal	UTI adulta
AB80LAMPR	Lavado bronco alveolar	UTI adulta
AB81LAMPR	Urina	Enfermária cirúrgica
AB125LAMPR	Aspirado traqueal	Enfermária Clínica

* Relatórios gerados pelo sistema de identificação automatizado bacilos Gram negativos GN, VITEK® 2 (*BioMérieux*, França). Fonte: o autor (2018).

Tabela 4 - Distribuição dos isolados de *A.baumannii* resistentes aos carbapenêmicos do HGCC de acordo com amostra clínica e setor de internação*

Cepas	Amostra clínica	Setor de internação
AB48LAMPR	Tecido de úlcera	-
AB83LAMPR	Sangue	UTI adulta
AB84LAMPR	Aspirado traqueal	UTI adulta
AB87LAMPR	Lavado bronco alveolar	Enfermária Clínica
AB88LAMPR	Aspirado traqueal	Enfermária Clínica
AB90LAMPR	Ponta de cateter	Enfermária
AB93LAMPR	Aspirado traqueal	Enfermária Cirúrgica
AB100LAMPR	Sangue	UTI adulta
AB102LAMPR	Sangue	UTI adulta
AB105LAMPR	Aspirado traqueal	UTI adulta
AB108LAMPR	Urina	Enfermária cirúrgica
AB110LAMPR	Aspirado traqueal	UTI adulta

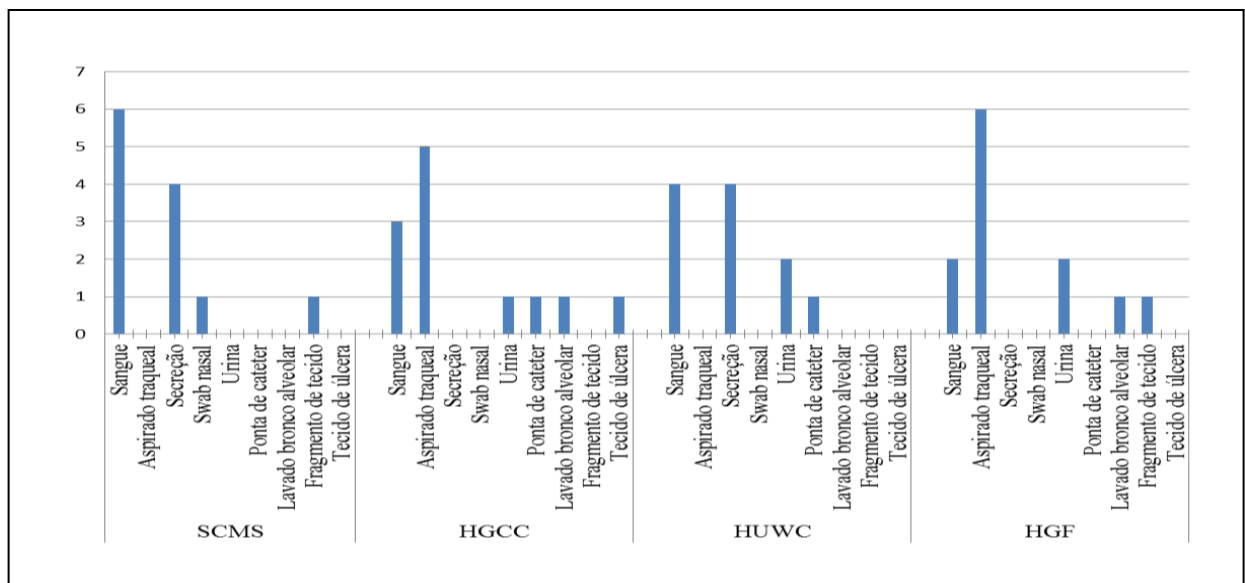
* Relatórios gerados pelo sistema de identificação automatizado bacilos Gram negativos GN, VITEK® 2 (*BioMérieux*, França). Fonte: o autor (2018).

Tabela 5 - Distribuição dos isolados de *A.baumannii* resistentes aos carbapenêmicos do HUWC de acordo com amostra clínica e setor de internação*

Cepas	Amostra clínica	Setor de internação
AB140LAMPR	Sangue	UTI adulta
AB141LAMPR	Urina	Enfermária clínica
AB142LAMPR	Sangue	UTI adulta
AB143LAMPR	Sangue	UTI adulta
AB145LAMPR	Sangue	UTI adulta
AB146LAMPR	Secreção	UTI adulta
AB147LAMPR	Secreção	UTI adulta
AB148LAMPR	Secreção	Enfermária clínica
AB149LAMPR	Secreção	UTI adulta
AB150LAMPR	Ponta de cateter	UTI adulta
AB151LAMPR	Urina	Neurologia

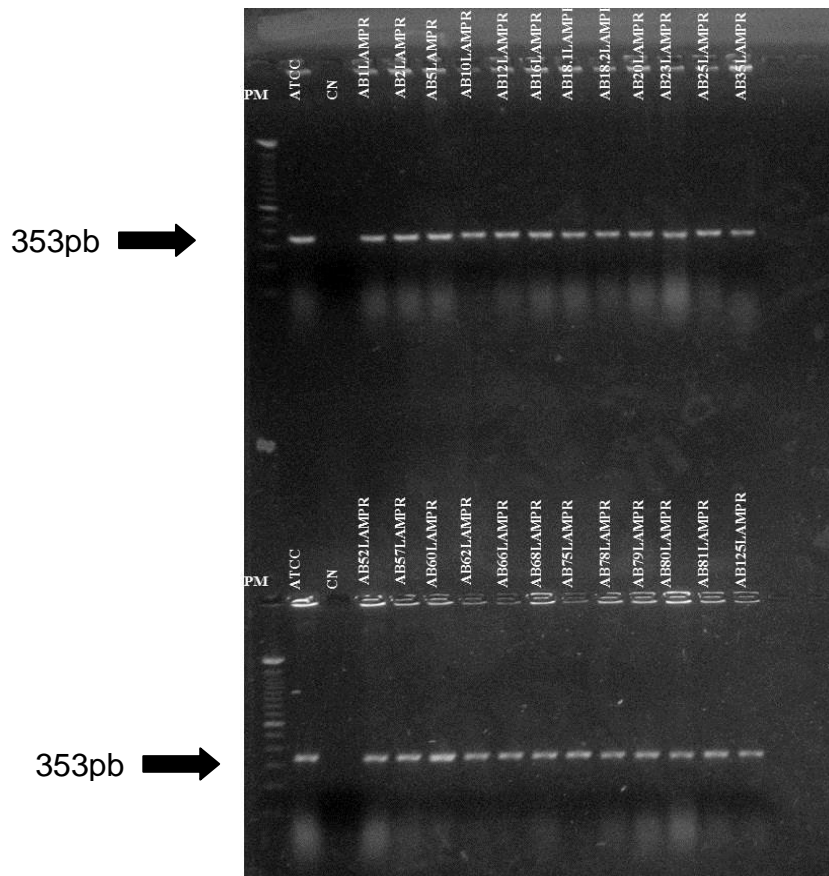
* Relatórios gerados pelo sistema de identificação automatizado bacilos Gram negativos GN, VITEK® 2 (BioMérieux, França). Fonte: o autor (2018).

Gráfico 1: Frequência da distribuição por amostra clínica de espécimes de *A.baumannii* isolados entre novembro de 2016 e abril de 2017 de pacientes com infecção nosocomial nos hospitais de ensino analisados*



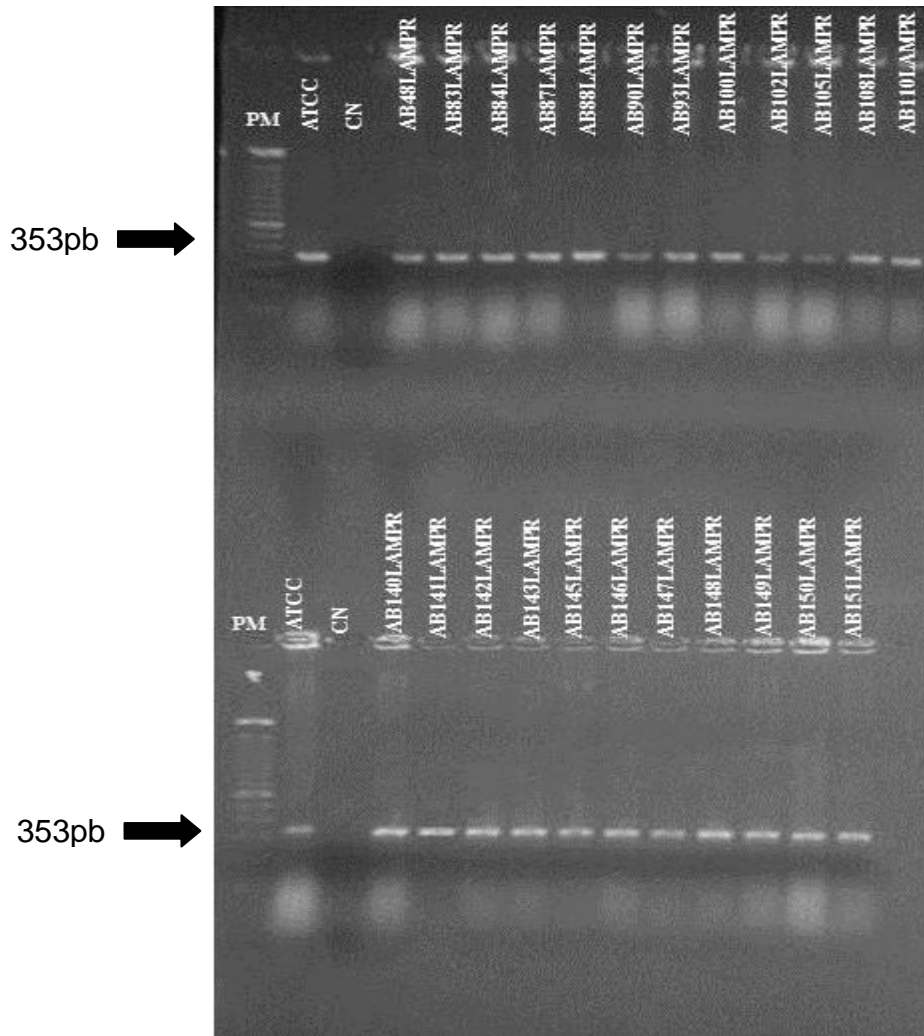
* Relatórios gerados pelo sistema de identificação automatizado bacilos Gram negativos GN, VITEK® 2 (BioMérieux, França). Fonte: o autor (2018).

Adicionalmente, a identidade dos isolados foi confirmada pela detecção do gene *bla*_{OXA-51}, que é intrínseco às espécies de *A. baumannii* (Figura 6 e 7).



A seta indica um fragmento de 353 pb, correspondente à região de codificação do gene *bla*_{OXA-51}. Fonte: O autor, 2018).

Figura 6: Gel de agarose contendo fragmentos do gene *bla*_{OXA-51} de espécimes nosocomiais de *A.baumannii* isolados da SCMS e HGF amplificados por PCR - PM 100 pb (Invitrogen, EUA).



A seta indica um fragmento de 353 pb, correspondente à região de codificação do gene *bla*_{OXA-51}.

Figura 7: Gel de agarose contendo fragmentos do gene *bla*_{OXA-51} de espécimes nosocomiais de *A.baumannii* isolados da HGCC e HUWC amplificados por PCR - PM 100 pb (Invitrogen, EUA).

As Tabelas 6, 7, 8 e 9 mostram os resultados do perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* dos espécimes nosocomiais de *A. baumannii* isolados dos diferentes hospitais de ensino frente aos dezesseis antimicrobianos analisados, incluindo β -lactâmicos, gliciliclinas, quinolonas, aminoglicosídeos e polimixinas. Todos os microrganismos apresentaram resistência aos carbapenêmicos, à cefuroxima, à cefuroxima axetil e piperacilina/tazobactam, mas foram sensíveis à colistina. Contudo, diferentes perfis de sensibilidade foram observados para os demais antibióticos testados (**Gráfico 2**).

Tabela 6 - Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados nosocomiais de *A.baumannii* resistentes aos carbapenêmicos da SCMS*

Pacient	AMI	AMP	AMP/SUB	CPM	CFO	CAZ	CRO	CRX	CRX/AXETIL	CIP	COL	GEN	IMP	MPN	PIP/TAZ	TIG
AB1LAMPR	R	R	I	R	R	R	I	R	R	S	S	R	R	R	R	S
AB2LAMPR	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S
AB5LAMPR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S
AB10LAMPR	I	R	R	I	R	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R	S
AB12LAMPR	R	R	S	R	R	R	I	R	R	S	S	R	R	R	R	S
AB16LAMPR	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S
AB18.1LAMPR	R	R	I	I	R	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R	S
AB18.2LAMPR	R	R	I	I	I	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
AB20LAMPR	R	R	I	I	I	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
AB23LAMPR	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S
AB25LAMPR	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
AB35LAMPR	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S

Fonte: o autor (2018)

R: Resistente; S: Sensível; I: Intermediário

* Relatórios gerados pelo sistema de identificação automatizado bacilos Gram negativos GN, VITEK® 2 (BioMérieux, França).

**Não testado.

AMI (Amicacina), AMP (Ampicilina), AMP/SUB (ampicilina/ sulbactam), CPM (Cefepima), CFO (Cefoxitin), CAZ (Ceftazidima), CRO (Ceftriaxona), CRX (Cefuroxima), CRX/AXETIL (Cefuroxima/axetil), CIP (Ciprofloxacino), COL (Colistina), GEN (Gentamicina), IMP (Imipenem), MPN (Meropenem), PIP/TAZ (Piperacilina Tazobactam), TIG (Tigeciclina).

Tabela 7 - Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados nosocomiais de *A.baumannii* resistentes aos carbapenêmicos do HGF *

Pacient	AMI	AMP	AMP/SUB	CPM	CFO	CAZ	CRO	CRX	CRX/AXETIL	CIP	COL	GEN	IMP	MPN	PIP/TAZ	TIG
AB52LAMPR	**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S
AB57LAMPR	**	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
AB60LAMPR	**	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R	S
AB62LAMPR	**	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
AB66LAMPR	**	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R	S
AB68LAMPR	**	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S
AB75LAMPR	**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S
AB78LAMPR	**	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S
AB79LAMPR	**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
AB80LAMPR	**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S
AB81LAMPR	**	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R	S
AB125LAMPR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S

Fonte: o autor (2018)

R: Resistente; S: Sensível; I: Intermediário

* Relatórios gerados pelo sistema de identificação automatizado bacilos Gram negativos GN, VITEK® 2(BioMérieux, França).

**Não testado

AMI (Amicacina), AMP (Ampicilina), AMP/SUB (ampicilina/ sulbactam), CPM (Cefepima), CFO (Cefoxitin), CAZ (Ceftazidima), CRO (Ceftriaxona), CRX (Cefuroxima), CRX/AXETIL (Cefuroxima/axetil), CIP (Ciprofloxacino), COL (Colistina), GEN (Gentamicina), IMP (Imipenem), MPN (Meropenem), PIP/TAZ (Piperacilina Tazobactam), TIG (Tigeciclina).

Tabela 8 - Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados nosocomiais de *A.baumannii* resistentes aos carbapenêmicos do HGCC*

Pacient	AMI	AMP	AMP/SUB	CPM	CFO	CAZ	CRO	CRX	CRX/AXETIL	CIP	COL	GEN	IMP	MPN	PIP/TAZ	TIG
AB48LAMPR	S	R	**	R	**	**	R	R	R	R	**	R	R	R	R	**
AB83LAMPR	R	R	I	R	R	I	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S
AB84LAMPR	S	R	I	S	R	R	I	R	R	S	S	S	R	R	R	S
AB87LAMPR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
AB88LAMPR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
AB90LAMPR	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
AB93LAMPR	R	R	R	R	S	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R	S
AB100LAMPR	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R	S
AB102LAMPR	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S
AB105LAMPR	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
AB108LAMPR	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
AB110LAMPR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	I

Fonte: o autor (2018)

R: Resistente; S: Sensível; I: Intermediário

* Relatórios gerados pelo sistema de identificação automatizado bacilos Gram negativos GN, VITEK® 2 (BioMérieux, França).

**Não testado.

AMI (Amicacina), AMP (Ampicilina), AMP/SUB (ampicilina/ sulbactam), CPM (Cefepima), CFO (Cefoxitin), CAZ (Ceftazidima), CRO (Ceftriaxona), CRX (Cefuroxima), CRX/AXETIL (Cefuroxima/axetil), CIP (Ciprofloxacino), COL (Colistina), GEN (Gentamicina), IMP (Imipenem), MPN (Meropenem), PIP/TAZ (Piperacilina Tazobactam), TIG (Tigeciclina).

Tabela 9 - Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados nosocomiais de *A.baumannii* resistentes aos carbapenêmicos do HUWC*

Pacient	AMI	AMP	AMP/SUB	COM	CFO	CAZ	CRO	CRX	CRX/AXETIL	CIP	COL	GEN	IMP	MPN	PIP/TAZ	TIG
AB140LAMPR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	I
AB141LAMPR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S
AB142LAMPR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
AB143LAMPR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
AB145LAMPR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R
AB146LAMPR	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
AB147LAMPR	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
AB148LAMPR	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
AB149LAMPR	I	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
AB150LAMPR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R	S
AB151LAMPR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	I

Fonte: o autor (2018)

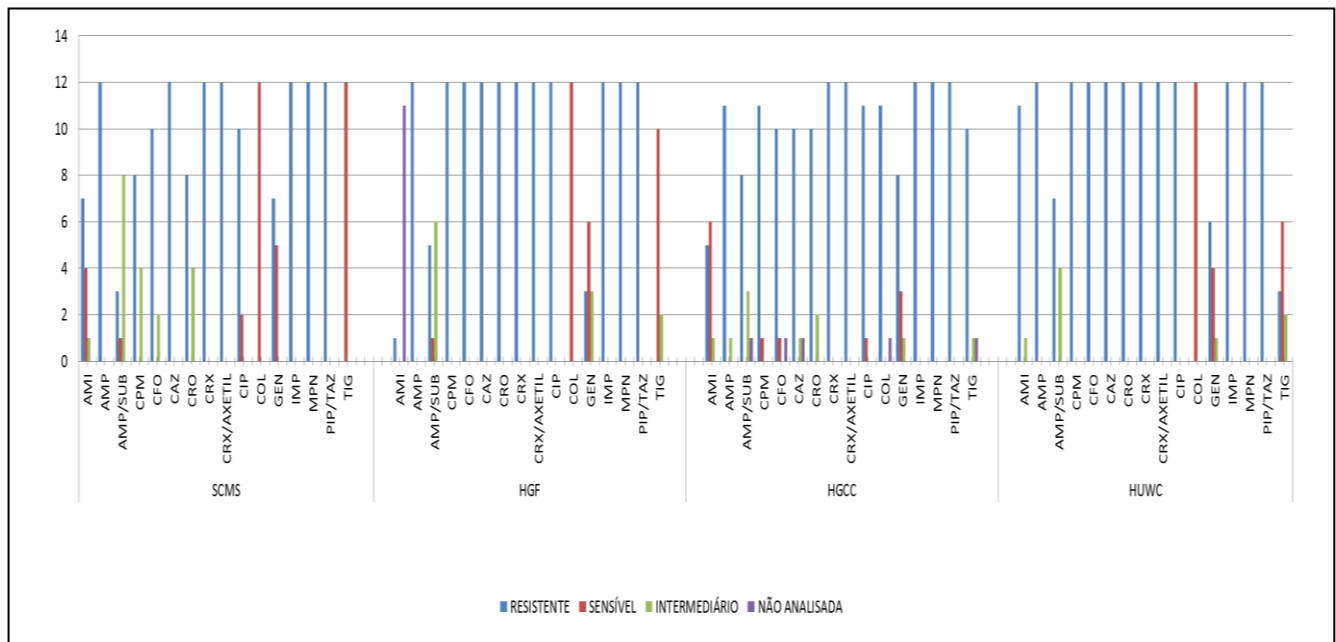
R: Resistente; S: Sensível; I: Intermediário

* Relatórios gerados pelo sistema de identificação automatizado bacilos Gram negativos GN, VITEK® 2 (BioMérieux, França).

**Não testado.

AMI (Amicacina), AMP (Ampicilina), AMP/SUB (ampicilina/ sulbactam), CPM (Cefepima), CFO (Cefoxitin), CAZ (Ceftazidima), CRO (Ceftriaxona), CRX (Cefuroxima), CRX/AXETIL (Cefuroxima/axetil), CIP (Ciprofloxacino), COL (Colistina), GEN (Gentamicina), IMP (Imipenem), MPN (Meropenem), PIP/TAZ (Piperacilina Tazobactam), TIG (Tigeciclina)

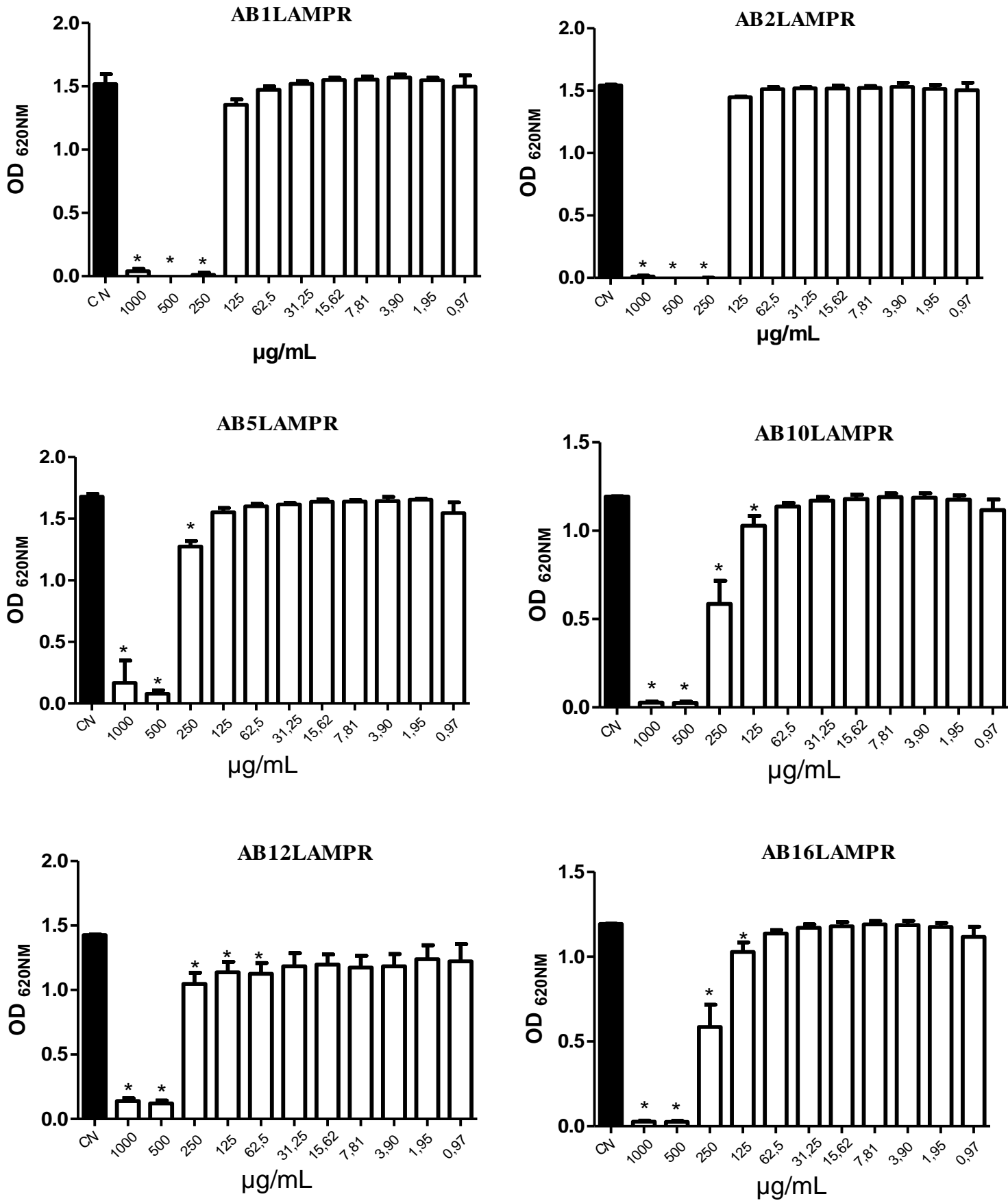
Gráfico 2: Perfil de sensibilidade antimicrobiana de isolados nosocomiais de *A. baumannii* dos diferentes hospitais analisados*



*Relatórios gerados pelo sistema de identificação automatizado bacilos Gram negativos GN, VITEK® 2 (BioMérieux, França). Fonte: o autor (2018).

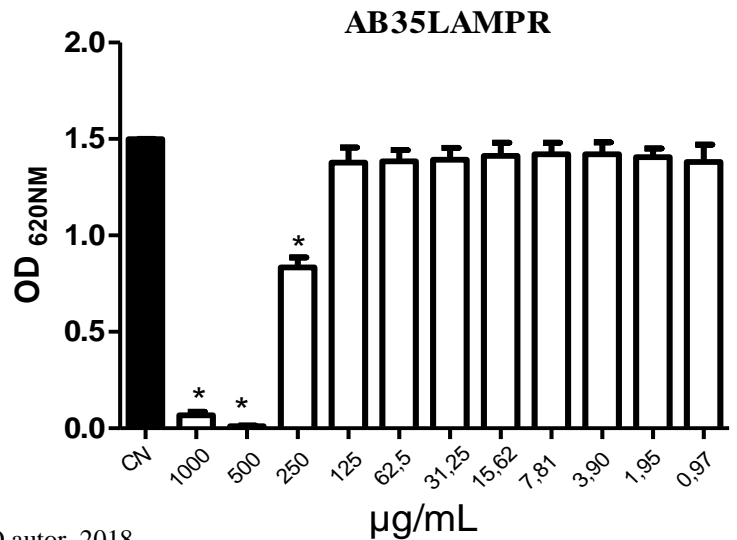
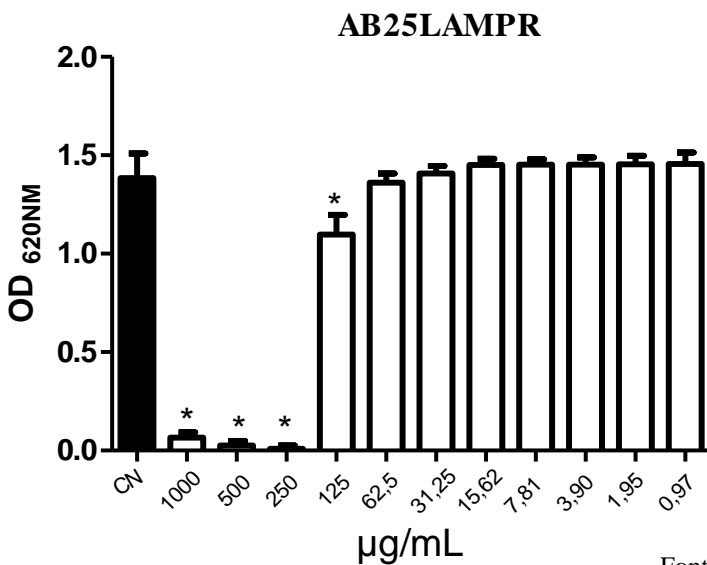
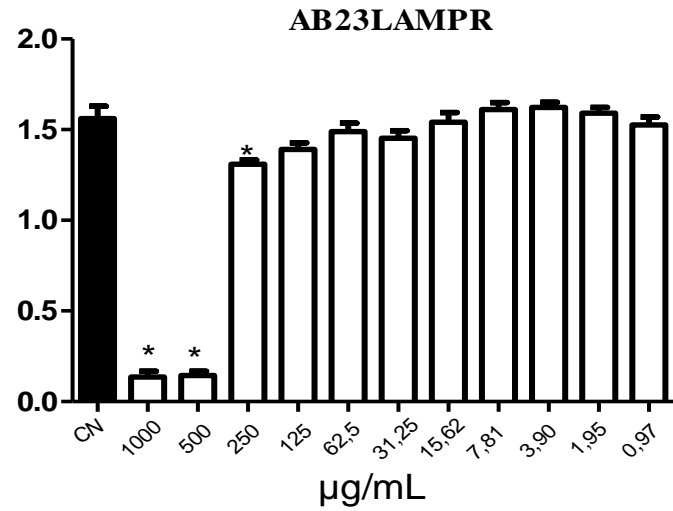
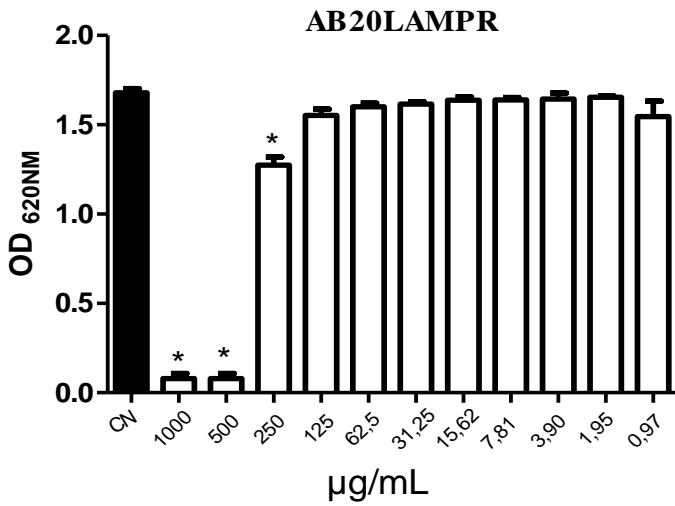
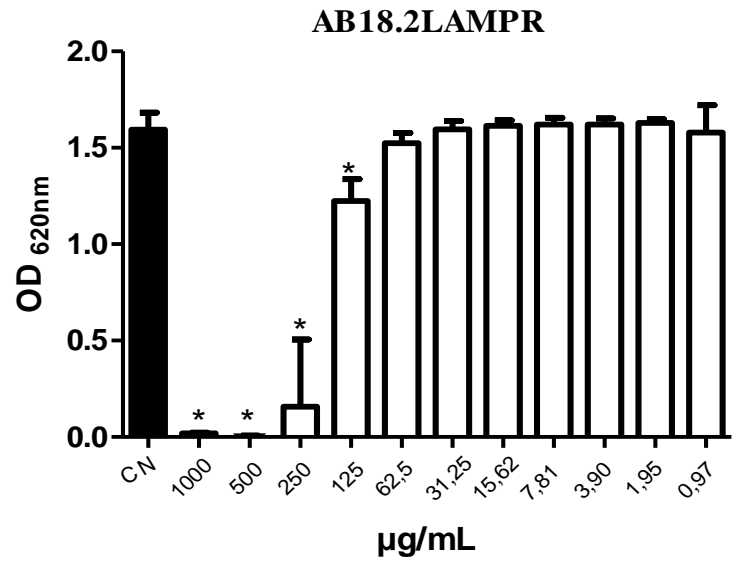
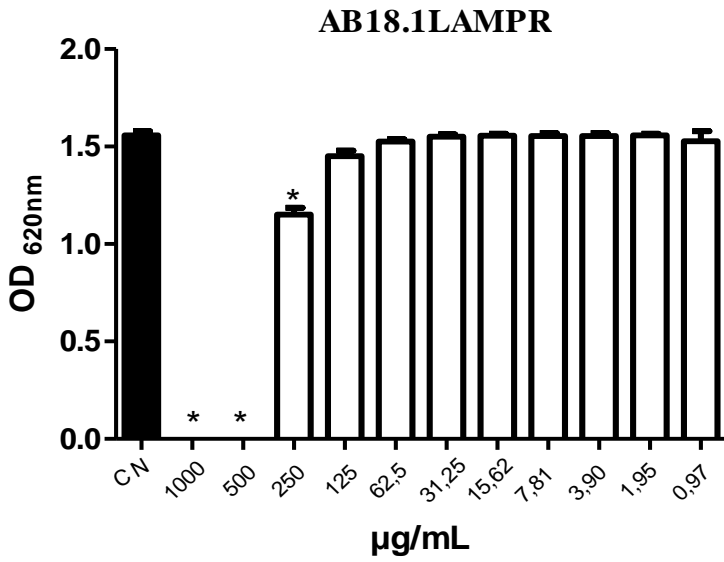
5.2 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

A concentração inibitória mínima (CIM) do cinamaldeído para os isolados testados variou de 125 a 500 µg / mL e a concentração bactericida mínima para a maioria dos isolados foi de 500 µg / mL (Figuras 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15) e (Tabelas 10, 11, 12 e 13).



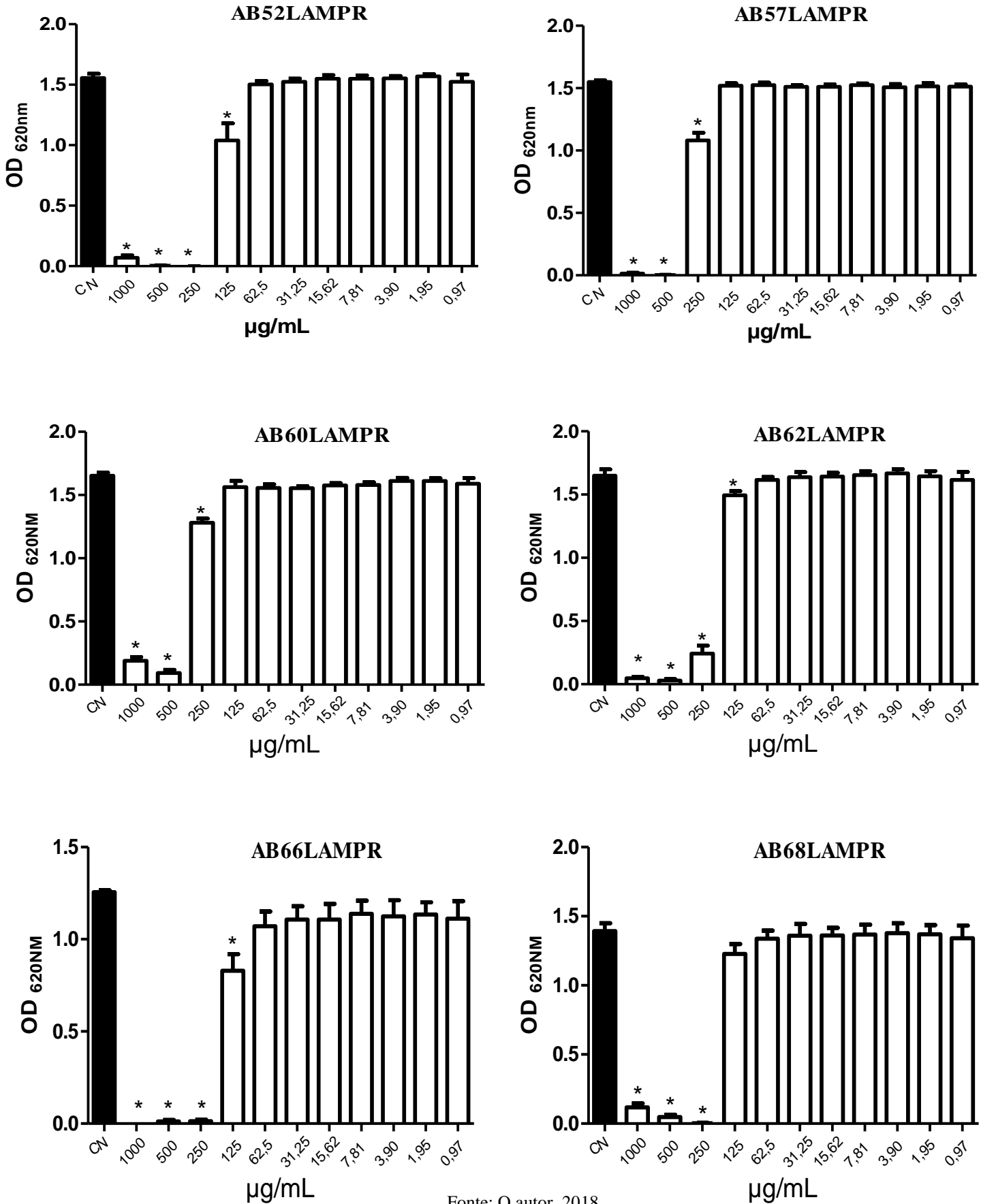
Fonte: o autor (2018)

Figura 8: CIM do cinamaldeído frente a isolados nosocomiais de *A.baumannii* resistentes aos carbapenêmicos da SCMS: (AB1LAMPR), (AB2LAMPR), (AB5LAMPR), (AB10LAMPR), (AB12LAMPR) e (AB16LAMPR). * significante $P < 0,01$



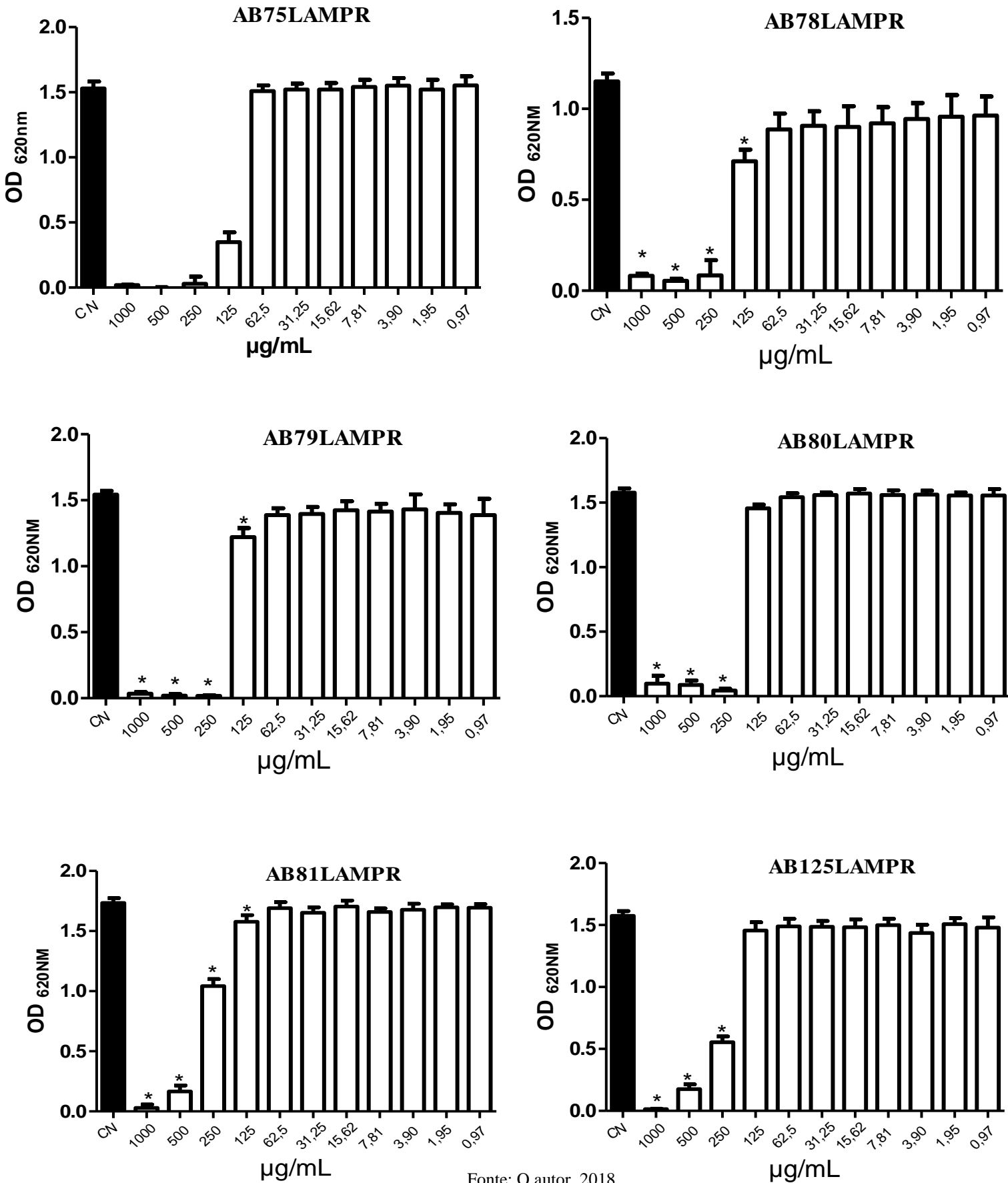
Fonte: O autor, 2018.

Figura 9: CIM do cinamaldeído frente a isolados nosocomiais de *A.baumannii* resistentes aos carbapenêmicos da SCMS: (AB18.1LAMPR), (AB18.2LAMPR),(AB20LAMPR), (AB23LAMPR), (AB25LAMPR) e (AB35LAMPR). * significante $P < 0,01$.



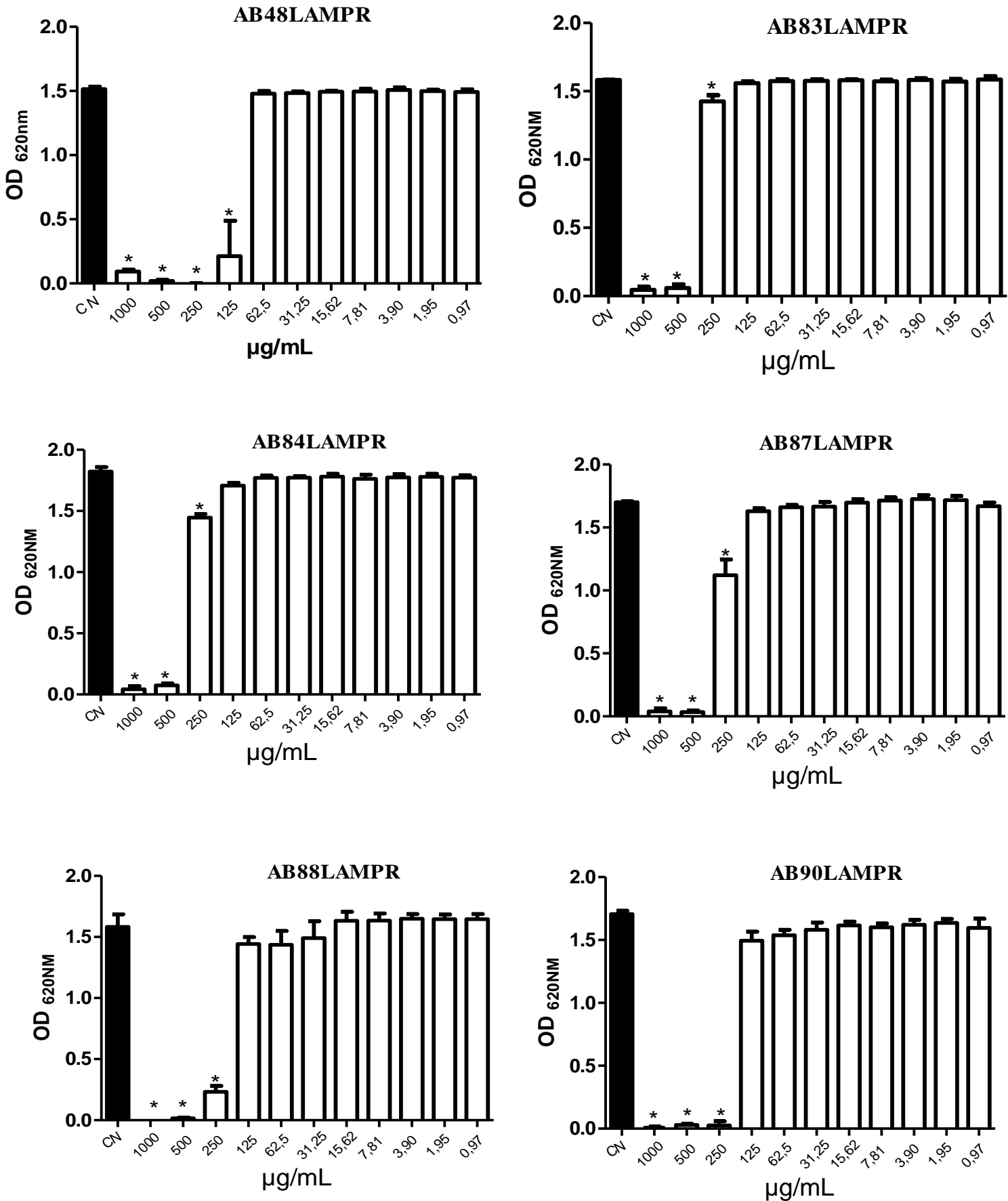
Fonte: O autor, 2018.

Figura 10: CIM do cinamaldeído frente a isolados nosocomiais de *A.baumannii* resistentes aos carbapenêmicos do HGF: (AB52LAMPR), (AB57LAMPR), (AB60LAMPR), (AB62LAMPR), (AB66LAMPR) e (AB68LAMPR). * significante $P < 0,01$



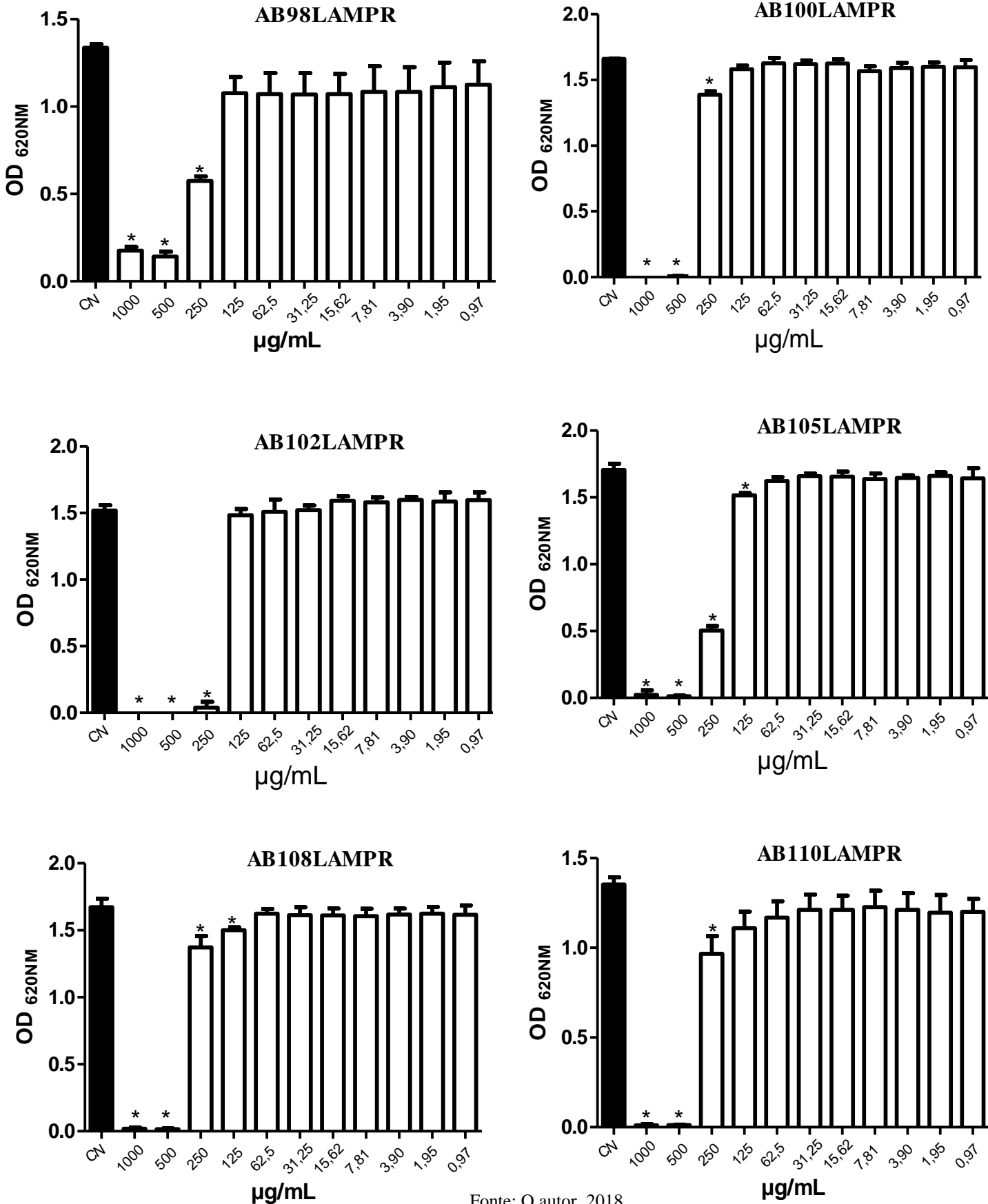
Fonte: O autor, 2018.

Figura 11: CIM do cinamaldeído frente a isolados nosocomiais de *A.baumannii* resistentes aos carbapenêmicos do HGF: (AB75LAMPR), (AB78LAMPR), (AB79LAMPR), (AB80LAMPR), (AB81LAMPR) e (AB125LAMPR). * significante $P < 0,01$.



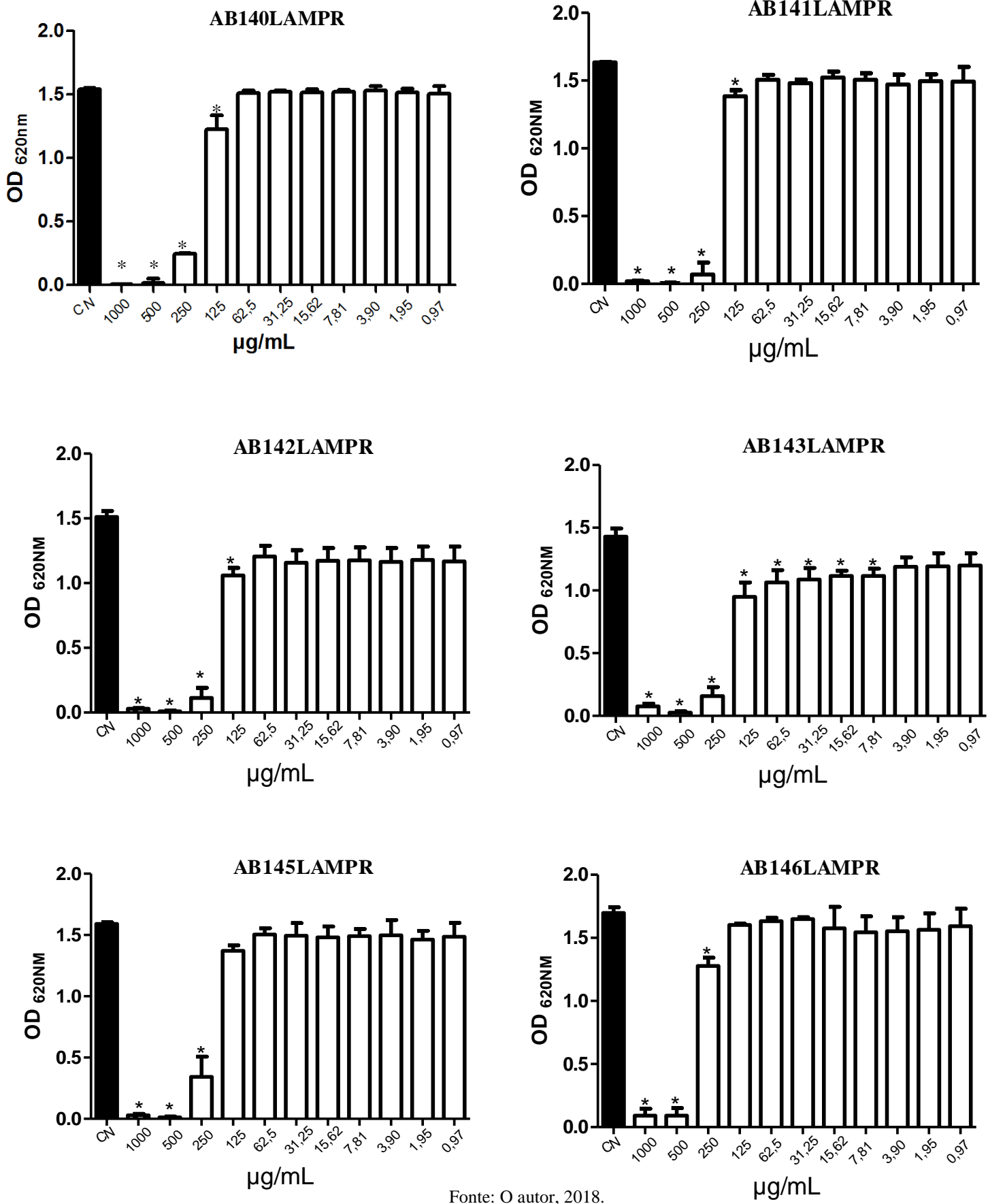
Fonte: O autor, 2018.

Figura 12: CIM do cinamaldeído frente a isolados nosocomiais de *A.baumannii* resistentes aos carbapenêmicos do HGCC: (AB48LAMPR), (AB83LAMPR), (AB84LAMPR), (AB87LAMPR), (AB88LAMPR) e (AB90LAMPR). * significante $P < 0,01$



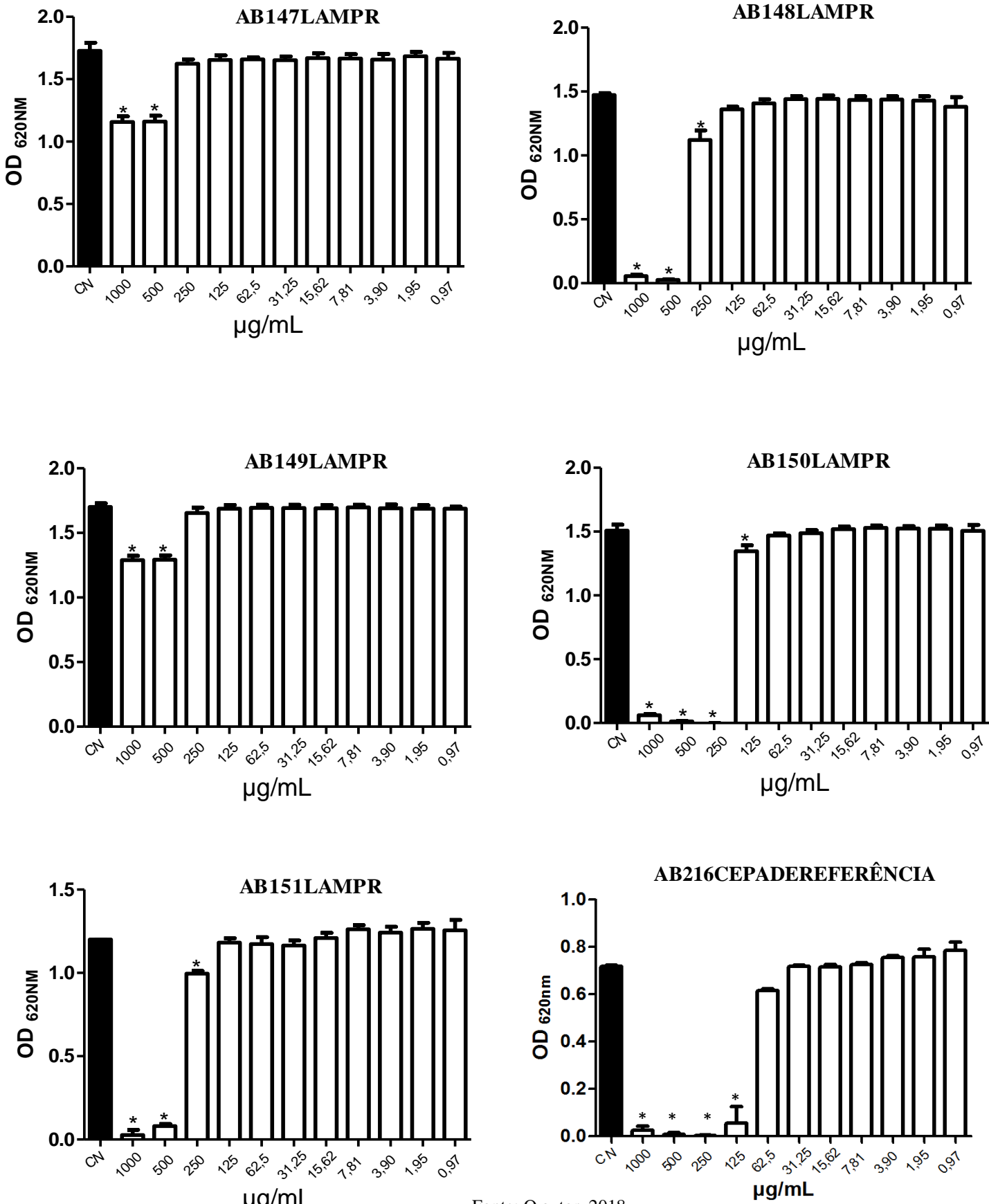
Fonte: O autor, 2018.

Figura 13: CIM do cinamaldeído frente a isolados nosocomiais de *A.baumannii* resistentes aos carbapenêmicos do HGCC: (AB98LAMPR), (AB100LAMPR), (AB102LAMPR), (AB105LAMPR), (AB108LAMPR) e (AB110LAMPR). * significante $P < 0,01$



Fonte: O autor, 2018.

Figura 14: CIM do cinamaldeído frente a isolados nosocomiais de *A.baumannii* resistentes aos carbapenêmicos do HUWC: (AB140LAMPR), (AB141LAMPR), (AB142LAMPR), (AB143LAMPR), (AB145LAMPR) e (AB146LAMPR). * significante P < 0,01



Fonte: O autor, 2018.

Figura 15: CIM do cinamaldeído frente a isolados nosocomiais de *A.baumannii* resistentes aos carbapenêmicos do HUWC: (AB147LAMPR), (AB148LAMPR), (AB149LAMPR), (AB150LAMPR), (AB151LAMPR) e (AB216CEPADEREFERÊNCIA). * significante P < 0,01

Tabela 10 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do cinamaldeído frente aos espécimes nosocomiais de *A. baumannii* isolados da SCMS.

CEPAS	MIC	MBC
AB1LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL
AB2LAMP	250 µg/mL	250 µg/mL
AB5LAMPR	250 µg/mL	500 µg/mL
AB10LAMPR	125 µg/mL	500 µg/mL
AB12LAMPR	125 µg/mL	250 µg/mL
AB16LAMPR	125 µg/mL	250 µg/mL
AB18.1LAMP	250 µg/mL	1000 µg/mL
AB18.2LAMP	125 µg/mL	250 µg/mL
AB20LAMPR	250 µg/mL	500 µg/mL
AB23LAMPR	250 µg/mL	500 µg/mL
AB25LAMPR	250 µg/mL	1000 µg/mL
AB35LAMPR	250 µg/mL	500 µg/mL
Média= 208,333 ± 61,5457		Média = 500 ± 261,116

Fonte: O autor, 2018.

Tabela 11- Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do cinamaldeído frente aos espécimes nosocomiais de *A. baumannii* isolados do HGF.

CEPAS	MIC	MBC
AB52LAMP	125 µg/mL	250 µg/mL
AB57LAMP	125 µg/mL	500 µg/mL
AB60LAMPR	250 µg/mL	500 µg/mL
AB62LAMPR	125 µg/mL	500 µg/mL
AB66LAMPR	125 µg/mL	500 µg/mL
AB68LAMPR	250 µg/mL	250 µg/mL
AB75LAMP	125 µg/mL	250 µg/mL
AB78LAMP	125 µg/mL	500 µg/mL
AB79LAMPR	125 µg/mL	500 µg/mL
AB80LAMPR	250 µg/mL	250 µg/mL
AB81LAMPR	125 µg/mL	1000 µg/mL
AB125LAMPR	250 µg/mL	1000 µg/mL
Média= 166,6667 ± 61,5457		Média=500 ± 261, 116

Fonte: O autor, 2018.

Tabela 12- Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do cinamaldeído frente aos espécimes nosocomiais de *A. baumannii* isolados do HGCC.

CEPAS	MIC	MBC
AB48LAMP	125 µg/mL	250 µg/mL
AB83LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL
AB84LAMPR	250 µg/mL	500 µg/mL
AB87LAMPR	250 µg/mL	500 µg/mL
AB88LAMPR	250 µg/mL	500 µg/mL
AB90LAMPR	250 µg/mL	500 µg/mL
AB93LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL
AB100LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL
AB102LAMPR	250 µg/mL	1000 µg/mL
AB105LAMPR	250 µg/mL	500 µg/mL
AB108LAMPR	250 µg/mL	500 µg/mL
AB110LAMPR	250 µg/mL	1000 µg/mL
Média=239,5833 ± 36,08439		Média=562,5 ± 216,506

Fonte: O autor, 2018.

Tabela 13- Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do cinamaldeído frente aos espécimes nosocomiais de *A. baumannii* isolados do HUWC.

CEPAS	MIC	MBC
AB140LAMP	125 µg/mL	250 µg/mL
AB141LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL
AB142LAMPR	250 µg/mL	500 µg/mL
AB143LAMPR	250 µg/mL	500 µg/mL
AB145LAMPR	250 µg/mL	500 µg/mL
AB146LAMPR	250 µg/mL	250 µg/mL
AB147LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL
AB148LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL
AB149LAMPR	250 µg/mL	1000 µg/mL
AB150LAMPR	250 µg/mL	500 µg/mL
AB151LAMPR	250 µg/mL	500 µg/mL
Média=239,5833 ± 36,08439		Média= 500 ± 193,6492

Fonte: O autor, 2018.

Journal of Medical Microbiology

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CINNAMALDEHYDE AGAINST CARBAPENEM-RESISTANT ACINETOBACTER BAUMANNII NOSOCOMIAL ISOLATES

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JMM-D-18-00225
Full Title:	EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CINNAMALDEHYDE AGAINST CARBAPENEM-RESISTANT ACINETOBACTER BAUMANNII NOSOCOMIAL ISOLATES
Article Type:	Research Article
Section/Category:	Antimicrobial Resistance
Keywords:	Acinetobacter baumannii; Cinnamaldehyde; Multidrug-resistance; Nosocomial infection; Teaching hospitals.
Corresponding Author:	Ana Jessyca Alves Morais Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceara Sobral, Ceará BRAZIL
First Author:	Ana Jessyca Alves Morais
Order of Authors:	Ana Jessyca Alves Morais Izabelly Linhares Ponte Brito Rondinely Lima da Silva Xhaulla Maria Quariguasi Cunha Fonseca Vicente de Paulo Teixeira Pinto Francisco Cesar Barroso Barbosa
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	<p>The emergence of <i>A. baumannii</i> multidrug-resistant (MDRAB) has become a worldwide critical clinical problem. The growing interest in new therapies based on natural products is the basic and primary source for the emergence of new antimicrobials. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of cinnamaldehyde against <i>A. baumannii</i> nosocomial strains (47) resistant to carbapenems isolated from patients in different teaching hospitals in the State of Ceará, Brasil. Phenotypic identification and susceptibility to antimicrobials were determined by the VITEK®2, additionally polymerase chain reaction (PCR) to amplify the blaOXA-51 gene was performed on all presumptively identified as <i>A. baumannii</i> and the clinical characteristics were analyzed. The minimum inhibitory concentration (MIC) of cinnamaldehyde was determined by the broth microdilution method, and the minimum bactericidal concentration (MBC) was considered the lowest concentration of cinnamaldehyde which prevented growth and reduced the inoculum by ≤ 99.9 within 24 h after incubation (37°C). The MIC of the cinnamaldehyde against <i>A. baumannii</i> nosocomial isolates ranged from 125 to 500 $\mu\text{g/mL}$ (Mean = 210.93 ± 58.55) and the MBC for most isolates was 250 $\mu\text{g/mL}$ (Mean = 510.41 ± 230.39). Bloodstream was the most frequent isolation site, and most of the strains were isolated from Intensive Care Units. These data demonstrated a potent inhibitory and bactericidal effect of cinnamaldehyde against carbapenem-resistant <i>A. baumannii</i> nosocomial strains, suggesting the prospection of this compound for the development of a new antibacterial substance, either as a medicament or in new products destined to the final disinfection of hospital environments.</p>

1 EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CINNAMALDEHYDE AGAINST
2 CARBAPENEM-RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII* NOSOCOMIAL ISOLATES

3
 4 Ana Jessyca Alves Morais¹; Izabelly Linhares Ponte Brito²; Rondinely Lima da Silva¹;
 5 Xhaulla Maria Quariguasi Cunha Fonseca³; Vicente de Paulo Teixeira Pinto^{1,2}; Francisco Cesar
 Barroso Barbosa²

6
 7
 8 ¹Postgraduate Program in Biotechnology, Federal University of Ceará, Sobral, CE, Brazil.

9 ²Postgraduate Program in Health Sciences, Federal University of Ceará, Sobral, CE, Brazil.

10 ³Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.

11
 12 Corresponding author: Francisco Cesar Barroso Barbosa

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

14 Telephone: + 55 88 3695.4722; Fax number: +55 88 3695.4648

15 E-mail: fcbarbosa@yahoo.com.br

16
ABSTRACT

18 The emergence of *A. baumannii* multidrug-resistant (MDRAB) has become a worldwide
 19 critical clinical problem. The growing interest in new therapies based on natural products is
 20 the basic and primary source for the emergence of new antimicrobials. The aim of this study
 21 was to evaluate the antimicrobial activity of cinnamaldehyde against *A. baumannii*
 22 nosocomial strains (47) resistant to carbapenems isolated from patients in different teaching
 23 hospitals in the State of Ceará, Brasil. Phenotypic identification and susceptibility to
 24 antimicrobials were determined by the VITEK®2, additionally polymerase chain reaction
 25 (PCR) to amplify the *bla_{OXA-51}* gene was performed on all presumptively identified
 26 as *A. baumannii* and the clinical characteristics were analyzed. The minimum inhibitory
 27 concentration (MIC) of cinnamaldehyde was determined by the broth microdilution method,
 28 and the minimum bactericidal concentration (MBC) was considered the lowest concentration
 29 of cinnamaldehyde which prevented growth and reduced the inoculum by ≤ 99.9 within 24 h
 30 after incubation (37°C). The MIC of the cinnamaldehyde against *A. baumannii* nosocomial
 31 isolates ranged from 125 to 500 $\mu\text{g/mL}$ (Mean = 210.93 ± 58.55) and the MBC for most
 32 isolates was 250 $\mu\text{g/mL}$ (Mean = 510.41 ± 230.39). Bloodstream was the most frequent
 33 isolation site, and most of the strains were isolated from Intensive Care Units. These data
 34 demonstrated a potent inhibitory and bactericidal effect of cinnamaldehyde against
 35 carbapenem-resistant *A. baumannii* nosocomial strains, suggesting the prospection of this
 36 compound for the development of a new antibacterial substance, either as a medicament or in
 37 new products destined to the final disinfection of hospital environments.

38 **Keywords:** *Acinetobacter baumannii*; Cinnamaldehyde; Multidrug-resistance; Nosocomial
 39 infection; Teaching hospitals.

40

41

42 Introduction

43 The multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDRB) have emerged
44 worldwide as an important cause of hospital infections, exhibiting high rates of resistance [1,
45 2]. *A. baumannii* infections occur in Intensive Care Units (ICUs), where they are commonly
46 found to be a cause of pneumonia associated with mechanical ventilation, urinary tract
47 infections, secondary meningitis, and bacteremia [3, 4]. These microorganisms have great
48 ability to increase their regulation of antimicrobial resistance or to acquire resistance
49 determinants [5, 6]. Thus, the combination of the vast resistance mechanisms of *A. baumannii*
50 species and their survival capacity in the hospital environment make them potential
51 nosocomial pathogens [7].

52 These microorganisms are considered opportunistic pathogens because they are
53 isolated from immunosuppressed patients who have undergone major surgeries, antibiotic
54 therapies, burns, use of devices and mainly mechanical ventilation, and can cause severe
55 infections [8].

56 In the last 30 years, isolates of *Acinetobacter* sp. have progressively accumulated
57 resistance to penicillin, cephalosporins, quinolones and aminoglycosides [9]. The mechanism
58 of resistance is due to the presence of β -lactamases, including oxacillinases, which are
59 enzymes capable of hydrolyzing carbapenems, imipenem, and meropenem, important
60 antimicrobials as a therapeutic resource against resistant multidrug bacteria [10].

61 However, the increasing prevalence of carbapenem-resistant *A. baumannii*,
62 particularly in the last two decades, has been of immense concern such that carbapenem-
63 resistant *A. baumannii* is now listed as the top priority pathogen in urgent need of new
64 antimicrobials by the World Health Organization in February 2017 [11].

65 In this context, it is necessary to search for new therapeutic approaches, among
66 which is the prospection of compounds that have activity against multiresistant bacteria, such
67 as compounds and molecules isolated from plants.

68 Essential oils and their secondary metabolites, since the Middle Ages, are used as
69 bactericides, insecticides, antiseptics, and fungicides. Due to its multiple properties, these
70 compounds are currently widely used in the pharmaceutical and food industries, cosmetics,
71 medical equipment, among others [12, 13, 14].

72 Studies have shown that cinnamaldehyde is the major compound (83.6%) among
73 components of cinnamon oils [15]. In the literature, there are reports of the antibacterial
74 activity of cinnamaldehyde against gram-positive and gram-negative bacteria, however,

75 studies of the activity of this substance against multidrug-resistant microorganisms are scarce.
76 Therefore, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of cinnamaldehyde
77 against *Acinetobacter baumannii* nosocomial strains resistant to carbapenems isolated from
78 patients in different teaching hospitals in the State of Ceará, Brazil.

79

80 **Methods**

81 The present study was conducted according to the Declaration of Helsinki, and the
82 protocol was approved by the Institutional Ethics Committee of the State University of Vale
83 de Acaraú, Sobral, Ceará, Brazil (Protocol nº1,843,504).

84

85 **Bacterial strains**

86 Carbapenem-resistant *A. baumannii* strains analyzed in this study were part of the
87 database of the Microbiology and Parasitology Laboratory of the FAMED (UFC / Sobral),
88 which were collected during the period from November 2016 to April 2017, from Santa Casa
89 de Misericórdia de Sobral (SCMS), Hospital Geral Cesar Cals (HGCC), Hospital Geral de
90 Fortaleza (HGF), and from Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC). Phenotypic
91 identification and susceptibility to antimicrobials were determined by the VITEK®2
92 automated system (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) in the microbiology laboratories of
93 these hospitals. Multi-drug resistance (MDR) was defined as resistance to three or more
94 classes of the drugs tested [16].

95

96 **Phenotypic confirmation of the strains by detection of *bla*_{OXA-51} gene**

97 *A. baumannii* presents the natural occurrence of intrinsic carbapenemases
98 genes such as the *bla*_{OXA-51} gene [17]. Therefore, the nosocomial species of *A. baumannii*
99 resistant to carbapenems were analyzed for the detection of *bla*_{OXA-51} gene by Polymerase
100 Chain Reaction (PCR). The primers and protocols previously described by Ma et al. [18]
101 were used to amplify the *bla*_{OXA-51} gene. The sequence of the fragments that were
102 amplified, the size of the amplicons and the annealing temperature is described in Table 1.

103

104

105

106 Table 1: Primers for amplification of the *bla*_{OXA-51} gene

Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon (pb)	Anellament temperature (°C)
	Amplification of <i>bla</i> _{OXA-51}	353	53°C
<i>bla</i> _{OXA-51} F	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG		
<i>bla</i> _{OXA-51} R	TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG		

107

108 **Preparation of Cinnamaldehyde Solution**

109 Cinnamaldehyde was solubilized in 5% DMSO and diluted in Brain Heart
 110 Infusion (BHI) medium (KASVI, Curitiba, Brazil) to obtain a concentration of 2,000 µg/mL.
 111 Starting from this concentration, a serial dilution was performed in 96-well plate with an
 112 initial concentration of 1,000 µg/mL.

113

114 **Preparation of bacterial suspension**

115 Bacteria were reactivated from the inoculation of 50 µL of a culture stocked in a
 116 test tube containing 5 mL of BHI broth (KASVI, Curitiba, Brazil), then incubated at 37° C for
 117 18 h in aerobic conditions. After this period, the bacterial suspensions were inserted into a 96-
 118 well plate and the absorbance reading was performed, where the concentration was adjusted
 119 by spectrophotometer (Abs = 620 nm) at 10⁸ CFU/mL. These bacterial suspensions with 10⁸
 120 CFU/mL were used to determinate the minimum inhibitory concentration (MIC) and
 121 minimum bactericidal concentration (MBC).

122

123 **Minimum Inhibitory Concentration (MIC)**

124 The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of
 125 cinnamaldehyde was performed according to microdilution methodology in standard 96-well
 126 polystyrene plates according to the M7-A 10th edition, Methods for Dilution Antimicrobial
 127 Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, according to Clinical and Laboratory
 128 Standards Institute [19]. Subsequently, the plates were analyzed by the Elisa reader (BIO Trak
 129 II - Plate Reader®).

130 The test was performed on 8 replicates for the same microorganism and the
131 concentrations from 1,000 µg/mL to 1.95 µg/mL were analyzed. In the last column of the 96-
132 well plate were the controls: negative (bacterial suspension + medium), turbidity (medium +
133 test substance) and control of contamination of the medium.

134 After completing the plate assembly, an initial reading (zero time) was performed
135 by an ELISA reader (BIO Trak II - Plate Reader®) with a wavelength of 620 nm. Then the
136 microplate was incubated at 37° C for 24 hours and after that period a new reading was
137 performed to evaluate bacterial growth through turbidity with the aid of the ELISA.

138

139 **Minimum bactericidal concentration (MBC)**

140 The determination of the minimum bactericidal concentration (MBC) was
141 performed using the method proposed by Courvalin et al. [20]. After determination of the
142 MIC, 10 µL of the wells where there was no visible microbial growth were transferred for
143 Petri dishes containing Muller Hinton Agar medium (KASVI, Curitiba, Brazil), then
144 incubated at 37° C for 24 hours in the aerobic growth greenhouse. MBC was considered the
145 lowest concentration of cinnamaldehyde where there was no cell growth on the surface of the
146 inoculated agar (99.9% of microbial death).

147

148 **Statistical analysis**

149 Statistical analyzes were performed using GraphPad® Prism software version
150 5.04 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). The level of significance
151 was 0.01 ($p \leq 0.01$). The difference between replicate means was verified using the One-way
152 ANOVA with Bonferroni post-test.

153

154 **Results**

155 Table 2 shows the distribution of 47 nosocomial strains of *A. baumannii* isolated
156 from patients in the four teaching hospitals surveyed per hospital unit, isolation site, and
157 hospitalization sector.

158 It was observed that bloodstream was the most frequent isolation site, followed by
 159 tracheal aspirate and secretion from the surgical wound. Furthermore, most of the strains were
 160 isolated from Intensive Care Units, followed by clinical and surgical wards (Table 2).

161 Table 2: Distribution of *A. baumannii* nosocomial strains per hospital unit, isolation site, and
 162 hospitalization sector *

	n	%
Microorganism		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	47	100.0
Hospital unit		
SCMS	12	25.53
HGCC	12	25.53
HGF	12	25.53
HUWC	11	23.40
Isolation site		
Blood	15	32
Tracheal aspirate	11	23.40
Secretion	8	17
Urine	5	10.63
Catheter tip	2	4.25
Tissue fragment	2	4.25
Alveolar bronchial lavage	2	4.25
Nasal swab	1	2.12
Ulcer tissue	1	2.12
Hospitalization sector		
UTI	31	65.95
Clinical and surgical wards	12	25.53
Neurology	2	4.25
Traumatology	2	4.25

163 *Reports generated by automated identification system Gram-negative bacillus
 164 GN, VITEK® 2; BioMérieux, France.

165

166 Table 3 shows the results of the *in vitro* antimicrobial susceptibility profile of 47
 167 nosocomial *A. baumannii* MDR against 16 antimicrobials of various classes, including β -
 168 lactams, glycolcyclines, quinolones, aminoglycosides, and polymyxins. Isolates showed
 169 different sensitivity profiles to clinically available antibiotics, but all presented resistance to
 170 carbapenems and sensitivity to colistin. Furthermore, 8 (17.39%) isolates were resistant or
 171 intermediately susceptible to tigecycline. So, the minimum inhibitory concentrations were
 172 determined by a broth microdilution technique for isolates resistant to tigecycline following
 173 the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute [19].

174

175

176 Table 3 - The antimicrobial resistance profiles of *A. baumannii* nosocomial strains from the
 177 four teaching hospitals analyzed

Antimicrobial	Resistant		Sensitive		Intermediate		No tested	
	N	%	N	%	n	%	n	%
Amikacin	23	48.9	10	21.2	3	6.3	11	23.4
Ampicillin	46	97.8	0	0.0	1	2.1	0	0.0
Ampicillin sulbactam	23	48.9	2	4.2	21	44.6	1	2.1
Cefepime	42	89.3	1	2.1	4	8.5	0	0.0
Cefoxitin	43	91.4	1	2.1	2	4.2	1	2.1
Ceftazidime	45	95.7	0	0.0	1	2.1	1	2.1
Ceftriaxone	41	87.2	0	0.0	6	12.7	0	0.0
Cefuroxime	47	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Cefuroxime axetil	47	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Ciprofloxacin	44	93.6	3	6.3	0	0.0	0	0.0
Colistin	0	0.0	47	100	0	0.0	0	0.0
Gentamicin	24	51	18	38.2	5	10.6	0	0.0
Imipenem	47	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Meropenem	47	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Piperacillin/tazobactam	47	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Tigecycline	3	6.3	38	80.8	5	10.6	1	2.1

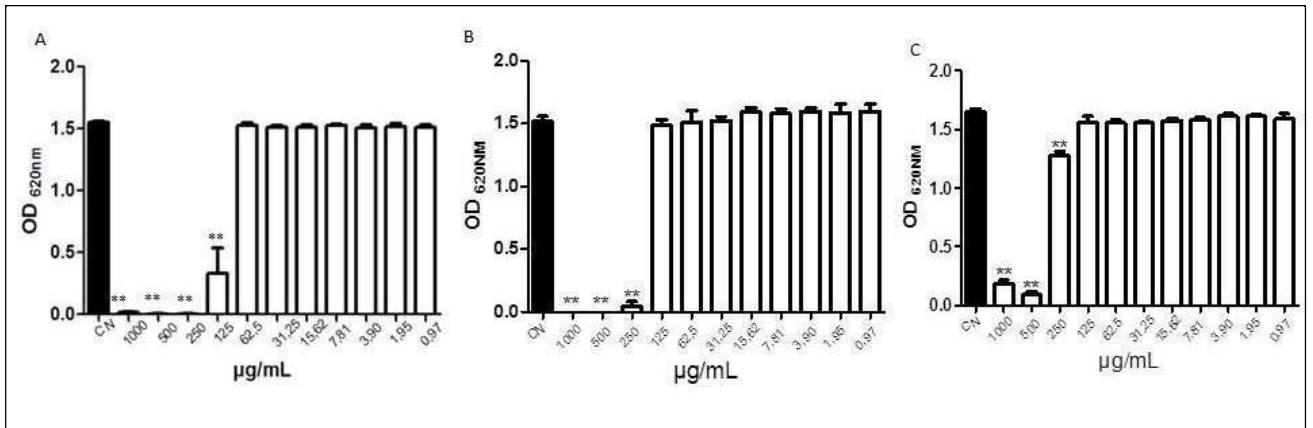
178 Data expressed as absolute frequency and percentage.

179

180 The minimum inhibitory concentration (MIC) of cinnamaldehyde to the tested
 181 isolates ranged from 125 to 500 µg/mL (Mean = 210.93 ± 58.55) and the minimum
 182 bactericidal concentration for most isolates was 250 µg/mL (Mean = 510.41 ± 230.39)
 183 (Figures 1 and Table 4).

184

185 Figure 1 – Minimum inhibitory concentration (MIC) of cinnamaldehyde against
 186 *A. baumannii* nosocomial strains



187

188 A: *A. baumannii* isolated from bloodstream in HGF (MIC = 125 µg/mL); B: *A. baumannii* isolated from
 189 bloodstream in HGCC (MIC = 250 µg/mL); C: *A. baumannii* isolated from Tracheal aspirate in HGF (MIC = 250
 190 µg/mL). (GraphPad® Software, San Diego California USA). The level of significance was 0.01 ($p \leq 0.01$)**.

191

192 Table 4- Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration
 193 (MBC) of cinnamaldehyde against 47 *A. baumannii* nosocomial isolates

Nosocomial strains	MIC	MBC	Hospital Unit
AB1LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	SCMS
AB2LAMP	250 µg/mL	250 µg/mL	SCMS
AB5LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	SCMS
AB10LAMP	125 µg/mL	500 µg/mL	SCMS
AB12LAMP	125 µg/mL	250 µg/mL	SCMS
AB16LAMP	125 µg/mL	250 µg/mL	SCMS
AB18.1LAMP	250 µg/mL	1000 µg/mL	SCMS
AB18.2LAMP	125 µg/mL	250 µg/mL	SCMS
AB20LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	SCMS
AB23LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	SCMS
AB25LAMP	250 µg/mL	1000 µg/mL	SCMS
AB35LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	SCMS
AB52LAMP	125 µg/mL	250 µg/mL	HGF
AB57LAMP	125 µg/mL	500 µg/mL	HGF
AB60LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	HGF
AB62LAMP	125 µg/mL	500 µg/mL	HGF
AB66LAMP	125 µg/mL	500 µg/mL	HGF
AB68LAMP	250 µg/mL	250 µg/mL	HGF
AB75LAMP	125 µg/mL	250 µg/mL	HGF
AB78LAMP	125 µg/mL	500 µg/mL	HGF
AB79LAMP	125 µg/mL	500 µg/mL	HGF
AB80LAMP	250 µg/mL	250 µg/mL	HGF
AB81LAMP	125 µg/mL	1000 µg/mL	HGF
AB125LAMP	250 µg/mL	1000 µg/mL	HGF
AB48LAMP	125 µg/mL	250 µg/mL	HGCC
AB83LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	HGCC
AB84LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	HGCC
AB87LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	HGCC
AB88LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	HGCC
AB90LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	HGCC
AB93LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	HGCC
AB100LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	HGCC
AB102LAMP	250 µg/mL	1000 µg/mL	HGCC
AB105LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	HGCC
AB108LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	HGCC
AB110LAMP	250 µg/mL	1000 µg/mL	HGCC
AB140LAMP	125 µg/mL	250 µg/mL	HUWC
AB141LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	HUWC
AB142LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	HUWC
AB143LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	HUWC
AB145LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	HUWC
AB146LAMP	250 µg/mL	250 µg/mL	HUWC
AB147LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	HUWC
AB148LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	HUWC
AB149LAMP	250 µg/mL	1000 µg/mL	HUWC
AB150LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	HUWC
AB151LAMP	250 µg/mL	500 µg/mL	HUWC
AB216 reference strain	125 µg/mL	250 µg/mL	-

195 Discussion

196 The alarming increase in antibiotic-resistant bacteria has led to many undesirable
197 phenomena such as the failure of antimicrobial therapy and the frequency of infections by
198 multiresistant microorganisms [16, 21]. In this regard, the identification of new natural
199 substances with antimicrobial activity may be effective alternatives against these pathogens.
200 Currently, the use of natural substances, especially essential oils (EOs) and their isolated
201 substances are studied for the prevention and treatment of infections caused by MDR bacteria
202 [22, 23, 24].

203 *A. baumannii* presents the natural occurrence of carbapenemases genes intrinsic to
204 this species. The first report of this genetic event presented the *bla*_{OXA-51} gene. Subsequently,
205 the presence of variants similar to this gene has been reported, these being named *bla*_{OXA-51-}
206 *LIKE* genes. Usual phenotypic examinations in the laboratory routine are often ineffective in
207 identifying *Acinetobacter* Sp. when not associated with molecular tests, such as PCR [17, 25].
208 Thus, it is necessary to use another test as confirmation criterion showing reliable results for
209 the therapeutic choice. In this search, the confirmation of the phenotypic identification
210 obtained by the automated system the VITEK® 2 was obtained by the detection of the *bla*_{OXA-}
211 *51* gene, validating all the results provided by the equipment.

212 In this study, *A. baumannii* was more isolated from the bloodstream and tracheal
213 aspirate, often associated with patients admitted to intensive care units (ICUs). These data
214 corroborate findings in the literature that this microorganism is responsible for increasingly
215 severe outbreaks of infections and the incidence of nosocomial infections in the bloodstream
216 caused by this pathogen is becoming more frequent [26]. Infections by *A. baumannii* are more
217 frequent in ICUs, where they are commonly found to be a cause of ventilator-associated
218 pneumonia, urinary tract infections, meningitis, and bacteremia [27, 28, 29].

219 Regarding the sensitivity profile, the isolates analyzed presented different
220 sensitivity patterns. Colistin and tigecycline have been shown to be the most effective
221 antimicrobials, these results are relevant with other studies demonstrating that these drugs
222 may be the best therapeutic option for the treatment of patients with carbapenem-resistant
223 *A.baumannii* infections [30, 27, 31, 32]. However, in this study almost 20% of the isolates
224 analyzed were resistant or intermediate susceptible to tigecycline. The resistance rate of this
225 microorganism to imipenem and meropenem, increased from 31% in 2005 to 62.4% in 2014
226 and from 39% in 2005 to 66.7% in 2014, respectively [5].

227 It should be noted that the worldwide emergence of multidrug-resistant *A.*
228 *baumannii* reduced the number of antibiotics available against this pathogen, including
229 resistance to β -lactams, fluoroquinolones, tetracyclines, and aminoglycosides [33]. Thus,
230 bacterial resistance to the available antibiotics induced the search for new therapies and
231 strategies aimed at decreasing the development of MDR bacteria [34]. Importantly, in this
232 study cinnamaldehyde showed significant antimicrobial activity against clinical isolates of
233 *A.baumannii* that presented a phenotype of resistance to carbapenems, which are the most
234 effective antibiotics for the treatment of infections caused by this pathogen.

235 In the literature there are reports of the toxicity of this substance, providing data
236 from *in vivo* studies suggesting that cinnamaldehyde is safe when administered orally in a
237 single dose (2,220 mg/kg) or for up to 2 years (550 mg/kg/day). It is worth noting that the rate
238 of excretion of cinnamaldehyde after 24 h of administration varies from 70 to 98% in rodents,
239 depending on the route of administration, and reaches 100% within 8 h when administered
240 orally to healthy human volunteers [35]. Cinnamaldehyde has been identified and utilized as a
241 non-toxic, food-grade antimicrobial agent. It is generally regarded as safe by the US Food and
242 Drug Administration [36]. Only high concentrations for prolonged exposures have been
243 shown to cause detrimental physiological changes in mammals [37].

244 In this study, cinnamaldehyde presented a MIC of 250 $\mu\text{g/mL}$ for 70.2% and an
245 MBC of the same value for 23.5% of the analyzed strains, these data were statistically
246 significant and presenting lower inhibitory concentrations than those observed by Guerra et al.
247 [38] that evaluated the antimicrobial activity of cinnamon oil against *Acinetobacter* sp. MDR.
248 However, they analyzed the MIC of the volatile oil, obtaining a MIC of 625 $\mu\text{g/mL}$ for 71%
249 of the strains analyzed and an MBC that ranged from 2,500 $\mu\text{g/mL}$ to 1,250 $\mu\text{g/mL}$.
250 Regarding the antimicrobial activity of cinnamaldehyde, these results reinforce the data of
251 literature [39], that demonstrate that the antimicrobial activity of cinnamon oil is due to
252 cinnamaldehyde [40].

253 Studies that evaluated the *in vitro* antimicrobial activity of cinnamon oil using the
254 fusion disc method against *A. baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* resistant to
255 carbapenems demonstrated effective qualitative results and confirmed that the antibacterial
256 action was due to its major component, cinnamaldehyde [41]. However, no quantitative
257 methods were used to measure MIC and MBC, as well as, the majority component was not
258 tested against these pathogens alone.

259 The antimicrobial effect of cinnamon oil was also demonstrated against
260 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*
261 and *Staphylococcus aureus* species with MIC values ranging from 800 to 3,200 µg/mL [42].

262 The antimicrobial potential of different essential oils was analyzed, among them
263 the cinnamon oil, and the researchers demonstrated that cinnamon oil demonstrated greater
264 efficacy than the others, and its antimicrobial action was attributed to the presence of
265 cinnamaldehyde, revealing that it was the main constituent of cinnamon oil [42], confirming
266 the data of Baratta et al. [43], Sleha et al. [44] and Utcharyiakiat et al. [45] that also reported
267 that cinnamaldehyde was the predominant active compound found in cinnamon oil.

268 Data in the literature report the antimicrobial activity of cinnamaldehyde against
269 *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* with MDR phenotypes with MIC values
270 ranging from 250 µg/mL to 500 µg/mL and MBC of 1,000 µg/mL [46, 47, 48, 45].

271 Therefore, these results demonstrated a potent inhibitory and bactericidal effect of
272 cinnamaldehyde against carbapenem-resistant *A.baumannii* nosocomial isolates. Thus, these
273 data suggest the prospection of this compound for the development of a new antibacterial
274 substance, either as a medicament or in new products destined to the final disinfection of
275 hospital environments, being able to reduce hospitalization costs and be safe in its use.

276

277 **Funding information**

278 This research was supported in part by Santa Casa de Misericórdia de Sobral (Edital
279 DEPE 02/2017).

280

281 **Acknowledgment**

282 To CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) for
283 granting the scholarship.

284

285 **Conflicts of interest**

286 There are no conflicts of interest.

287

288 **Ethical statement**

289 This research was approved and obtained a favorable opinion from the Research
290 Ethics Committee - CEP of the Vale do Acaraú State University (Protocol nº1,843,504).

291 **Abbreviations:**

292 BHI - Brain Heart Infusion
 293 CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute
 294 MIC - minimum inhibitory concentration
 295 MBC - minimum bactericidal concentration
 296 MDR - multidrug resistance
 297
 298
 299 **References**

- 300 1. **Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK et al.** Biology of *Acinetobacter*
 301 *baumannii*: Pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment
 302 options. *Front. Cell. Infect. Microbiol* 2017; 7: 55.
 303
- 304 2. **Raro OHF, Gallo SW, Ferreira CAS, Oliveira SD.** Carbapenem-resistant
 305 *Acinetobacter baumannii* contamination in an intensive care unit. *Rev Soc Bras Med*
 306 *Trop* 2017; 50: 167-172.
 307
- 308 3. **Clark NM, Zhanel GG, Lynch JP.** Emergence of antimicrobial resistance among
 309 *Acinetobacter* species: a global threat. *Curr Opin Crit Care* 2016; 22: 491-499.
 310
- 311 4. **Maragakis LL, Perl TM.** *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial
 312 resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1254-1263.
- 313 5. **Hu FP, Guo Y, Zhu DM, Wang F, Jiang XF et al.** Resistance trends among clinical
 314 isolates in China reported from CHINET surveillance of bacterial resistance, 2005–
 315 2014. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22 Suppl 1: S9–14.
 316
- 317 6. **Karageorgopoulos, ED, Falagas ME.** Current control and treatment of multidrug-
 318 resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect. Dis* 2008; 8: 751–762.
 319
- 320 7. **Montagu A, Joly-Guillou ML, Rossines E, Cayon J, Kempf, M, Saulnier P.** Stress
 321 Conditions Induced by Carvacrol and Cinnamaldehyde on *Acinetobacter*
 322 *baumannii*. *Frontiers in Microbiology* 2016; 7: 1133.
 323
- 324 8. **Doi Y, Murray GL, Peleg AY.** *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial
 325 resistance-treatment options. *Respir. Crit. Care Med* 2015; 36: 85–98.
 326
- 327 9. **Tartari DC.** Screening, Identification and Genetic Characterization of *Acinetobacter*
 328 spp. Hospital Environment Isolate. Florianópolis-Sc. Dissertation. Graduate Program
 329 in Pharmacy. Federal University of Santa Catarina, Rio Grande do Sul; 2016.
 330
- 331 10. **Nordmann P, Poirel L, Dortet L.** Rapid detection of carbapenemase-
 332 producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases* 2012; 18: 1503–1507.
 333
- 334 11. World Health Organization, 2017. Available

- 335 at: [http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/)
 336 [needed/en/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/). *Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently*
 337 *Needed*. Geneva: World Health Organization, 2017. Accessed Feb 23, 2018.
 338
- 339 12. **Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M.** Biological effects of essential
 340 oils—a review. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 446–475.
 341
- 342 13. **Perricone M, Arace E, Corbo MR, Sinigaglia M, Bevilacqua A.** Bioactivity
 343 of essential oils: a review of their interaction with food components. *Front Microbiol*
 344 2015; 6: 76.
 345
- 346 14. **Tabassum N, Vidyasagar GM.** Antifungal investigations on plant essential oils: a
 347 review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2013; 5: 19-
 348 28.
 349
- 350 15. **Yeh HF, Luo CY, Lin CY, Cheng SS, Hsu YR, Chang ST.** Methods for thermal
 351 stability enhancement of leaf essential oils and their main constituents from
 352 indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *J Agric Food Chem* 2013; 61:
 353 6293-6298.
 354
- 355 16. **Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME et**
 356 **al.** Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pan-drug-resistant bacteria: an
 357 international expert proposal for interim standard definitions for acquired
 358 resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 268–281.
 359
- 360 17. **Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL.**
 361 Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like
 362 carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2974-2976.
 363
- 364 18. **Ma Z, Zhou LQ, Wang H, Luo L.** Investigation on the genomic diversity of OXA
 365 from isolated *Acinetobacter baumannii*. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8: 4429-4432.
 366
- 367 19. Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. *Performance Standards for*
 368 *Antimicrobial Susceptibility Testing*. 28 th ed; CLSI document Wayne, PA, CLSI 2018.
 369
- 370 20. **Courvalin P, Goldstein F, Philippon A, Sirot JL.** antibiogramme, Ed. MPC–
 371 Videom, Paris, France, 1985.
 372
- 373 21. **Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA.** Global
 374 challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents*
 375 *Chemother* 2017; 51: 3471–3484.
 376
- 377 22. **Aelenei P, Miron A, Trifan A, Bujor A, Gille E, Aprotosoia AC.** Essential Oils
 378 and Their Components as Modulators of Antibiotic Activity Against Gram-Negative
 379 Bacteria. *Medicines* 2016; 3: 19.

- 380 23. **Burt S.** Essential oils: their antibacterial properties and potential 374 applications in
381 food – a review. *Intl. J. Food Microbiol* 2004; 94: 223–253.
382
- 383 24. **Chouhan S, Sharma k, Guleria S.** Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—
384 Present Status and Future Perspectives. *Medicines* 2017; 4: 58.
385
- 386 25. **Kooti S, Motamedifar M, Sarvari J.** Antibiotic Resistance Profile and Distribution of
387 Oxacillinase Genes Among Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Shiraz Teaching
388 Hospitals, 2012 - 2013. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2015; 8: e20215.
389
- 390 26. **Bianco A, Quirino A, Giordano M, Marano V, Rizzo C et al.** Control of
391 carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit of a
392 teaching hospital in Southern Italy. *BMC Infect Dis* 2016; 16: 747.
393
- 394 27. **Dahdouh E, Gómez-Gil R, Pacho S, Mingorance J, Daoud Z, Suárez M.**
395 Clonality, virulence determinants, and profiles of resistance of
396 clinical *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from a Spanish hospital. *PLoS One*
397 2017; 12: e0176824.
- 398 28. **Gordon NC, Wareham DW.** Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*:
399 Mechanisms of Virulence and Resistance. *International Journal of Antimicrobial*
400 *Agents* 2010; 35: 219–226.
401
- 402 29. **Li Y, Kong D, Wu H.** Analysis and evaluation of essential oil components of
403 cinnamon barks using GC-MS and FTIR spectroscopy. *Ind Crop Prod* 2013; 41: 269-
404 78.
- 405 30. **Castilho SRA, Godoy CSM, Guilarde AO, Cardoso JL, André MCP et al.**
406 *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients in intensive care units in
407 Goiânia, Brazil: Molecular and drug susceptibility profiles. *Plos One* 2017; 12:
408 e0176790.
- 409 31. **El-shazly S, Dashti A, Vali L, Bolaris M, Ibrahim AS.** Molecular epidemiology and
410 characterization of multiple-drug-resistant (MDR) clinical isolates of *Acinetobacter*
411 *baumannii*. *Int J Infect Dis* 2015; 41: 42–49.
412
- 413 32. **Hagihara M, Housman ST, Nicolau DP, Kuti JL.** In vitro pharmacodynamics of
414 polymyxin B and tigecycline alone and in combination against carbapenem-
415 resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 874-879.
- 416 33. **Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N.** Colistin resistance of *Acinetobacter*
417 *baumannii*: clinical reports, mechanisms, and antimicrobial strategies. *J Antimicrob*
418 *Chemother* 2012; 67: 1607-1615.
419
420
421
422
423
- 424 34. **Ferro TA, Araújo JM, Dos Santos Pinto BL, Dos Santos JS, Souza EB et al.**
425 Cinnamaldehyde Inhibits *Staphylococcus aureus* Virulence Factors and Protects
426 against Infection in a *Galleria mellonella* Model. *Front Microbiol* 2016; 7: 2052.

- 427 **Cocchiara J, Letizia CS, Lalko J, Lapczynski A, Api AM.** Fragrance material
428 review on cinnamaldehyde. *Food Chem. Toxicol* 2005; 43: 867-923.
- 429 36. United States Food and Drug Administration (USFDA), 2017. Available at
430 <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.60>.
431 Code of Federal Regulations title 21, 3. Accessed Feb 23, 2018.
- 432 37. **Hooth MJ, Sils RC, Burka LT, Haseman JK, Witt KL et al.** Toxicology and
433 carcinogenesis studies of microencapsulated trans-cinnamaldehyde in rats and
434 mice. *Food Chem Toxicol* 2004; 42: 1757–1768.
- 435 38. **Guerra FQS, Mendes JM, Oliveira WA, Rodrigues LAS, Santos BHC, Lima EO.**
436 Chemical composition and antimicrobial activity of *Cinnamomum zeylanicum* Blume
437 essential oil on multi-resistant *Acinetobacter* spp. strains. *Journal of Biology and*
438 *Pharmacy* 2012; 1: 62-68.
- 439
440 39. **Li Y, Guo Q, Wang P, Zhu D, Ye X et al.** Clonal dissemination of extensively drug-
441 resistant *Acinetobacter baumannii* producing an OXA-23 β -lactamase at a teaching
442 hospital in Shanghai, China. *J Microbiol Immunol Infect* 2015; 48: 101-108.
- 443
444 40. **Ooi LSM, Li Y, Kam SL, Wang H, Wong EYL, Ooi VEC.** Antimicrobial activities
445 of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum*
446 *cassia blume*. *Am. J. Chin. Med* 2006; 34: 511-522.
- 447
448 41. **kaskatepe B, Kiymaci ME, Suzuki S, Erdem SA, Cesur S, Yildiz S.** Antibacterial
449 effects of cinnamon oil against carbapenem-resistant nosocomial *Acinetobacter*
450 *baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Industrial Crops and Products*
451 2016; 81: 191–194.
- 452
453 42. **Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S.** *IN vitro* antibacterial activity of
454 some plant essential oils. *BMC Complement Altern Med* 2006; 6: 39.
- 455
456 43. **Baratta MT, Dorman HJ, Deans SG, Figueiredo AC, Barroso JG, Ruberto G.**
457 Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flav*
458 *Fragr J* 1998; 13: 235–244.
- 459
460 44. **Sleha R, Mosio P, Vydrzalova M, Jankowski A, Bostikova V, Mazurova J.** *In vitro*
461 antimicrobial activities of cinnamon bark oil, anethole, carvacrol, eugenol and
462 guaiazulene against *Mycoplasma hominis* clinical isolates. *Biomed Pap Med Fac Univ*
463 *Palacky Olomouc Czech Repub* 2014; 158: 208-211.
- 464
465 45. **Utchariyakiat I, Surassmo S, Jaturanpinyo M, Khuntayaporn P, Chomnawang**
466 **MT.** Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug
467 resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the synergistic effects in combination with
468 other antimicrobial agents. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2016; 16:

469

470

471

472

473

46. **Chang ST, Chen PF, Chang CC.** Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J Ethnopharmacol* 2001; 77: 123–127.

474

475

476

477

478

47. **Chen, W, Golden DA, Critzer FJ, Davidson PM.** Antimicrobial activity of cinnamaldehyde, carvacrol, and lauric arginate against *Salmonella* Tennessee in a glycerol-sucrose model and peanut paste at different fat concentrations. *J. Food Prot* 2015; 78: 1488–1495.

479

480

481

482

48. **Shen S, Zhang T, Yuan Y, Lin S, Xu J, Ye H.** Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane. *Food Control* 2015; 47: 196–202.

483

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, I. ABBOTT, I.; CERQUEIRA, G. M.; BHUIYAN, S.; PELEG, A. Y. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 11, n. 4, p. 395-409, 2013.
- AMBLER, R.P. The structure of beta-lactamases. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.**, v. 289, p. 321-331, 1980.
- ALI, S.; KHAN, A.A.; AHMED, I.; MUSADDIQ, M.; AHMED, K.S.; POLASA, H.; RAO, L.V.; HABIBULLAH, C.M.; SECHI, L.A.; AHMED, N. Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 4, p. 20, 2005.
- ATTOKARAN, M. Turmeric: *Curcuma longa L* (Zingiberaceae). Natural Food Flavors and Colorants. Ames: Blackwell Publishing Ltd. and **Inst. Food Technol.**, v. 98, p. 391-398, 2011.
- BAKKALI, F; AVERBECK, S; AVERBECK, D; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food Chem Toxicol**, v.46, p. 446–475, 2008.
- BARATTA, M.T.; DORMAN, H.J.; DEANS, S.G.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flav Fragr J**, v.13, p.235–244, 1998.
- BASSOLE, I. H.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3989-4006, 2012.
- BLAIR, J. M.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 13, p. 42–51, 2015.
- BOTSARIS, A. **Cresce interesse pela fitoterapia**. Vya estelar: caminhos para o bem-estar integral. Disponível em: <<http://www2.uol.com.br/vyaestelar/plantas.htm>>. Acesso em: 14 jun. 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução – RDC nº 10, de 9 de março de 2010**. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. Diário Oficial de União, Brasília, 2010.
- BRAUN, S. D.; MONECKE, S.; THÜRMER, A.; RUPPELT, A.; MAKAREWICZ, O.; PLETZ, M.; REIBIG, A.; SLICKERS, P.; EHRICHT, R. Rapid Identification of Carbapenemase Genes in Gram-Negative Bacteria with an Oligonucleotide Microarray-Based Assay. **PLOS ONE**, v.9, n. 7, p. 1022-1032, 2014.

- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential 374 applications in food – a review. **Intl. J. Food Microbiol**, v. 94, p. 223–253, 2004.
- BUSH, K.; BRADFORD, P.A. β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. **Cold Spring Harb Perspect Med**. v. 6, n 8, pii: a025247, 2016.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**, v.33, p. 179–189, 2000.
- CARVALHO, A. C. B. et al. Regulação brasileira em plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 1, n. 7, 2012.
- CHAN, J.; OSHIRO, T.; THOMAS, S.; HIGA, A.; BLACK, S.; TODOROVIC, A.; ELBARBRY, F.; HARRELSON, J. P. Inactivation of CYP2A6 by the Dietary Phenylpropanoid *trans*-Cinnamic Aldehyde (Cinnamaldehyde) and Estimation of Interactions with Nicotine and Letrozole. **Drug Metabolism and Disposition**, v.44, n.4, p.534–543, 2016.
- CHANG, S.T; CHEN, P.F; CHANG, C.C. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. **J Ethnopharmacol**, v. 77, p.123–7, 2001.
- CHEN-LUNG, H.; PEI-CHUN, L.; YU-CHANG, S. Composition and antimicrobial activities of the leaf essential oil of *Machilus zuihoensis* from Taiwan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n.2, p. 277-283, 2012.
- COELHO, J.; WOODFORD, N.; TURTON, J.; LIVERMORE, D.M. Multiresistant *acinetobacter* in the UK: how big a threat?. **J Hosp Infect**, v.58, n.3, p. 167-169, 2004.
- CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLSI document M100-S28. Wayne: CLSI; 2018.
- COUTO, R.C.; PEDROSA, T.M.G.; NOGUEIRA, J.M. Infecção Hospitalar - Epidemiologia, Controle e tratamento. 3 A ed. Rio de Janeiro, Editora Médica e Científica; 2003.
- COURVALIN, P.; GOLDSTEIN, F.; PHILIPPON, A.; SIROT, J. L'antibiogramme, Ed. MPC – Videom, Paris, France, 1985.
- DHIFI, W.; BELLILI, S.; JAZI, S.; BAHLOUL, N.; MNIF, W. Essential oils chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. **Medicines**, v. 25, p. 1-16, 2016.
- DOMADIA, P.; SWARUP, S.; BHUNIA, A.; SIVARAMAN, J.; DASGUPTA, D. Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. **Biochem. Pharmacol**. v. 74, p.831–840, 2007.

- DORTET, L. POIREL, L.; ERRERA, C.; NORDMANN, P. CarbAcineto NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Acinetobacter* spp. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 7, p. 2359–2364, 2014.
- EVANS, H.L.; LEFRAK, S.N, LYMAN, J.; SMITH, R.L.; CHONG, T.W.; MCELEARNEY, S.T.; SCHULMAN, A.R.; HUGHES, M.G.; RAYMOND, D.P.; PRUETT, T.L.; SAWYER, R.G. Cost of Gram-negative resistance. **Crit Care Med**, v.35, n.1, p.89–95, 2007.
- EVEILLARD, M.;SOLTNER C.; KEMPF, M, SAINT-ANDRÉ, J.P.; LEMARIÉ, C.; RANDRIANARIVELO, C.; SEIFERT, H.; WOLFF, M.; JOLY-GUILLOU, M. L. The virulence variability of different *Acinetobacter baumannii* strains in experimental pneumonia. **J. Infect.**, v.60, n. 2, p.154–161, 2009.
- FERNÁNDEZ, J.; BERT, F.; NICOLAS-CHANOINE, M.H. The challenges of multi-drug-resistance in hepatology. v.65, n.5, p. 1043-1054, 2016.
- FRIEDMAN, M.; KOZUKUE, N.; HARDEN, L.A. Cinnamaldehyde content in foods determined by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem**, v. 48, p. 5702-5709, 2000.
- GRUENWALD, J.; FREDER, J.;ARMBRUESTER, N. Cinnamon and health. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 50, p. 822-834, 2010.
- GILL, A.O.; HOLLEY, R. A. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L.monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 70, p. 5750–5755, 2004.
- GISKE, C. G.; MONNET, D. L.; CARS, O.; CARMELI , Y. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant Gram-negative bacilli. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, n.3, p. 813-821, 2008.
- ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Prot**, v. 19, n.8, p. 603–608, 2000.
- JAYAPRAKASHA, G. K.; RAO, L. J.; SAKARIAH, K. K. Volatile constituents from *Cinnamomum zeylanicum* fruit stalks and their antioxidant activities. **J. Agric. Food Chem**, v.51, p. 4344-4348, 2003.
- KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Curr Med Chem**, v.10, p.813–29, 2003.
- KARAGEORGOPOULOS, E.D.; FALAGAS, M.E. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **Lancet Infect. Dis.**,v. 8, n.2, p. 751–762, 2008.

- KASKATEPE, B.; KIYMACI, M. E.; SUZUK, S.; ERDEM, S. A.; CESUR, S.; YILDIZ, S. Antibacterial effects of cinnamon oil against carbapenem resistant nosocomial *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 191–194, 2016.
- KONG, K.F.; SCHNEPER, L.; MATHEE, K. β -lactam antibiotics: From antibiotic resistance to bacteriology, **Acta Pathol. Microbiol. Immunol**, v. 118, p. 1–36, 2009.
- KONG, K. F.; SCHNEPER, L.; MATHEE, K. Beta-lactam antibiotics: from antibiotic resistance to bacteriology. **APMIS**, v. 118, n. 1, p. 1-36, 2010.
- KEMPF, M.; ROLAIN, J.M. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. **Int J Antimicrob Agents**, v. 39, n. 2, p.105-114, 2012.
- LEITE, J.P.V. Desenvolvimento da Fitoterapia, In: Leite, J.P.V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. 1 ed. São Paulo: Editora Atheneu, p.4-18, 2009.
- LIN, M.F.; LAN, C.Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From benchtop to bedside. **World J Clin Cases**, v. 2, n. 12, p. 787–814, 2014.
- LIN, J.; NISHINO, K.; ROBERTS, M. C.; TOLMASKY, M.; AMINOV, R. I.; ZHANG, L. Mechanisms of antibiotic resistance. **Front. Microbiol.** v. 6, p.34, 2015.
- LÓPEZ, P.; SANCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERÍN, C. Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. **J Agric Food Chem.** v. 55, n.11, p.4348-4356, 2007.
- MA, Z.; ZHOU, L. Q.; WANG, H.; LUO, L. Investigation on the genomic diversity of OXA from isolated *Acinetobacter baumannii*. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, n. 3, p. 4429-32, 2015.
- MARAGAKIS, L.L.; PERL, T.M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Clin Infect Dis.** v.46, p. 1254-1263, 2008.
- MALUF, S. **Aromaterapia**. São Paulo: Ed. do Autor, 2008.
- MARÍN, M., GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. **Enferm Infecc Microbiol Clin.**, v. 21, n.1, p. 42-55, 2003.
- MATAN, N.; RIMKEEREE, H.; MAWSON, A.J.; CHOMPREEEDA, P.; HARUTHAITHANASAN, V.; PARKER, M. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. **Int J Food Microbiol.** v. 107, n.2, p.180-185. 2006.
- MEDEIROS, M.; LINCOPAN, N. Oxacilinase (OXA)- producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: clinical and environmental impact and therapeutic options. **J Bras Patol Med Lab.** v.49, n.6, p.391-05, 2013.

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 15, p. 316-320, 2005.

MULYANINGSIH, S.; SPORER, F.; REICHLING, J.; WINK, M. Antibacterial activity of essential oils from Eucalyptus and of selected components against multidrugresistant bacterial pathogens. **Pharm. Biol**, v. 49, n. 9, p. 893-9, 2011.

MUNOZ-PRICE, L.S.; WEINSTEIN, R.A. *Acinetobacter* infection. **The New England journal of medicine**, v. 358, p. 1271-1281, 2008.

NAVARRETE, A.; WALLRAF, S.; MATO, R. B.; COCERO, M. J. Improvement of Essential oil steam distillation by microwave pretreatment. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 50, n. 8, p. 4667-4671, 2011.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clin Microbiol Infect**, p. 321–331, 2002.

OHNO, T.; KITA, M.; YAMAOKA, Y.; IMAMURA, S.; YAMAMOTO, T.; MITSUFUJI, S.; KODAMA, T.; KASHIMA, K.; IMANISHI. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**. v. 8, n.3, p. 207–15, 2003.

OKOH, S. O.; IWERIEGBOR, B.C.; OKOH, O.O.; NWODO, U.U.; I.OKOH, A. Bactericidal and antioxidant properties of essential oils from the fruits *Dennettia tripetala* G. Baker. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.16, p. 486, 2016.

PARANAGAMA, P.A.; WIMALASENA, S.; JAYATILAKE, G.S.; JAYAWARDENA, A.L.; SENANAYAKE, U.M.; MUBARAK, A.M: A comparison of essential oil constituents of bark, leaf root and fruit of cinnamon (*cinnamomum zeylanicum* Blum), grown in Sri Lanka. **J Natl Sci Found Sri**. Vol. 29, p. 147-153, 2010.

PATEL, G.; BONOMO, R.A. Status report on carbapenemases: challenges and prospects. **Expert Rev Anti Infect. Ther**, v.9, n.5, p.555–570, 2011.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. *IN vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complement Altern Med**, v, 6, p. 39, 2006.

PRAGASAM, A.K.; VIJAYAKUMAR, S.; BAKTHAVATCHALAM, Y. D.; KAPIL, A.; DAS, B. K.; RAY, P.; GAUTAM, V.; SISTLA, S.; PARIJA, S. C.; WALIA, K.; OHRI, V. C.; ANANDAN, S.; VEERARAGHAVAN, B. Molecular characterisation of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* during 2014 and 2015 collected across India. **Indian J Med Microbiol**, v. 34, n. 4, p. 433-441, 2016.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D.L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clin Microbiol Rev**, p. 538–582, 2008.

- PEREZ F., HUJER A. M., HUJER K. M., DECKER B. K., RATHER P.N., BONOMO R. A. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemotherapy**. v. 51 p. 3471–3484, 2007.
- PERRICONE, M.; ARACE, E.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M.; BEVILACQUA, A. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1-7, 2015.
- RAHMATULLAH, M.; NOMAN, A.; HOSSAN, M.S.; HARUN-OR-RASHID, M.H.; RAHMAN, T.; CHOWDHURY, M.; JAHAN, R. A survey of medicinal plants in two areas of Dinajpur district, Bangladesh including plants which can be used as functional foods. American-Eurasian. **Journal of Sustainable Agriculture**, v. 3, n.4, p. 862-876, 2009.
- RANASINGHE, P. et al. Medicinal properties of ‘true’ cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 275-284, 2013.
- SIENIAWSKI, K.; KACZKA, K.; RUCIŃSKA, M.; GAGIS, L.; POMORSKI, L. *Acinetobacter baumannii* nosocomial infections. **Pol Przegl Chir**, p. 483–490, 2013.
- SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Intercalations of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **J Biol Chem**, v. 269, p. 8022–8028, 1994.
- SYDNOR, E.R.; PERL, T.M. Hospital Epidemiology and Infection Control in Acute-Care Settings. **Clin Microbiol Rev**, p. 141-17, 2011.
- SOARES, G. M.; FIGUEIREDO, L. C.; FAVERI, M.; CORTELLI, S. C.; DUARTE, P. M.; FERES, M. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. **J. Appl. Oral. Sci**, v. 20, p. 295-309, 2012.
- SOUSA, D. P.; HOCAYEN, P. A. S.; ANDRADE, L. N.; ANDREATINI, R. A Systematic Review of the Anxiolytic-Like Effects of Essential Oils in Animal Models. **Molecules**, v. 20, p. 18620-18660; 2015.
- SHAN, B.; CAI, Y.Z.; BROOKS, D.J.; CORKE, H. Antibacterial properties and major bioactive component of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): activity against food borne pathogenic bacteria. **J Agric Food Chem**, p. 5484–5490, 2007.
- SHEN, S.; ZHANG, T.; YUAN, Y.; LIN, S.; XU, J.; YE, H. Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane. **Food Control**. v. 47, p. 196–202, 2015.
- TARTARI, D.C. **Rastreo, Identificação E Caracterização Genética De Acinetobacter Spp. Isolados De Ambiente Hospitalar. Florianópolis-Sc.** 130p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina. Universidade Federal de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, 2016.

TIWARI, V.; MOGANTY, R.R. Conformational stability of OXA-51 beta-lactamase explains its role in carbapenem resistance of *Acinetobacter baumannii*. **J. Biomol. Struct. Dyn**, v. 32, p. 1406–1420, 2014.

TUON, F. F.; ROCHA, J. L.; MERLINI, A. B. Combined therapy for multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection: there evidence outside the laboratory? **J Med Microbiol**, v. 64, n. 9, p. 951-959, 2015.

TURINA, A.V.; NOLAN, M.V.; ZYGADLO, J.A.; PERILLO, M.A. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophys. Chem**, V.122, p. 101–113, 2006.

TURTON, J.F.; WOODFORD, N.; GLOVER, J.; YARDE, S.; KAUFMANN, M.E.; PITT, T.L. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. **J Clin Microbiol**. v. 44, n.8, p. 2974-2976, 2006.

UTCHARIYAKIAT, I.; SURASSMO, S.; JATURANPINYO, M.; KHUNTAYAPORN, P.; CHOMNAWANG, M. T. Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. **BMC Complement. Altern. Med**, v. 16, p.158, 2016.

VIEIRA, P.B.; PICOLI, S.U. *Acinetobacter baumannii* Multirresistente: Aspectos Clínicos e Epidemiológicos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 19, n. 2, p.151-156, 2015.

VIEHMAN, J. A.; NGUYEN, M. H.; DOI, Y. Treatment Options for Carbapenem-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections. **Drugs**, v.74, n. 12, p. 1315–1333, 2015.

VISVALINGAM J, HERNANDEZ-DORIA JD AND HOLLEY RA. Examination of the genome-wide transcriptional response of *Escherichia coli* O157:H7 to cinnamaldehyde exposure. **Applied Environmental Microbiology**, v. 79, p. 942–950, 2013.

WILSON, B. A.; GARUD, N. R.; FEDER, A. F.; ASSAF, Z. J.; PENNING, P. S. The population genetics of drug resistance evolution in natural populations of viral, bacterial and eukaryotic pathogens. **Mol. Ecol**. v.25, p. 42–66, 2016.

WILLIAMS, J.D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. **Inter. J. Antimicrob. Agents**, v.12, p. 3-7, 1999.

XIA, J.; GAO, J.; TANG, W. Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Biosci Trends**, v.10, n.1, p.14-21, 2016.



SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SOBRAL
DEPARTAMENTO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO
SUBCOMISSÃO DE PESQUISA

Sobral-Ce, 03 de julho de 2017.

CARTA DE ANUÊNCIA PARA O SERVIÇO

Declaramos que o Projeto de Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Sobral, intitulado “**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CINAMALDEIDO EM ACINETOBACTER BAUMANNII RESISTENTES A CARBAPENÊMICOS**” sob orientação do **Prof. Dr. Francisco César Barroso Barbosa** obedece ao protocolo para realização de pesquisa desta instituição, obtendo **Parecer Favorável** desta subcomissão para sua realização.

A pesquisa foi submetida ao DEPE (Departamento de Ensino, Pesquisa e Extensão) e possui aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos com o protocolo número **1.843.504** e terá como local de coleta de dados o **Laboratório de Bioquímica/ imunologia/ biologia celular/ genética**.

Atenciosamente,

Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto
Diretor de Ensino, Pesquisa e Extensão da SCMS



UNIVERSIDADE ESTADUAL
VALE DO ACARAÚ - UVA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÔMICA DE ISOLADOS NOSOCOMIAIS DE *Acinetobacter baumannii* MULTIRRESISTENTES PRODUTORES DE CARBAPENEMASES

Pesquisador: Izabelly Linhares Ponte Brito

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57095216.0.0000.5053

Instituição Proponente: Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

Patrocinador Principal: Santa Casa de Misericórdia de Sobral

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.843.504

Apresentação do Projeto:

. Coleta de dados: De Novembro de 2016 a Abril de 2017, serão coletadas espécies nosocomiais de *A. baumannii* isolados de amostras clínicas de sangue, de infecções do trato respiratório, ponta de cateter percutâneo, secreção de abscesso e de ferida cirúrgica. Vale ressaltar, que o isolamento das espécies bacterianas será realizado a partir de amostras clínicas de pacientes internados em enfermarias e Unidades de Terapia Intensiva com suspeita de infecção hospitalar, desde que essas amostras já tenham sido previamente solicitadas e coletadas pela equipe médica dos hospitais de ensino envolvidos nesta pesquisa. Portanto, não será feita coleta adicional de sangue e nem de nenhuma outra amostra clínica do paciente. Dessa forma, a quantidade e manipulação das amostras segue o protocolo operacional padrão de cada hospital, assim

como o método de descarte das amostras biológicas segue o plano de gerenciamento de resíduos de serviço de saúde de acordo com a Resolução RDC Nº306 de 07 de dezembro de 2004. Todos os isolados serão previamente identificados no laboratório de microbiologia dos referidos hospitais

pelo sistema automatizado VITEK®2 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Após, os espécimes serão armazenados e enviados em tubos contendo

BHI (Brain Heart Infusion) (Himedia®, Mumbai, Índia) com glicerol a 20% ao Laboratório de

Endereço: Av Comandante Maurocélso 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

