

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO



Dissertação

Efeito antimicrobiano dos óleos essenciais de *Cymbopogon martini* e *Thymus vulgaris* e sinergismo dos constituintes eugenol, timol e geraniol frente a isolados bacterianos de origem hospitalar multirresistentes.

Camila De David Tessele Martini

Pelotas, 2019

Camila De David Tessele Martini

Efeito antimicrobiano dos óleos essenciais de *Cymbopogon martini* e *Thymus vulgaris* e sinergismo dos constituintes eugenol, timol e geraniol frente a isolados bacterianos de origem hospitalar multirresistentes.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial a obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica Bioprospecção).

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Vaucher

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M386e Martini, Camila De David Tessele

Efeito antimicrobiano dos óleos essenciais de *Cymbopogonmartini* e *Thymusvulgaris* e sinergismo dos constituintes eugenol, timol e geraniol frente a isolados bacterianos de origem hospitalar multirresistentes / Camila De David Tessele Martini ; Rodrigo de Almeida Vaucher, orientador. — Pelotas, 2019.

69 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Resistência antimicrobiana. 2. Eugenol. 3. Óleos essenciais. 4. Geraniol. 5. Timol. I. Vaucher, Rodrigo de Almeida, orient. II. Título.

CDD : 664

Camila De David Tessele Martini

Efeito antimicrobiano dos óleos essenciais de *Cymbopogon martini* e *Thymus vulgaris* e sinergismo dos constituintes eugenol, timol e geraniol frente a isolados bacterianos de origem hospitalar multirresistentes.

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica Bioprospecção), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 20/12/2019.

Banca examinadora:



Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Vaucher (Orientador)
Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Prof. Dr. Wilson João Cunico Filho
Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria.



Prof.^a Dr.^a Ana Paula Pesarico
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) Universidade Federal de Santa Maria.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus, pelo dom da vida, pela saúde, força e coragem para seguir nessa caminhada e por todas as graças alcançadas diariamente.

À minha família, em especial meu esposo, Bruno, pelo apoio nas horas mais difíceis, pelo incentivo na busca dos meus objetivos, sempre assumindo o cuidado e dedicação para com as crianças. Aos meus filhos amados, Pedro, João, Antônio e Francisco, minhas razões de viver e de buscar sempre ser uma pessoa melhor a cada dia. Aos meus pais, pela referência, apoio e amor incondicional. Aos meus irmãos, pela cumplicidade e amor que temos um com o outro.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Vaucher, pela oportunidade, os ensinamentos transmitidos, paciência e compreensão pelos meus horários limitados devido a tantos fatores que ocorreram nesses vinte e oito meses de mestrado; afinal, foram duas gestações, conciliando trabalho e filhos nesse período.

Ao grupo LaPeBBioM, pela ajuda e parceria em todos os momentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, bem como seus docentes.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, pela oportunidade de ingresso ao Programa.

Aos meus colegas de trabalho, que sempre me apoiaram e compreenderam os momentos em que eu precisava estar ausente.

Aos meus amigos e pessoas queridas, que torcem, de perto ou de longe, pela realização dos meus objetivos.

A todas as demais pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

Resumo

TESSELE, Camila De David. **Efeito antimicrobiano dos óleos essenciais de *Cymbopogon martini* e *Thymus vulgaris* e sinergismo dos constituintes eugenol, timol e geraniol frente a isolados bacterianos de origem hospitalar multirresistentes.** 2019. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um grave problema de saúde pública de âmbito mundial, devido a sua elevada taxa de mortalidade e restrição na opção terapêutica. Dentre os microrganismos comumente associados à mecanismos de resistência, destacam-se as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, produtoras de enzimas betalactamases, como as de espectro estendido (ESBL) e as carbapenemases (KPC). Ao longo dos anos, a busca por alternativas terapêuticas oriundas de plantas medicinais, vem aumentando gradativamente e, com isso, diversos estudos utilizando óleos essenciais (OE) extraídos de plantas aromáticas e medicinais, vêm mostrando suas atividades antimicrobianas, como é o caso dos OE de *Thymus vulgaris* L. (OT) e *Cymbopogon martini* (OP), bem como de alguns constituintes majoritários. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do OT e OP e o sinergismo dos constituintes majoritários (timol, eugenol e geraniol) frente a isolados bacterianos de origem hospitalar multirresistentes. As bactérias foram isoladas a partir de amostras clínicas de pacientes internados no Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas – RS, Brazil. Aquelas identificadas com sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos, foram submetidas ao teste fenotípico para detecção das enzimas carbapenemases. Foi realizada a caracterização dos OE e a determinação de sua atividade antioxidante se deu pelo ensaio *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP). Atividade antimicrobiana e sinérgica dos OE e dos constituintes majoritários foi determinada através da concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e monitorada pelas curvas de inibição do crescimento bacteriano. Os resultados do FRAP mostraram atividade antioxidante dos extratos, especialmente do geraniol. Todos os OE e constituintes majoritários apresentaram atividade antimicrobiana. O timol foi o composto que apresentou os menores valores de CIM, variando de 3.51 a 9.37 $\mu\text{g mL}^{-1}$; seguido do eugenol, com 104.19 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O OT não apresentou atividade antimicrobiana frente aos isolados mais resistentes. De acordo com os resultado do sinergismo, foi evidenciado efeito sinérgico apenas na combinação do timol com o eugenol. Também foi constatado que, de acordo com os valores das CBM, o timol, assim como os demais constituintes majoritários, apresentaram tanto atividade inibitória, quanto bactericida frente aos isolados bacterianos. Esses resultados sugerem que os OE testados e seus constituintes majoritários, especialmente o timol, apresentam potencial como agentes antimicrobianos promissores frente a isolados multiresistentes.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana; óleos essenciais; timol; eugenol; geraniol; ESBL; KPC.

Abstract

TESSELE, Camila De David. **Antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* and *Cymbopogon martini* essential oils and synergism of thymol, eugenol and geraniol constituents against multidrug resistant bacterial isolates.** 2019. Dissertation (Master) - Postgraduate Program in Biochemistry Bioprospecting. Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

Bacterial resistance to antimicrobials is a serious worldwide public health problem due to its high mortality rate and restricted therapeutic options. Among the common microorganisms associated with resistance mechanisms, it is possible to highlight bacteria of the *Enterobacteriaceae* family, producers of beta-lactamase enzymes, such as extended spectrum (ESBL) and carbapenemases (KPC). Over the years, the search for alternative therapies by medicinal plants has been gradually increasing and, with this, several studies using essential oils (EO) extracted from aromatic and medicinal plants have been showing their antimicrobial activities, as is the case with the EO *Thymus vulgaris* L. (TO) and *Cymbopogon martini* (PO), as well as some of their major constituents. The present study aimed to evaluate the antimicrobial activity of TO and PO and synergism of their major constituents (thymol, eugenol and geraniol) against multiresistant bacterial isolates. Bacteria were isolated from clinical samples of patients admitted into the School Hospital of the Federal University of Pelotas - RS, Brazil. Those identified with reduced carbapenemic sensitivity were submitted to phenotypic tests for carbapenemase enzymes detection. The characterization of the EO was performed and determination of its antioxidant activity was done with the Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay. Antimicrobial and synergistic activity of the EO and their major constituents were determined through minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and monitored by inhibitory curves in bacterial growth. FRAP results showed antioxidant activities of the extracts, especially geraniol. All the EOs and their major constituents presented antimicrobial activity. Thymol was the compound with the lowest MIC values, ranging from 3.51 to 9.37 $\mu\text{g mL}^{-1}$; followed by eugenol with 104.19 $\mu\text{g mL}^{-1}$. TO showed no antimicrobial activity against the most resistant isolates. According to the synergism results, a synergistic effect was evidenced only in the combination of thymol with eugenol. This study also found that, according to MBC values, thymol, as well as the other major constituents, presented both inhibitory and bactericidal activity against bacterial isolates. These results suggest that the tested EO and their major constituents, especially thymol, present potential as promising antimicrobial agents against multiresistant isolates.

Keywords: Antimicrobial Resistance; essential oils; thymol; eugenol; geraniol; ESBL; KPC.

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura química geral dos antibióticos carbapenêmicos.....	17
Figura 2 - Célula bacteriana com os principais mecanismos de resistência	20
Figura 3 - Estrutura química do timol.....	25
Figura 4 - Estrutura química do eugenol	26
Figura 5 - Estrutura química do geraniol.....	28

Lista de Quadros

Quadro 1 - Principais grupos de antimicrobianos betalactâmicos e exemplos de antibióticos (CLSI, 2012)	16
---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATP - trifosfato de adenosina

CBM - concentração bactericida mínima

CG/EM - cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas

CIM - concentração inibitória mínima

DNA - ácido desoxirribonucleico

EROs - espécies reativas de oxigênio

ESBL - betalactamases de espectro amplo

FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power

KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

LPS - lipopolissacarídeo

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

OE - óleo essencial

OMS - Organização Mundial de Saúde

OP - óleo essencial de palmarosa

OT - óleo essencial de tomilho

PBPs - proteínas ligadoras de penicilinas

UFC - unidades formadoras de colônias

Sumário

1 Introdução.....	11
2 Objetivos	13
Objetivo geral.....	13
Objetivos específicos	13
3 Revisão Bibliográfica	14
Família <i>Enterobacteriaceae</i>	14
Classes de antimicrobianos.....	15
Antibióticos Carbapenêmicos.....	16
Mecanismos de resistência bacteriana.....	18
<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase - KPC.....	20
Betalactamases de espectro estendido - ESBL.....	21
Óleos essenciais - OE	21
Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais	23
Atividade antioxidante dos óleos essenciais	24
Eugenol.....	26
Geraniol	27
4 Manuscrito	29
5 Conclusões.....	56
Referências.....	57
Anexos.....	65
Anexo A – Comprovante de submissão do manuscrito a Revista Microbial Pathogenesis.....	66
Anexo B - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).....	67

1 Introdução

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um grave problema de saúde pública, que vem aumentando de forma alarmante no âmbito mundial, devido a sua elevada taxa de mortalidade e restrição na opção terapêutica, principalmente quando ocorre no ambiente hospitalar (NORDMANN, CORNAGLIA, 2012).

Dentre os microrganismos comumente associados à mecanismos de resistência, destacam-se as bactérias gram negativas da família *Enterobacteriaceae*, produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL) e de enzimas carbapenemases (KPC, AmpC e metalo-carbapenemase). As cepas mais relevantes de bactérias produtoras de ESBL constituem a *Klebsiella spp* e *Escherichia coli*, porém já foram detectadas em diversas espécies de *Enterobacteriaceae* e em *Pseudomonas aeruginosa* (BELL et al., 2007).

A produção das enzimas carbapenemases pelas enterobactérias é um fator imprescindível que confere resistência às mesmas, visto que essas enzimas são capazes de hidrolisar os carbapenêmicos, bem como codificar genes de resistência em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, aumentando a sua disseminação (WRIGHT, 2005). Acredita-se que o uso amplo e indiscriminado desses antimicrobianos tenha auxiliado na disseminação da resistência bacteriana, embora a produção das betalactamases por algumas bactérias, tenha ocorrido muito antes do aperfeiçoamento das terapias antimicrobianas (BARBOSA, TORRES, 1998).

No tratamento de infecções causadas pelas enterobactérias produtoras de ESBL, a última escolha terapêutica são os antibióticos carbapenêmicos (doripenem, ertapenem, imipenem e meropenem) (ANVISA, 2013). Os carbapenêmicos e as cefalosporinas são exemplos de antibióticos beta-lactâmicos com amplo espectro de atividade, que agem inibindo a síntese da parede celular bacteriana, desestruturando sua camada de peptidoglicano e predispondo a bactéria à lise celular, através da ligação e inativação das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) presentes na parede celular bacteriana (NETO, NICODEMO, VASCONCELLOS, 2007).

As principais estratégias de resistência aos carbapenêmicos são: a impermeabilidade de membrana frente ao antibiótico associada à produção de enzimas hidrolisadoras, as betalactamases; a degradação do antibiótico através

destas enzimas; e a proteção dos alvos do antibiótico por meio de alterações das PBPs. Em contrapartida, existem três tipos de inibidores de betalactamases: o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam, que agem, principalmente, inibindo as ESBL (DAVIN-REGLI et al., 2008).

Uma das principais carbapenemases de importância clínica é a enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), caracterizada por hidrolisar uma variedade de antibióticos beta-lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, cefalosporinas, penicilinas e aztreonam, e por apresentar uma grande capacidade de disseminação, devido à sua localização plasmidial ou à presença de elementos móveis de resistência (NAAS et al., 2008).

Ao longo dos anos, a busca por alternativas terapêuticas oriundas de plantas medicinais, vem aumentando gradativamente e, com isso, diversos estudos utilizando óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas e medicinais vêm mostrando suas atividades antimicrobianas, como é o caso dos óleos essenciais (OE) de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e palmarosa (*Cymbopogon martini*) (SANCHEZ, GARCIA, HEREDIA, 2010; SCHELZ, HOHMANN, MOLNAR, 2010).

O OE de tomilho tem como principal constituinte majoritário o timol, sendo a ele atribuída sua atividade antimicrobiana, devido a ação na parede celular bacteriana. O eugenol representa o constituinte majoritário do OE de cravo e, segundo relatos na literatura, apresenta propriedades antibacterianas e antifúngicas. O OE de palmarosa é rico em geraniol, um composto que igualmente apresenta atividade antimicrobiana, além de imunomoduladora e antitumoral (KEREKES et al., 2016).

Considerando a resistência antimicrobiana como uma problemática de grande impacto na saúde pública, principalmente no âmbito hospitalar, faz-se necessário um estudo a fim de isolar e identificar as enterobactérias multirresistentes, bem como avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e seus constituintes majoritários, visto que a opção terapêutica para as cepas multirresistentes é bastante restrita.

2 Objetivos

Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de palmarosa e tomilho e o sinergismo dos constituintes majoritários geraniol, timol e eugenol, frente a isolados clínicos hospitalares multirresistentes.

Objetivos específicos

- Identificar o perfil de resistência de bactérias isoladas provenientes de pacientes internados no Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas.
- Caracterizar os óleos de palmarosa e tomilho através de Cromatografia Gasosa acoplado ao espectrômetro de massas (CG/EM).
- Avaliar a atividade antioxidante dos compostos utilizando o ensaio *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP).
- Determinar atividade antimicrobiana destes compostos através da técnica de disco difusão, da concentração inibitória mínima (CIM), da concentração bactericida mínima (CBM) e através do monitoramento pelas curvas de viabilidade celular.

3 Revisão Bibliográfica

Família *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* é constituída por bactérias gram-negativas fermentadoras de glicose, as enterobactérias, predominantes nos gêneros *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus* e *Morganella* (NORDMANN, GIRLICH, POIREL, 2012). De acordo com Abera, Kribet e Mulu (2016), estão associadas à infecções no sistema nervoso central, vias respiratórias, sangue, feridas e locais do trato urinário e caracterizam-se pela sua rápida introdução no ambiente hospitalar, com grande capacidade de disseminação, resultando em consequências devastadoras (SUWANTARAT et al., 2016).

As enzimas carbapenemases aparecem com maior frequência nas enterobactérias, contudo, podem aparecer também em bactérias gram-negativas não fermentadoras, como em espécies de *Pseudomonas* e *Acinetobacter* (SANTELLA et al., 2012). Carbapenemases são enzimas mediadas por plasmídeos - estruturas circulares de DNA - e que conferem resistência a todos os antibióticos betalactâmicos. Apresentam uma grande capacidade de disseminação, devido à troca de material genético entre diferentes espécies e gêneros, através de sua estrutura plasmidial (ALVES, BEHAR, 2013). A Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou as enterobactérias produtoras de carbapenemases como uma das três maiores ameaças à saúde humana (BURNS et al., 2013).

As ESBL são um grupo de enzimas produzidas por determinadas bactérias que degradam antibióticos betalactâmicos de amplo espectro, como as cefalosporinas de terceira geração, penicilinas e monobactâmicos (STEWARTSON et al., 2013; ABERA, KIBRET, MULU, 2016). Também são frequentemente mediadas por plasmídeos, responsáveis pela rápida transmissão de genes de resistência entre as bactérias (VIAU et al., 2016).

De acordo com Alves e Behar (2013), a resistência aos betalactâmicos mais importante ocorre por meio das enzimas produtoras de betalactamases, que hidrolisam o anel betalactâmico dessa classe de antimicrobianos. Segundo os autores, os dois grupos mais preocupantes são justamente o grupo das ESBL e os da

carbapenemases, que hidrolisam os carbapenêmicos e também todas outras classes de betalactâmicos.

Em algum momento, quase todas as enterobactérias eram suscetíveis a antibióticos betalactâmicos de amplo espectro, incluindo a ceftriaxona, ceftazidima e cefotaxima. Lamentavelmente, nos últimos 30 anos, o surgimento e evolução das ESBL e carbapenemases, teve um grande impacto na terapia de doenças infecciosas, o que limitou a eficácia de todas as classes de betalactâmicos atualmente disponíveis (VIAU et al., 2016).

Classes de antimicrobianos

A terapêutica antimicrobiana consiste numa conduta fundamental e imprescindível no combate às infecções bacterianas e, em 1940, a terapia com penicilina tornou-se disponível em larga escala, dando início à era dos antibióticos (ALVES, BEHAR, 2013). Os agentes antimicrobianos podem ser classificados de acordo com seu principal mecanismo de ação, que consiste na interferência da síntese da parede celular bacteriana; inibição da síntese de proteína; interferência na síntese de ácidos nucleicos; ou inibição de uma via metabólica da bactéria (NEU, 1992).

Segundo Neu (1992), os antimicrobianos que interferem na síntese da parede celular são as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos, assim como os glicopeptídeos, incluindo a vancomicina. Eles agem inibindo a síntese da parede celular bacteriana, interferindo nas enzimas necessárias para a produção da camada de peptidoglicano da bactéria (McMANUS, 1997).

Os macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, streptograminas e oxazolidinonas produzem efeitos antibacterianos por inibição da síntese proteica da bactéria, pois agem a nível de ribossomos, estruturas celulares onde as proteínas são sintetizadas (McMANUS, 1997).

Tenover (2006) mostrou que as fluoroquinolonas por sua vez, agem através da interrupção da síntese de DNA, por induzir quebras durante a replicação do mesmo na célula, enquanto que as sulfonamidas e o trimetoprim bloqueiam a via para a síntese do ácido fólico, que, em última instância, inibe a síntese do DNA. O mesmo

relatou também que a comum combinação de trimetoprim, um análogo do ácido fólico, com o sulfametoxazol bloqueia a via enzimática para a síntese bacteriana de folato.

A ruptura da estrutura da membrana bacteriana pode ser um outro, embora menos caracterizado, mecanismo de ação. É postulado que as polimixinas exercem seus efeitos inibitórios aumentando a permeabilidade da membrana bacteriana, causando vazamento do conteúdo bacteriano. A daptomicina aparentemente insere sua cola lipídica na membrana da célula bacteriana, causando despolarização da membrana e eventual morte da bactéria (CARPENTER, CHAMBERS, 2004).

Quadro 1 - Principais grupos de antimicrobianos betalactâmicos e exemplos de antibióticos (CLSI, 2012).

GRUPO		ANTIMICROBIANO
Penicilinas		Ampicilina Piperacilina
Cefalosporinas	1ª Geração	Cefalotina Cefazolina
	2ª Geração	Cefuroxima Cefamandol
	3ª Geração	Ceftazidima Cefotaxima Ceftriaxona Cefoperazona
	4ª Geração	Cefepime
	Cefamicinas	Cefoxitina Cefotetan
Monobactâmicos		Aztreonam
Carbapenêmicos		Imipenem Meropenem Ertapenem Doripenem

3.2.1 Antibióticos Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos são exemplos de antibióticos betalactâmicos mais recentes, dos quais fazem parte deste grupo o imipenem, ertapenem e o meropenem (LIVERMORE, 1996). Eles possuem estrutura química semelhante à das penicilinas e apresentam maior potência, com um espectro antibacteriano mais amplo. Durante as últimas três décadas, o imipenem e outros carbapenêmicos, como meropenem, ertapenem e doripenem desempenharam um papel central na terapêutica antimicrobiana pelo fato de serem confiáveis e tratarem de forma eficaz infecções graves causadas por bactérias resistentes em pacientes muito debilitados (PEREZ et al., 2016).

Constituem os antimicrobianos terapêuticos de primeira escolha para infecções causadas por microrganismos multirresistentes, como as ESBL (GUPTA et al., 2011). Portanto, a crescente tendência mundial de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos representa uma ameaça aos cuidados de saúde nos dias atuais e está associada a elevada taxa de morbidade e mortalidade (VAN LOON, VOOR, VOS, 2018). Entre os fatores de risco associados à resistência aos carbapenêmicos estão o uso prévio destes antimicrobianos, comorbidades subjacentes, maior tempo de internação, ventilação mecânica, internação em unidade de terapia intensiva (UTI), cirurgias e transferência de ambientes de saúde (GAN, ENG, DHANOA, 2019).

Em 1985, o imipenem tornou-se o primeiro carbapenêmico comercialmente disponível e suas propriedades únicas levaram ao sucesso terapêutico contra infecções causadas por enterobactérias produtoras de ESBL. Infelizmente, isso também coincidiu com o surgimento inicial das ESBL entre as enterobactérias (PATERSON et al., 2004). Posteriormente, o meropenem foi lançado com o mesmo mecanismo de ação do anterior, contudo apresentou atividade relacionada à redução dos efeitos convulsivantes, observados no imipenem (NORRBY, 1995).

Essa classe de antimicrobianos é recomendada como terapia de primeira escolha para infecções graves causada por enterobactérias produtoras de ESBL (PITOUT, LAUPLAND, 2008). Entretanto, a emergente condição das enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos é um tanto preocupante, pois restringe as opções terapêuticas no tratamento dessas infecções e sua utilização está severamente comprometida, sendo, comumente associada com um prognóstico ruim (NORDMANN, CUZON, NAAS, 2009).

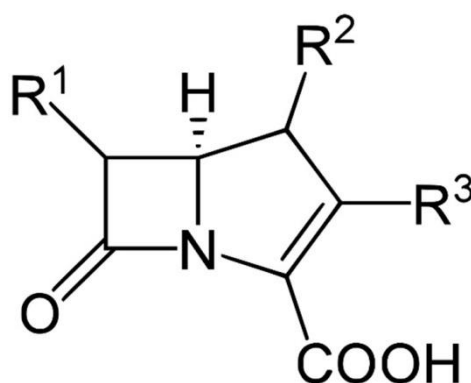


Figura 1 - Estrutura química geral dos antibióticos carbapenêmicos.

Mecanismos de resistência bacteriana

Múltiplos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos foram identificados, incluindo a produção de carbapenemases com capacidade hidrolisadora, superexpressão de bombas de efluxo e permeabilidade reduzida da membrana externa mediada por mutações de porinas (RIPABELLI et al., 2017). Os genes produtores de carbapenemases são transportados principalmente por plasmídeos e representam um potencial para ampla disseminação da resistência aos carbapenêmicos, associada aos surtos de infecção dentro e entre estabelecimentos de saúde (CELLA et al., 2017; VAN LOON, VOOR, VOS, 2018).

Conforme Tenover (2006), as bactérias podem manifestar resistência a medicamentos antibacterianos através de uma variedade de mecanismos. Algumas espécies de bactérias são inatamente resistentes a uma determinada classe de agentes antimicrobianos. Diante de tal perspectiva, todas as cepas dessa espécie bacteriana são igualmente resistentes aos membros dessas classes antibacterianas. A maior preocupação são os casos de resistência adquirida, onde populações de bactérias inicialmente suscetíveis, tornaram-se resistentes a um determinado agente antimicrobiano, aumentando ainda mais a sua proliferação através do uso desse antibiótico (TENOVER, 2006).

Vários mecanismos de resistência antimicrobiana são associados a uma variedade de gêneros bacterianos. Primeiramente, o microrganismo pode adquirir genes codificando enzimas, como as lactamases, que destroem o agente antibacteriano antes que ele possa exercer algum efeito. Em seguida, as bactérias podem produzir bombas de efluxo que extrudem o agente antibacteriano da célula antes que ele possa alcançar seu sítio alvo e exercer o seu efeito. Em terceiro lugar, as bactérias podem codificar genes para uma via metabólica que irão sintetizar uma parede celular alterada, a qual não contém o sítio de ligação do agente antimicrobiano, impedindo seu mecanismo de ação (TENOVER, 2006).

Sendo assim, as populações normalmente suscetíveis às bactérias podem tornar-se resistentes aos agentes antimicrobianos através de mutações e seleções, ou adquirindo através de outras bactérias a informação genética que codifica a resistência, a qual pode ocorrer através de vários mecanismos genéticos, incluindo

transformação, conjugação ou transdução (McMANUS, 1997). O mecanismo de troca genética possibilita que muitas bactérias se tornem resistentes à múltiplas classes de agentes antibacterianos, evento este, de grande problema para a saúde pública, principalmente em hospitais e outras instituições de saúde onde tendem a ocorrer mais comumente (TENOVER, 2006).

De acordo com Tenover (2006), as mutações nos genes bacterianos podem ser responsáveis por causar mecanismos de resistência, tais como: alteração na proteína alvo, a qual o agente antibacteriano se liga modificando ou eliminando o sítio de ligação; aumento na produção de enzimas que inativam o agente antimicrobiano; bem como alteração de um canal de proteína da membrana externa em que o fármaco requer para a entrada na célula; ou ainda, através de bombas reguladoras que expulsam a droga da célula, produzidas por *Staphylococcus aureus*, por exemplo (McMANUS, 1997).

As bactérias também desenvolvem resistência através da aquisição de material genético novo de outros organismos resistentes e pode ocorrer entre cepas da mesma espécie ou entre diferentes espécies ou gêneros bacterianos. Os mecanismos de troca genética incluem conjugação, transdução e transformação (McMANUS, 1997). Para cada um desses processos, os *transposons* - elementos genéticos móveis - podem facilitar a transferência e incorporação dos genes de resistência adquiridos no genoma do hospedeiro ou em plasmídeos bacterianos (TENOVER, 2006).

Durante a conjugação, uma bactéria gram-negativa transfere o plasmídeo contendo genes de resistência para uma bactéria adjacente, muitas vezes através de um alongamento denominado pilus. Na transdução, genes de resistência são transferidos de uma bactéria para outra via bacteriófago (vírus bacteriano). Finalmente, a transformação consiste no processo pelo qual as bactérias adquirem e incorporam segmentos de DNA de outras bactérias através da liberação do seu complemento de DNA no ambiente após lise celular, o que pode transformar genes de resistência em cepas anteriormente suscetíveis (TENOVER, 2006).

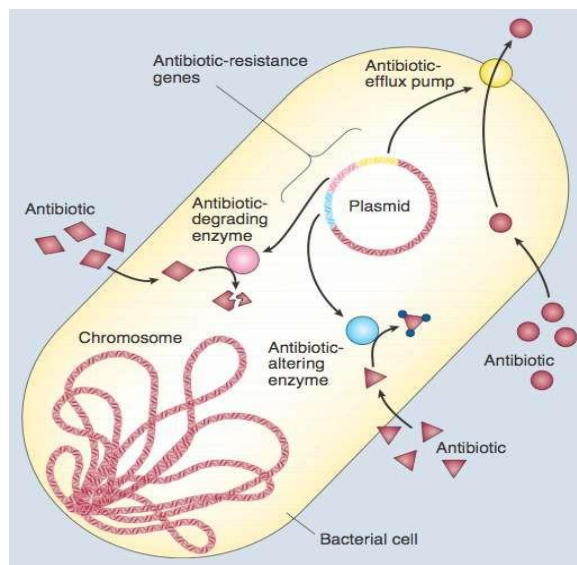


Figura 2 - Célula bacteriana com os principais mecanismos de resistência.
Fonte: Marshal; Levy, 2004.

***Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - KPC**

A KPC, é uma enzima de resistência produzida, inicialmente pela espécie *K. pneumoniae*, identificada pela primeira vez na Carolina do Norte, em 1996 (YIGIT et al., 2001). Contudo, estudos mostram que outras espécies de enterobactérias também são capazes de produzir esta enzima (DIENSTMANN et al., 2010).

De acordo com Nordmann, Cuzon e Naas (2009), a espécie de *K. pneumoniae* isolada foi resistente a todas as classes de betalactâmicos, bem como os carbapenêmicos, devido a sua capacidade de hidrólise do antimicrobiano. Entretanto, observou-se que as CIM foram diminuindo ligeiramente após a adição de ácido clavulânico, um inibidor da enzima betalactamase.

Os estudos bioquímicos mostraram que as enzimas KPC tem a capacidade de hidrolisar toda a molécula dos betalactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e monobactams. As Cefamicinas e ceftazidima são fracamente hidrolisadas, enquanto que imipenem, meropenem, ertapenem, cefotaxima e aztreonam são hidrolisados menos eficientemente do que as penicilinas e cefalosporinas de espectro estreito (YIGIT et al., 2001).

Segundo Yigit et al. (2001) as enzimas KPC podem ser confundidas com ESBL, uma vez que também hidrolisam cefalosporinas de amplo espectro. No entanto, ao

contrário das ESBL, as KPC apresentam atividade de hidrólise aos carbapenêmicos, conferindo assim, sua resistência mais preocupante.

Betalactamases de espectro estendido - ESBL

É uma enzima de resistência bacteriana, identificada pela primeira vez em 1983 na Europa, na bactéria *Klebsiella ozaenae*. Posteriormente, foi detectada em cepas de *E. coli*, as quais sofreram mutações e foram disseminadas através de plasmídios (KNOTHE et al., 1983). Desde então, as ESBL tem sido descritas no mundo todo, em diversas espécies da família *Enterobacteriaceae* e em bacilos gram negativos não fermentadores de glicose (BRADFORD, 2001).

As bactérias produtoras ESBL, surgiram como uma ameaça global à saúde humana e foram isolados das origens humanas, animais e ambientais. O uso pequeno, mas gradualmente crescente, de cefalosporinas de terceira geração pode estar ligado ao surgimento de bactérias produtoras de ESBL (SIHEM et al., 2015; ABAYNEH et al., 2019). As ESBL é o mecanismo de resistência mais comum e importante atualmente em enterobactérias, podendo reduzir a eficácia dos medicamentos modernos de cefalosporinas e monobactâmicos de espectro expandido, com exceção dos carbapenêmicos (LIVERMORE, 2008).

Livermore (2008), relatou que alterações, tais como inserções e deleções de aminoácidos na estrutura básica dessas enzimas, podem alterar seu espectro de atividade, aumentando sua habilidade em hidrolisar cefalosporinas de terceira e quarta gerações e monobactâmicos. São também caracterizadas por sofrerem inibição de compostos como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. De acordo com Nüesch-inderbinen e Stephan (2016), a produção de ESBL e a resistência a múltiplas drogas aumentam o risco de falha do tratamento empírico em diversas infecções.

Óleos essenciais - OE

As plantas são fonte de uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas, contribuindo para o desenvolvimento de novos agentes anti-infecciosos (SCHELZ, HOHMANN, MOLNAR, 2010). Dentre estas, os OE de plantas

aromáticas e medicinais têm ganhado destaque nas últimas décadas devido às suas propriedades antimicrobianas, com capacidade em inibir a formação de biofilme bacteriano e fúngico, sugerindo sua potencial utilização como conservante de alimentos e agentes desinfetante e antimicrobiano (SANCHEZ, GARCIA, HEREDIA, 2010; ADUKWU, ALLEN, PHILLIPS, 2012).

Os OE constituem-se de misturas complexas de compostos voláteis e semi-voláteis, geralmente lipofílicas, derivados da matéria-prima da planta por hidrodestilação, destilação a vapor ou destilação a seco, ou ainda, por um processo mecânico (SANGWAN et al., 2001). Alguns de seus componentes são os hidrocarbonetos terpênicos, álcoois, cetonas, aldeídos, ésteres, fenóis, ácidos orgânicos, dentre outros, presentes em diferentes concentrações, e apresentando um composto majoritário farmacologicamente ativo (KACHUR, SUNTRES, 2019).

Esses compostos não têm importância fisiológica para o crescimento da planta em si, e sua composição depende de vários fatores intrínsecos, como variações sexuais, sazonais e genéticas; e extrínsecos, como características ecológicas e ambientais (FIGUEIREDO et al., 2008; EDRIS, 2007; CHIZZOLA, 2010). Contudo, funcionam principalmente como mecanismos defensivos contra infecções bacterianas, virais e fúngicas. Além disso, devido ao seu forte sabor e odor, eles também podem atuar como impedimentos para os herbívoros (TROMBETTA et al., 2005) ou desempenhar um papel na polinização e dispersão dos frutos e sementes, atraindo insetos e outros animais (ABBAS et al., 2017).

De acordo com Nieto (2017) e Mamadalieva et al. (2017) as principais famílias de plantas portadoras de OE incluem: *Lamiaceae*, um grupo muito diversificado de ervas e arbustos aromáticos, incluindo lavanda, orégano, tomilho, hortelã-pimenta, sálvia e manjerona; *Apiaceae*, um grupo amplamente distribuído de plantas anuais, bienais e perenes, incluindo alcaravia e anis; *Rutaceae*, comumente conhecida como a família cítrica, composta de ervas, arbustos e árvores incluindo a laranja e limão; *Asteraceae*, com mais de 30.000 espécies de arbustos verdes, ervas rizomatosas, plantas perenes tuberosas e ervas de árvores, incluindo a família das margaridas, dos girassóis e dos cardoís e *Cupressaceae*, um grupo de coníferas, consistindo de árvores e arbustos (CARVALHO et al., 2018).

Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

A atividade antimicrobiana dos OE geralmente depende de sua composição química e das quantidades de cada componente ativo, um recurso comum a todos os extratos de plantas naturais. Existem vários estudos mostrando os efeitos biológicos dos OE e apontando sua utilização na indústria farmacêutica e cosmética - perfumes e produtos de maquiagem, bem como na indústria alimentícia - conservantes e aditivos, e na indústria química - produtos sanitários, agrícolas e em remédios naturais (KEREKES et al., 2016).

Há relatos elencando que os OE de manjerona e canela apresentam efeitos inibitórios contra *E. Coli* e biofilme de *Pseudomonas putida* (KEREKES et al., 2016). OE isolados de plantas da família *Lamiaceae*, assim como outras famílias, têm demonstrado agir como agentes antibacterianos contra um amplo espectro de cepas bacterianas patogênicas, incluindo *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Campylobacter jejuni* e *Salmonella enterica*. De acordo com Kerekes et al. (2016), o OE de tomilho e seu principal componente, o timol, apresentaram resultados satisfatórios de atividade antimicrobiana e inibição de biofilme.

As propriedades antibacterianas dos OE foram atribuídas aos seus constituintes bioativos, que agem de forma sinérgica e atuando em vários locais de ação à nível celular. O mecanismo de ação antibacteriano mais frequentemente relatado, inclui a ruptura da parede celular e da membrana, levando ao vazamento do conteúdo intracelular e à lise de bactérias (citólise). Outros mecanismos propostos de ação antibacteriana incluem: a inibição de bombas de efluxo, conhecidas por serem responsáveis pela resistência da bactéria; distúrbios no equilíbrio do trifosfato de adenosina (ATP), que alteram as atividades celulares mediadas por energia; assim como alteração na síntese proteica bacteriana (ZUO et al., 2010; ELSHAFIE, CAMELE, 2017).

Os OE possuem atividade antibacteriana, podendo agir isoladamente ou sinérgicamente com outros compostos presentes, assim como, foram relatadas atividades antimicrobianas do efeito sinérgico entre os OE e alguns antibióticos. Uzair et al. (2017) mostraram atividade sinérgica entre OE e amoxicilina contra infecções por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA). O sinergismo entre o óleo

de tomilho e as ciprofloxacinas mostrou máxima inibição de crescimento bacteriano (ALLAM, ELDRIENY, MOHAMED, 2015).

Foi demonstrado que os OE e seus constituintes são mais eficazes contra bactérias gram-positivas do que as gram-negativas, devido ao fato das gram-negativas possuírem a membrana rica em lipopolissacarídeo (LPS) e ser mais complexa, limitando a difusão de compostos hidrofóbicos por ela (GARVEY et al., 2011). Ausente nas bactérias gram-positivas, que são cercadas por uma parede peptidoglicana espessa, não é densa o suficiente para resistir às pequenas moléculas antimicrobianas, facilitando o acesso do composto à membrana celular (SILHAVY, KAHNE, WALKER, 2010; HYLDGAARD, MYGIND, MEYER, 2012).

Atividade antioxidante dos óleos essenciais

Os antioxidantes são conhecidos por desempenharem papel importante na proteção contra danos oxidativos. Estudos mostraram que alimentos ricos em antioxidantes contribuem na prevenção de certas doenças cardiovasculares e o câncer, por exemplo (FREI, 2004). A homeostase dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs) é essencial na proliferação e sobrevivência celular (D'AUTRÉAUX, TOLEDANO, 2007).

É sabido que os OE apresentam compostos bioativos com propriedades antioxidantes (BASCHIERI et al., 2017), e estudos apontam que os OE podem desempenhar um papel importante na prevenção da peroxidação e oxidação de lipídios, DNA e proteínas endógenas, através do sistema de defesa antioxidante não enzimático. Nas células de mamíferos, duas enzimas principais estão relacionadas ao sistema antioxidante enzimático: a glutathione peroxidase e a catalase. Ambas têm como principal função desintoxicar o peróxido de hidrogênio, reduzindo-o em água e oxigênio, diminuindo os níveis de produtos oxidativos e aumentando os sistemas de defesa antioxidante (NORDBERG, ARNÉR, 2001).

Nos últimos anos, os óleos essenciais foram ativamente investigados para substituir os antioxidantes sintéticos já existentes (BASCHIERI et al., 2017). Um resultado da inclusão de OE na dieta de herbívoros, mostrou uma melhoria do status antioxidante desses animais. Baschieri et al., (2017), constataram a atividade antioxidante dos OE de tomilho e orégano em alimentos e atribuíram aos seus

constituintes, timol e carvacrol, dois componentes fenólicos com atividade semelhante à dos antioxidantes sintéticos.

Timol

O timol (2-isopropil-5metilfenol) é um constituinte majoritário e comum dos OE derivados das plantas *Thymus* e *Origanum* e confere propriedades antimicrobianas a esses óleos (KACHUR, SUNTRES, 2019). O óleo de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), é conhecido por apresentar grandes quantidades de timol em sua composição. Além disso, este composto é atualmente usado em conjunto com a clorexidina nos enxaguantes bucais, para inibir bactérias orais (TWETMAN, PETERSSON, 1997). Foi postulado que o timol diminui a atividade enzimática e interrompe a integridade da membrana bacteriana, alterando suas reações proteicas (JUVEN et al., 1994).

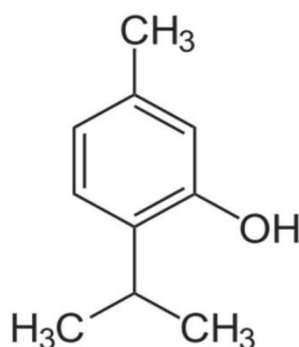


Figura 3 - Estrutura química do timol.

As propriedades antimicrobianas e os mecanismos de ação do timol, que se dá devido ao seu grupo hidroxil, demonstraram ser eficientes contra uma ampla gama de bactérias (WALSH et al., 2003; OUSSALAH et al., 2007), inibindo o crescimento de diversas espécies, como *S. aureus*, *E. coli*, *S. enterica* spp., *L. monocytogenes* e *Shigella sonnei* (TROMBETTA et al., 2005; OUSSALAH et al., 2007; KHAN et al., 2017). Oussalah et al. (2007) relataram que concentrações abaixo da CIM podem reduzir a taxa de crescimento das espécies bacterianas, mesmo aquelas que não foram completamente diminuídas por concentrações mais altas, como *P. aeruginosa*.

Um dos mecanismos pelos quais este composto inibe e reduz o crescimento bacteriano é atribuído aos seus efeitos prejudiciais na membrana celular da bactéria,

pois tem a capacidade de se integrar em sua membrana celular, causando alterações na função normal, levando ao aumento da permeabilidade (WALSH et al., 2003). Segundo Chauhan e Kang (2014) a ruptura da integridade da membrana foi confirmada como o principal mecanismo de ação do timol contra *S. enterica spp.*

Outros fatores que determinam a eficácia antibacteriana do timol e outros fenóis, incluem a carga líquida da superfície da membrana, bem como sua composição lipídica e a presença e concentração de LPS (TROMBETTA et al., 2005). Além da alteração na membrana celular da bactéria, outros mecanismos de ação do timol foram descritos, como a inibição da formação de biofilme bacteriano; da motilidade, através de seu efeito no flagelo do microrganismo; e da bomba de efluxo. Os autores constataram também, os efeitos sinérgicos do timol com antibióticos convencionais, podendo fornecer métodos alternativos para superar o problema de resistência a bactérias (MILADI et al., 2017).

Eugenol

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) é um hidroxifenilpropeno, com características anifpáticas, presente em uma variedade de plantas. Uma fonte particularmente boa desse propeno é o *Syzygium aromaticum*, comumente conhecido como cravo-da-índia, que é principalmente produzido na Indonésia, Índia, Malásia, Sri Lanka, Madagascar e Tanzânia (KAMATOU et al., 2012).

O óleo de cravo é usado para tratar muitas doenças, incluindo acne, asma, artrite reumatóide, cicatrizes, verrugas e várias alergias; como também usado como analgésico e anti-séptico geral na prática odontológica. Os principais constituintes polifenóis isolados do cravo são hidroxifenilpropenos, ácidos fenólicos e flavonóis. Dentre estes, o principal componente bioativo é o eugenol, sendo a ele atribuídas as atividades antimicrobiana deste OE (MARCHESE et al., 2017).

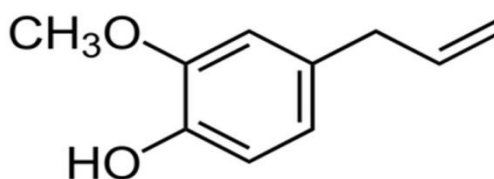


Figura 4 - Estrutura química do eugenol.

A atividade antimicrobiana do eugenol pode ser atribuída à presença de um grupo hidroxila livre na molécula (NAZZARO et al., 2013) que apresenta ação nas células bacterianas através de diversos mecanismos. Um deles é a perturbação da membrana citoplasmática, que aumenta a permeabilidade inespecífica da membrana e afeta o transporte de íons e ATP (DEVI et al., 2010; GILL, HOLLEY, 2006).

Em 2015, Biasi-Garbin et al. estudaram as alterações morfológicas e estruturais em células de *Streptococcus agalactiae* e observaram que após 5 horas de incubação com uma concentração inibitória de eugenol, as células apresentaram várias alterações na morfologia celular e rompimento da parede. Devi et al. (2010) a

valiaram a atividade antibacteriana do eugenol e seu mecanismo de ação contra *Salmonella typhi*. Esses autores mostraram que este composto apresenta ação na membrana celular bacteriana, alterando sua permeabilidade e ocasionando o vazamento de íons e perda de outros conteúdo celulares.

Em 2016, Das e colaboradores estudaram o mecanismo de ação do eugenol contra vários isolados de *S. aureus*, incluindo cepas resistente à vancomicina, e demonstraram que o eugenol foi capaz de desencadear a citotoxicidade celular devido à produção intracelular de EROs que induzem a inibição do crescimento celular, rompimento da membrana celular e danos ao DNA, resultando em decomposição celular e morte bacteriana. (HYLDGAARD et al., 2012). Vários relatos na literatura mostram a atividade antimicrobiana do eugenol frente à diversas bactérias como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (MARCHESE et al., 2017).

Geraniol

O geraniol (3,7-dimetil-oct-2,6-dien-1-ol) é um monoterpene isoprenóide acíclico, podendo ser extraído de OEs de várias plantas aromáticas, como capim-limão, limão, gengibre e a palmarosa. O geraniol tem sido amplamente utilizado nas indústrias de aromas e fragrâncias nas últimas décadas, e muitas pesquisas são focadas em um método eficaz para sua biossíntese, já que a obtenção via extração de plantas é limitada (LEI et al., 2019).

Recentemente, o geraniol demonstrou possuir várias propriedades farmacológicas, como antioxidantes, anti-inflamatórias (de CASSIA et al., 2013), antimicrobianas (SANTOS, NOVALES, 2012) e antitumorais (CARNESECCHI et al., 2004), através da regulação de várias vias de sinalização em diversos processos biológicos, sugerindo ser um candidato promissor ao desenvolvimento de medicamentos.

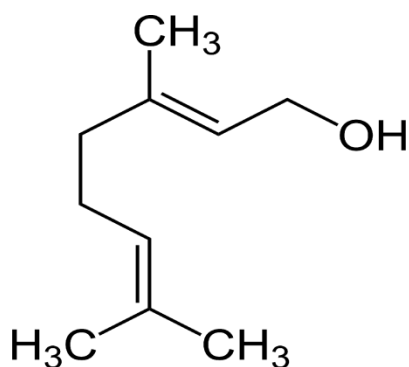


Figura 5 - Estrutura química do geraniol.

Um recente estudo mostrou que o tratamento com este composto enfraqueceu as atividades de espécies albicans e não albicans de *Candida*, bem como de dermatófitos. Administração oral do geraniol mostrou um efeito inibitório dependente da concentração na formação de biofilme de fungos patogênicos, bem como a destruição da função da parede celular fúngica (LEITE et al., 2015). Kannappan et al. (2017), demonstraram que quanto maiores as concentrações do composto utilizado no experimento com *Staphylococcus epidermidis*, maior a inibição do biofilme formado pela bactéria.

De acordo com Yue et al. (2017), o geraniol e outros constituintes dos óleos essenciais são particularmente atraentes como agentes antibacterianos porque eles não apenas podem inibir vários patógenos, mas também são agentes antibacterianos naturais.

4 Manuscrito

A metodologia e os resultados obtidos nesta dissertação serão apresentados em forma de manuscrito e representam a íntegra deste estudo. O presente manuscrito está formatado segundo as normas da revista a qual foi submetido: *Microbial Pathogenesis* (ISSN: 0882-4010).

Antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* and *Cymbopogon martini* essential oils and synergism of thymol, eugenol and geraniol constituents against multidrug resistant bacterial isolates

Camila De David Tessele Martini^a, Milena Mattes Cerveira^a, Helena Silveira Vianna^a, Edila Ferrer^a, Ivandra Ignês de Santi^b, Rogério Antônio Freitag^b, Diego Alves^c, Matheus D. Baldissera^d, Alexsandro da Silva Schefer^e, Janice Luehring Giongo^{a,f}, Rodrigo de Almeida Vaucher^{a*}

^a Laboratório de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular de Micro-organismos (LaPeBBioM), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brazil.

^b Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brazil.

^c Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelota, -RS, Brazil.

^d Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

^e Departamento de Saúde Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brazil.

^f Curso de Farmácia, Faculdade Anhanguera - Campus Pelotas, RS, Brazil.

***Corresponding author.**

Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

Email addresses: rodvaucher@hotmail.com (R A Vaucher)

ABSTRACT

Bacterial resistance to antimicrobials is a serious worldwide public health problem due to its high mortality rate and restricted therapeutic options. Among the common microorganisms associated with resistance mechanisms, it is possible to highlight bacteria of the *Enterobacteriaceae* family, producers of beta-lactamase enzymes, such as extended spectrum (ESBL) and carbapenemases (KPC). Over the years, the search for alternative therapies via medicinal plants has been gradually increasing and, with this, several studies using essential oils (EO) extracted from aromatic and medicinal plants have been showing their antimicrobial activities, as is the case with the EO *Thymus vulgaris* L. (TO) and *Cymbopogon martini* (PO), as well as some of their major constituents. The present study aimed to evaluate the antimicrobial activity of TO and PO and synergism of their major constituents (thymol, eugenol and geraniol) against multiresistant bacterial isolates. Bacteria were isolated from clinical samples of patients admitted into the School Hospital of the Federal University of Pelotas - RS, Brazil. Those identified with reduced carbapenemic sensitivity were submitted to phenotypic tests for carbapenemase enzymes detection. The characterization of the EO was performed and determination of its antioxidant activity was done with the Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay. Antimicrobial and synergistic activity of the EO and their major constituents were determined through minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and monitored by inhibitory curves in bacterial growth. FRAP results showed antioxidant activities of the extracts, especially geraniol. All the EOs and their major constituents presented antimicrobial activity. Thymol was the compound with the lowest MIC values, ranging from 3.51 to 9.37 $\mu\text{g mL}^{-1}$; followed by eugenol with 104.19 $\mu\text{g mL}^{-1}$. TO showed no antimicrobial activity against the most resistant isolates. According to the synergism results, a synergistic effect was evidenced only in the combination of thymol with eugenol. This study also found that, according to MBC values, thymol, as well as the other major constituents, presented both inhibitory and bactericidal activity against bacterial isolates. These results suggest that the tested EO and their major constituents, especially thymol, present potential as promising antimicrobial agents against multiresistant isolates.

Keywords: Antimicrobial Resistance; essential oils; thymol; eugenol; geraniol; ESBL; KPC.

1. Introduction

Bacterial resistance to antimicrobials is a serious public health problem, which has been alarmingly increasing worldwide, due to its high mortality rate and restrictions in therapeutic options, especially when occurs in the hospital environment [1]. Among the microorganisms commonly associated with resistance mechanisms are gram-negative bacteria of the *Enterobacteriaceae* family, producers of extended spectrum betalactamases (ESBL) as well as of carbapenemases enzymes (KPC, AmpC and metallo-carbapenemases). The most relevant strains with ESBL-producing bacteria are the *Klebsiella spp* and *Escherichia coli*, however, they have already been detected in several species of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* [2].

The production of carbapenemases enzymes by enterobacteria is an essential factor that confers resistance to them, since these enzymes are able to hydrolyze carbapenemic drugs, as well as encode resistance genes in mobile genetic elements such as plasmids, increasing their dissemination [3]. The widespread and indiscriminate use of these antimicrobials is believed to have aided in the spread of bacterial resistance, although the production of betalactamases by some bacteria occurred long before antimicrobial therapies were improved [4].

One of the major clinically important carbapenemases is the enzyme *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC), which is characterized by hydrolyzing a variety of beta-lactam antibiotics, including carbapenems, cephalosporins, penicillins and aztreonam, and has a high spreadability due to their location or the presence of mobile resistance elements [5].

Plants are the source of a variety of substances with antimicrobial properties, contributing to the development of new anti-infectious agents. Therefore, over the years the search for therapeutic alternatives from medicinal plants has been gradually increasing and, thus, several studies using essential oils (EO) extracted from aromatic and medicinal plants have been showing their antimicrobial activities, such as the case of essential oil *Thymus vulgaris* L. and *Cymbopogon martini*, popularly known as thyme (TO) and palmarosa oils (PO) [6, 7].

The major constituent of TO is thymol, and its antimicrobial activity is attributed to it due to its action on the bacterial cell wall. Eugenol represents the major constituent of clove EO and, according to reports in the literature, it has antibacterial and antifungal

properties. PO is rich in geraniol, a compound that also has antimicrobial as well as immunomodulatory and antitumor activity [8].

Considering antimicrobial resistance as a problem of great impact on public health, especially in hospitals, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of EOs and their major constituents in a synergistic way against multiresistant hospital clinical isolates.

2. Materials and methods

Sample collection, culture and bacterial identification

The samples used correspond to different biological materials from patients admitted into the School Hospital of the Federal University of Pelotas (HE-UFPel). This project was approved by the Ethics Committee on Research with Human Beings/UFPel (Report n°. 2.919.605). From these samples, bacterial isolates were obtained by culturing in blood agar (AS) and MacConkey (MC) medium and incubated in a microbiological greenhouse at 37°C for 24 hours. After colony growth, the bacterial inoculum was prepared and introduced into identification and antibiogram panels at a concentration of 1.5×10^8 CFU mL⁻¹, standardized by the McFarland turbidity scale, and revealed on the BD Phoenix 100 Automated Microbiology equipment for microorganism identification (ID) as well as antimicrobial susceptibility testing (AST).

Enterobacteria identified with decreased carbapenemic sensitivity were referred for phenotypic confirmation by presumptive detection of carbapenemase enzymes such as KPC, metallo-carbapenemase and AmpC. For this, the disk diffusion technique (Kirby-Bauer) was used on Mueller Hinton agar, using carbapenem antimicrobial disks (ertapenem, imipenem and meropenem) at concentrations of 10 µg. The bacterial resistance enzymes KPC, metallo and AmpC are blocked by certain concentrations of phenylboronic acid, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) and cloxacillin, respectively; therefore, 10 µL of each inhibitor were added to the antimicrobial discs and the plates were incubated in a microbiological oven at 37°C for 24 hours for further interpretation of the phenotypic test results by measuring the diameter of the inhibition zone diffused in the agar. Carbapenemase enzyme producers were considered to be strains that presented a halo around the inhibitor

greater than or equal to 5 mm in diameter in comparison to pure antibiotics, according to standardization of the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) [9].

Isolated bacteria with their resistance markers are described in Table 1. Among them, microorganisms of interest were selected through a primary screening through the disk diffusion technique, for subsequent filtering of the samples that obtained inhibition from the antimicrobial activity of the bacteria compounds.

Acquisition of essential oils and majority constituents

TO was extracted at the Natural Products Research Laboratory (NPRL), which belongs to the Forensic Chemistry course of the Federal University of Pelotas (UFPeL). The method used to extract the essential oil was hydrodistillation using a Clevenger apparatus. Previously pulverized in a cutting mill, 100g of dry leaves were placed together with distilled water in a 2.000 mL volumetric flask. The balloon was attached to a Clevenger apparatus and the extraction was performed for a period of 4 hours according to Brazilian Pharmacopoeia (2010) [10]. The essential oil was removed with the aid of a Pasteur pipette and dried over Anhydrous Sodium Sulfate. The oil was then stored in a hermetically sealed glass vial and wrapped in aluminum foil under refrigeration of -4°C until use. PO was purchased commercially from the Ferquima Indústria e Comércio company (Vargem Grande Paulista, Brazil). The major constituents thymol (Cas nº. 89.83-8), eugenol (Cas nº. 97.53-0) and geraniol (Cas nº. 106.24-1) were purchased from the Sigma-Aldrich company (Sao Paulo, Brazil).

Characterization of oils

The characterization of TO and PO was performed after previous preparation of the oils that were subjected to chromatographic analysis on GC/MS equipment, brand Shimadzu QP2010, equipped with a split/splitless divider. An Rtx-5MS Restek capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) was used under the following chromatographic conditions: helium gas carrier obtained by electron impact fragments at a rate of 70 eV of 1.27 mL/min, split flow of 1:50 and injected sample volume of 1 µL [11]. Programmed oven temperature: The initial temperature was 40°C with a heating ramp of 5°C/min to 280°C, remaining stable at this temperature for 10 minutes, totaling a run of 58

minutes, with injector and interface temperatures of 280°C [11]. Compounds were analyzed using NIST08 GC/MS library [11]. The identification of TO and PO constituents was based on the Retention Index (RI), determined with reference of the homologous C7-C30 n-alkane series under similar experimental conditions, comparing with the similar mass of the mass spectrum of the NBS Library and that described by Adams (1995) [11, 12, 13]. The relative amounts of the individual components were calculated based on the GC peak area (FID response) [11].

FRAP assay

For the determination of the antioxidant capacity of TO, PO, thymol, eugenol and geraniol, the Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay was employed, following the methodology described by Benzie and Strain (1999) [14], adapted to the Cobas Mira® automated system (Roche Diagnostics, Switzerland). The FRAP assay reagent was prepared from a combination of acetate buffer solution with TPTZ (2,4,6-tris (2-pyridyl)-s-triazine), and aqueous ferric chloride solution. At acid pH, the complex Fe^{3+} is reduced to Fe^{2+} and forms an intense blue solution. As a reference, FRAP reagent solution was used and the absorbance was measured at 600 nm. For the calibration curve, FeCl_2 was used as a standard in concentrations ranging from 50 to 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The results were expressed in $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Diffusion Disk

A screening assay was performed using the disk diffusion technique (Kirby-Bauer) to select bacteria of interest that obtained satisfactory results in relation to the antimicrobial activity of the EOs and their major constituents, aiming to then proceed with the microdilution technique described in the item below. Among the isolated bacteria, the ones chosen for the disk diffusion technique were: *Escherichia coli* (1), *Klebsiella pneumoniae* ESBL and KPC (2), *Klebsiella pneumoniae* ESBL and KPC (3), *Klebsiella pneumoniae* ESBL and KPC (4), *Klebsiella pneumoniae* ESBL and KPC (5) and *Pseudomonas aeruginosa* (6).

The bacterial inoculum was obtained and adjusted to McFarland turbidity scale 0.5 (1.5×10^8 UFC mL^{-1}) with spectrophotometer at 600 nanometers (nm), and then

seeded in plates containing Mueller-Hinton agar culture medium. Filter paper discs containing 10 μL of each pure compound (TO, PO, thymol, eugenol and geraniol), a disc containing 10 μL of the mixed major compounds and a negative control disc containing 10 μL of dimethylsulfoxide (DMSO) were added. Afterward, the plates were incubated at 37°C for 24 hours. The reading was based on the size of the inhibition halo (mm) formed by the compound around the disk, all tests being performed in duplicate.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

Among the bacteria screened in the disk diffusion technique, the ones chosen for microdilution, with their respective caption, were: *Escherichia coli* (1), *Klebsiella pneumoniae* ESBL and KPC (2), *Klebsiella pneumoniae* ESBL and KPC (3), *Klebsiella pneumoniae* ESBL and KPC (4) and *Klebsiella pneumoniae* ESBL and KPC (5).

MIC determination was performed via the microdilution technique according to CLSI method M7-A6. The EOs and major compounds were prepared with a 1:2 dilution in 50% DMSO sterile tube, so that the final concentrations of TO, PO, thymol, eugenol and geraniol stock solutions were 464.200, 447.000, 150, 533.500, and 439.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. Compounds were stored at 4°C to minimize volatilization. Assays were performed in 96-well microplates (one plate per bacterium), with 100 μL of Mueller-Hinton broth with 100 μL of the compounds added in the first wells. Starting at the first well, serial dilution succeeded to the tenth well of the plate. After serial microdilution, 10 μL of bacterial inoculum at the scale of 0.5 McFarland (1.5×10^8 CFU mL^{-1}) were added to all wells and the microplates were incubated for 24 hours at $35 \pm 2^\circ\text{C}$. A negative control containing only the culture medium and a positive control for bacterial growth containing culture medium and 10 μL of the inoculum were performed. MIC was defined as the lowest concentration of the compound that inhibited microbial growth and was observed through turbidity of the culture medium in the microplate wells after centrifugation. These assays were performed in duplicate and the MBC was determined after seeding of 1 μL of the MIC, $\frac{1}{2}$ MIC and MIC x 2 well contents in Mueller-Hinton agar. They were then incubated for 24 hours at 37°C for subsequent verification of presence growth of bacterial colonies.

Synergism

Among the bacteria screened in the microdilution technique, the ones chosen for the synergism assays were: *Escherichia coli* (1), *Klebsiella pneumoniae* ESBL and KPC (2), *Klebsiella pneumoniae* ESBL and KPC (3) and *Klebsiella pneumoniae* ESBL and KPC (4).

Synergism was determined by the 96-well microdilution technique, using one plate for each bacterium. There was crossover through serial dilution only for the major compounds thymol, eugenol and geraniol. To all wells of the plate, 100 μL of Mueller-Hinton broth were added, then 100 μL of compound A (thymol and geraniol) were added to the first well following the base 2 serial dilution. Subsequently, 100 μL of compound B (eugenol) were added and crossing of the different concentrations of the compounds was realized. At the end, 10 μL of bacterial inoculum at the scale of 0.5 McFarland ($1.5 \times 10^8 \text{ CFU mL}^{-1}$) were added to all wells. The microplates were incubated for 24 hours at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ and the results were observed after centrifugation. This test was performed in duplicate in two independent experiments.

Interpretation of the checkerboard results was performed using the inhibitory fractional concentration index (FICI), obtained by the following formula: $\text{FICI} = (\text{MIC}_{\text{major A combined}} / \text{MIC}_{\text{major A alone}}) + (\text{MIC}_{\text{major B combined}} / \text{MIC}_{\text{major B alone}})$. FICI results were interpreted as follows: $\text{FICI} \leq 0.5$ = Synergism; $0.5 < \text{FICI} \leq 4$ = Indifference and $\text{FICI} > 4$ = Antagonism [15].

Bacterial Growth Inhibition Curve

Macrodilution was performed in duplicate using sterile microtubes, where 200 μL of Mueller-Hinton broth, 200 μL of the compounds at concentrations corresponding to $\frac{1}{2}$ MIC, 1x MIC and 2x MIC and 10 μL of the bacterial inoculum at a scale of 0.5 McFarland were introduced. The growth curve was monitored at intervals of 0, 6, 12, 24 and 48 hours of incubation by seeding 1 μL of the microtube content in Mueller-Hinton agar and incubating for 24 hours at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for quantification of colonies. For validation of the assays, a negative control (culture medium only) and a positive control (culture medium with bacterial inoculum) were used.

Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) for two independent determinations for each experimental point. Data were analyzed with software package GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego- CA, USA). The data from the synergism experiment were submitted to analysis of variance (oneway ANOVA) followed by Tukey test ($p < 0.05$).

3. Results

Insulation resistance profile

The resistance profile of the isolated bacteria is described in **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, with their phenotypes, resistance markers and respective resistant antimicrobials. Among the isolated bacteria, 73% belong to the *Enterobacteriaceae* family. Regarding resistance markers, 19% correspond to ESBL and 14% are KPC + ESBL markers; 3% are *Staphylococcus* producer of betalactamase (BLACT) and 3% *Enterococcus faecium* resistant Vancomycin (VRE). The remaining 62% correspond to bacteria without resistance markers.

Table 1 - Resistance profile of isolated bacteria (Manuscript).

Resistance Markers (RM)	Isolated bacteria	Antimicrobial	N	N (%)	% por RM	
BLACT	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ampicillin	1	3%	3%	
		Penicillin				
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Cefepime	1	3%	19%	
		Ceftriaxone				
		Ceftazidime				
		Ertapenem				
		Imipenem				
ESBL	<i>Escherichia coli</i>	Cefepime	2	5%		
		Ceftriaxone				
		Ceftazidime				
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cefepime	4	11%		
		Ceftriaxone				
		Ceftazidime				
		Ertapenem				
ESBL/KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cefepime	5	14%	14%	
		Ceftriaxone				
		Ceftazidime				
		Ertapenem				
		Imipenem				
		Meropenem				

VRE	<i>Enteococcus faecium</i>	Vancomycin	1	3%	3%
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Imipenem	2	5%	62%
		Meropenem	1	3%	
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Ertapenem			
		Imipenem	1	3%	
		Meropenem			
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Ertapenem	2	5%	
	<i>Escherichia coli</i>		7	19%	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		2	5%	
	<i>Morganella morganii</i>		1	3%	
	<i>Proteus mirabilis</i>	Ertapenem	1	3%	
		Meropenem			
			1	3%	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Imipenem	4	11%	
		Meropenem			
			1	3%	
			37	100%	100%

BLACT - *Staphylococcus* producer of betalactamase; ESBL - producers of extended spectrum betalactamases; KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; VRE - *Enterococcus faecium* resistant Vancomycin.

Characterization of essential oils

The results of PO and TO chemical analysis are presented in Table 2. The following major compounds for PO were identified: geraniol (35.27%), neral (13.09%) and geranyl acetate (9.68%). TO presented the following as its major compounds: thymol (49.27%), p-cyme (20.18%) and carvacrol (11.86%).

Table 2 - Composition of the PO and TO (Manuscript).

Compounds	<i>Cymbopogon martini</i> (PO)		<i>Thymus vulgaris</i> (TO)	
	RI ^a	RI ^b	(%)	(%)
α -thujene	932	931		0.75
α -pinene	937	939		1.62
α -camphene	953	953		1.23
β -pinene	980	980		0.57
β -Myrcene	991	989	1.71	0.34
α -terpinene	1018	1019		1.27
p-Cimene	1026	1027	5.82	20.18
1.8 cineole	1037	1033		0.95
γ -terpinene	1062	1061		1.45
Linalool	1098	1099	2.09	1.11
Camphenol	1109	1112	0.65	
Camphor	1142	1143		0.18
Borneol	1161	1166		0.71
Terpin-4-ol	1179	1177		1.09
α -terpineol	1185	1189		2.43

Nerol	1228	1228	1.83	
Neral	1240	1141	13.09	
Geraniol	1255	1253	35.27	
Thymol	1291	1292		49.27
Carvacrol	1298	1296	0.45	11.86
E-Citral	1341	1341	3.17	
thymol acetate	1356	1355		0.09
Geranyl acetate	1383	1380	9.68	
β -Elemene	1391	1388	4.35	
β -Caryophyllene	1418	1419	5.92	2.57
α -humelene	1451	1454		0.39
Neryl propanate	1454	1459	1.69	
Aromandrene	1461	1460	0.81	
Geranyl propionato	1476	1475		0.08
germacreno D	1483	1480		0.25
Valencene	1491	1489	0.36	
(Z)-Nerolidol	1534	1533	1.57	
α -cadidene	1540	1538		0.17
Elemol	1549	1550	0.29	
Geranyl butyrate	1562	1561	1.63	
Caryophyllene oxide	1581	1580	2.79	0.41
Globulol	1583	1585	0.91	
Viridiflorol	1590	1593	1.13	
(E,E)-Farnesol	1722	1725	4.52	
Total identified (%)			99.73	99.97

Relative proportions of the essential oil constituents were expressed as percentages. ^aRetention indices from literature (Adams, 1995). ^bRetention indices experimental (based on homologous series of *n*-alkane C₇-C₃₀) [11].

FRAP Test

The antioxidant activity of the oils and majority constituents via the FRAP method can be seen in Figure 1. Geraniol is the compound that most exhibits antioxidant activity, with a value of 1060 $\mu\text{mol/L}$, followed by TO (980 $\mu\text{mol/L}$) and thymol. (850 $\mu\text{mol/L}$), compared to the positive control, vitamin C.

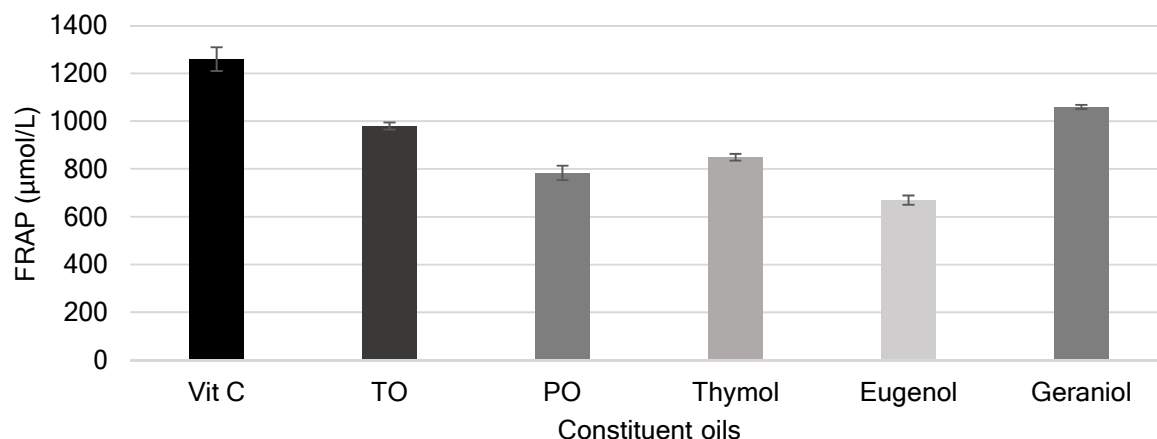


Figure 1 - Antioxidant activity of major oils and constituents in the FRAP assay (Manuscript).

Evaluation of antimicrobial activity

Disc Diffusion

Halo diameter measurement values in mm are described in Table 3. Eugenol represents the compound that most induced inhibition of bacteria, with halo averages ranging from 10 to 15 mm, followed by thyme, with a halo of 10 to 16 mm. The most inhibited bacteria was *Klebsiella pneumoniae* ESBL and KPC (3), with a halo average of 11.33 mm in relation to all tested compounds. *Pseudomonas aeruginosa* (6) showed no inhibition halo for any compound, representing the most resistant bacteria against the EOs and its major constituents. For this reason, it was not used for the microdilution technique.

Table 3 - Halo diameter measurement values in mm (Manuscript).

Diffusion Disk (mm)						
Bacteria	Thymol	Geraniol	Eugenol	TO	PO	Synergism
1	0	11	15	12	8	13
2	0	11	10	10	0	10
3	4	12	14	16	11	11
4	9	10	14	13	7	10
5	7	10	15	13	5	12
6	0	0	0	0	0	0

(1) *E. coli*; (2) *K. pneumoniae* ESBL e KPC; (3) *K. pneumoniae* ESBL e KPC; (4) *K. pneumoniae* ESBL e KPC; (5) *K. pneumoniae* ESBL e KPC; (6) *Pseudomonas aeruginosa*.

Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration

The MIC and MBC results for EOs and their major constituents against enterobacteria are described in Tables 4 and 5, respectively. We can see that the compound with the lowest MIC values was thymol, ranging from 3.515 to 9.375 µg / mL, confirming its effective antibacterial activity. Then we have eugenol, with an MIC value of 104.19 µg / mL for all bacteria. PO was the compound that presented the highest concentrations against bacterial isolates, while TO, for the most resistant strains, did not inhibit growth in any of the tested concentrations. MBC results show that there was a bactericidal effect, with values equal to or very close to MIC for all major compounds.

Table 4 - Minimum inhibitory concentration (MIC) of the major compounds in µg/mL (Manuscript).

Bacteria	Majority Constituents					
	Thymol		Geraniol		Eugenol	
	MIC (µg/ml)	CBM (µg/ml)	MIC (µg/ml)	CBM (µg/ml)	MIC (µg/ml)	CBM (µg/ml)
1	3.515	3.515	42.91	64.37	104.19	104.19
2	9.375	9.375	2059.9	2059.9	104.19	104.19
3	3.515	3.515	85.83	85.83	104.19	104.19
4	7.031	9.375	343.35	343.35	104.19	104.19
5	3.515	3.515	708.17	729.63	104.19	104.19

(1) *E. coli*; (2) *K. pneumoniae* ESBL e KPC; (3) *K. pneumoniae* ESBL e KPC; (4) *K. pneumoniae* ESBL e KPC; (5) *K. pneumoniae* ESBL e KPC.

Table 5 - Minimum inhibitory concentration (MIC) of the OE in µg/mL (Manuscript).

Bacteria	Essencial oils (µg/ml)	
	TO	PO
1	11605	349.21
2	*	13.968.725
3	*	1.125
4	2901.25	523.82
5	*	1047.65

(1) *E. coli*; (2) *K. pneumoniae* ESBL e KPC; (3) *K. pneumoniae* ESBL e KPC; (4) *K. pneumoniae* ESBL e KPC; (5) *K. pneumoniae* ESBL e KPC.

Synergism

The checkboard results described in Table 6 below show that there was synergism only in the combination of thymol with eugenol for bacteria 1, 2 and 4, while there was indifference for bacterium 3. Regarding the combination of thymol with geraniol, and eugenol with geraniol, the results show indifference for bacteria 1 and 2, and antagonism for bacteria 3 and 4.

Table 6 - *In vitro* combinations among majorities against multidrug-resistant bacteria. (Manuscript).

Isolates	Combinations					
	Thymol/Eugenol		Thymol/Geraniol		Eugenol/Geraniol	
	MIC	FICI (X)	MIC	FICI (X)	MIC	FICI (X)
1	0.58/52.1	0.5 (S)	4.68/686.7	2.5 (I)	104.2/687.7	3.0 (I)
2	0.58/52.1	0.5 (S)	0.58/171.6	1.7 (I)	104.2/171.6	2.64 (I)
3	4.68/104.1	1.49 (I)	4.68/1373	4.49 (A)	104.1/1373	4.99 (A)
4	1.17/52.1	0.5 (S)	1.17/2746	8.1 (A)	104.1/2746	8.9 (A)

Thymol; Eugenol; Geraniol; minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$); FICI, fractional inhibitory concentration index; X, FICI interpretation; S, synergism; I, indifference; A, antagonism.

Bacterial Growth Inhibition Curve

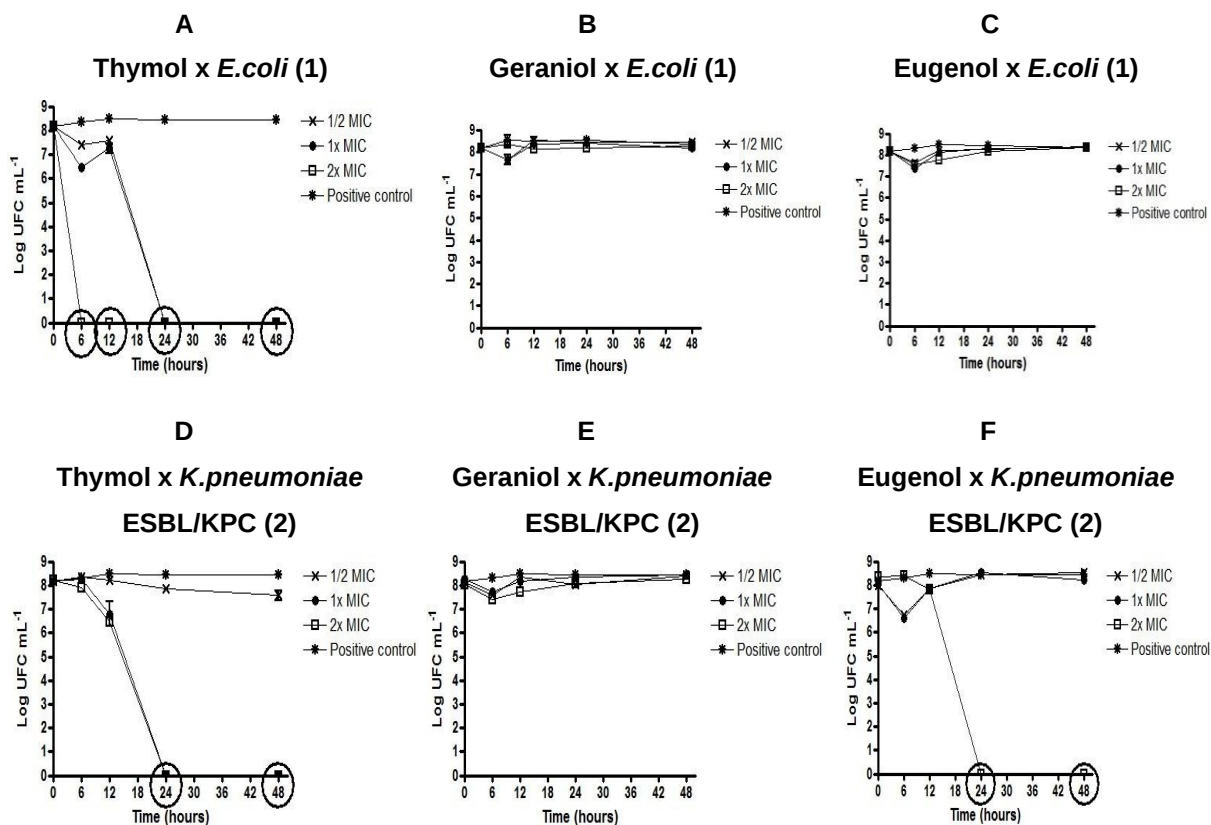
The results indicate a significant reduction in CFU (Colony Forming Units) at 6 hours of incubation of *E. coli* (1) against thymol at 2x MIC concentration. This indicates approximately 8 log of inhibition at this time. The thymol $\frac{1}{2}$ MIC and 1x MIC concentrations were able to significantly decrease the count within 24 hours, with a decrease of approximately 7 log if compared with the positive control (Figure 7A). We can see below that for geraniol and eugenol there was no significant reduction in CFU values for *E. coli* (1) after 48 hours of incubation of the bacteria at different tested concentrations when compared with the positive control (Figure 2B and 2C).

Regarding *K. pneumoniae* ESBL/KPC (2), we can see a reduction of CFU within 24 hours of incubation with thymol at concentrations of 1x MIC and 2x MIC. This indicates inhibition of approximately 7 log at this time. On the other hand, thymol at concentrations of $\frac{1}{2}$ MIC showed no significant reduction when compared with the positive control (Figure 2D). Geraniol showed no significant reduction in CFU values

(Figure 2E), while eugenol decreased it by approximately 8 log at 2x MIC concentration within 24 hours of incubation (Figure 2F).

The results indicate a significant reduction of CFU within 12 hours of incubation for *K. pneumoniae* ESBL/KPC (3) with thymol having bactericidal action at 2x MIC concentration. This indicates inhibition of approximately 7 log at this time. On the other hand, thymol at concentrations of 1x MIC were able to significantly decrease the count within 24 hours (Figure 2G). Below, It is possible to observe that geraniol presented reduction in CFU at 2x MIC concentrations within 48 hours of incubation (Figure 2H), whereas eugenol induced CFU reduction by approximately 7 log at 2x MIC concentrations within 12 hours of incubation (Figure 2I).

The results indicate a significant reduction of CFU within 48 hours of incubation of *K. pneumoniae* ESBL/KPC (4) with thymol at a concentration of 2x MIC and 1x MIC. This evidences inhibition of approximately 7 and 8 log at these times, respectively (Figure 2J). Below, it is possible to note that geraniol and eugenol presented no significant reduction in CFU at all concentrations tested for this bacterium (Figure 2K and 2L).



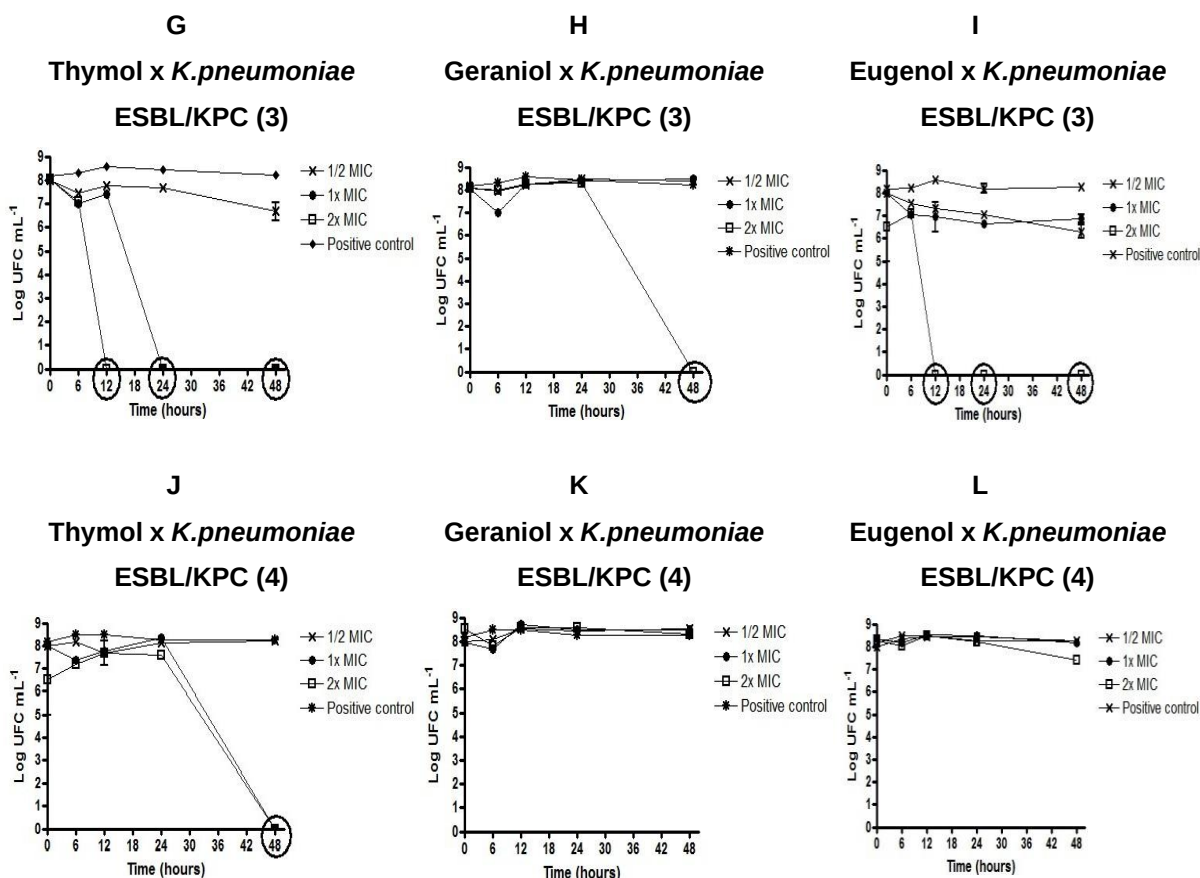


Figure 2 - Growth inhibition curve in different bacteria tested against major constituents (A, D, G, J) Thymol, (B, E, H, K) Geraniol e (C, F, I, L) Eugenol (Manuscript).

4. Discussion

Among the isolated bacteria, 73% belong to the *Enterobacteriaceae* family, which is often associated with resistance mechanisms detected in clinical laboratories. The *Enterobacteriaceae* family is comprised of glucose-fermenting gram-negative bacteria, the enterobacteria, predominant in the genera *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Morganella* [16]. According to Abera et al. (2016) [17], they are associated with infections in the central nervous system, in airways, blood, wounds and urinary tract sites and are characterized by their rapid introduction into the hospital environment, with widespread dissemination, resulting in devastating consequences [18]. Betalactamases enzymes appear most frequently in enterobacteria, however, they may also appear in non-fermenting gram-negative bacteria, such as the *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species [19].

We can see that 19% of the resistance markers correspond to ESBL, these being the most frequently detected in clinical isolates. Abayneh et al. (2019) [20] have already described that ESBL comprise the most common and important resistance mechanism in enterobacteria today and may reduce the effectiveness of modern expanded-spectrum cephalosporin and monobactam drugs [3]. ESBL are also often mediated by plasmids, which are responsible for the rapid transmission of resistance genes between bacteria [21].

Following that, with a presence of 14%, the resistance marker KPC + ESBL was detected, with KPC being an enzyme initially produced by *K. pneumoniae*, first identified in North Carolina in 1996 [22]. However, studies show that other species of enterobacteria are also capable of producing KPC [23]. According to Nordmann, Cuzon and Naas (2009) [24], the isolated *K. pneumoniae* species were resistant to all classes of betalactamics as well as carbapenemics due to its antimicrobial hydrolysis capacity. The great rise of KPC enzymes today occurs because of their spreading capacity, due to their plasmid localization or the presence of mobile resistance elements [5]. The World Health Organization (WHO) has classified carbapenemase-producing enterobacteria as one of the three major threats to human health [25].

EOs extracted from plants appears as a promising alternative in the treatment of infections caused by various microorganisms. They consist of complex mixtures of volatile and semi-volatile compounds, usually lipophilic, derived from the plant's raw material via hydrodistillation, steam distillation, dry distillation, or by a mechanical process [30]. Some of their components are terpene hydrocarbons, alcohols, ketones, aldehydes, esters, phenols, organic acids, among others, present in different concentrations, and presenting a pharmacologically active major compound [31]. They have no physiological importance for plant growth per se, and their composition depends on several intrinsic factors, such as sexual, seasonal and genetic variations; and extrinsic factors, such as ecological and environmental characteristics [32, 33, 34]. However, they function primarily as defensive mechanisms against bacterial, viral and fungal infections. Moreover, due to their strong taste and odor, they can also act as impediments to herbivores [35] or play a role in pollination and dispersal of fruits and seeds by attracting insects and other animals [36].

According to Nieto (2017) [37] and Mamadalieva et al. (2017) [38] the major families of EO-bearing plants include: *Lamiaceae*, a very diverse group of herbs and aromatic shrubs, including lavender, oregano, thyme, peppermint, sage and marjoram; *Apiaceae*, a widely distributed group of annual, biennial and perennial plants, including caraway and anise; *Rutaceae*, commonly known as the citrus family, consisting of herbs, shrubs and trees, including orange and lemon; *Asteraceae*, with over 30,000 species of evergreen shrubs, rhizomatous herbs, tuberous perennials and tree herbs, including the daisies, sunflowers and cardo family [39]; and *Cupressaceae*, a group of conifers consisting of trees and shrubs.

The antioxidant activity of EOs and major constituents using the FRAP assay was found in all tested compounds. Geraniol is the compound that showed the most antioxidant activity, followed by TO and thymol. The compound with the least antioxidant activity was eugenol, when compared with the positive control, vitamin C. The FRAP assay [18] is based on the ability of phenols to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} , which is accompanied by the formation of a colorful complex with Fe^{2+} . This complex has an intense blue color, which can be quantified spectrophotometrically at 600 nm, which is proportional to the amount of reducer species present in the sample [20]. According to reports in the literature, geraniol is directly linked to antioxidant action, stimulating the activity of antioxidant enzymes, such as catalase, and inhibiting the amount of proinflammatory cytokines, confirming its anti-inflammatory and antioxidant activity [40].

The antibacterial properties of EOs have been attributed to their bioactive constituents, which act synergistically and at various sites of action at cellular level. Burt (2004) [41] found that the bacteriostatic and/or bactericidal activity of EOs is mainly exerted by terpenoid and phenolic compounds, most of which are the major constituents of EOs. The most frequently reported antibacterial mechanism of action includes cell wall and membrane rupture, leading to intracellular content leakage and bacterial lysis (cytolysis). Other proposed mechanisms of antibacterial action include: inhibition of efflux pumps, known to be responsible for bacterial resistance; ATP balance disorders, which alter energy-mediated cellular activities; as well as alteration in bacterial protein synthesis [41, 42, 43, 44]. Pereira et al. (2004) [45] showed that antimicrobial activity using EOs extracted from *Salvia officinalis* L. presented more than 96% effectiveness in fighting *E. coli*, 100% in fighting *K. pneumoniae*, over 83% in

fighting *Proteus mirabilis*, 75% in fighting *Morganella morganii*, 100% in fighting *Enterobacter aerogenes*, 100% in fighting *Klebsiella oxytoca* and showed no effect on *P. aeruginosa*, in the same way that the present work did not obtain inhibition results in the disk diffusion technique for this bacterium.

According to Kerekes et al. (2016) [8], TO and its main component, thymol, showed satisfactory results of antimicrobial activity and inhibition of bacterial biofilm with MIC values less than 1 mg/mL. In this study, the antibacterial activity of thymol with MIC values of less than 1 mg/mL was also noted and confirmed. In addition, according to MBC values, it can be concluded that thymol, as well as the other major constituents, presented both inhibitory and bactericidal activity against bacterial isolates. Thymol (5-methyl-2-isopropylphenol) is a major and common constituent of thymus and organum-derived EOs and confers antimicrobial properties to these oils, which are attributed to the hydroxyl group present in their structure [5,10,16,17]. It has been postulated that thymol decreases enzymatic activity and disrupts the integrity of the bacterial membrane, altering its protein reactions [2, 3, 15]. Oussalah et al. (2007) [46], reported that concentrations below the MIC may reduce the growth rate of bacterial species, even those that have not been completely decreased by higher concentrations, such as *P. aeruginosa*. Kerekes et al. (2016) [8] reported that thymol is the compound with the best antimicrobial activity among EOs, with the ability to eliminate bacterial biofilm in strains of *E. coli* and *Listeria monocytogenes*. However, in the same study, the authors found that *Pseudomonas putida* was the most oil-resistant bacteria.

Eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol) is an amphipathic hydroxyphenylpropene present in a variety of plants, the best known being the clove. The antimicrobial activity of eugenol can be attributed to the presence of a free hydroxyl group in the molecule [47], which has action on bacterial cells through several mechanisms. One is cytoplasmic membrane disturbance that increases nonspecific membrane permeability and affects ion and ATP transport [48, 49, 50]. In the present study, eugenol was efficient in its antimicrobial activity, as can be analyzed in table 3, with MIC values of 104.19 µg / mL. Abdullah et al. (2015) [51] evaluated the antimicrobial activity of cloves against four multiresistant bacteria (*Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Enterococcus faecalis*) isolated from different clinical samples. *A. baumannii* was the most sensitive species, followed by *E. faecalis*. *S.*

aureus and *P. aeruginosa* were the least susceptible bacteria to the tested oil. Dhara & Tripathi (2013) [52] found eugenol antimicrobial activity on bacterial infections by ESBL *E. coli* and *K. pneumoniae*, presenting MIC ranging from 249 to 999 µg/ml for *E. coli*.

Geraniol is an acyclic isoprenoid monoterpene and can be extracted from EOs of various aromatic plants, such as lemongrass, ginger and palmarosa. This compound and other EO constituents are particularly attractive as antibacterial agents because not only do they inhibit various pathogens, they are also non-toxic and a natural antibacterial agents [53]. According to the results, geraniol presented lower MIC value (42.91 µg/mL) for *E. coli* (1), while MIC values were higher for more resistant bacteria, ranging from 2059.9 to 85.83 µg/mL. Palmarosa, the main plant containing geraniol as its major constituent (35.27%), was the compound that presented the highest concentrations against bacterial isolates while thyme, rich in thymol (49.27%), for the more resistant strains, did not inhibit growth at any of the tested concentrations.

EOs possess antibacterial activity and may act alone or synergistically with other present compounds. Furthermore, antimicrobial activity resulting of the synergistic effects between EOs and some antibiotics has been reported. Uzair et al. (2017) [54] showed synergistic activity between EOs and amoxicillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. Synergism between TO and ciprofloxacin showed maximum inhibition of bacterial growth [55]. In 2011, Lv et al. (2011) [56] observed synergistic activity using ten essential oils (among them: oregano, sage and bergamot) against *S. aureus*.

Synergism between two compounds occurs as a result of various interactions, including inhibitory effects at different stages of the same biochemical pathway, or agents that interfere with the cell wall, thereby increasing sensitivity to other compounds [57]. The compounds in EOs can interact with each other, resulting in synergies of additive, indifferent or antagonistic effects. Synergism occurs when there is a positive interaction between two or more compounds combined in order to exert an inhibitory effect, greater than their individual effects, against a given microorganism. The indifferent result is when the combination of the compounds resulted in a similar effect to the isolates; and antagonism occurs when the combined effect is smaller than that alone [58]. In recent years, many studies have investigated combinations of EOs

and their components. Eugenol and thymol have been reported to show synergistic activity against *L. Monocytogenes*, *E. coli* and *P. aeruginosa*; and an indifferent effect against *E. aerogenes*. These synergistic effects are related to the mechanism of action of each compound, such as the disruption and disintegration of the outer membrane of gram-negative bacteria by thymol, allowing eugenol to access the cytoplasm and destroy bacterial enzymes. Gallucci et al. (2009) [59] also evaluated the combinatorial effect of eugenol with geraniol, showing only partial synergism against *Bacillus cereus*, and indifference against *E. coli* and *S. aureus*.

In the present study, it was possible to observe three synergistic interactions between the cross-compounds, which correspond to the combination of thymol with eugenol for bacteria 1, 2 and 4, while for bacterium 3 there was indifference, thus confirming the results obtained in the literature for the combination of thymol with eugenol. Regarding the combination of thymol with geraniol and eugenol with geraniol, the results show indifference for bacteria 1 and 2, and an antagonism for bacteria 3 and 4. We can conclude that when there is antagonism, the inhibitory effects of bacterial growth are better with the isolated compounds.

5. Conclusion

These results suggest that the tested EOs and their major constituents, especially thymol, have potential as promising antimicrobial agents, mainly because this compound presents activity against multidrug-resistant strains, producing enzymes of clinical importance, little described in the existing literature. However, the issue of thymol cytotoxicity is a parameter that can be evaluated in future studies.

Funding

Current research was funded by FAPERGS, CAPES and UFPel.

Acknowledgements

This study was funded by the Rio Grande do Sul Research Support Foundation (FAPERGS; process # 17/2551-0001078-7) and CAPES (Higher Education Personal Training Coordination, Brazil).

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest.

6. Reference

- [1] P. Nordmann, G. Cornaglia, Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action, *Clinical Microbiology and Infection*, 18.5 (2012): 411-412. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03795.x>.
- [2] J.M. Bell, M. Chitsaz, J.D. Turnidge, M. Barton, L.J. Walters, R.N. Jones. Prevalence and significance of a negative extended-spectrum β -lactamase (ESBL) confirmation test result after a positive ESBL screening test result for isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: results from the SENTRY Asia-Pacific surveillance program. *Journal of clinical microbiology* 45.5 (2007): 1478-1482. <https://doi.org/10.1128/JCM.02470-06>.
- [3] G.D. Wright, Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced drug delivery reviews*, 57.10 (2005): 1451-1470. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.002>.
- [4] H.R. Barbosa, B.B. Torres, *Microbiologia básica*. São Paulo: Atheneu, 1998. 196p.
- [5] T. Naas et al., Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase blaKPC gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52.4 (2008): 1257-1263. <https://doi.org/10.1128 / AAC.01451-07>.
- [6] E. Sánchez, S. García, N. Heredia. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76.20 (2010): 6888-6894. <https://doi.org/10.1128 / AEM.03052-09>.
- [7] Z. Schelz, J. Hohmann, J. Molnár. Recent advances in research of antimicrobial effects of essential oils and plant derived compounds on bacteria. (2010): 179-201.
- [8] E-B. Kerekes et al. Anti-listerial effect of selected essential oils and thymol. *Acta Biologica Hungarica*, 67.3 (2016): 333-343. <https://doi.org/10.1556/018.67.2016.3.10>.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2013.

- [10] Pharmacopoeia, Brazilian. Ed 5. São Paulo: Atheneu, 2010.
- [11] A.A. Boligon et al. *Scutia buxifolia* Reissek essential oil: in vitro antioxidant and antimicrobial activities. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 86.3 (2014): 1463-1469. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201420120034>.
- [12] Y. Massada, *Analysis of essential oil by chromatography and spectrometry*. John Wiley & Sons, New York: 1995.
- [13] R.P. Adams, *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Allured Publishing Corporation: Illinois USA, p. 456, 1995.
- [14] I.F.F. Benzie, J. J. Strain, Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in enzymology*. Vol. 299. Academic Press, 1999. 15-27. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5).
- [15] J. Rondevaldova, P. Novy, L. Kokoska. In vitro combinatory antimicrobial effect of plumbagin with oxacillin and tetracycline against *Staphylococcus aureus*. *Phytotherapy research*, 29.1 (2015): 144-147. <https://doi.org/10.1002/ptr.5237>.
- [16] P. Nordmann, D. Girlich, L. Poirel, Detection of carbapenemase producers in Enterobacteriaceae by use of a novel screening medium. *Journal of clinical microbiology*, 50.8 (2012): 2761-2766. <https://doi.org/10.1128/JCM.06477-11>.
- [17] B. Abera, M. Kibret, W. Mulu. Extended-Spectrum beta (β)-lactamases and Antibiogram in Enterobacteriaceae from clinical and drinking water Sources from Bahir Dar City, Ethiopia. *PloS one*, 11.11 (2016): e0166519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166519>.
- [18] Suwantararat, N. et al. The prevalence and molecular epidemiology of multidrug-resistant Enterobacteriaceae colonization in a pediatric intensive care unit. *Infection control & hospital epidemiology*, 37.5 (2016): 535-543. <https://doi.org/10.1017/ice.2016.16>.
- [19] Santella, G. et al. First clonal spread of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Buenos Aires, Argentina. *Infection, Genetics and Evolution*, 8.12 (2012): 2003-2005. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.03.022>.
- [20] M. Abayneh et al. Assessment of extended-spectrum β -lactamase (ESBLs)-producing *Escherichia coli* from minced meat of cattle and swab samples and hygienic status of meat retailer shops in Jimma town, Southwest Ethiopia. *BMC infectious diseases*, 19.1 (2019): 897. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4554-6>.
- [21] R. Viau et al. Intestinal carriage of carbapenemase-producing organisms: current status of surveillance methods. *Clinical microbiology reviews*, 29.1 (2016): 1-27. <https://doi.org/10.1128/CMR.00108-14>.

- [22] H. Yigit et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45.4 (2001): 1151-1161. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>.
- [23] R. Dienstman et al. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 46.1 (2010): 23-27.
- [24] P. Nordmann, G. Cuzon, T. Naas. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet infectious diseases*, 9.4 (2009): 228-236. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70054-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70054-4).
- [25] K. Burns et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Irish critical care units: results of a pilot prevalence survey, June 2011. *Journal of Hospital Infection*, 83.1 (2013): 71-73. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2012.09.015>.
- [30] N. S. Sangwan et al. Regulation of essential oil production in plants. *Plant growth regulation*, 34.1 (2001): 3-21. <https://doi.org/10.1023/A:1013386921596>.
- [31] K. Kachur, S. Zacharias. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, (2019): 1-12. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1675585>.
- [32] A.C. Figueiredo et al. Portuguese *Thymbra* and *Thymus* species volatiles: chemical composition and biological activities. *Current Pharmaceutical Design*, 14.29 (2008): 3120-3140. <https://doi.org/10.2174/138161208786404218>.
- [33] A. E. Edris. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21.4 (2007): 308-323. <https://doi.org/10.1002/ptr.2072>.
- [34] R. Chizzola, Essential oil composition of wild growing Apiaceae from Europe and the Mediterranean. *Natural product communications*, 5.9 (2010): 1934578X1000500925. <https://doi.org/10.1177/1934578X1000500925>.
- [35] D. Trombetta et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49.6 (2005): 2474-2478. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005>.
- [36] F. Abbas et al, Volatile terpenoids: multiple functions, biosynthesis, modulation and manipulation by genetic engineering. *Planta*, 246.5 (2017): 803-816. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2749-x>.
- [37] G. Nieto. Biological activities of three essential oils of the Lamiaceae family. *Medicines*, 4.3 (2017): 63. <https://doi.org/10.3390/medicines4030063>.
- [38] N. Z. Mamadalieva et al. Aromatic medicinal plants of the Lamiaceae family from Uzbekistan: Ethnopharmacology, essential oils composition, and biological activities. *Medicines*, 4.1 (2017): 8. <https://doi.org/10.3390/medicines4010008>.

- [39] A. R. Carvalho Jr. et al. Use of some asteraceae plants for the treatment of wounds: from ethnopharmacological studies to scientific evidences. *Frontiers in pharmacology*, 9 (2018): 784. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00784>.
- [40] Y. Lei et al, Pharmacological properties of geraniol-a review. *Planta medica*, 85.01 (2019): 48-55. <https://doi.org/10.1055/a-0750-6907>.
- [41] S. Burt, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, v.94, n.3 (2004), p. 223-53. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>.
- [42] X. Zuo et al. Cytochrome c oxidase is essential for copper-induced regression of cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovascular toxicology*, 10.3 (2010): 208-215. <https://doi.org/10.1007/s12012-010-9080-0>.
- [43] H. S. Elshafie, I. Camele. An overview of the biological effects of some mediterranean essential oils on human health. *BioMed research international*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9268468>.
- [44] F. Bakkali et al. Biological effects of essential oils-a review. *Food and chemical toxicology*, 46.2 (2008): 446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.
- [45] R.S. Pereira et al., Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. *Revista de Saúde Pública*, 38 (2004): 326-328.
- [46] M. Oussalah et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food control*, 18.5 (2007): 414-420. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.009>.
- [47] F. Nazzaro et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6.12 (2013): 1451-1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>.
- [48] K.P. Devi et al, Eugenol (an essential oil of clove) acts as na antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of ethnopharmacology*, 130.1 (2010): 107-115. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.025>.
- [49] C. T. Filgueiras, M. C. D. Vanetti. Effect of eugenol on growth and listeriolysin O production by *Listeria monocytogenes*. *Brazilian archives of biology and technology*, 49.3 (2006): 405-409. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132006000400008>.
- [50] A. O. Gill, R. A. Holley. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International journal of food microbiology*, 108.1 (2006): 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.009>.
- [51] B.H. Abdullah, S.F. Hatem, W. Jumaa. A comparative study of the antibacterial activity of clove and rosemary essential oils on multidrug resistant bacteria. *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences*, 3.1 (2015): 18-22. <http://dx.doi.org/10.20510/ukjpb/3/i1/89220>.

- [52] L. Dhara, A. Tripathi. Antimicrobial activity of eugenol and cinnamaldehyde against extended spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae by in vitro and molecular docking analysis. *European Journal of Integrative Medicine*, 5.6 (2013): 527-536. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2013.08.005>.
- [53] L. Yue et al. Geraniol grafted chitosan oligosaccharide as a potential antibacterial agent. *Carbohydrate polymers*, 176 (2017): 356-364. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.043>.
- [54] B. Uzair et al. Essential oils showing in vitro anti MRSA and synergistic activity with penicillin group of antibiotics. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 30 (2017).
- [55] N.G. Allam, E. A. E-A. Eldrieny, A. Z. Mohamed. Effect of combination therapy between thyme oil and ciprofloxacin on ulcer-forming *Shigella flexneri*. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9.05 (2015): 486-495. <https://doi.org/10.3855/jidc.6302>.
- [56] F. Lv et al. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44.9 (2011): 3057-3064. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.030>.
- [57] A. Marchese et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Critical reviews in microbiology*, 43.6 (2017): 668-689. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1295225>.
- [58] I. H. N. Bassolé, H. R. Juliani. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17.4 (2012): 3989-4006. <https://doi.org/10.3390/molecules17043989>.
- [59] M. N. Gallucci et al. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour and Fragrance Journal*, 24.6 (2009): 348-354. <https://doi.org/10.1002/ffj.1948>.

5 Conclusões

- As bactérias isoladas no Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas, foram identificadas, em sua grande maioria, como enterobactérias, dentre essas, a *K. pneumoneae* foi a mais associada a mecanismos de resistência, sendo as ESBL, as enzimas mais detectadas neste estudo, seguida da KPC.

- Os OE de palmarosa e tomilho caracterizados, apresentaram compostos majoritários de acordo com estudos prévios relatados na literatura, sendo identificados o geraniol e o timol, respectivamente.

- Foi constatada atividade antioxidante dos OE e constituintes majoritários, principalmente o geraniol, confirmando estudos previamente realizados.

- Todos os compostos majoritários apresentaram atividade antibacteriana para as enterobactérias testadas, em especial o timol. O OT não mostrou atividade antimicrobiana em nenhuma concentração para as enterobactérias mais resistentes (2, 3 e 5). O OP apresentou os maiores valores de CIM, enquanto que para o timol, obteve-se os valores mais baixos.

- Os compostos majoritários timol e eugenol combinados, mostraram atividade sinérgica para as bactérias 1, 2 e 4; enquanto que as demais combinações, não apresentaram sinergismo.

- A curva de viabilidade celular mostrou redução significativa nas UFC em diferentes estágios de tempos para todas as bactérias testadas com o timol. O geraniol foi o composto que menos apresentou redução nas UFC das bactérias nos intervalos testados.

Referências

ABAYNEH, M. et al. Assessment of extended-spectrum β -lactamase (ESBLs)-producing *Escherichia coli* from minced meat of cattle and swab samples and hygienic status of meat retailer shops in Jimma town, Southwest Ethiopia. **BMC infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 897, 2019.

ABBAS, F. et al. Volatile terpenoids: multiple functions, biosynthesis, modulation and manipulation by genetic engineering. **Planta**, v. 246, n. 5, p. 803-816, 2017.

ABERA, B.; KIBRET, M.; MULU, W. Extended-Spectrum beta (β)-lactamases and Antibigram in Enterobacteriaceae from clinical and drinking water Sources from Bahir Dar City, Ethiopia. **PloS one**, v. 11, n. 11, p. e0166519, 2016.

ADUKWU, E. C.; ALLEN, S. C. H.; PHILLIPS, C. A. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 113, n. 5, p. 1217-1227, 2012.

ALLAM, N. G.; ELDRIENY, E. A. E-A.; MOHAMED, A. Z. Effect of combination therapy between thyme oil and ciprofloxacin on ulcer-forming *Shigella flexneri*. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 05, p. 486-495, 2015.

ALVES, A. P.; BEHAR, P. R. P. Nosocomial infections by KPC-producing enterobacteria in a tertiary hospital in Southern Brazil. **Revista da AMRIGS**. v.57, n.3, p.213-18, 2013.

ANVISA. NOTA TÉCNICA Nº 01/2013: Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multirresistentes. Brasília, 17 de abril de 2013.

BARBOSA, H.R.; TORRES, B.B. Microbiologia básica. São Paulo: Atheneu, 196p. 1998.

BASCHIERI, A., et al. Explicar a atividade antioxidante de alguns componentes não fenólicos comuns dos óleos essenciais. **Food Chemistry**. v. 232, p. 656-663, 2017.

BELL, J. M. et al. Prevalência e significância de um resultado negativo do teste de confirmação de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) após um resultado positivo do teste de triagem de ESBL para isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*: resultados do programa de vigilância SENTRY Ásia-Pacífico. **Jornal de microbiologia clínica**, v. 45, n. 5, p. 1478-1482, 2007.

BIASI-GARBIN, R.; et al. Effect of Eugenol against *Streptococcus agalactiae* and Synergistic Interaction with Biologically Produced Silver Nanoparticles. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. p. 1-8, 2015.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum betalactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin Microbiol Rev.** v. 14, p. 933-951, 2001.

BURNS, K. et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Irish critical care units: results of a pilot prevalence survey, June 2011. **Journal of Hospital Infection**, v. 83, n. 1, p. 71-73, 2013.

CARNESECCHI, S.; et al. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. **Cancer Letters**. v. 215, n. 1, p. 53-59, 2004.

CARPENTER, C. F.; CHAMBERS, H. F. Daptomycin: another novel agent for treating infections due to drug-resistant gram-positive pathogens. **Clinical infectious diseases**. v.38, p.994-1000, 2004.

CARVALHO JR, A. R. et al. Use of some asteraceae plants for the treatment of wounds: from ethnopharmacological studies to scientific evidences. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 784, 2018.

CELLA, E.; et al. Multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* strains circulating in hospital setting: whole-genome sequencing and Bayesian phylogenetic analysis for outbreak investigations. **Scientific reports**. v. 7, n. 3534, 2017.

CHAUHAN, A. K.; AND S. C; KANG. Thymol disrupts the membrane integrity of salmonella ser. typhimurium in vitro and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex vivo model. **Res Microbiol**. v. 165, n. 7, p. 559-65, 2014.

CHIZZOLA, R. Essential oil composition of wild growing Apiaceae from Europe and the Mediterranean. **Natural product communications**, v. 5, n. 9, p. 1934578X1000500925, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement**. CLSI Publication M100-S22, Vol. 32, No. 3. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2012.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v. 8, p. 813-824, 2007.

DAS, B.; et al. Eugenol Provokes ROS-Mediated Membrane Damage-Associated Antibacterial Activity against Clinically Isolated Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **Infectious Diseases: Research and Treatment**. v. 9, p. 11-19, 2016.

DAVIN-REGLI, A.; BOLLA, J. M.; JAMES, C. E.; LAVIGNE, J. P.; CHEVALIER, J.; GARNOTEL, E.; MOLITOR, A.; PAGÈS, J. M. Membrane permeability and regulation of drug "influx and efflux" in enterobacterial pathogens. **Current Cancer Drug Targets**, v.9, n.9, p.750-9, 2008.

DE CÁSSIA, D. S. E. S. et al. A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 2, p. 1459, 2014.

DEVI, K. P. et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107-115, 2010.

DIENSTMANN, R. et al. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 23-27, 2010.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007.

ELSHAFIE, H. S.; CAMELE, I. An overview of the biological effects of some mediterranean essential oils on human health. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Portuguese Thymbra and Thymus species volatiles: chemical composition and biological activities. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 29, p. 3120-3140, 2008.

FREI, B. Efficacy of dietary antioxidants to prevent oxidative damage and inhibit chronic disease. **J utr.**, v.134, n. 11, p. 3196S-3198S, 2004.

GAN, H. M.; ENG, W. W. H.; DHANOA, A. First genomic insights into carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Malaysia, **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. 2019.

GARVEY, M. I.; et al. Medicinal plant extracts with efflux inhibitory activity against gram-negative bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents** v. 37, n. 2, p. 145-51, 2011.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International journal of food microbiology**, v. 108, n. 1, p. 1-9, 2006.

GUPTA, N.; et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. **Clinical infectious diseases**. v. 53, p. 60-7, 2011.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**. v. 3:, n. 12, 2012.

JUVEN, B. J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **J Appl Bacteriol**. v. 76, p. 626-631, 1994.

KACHUR, K.; SUNTRES, Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-12, 2019.

KAMATOU, G. P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M. Eugenol—From the Remote Maluku Islands to the International Market Place: A Review of a Remarkable and Versatile Molecule. **Molecules**. v. 17, n. 6, p. 6953-6981, 2012.

KANNAPPAN, et al. Inhibitory efficacy of geraniol on biofilm formation and development of adaptive resistance in *Staphylococcus epidermidis* RP62A. **Journal of Medical Microbiology**. v. 66, p. 1506-1515, 2017.

KEREKES, E-B. et al. Anti-listerial effect of selected essential oils and thymol. **Acta Biologica Hungarica**, v. 67, n. 3, p. 333-343, 2016.

KHAN, I.; et al. Antimicrobial potential of carvacrol against uropathogenic *Escherichia coli* via membrane disruption, depolarization, and reactive oxygen species generation. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, n. 2421, 2017.

KNOTHE, H; et al. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**. v.11, n.6, p.315-317, 1983.

LEI, Y. et al. Pharmacological properties of geraniol-a review. **Planta medica**, v. 85, n. 01, p. 48-55, 2019.

LEITE, M. C. A. Investigating the antifungal activity and mechanism(s) of geraniol against *Candida albicans* strains. **Medical Mycology**. v. 53, n. 3, p. 275-284, 2015.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**. v. 10, n. 12, p. S122-S129, 2004.

LIVERMORE, D. M. Defining an extended-spectrum β -lactamase. The beginnings of a term. **Clin Microbiol Infect**. v. 14, p. 3-10, 2008.

LIVERMORE, D.M. - Are all beta-lactams created equal? **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**. v.101, p.33-43, 1996.

MAMADALIVA, N. Z. et al. Aromatic medicinal plants of the Lamiaceae family from Uzbekistan: Ethnopharmacology, essential oils composition, and biological activities. **Medicines**, v. 4, n. 1, p. 8, 2017.

MARCHESE, A. et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical reviews in microbiology**, v. 43, n. 6, p. 668-689, 2017.

McMANUS, M. C. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **American Journal of Health-System Pharmacy**. v.54, p.1420-33, 1997.

MILADI, H.; et al. Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens. **Microbial Pathogenesis**. v. p. 95-100, 2016.

NAAS, T. et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase blaKPC gene. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1257-1263, 2008.

NAZZARO, Filomena et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.

NETO, V. A.; NICODEMO, A. C.; VASCONCELLOS, H. Antibióticos na prática médica. 6 ed. Editorial Sarver, SP, 2007.

NEU HC. The crisis in antibiotic resistance. **Science**. v.257, p.1064-73, 1992.

NIETO, G. Biological activities of three essential oils of the Lamiaceae family. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 63, 2017.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic. **Biol. Med**. v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NORDMANN, P.; CORNAGLIA, G. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action! **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 5, p. 411-412, 2012.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet infectious diseases**, v. 9, n. 4, p. 228-236, 2009.

NORDMANN, P.; GIRLICH, D.; POIREL, L. Detection of carbapenemase producers in Enterobacteriaceae by use of a novel screening medium. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 8, p. 2761-2766, 2012.

NORRBY, S. R. Carbapenems. **Medical Clinics of North America**. v.79, p.745-59, 1995.

NÜESCH-INDERBINEN, M.; STEPHAN, R. Epidemiology of extended-Spectrum β -lactamase (ESBL) -producing *Escherichia coli* in the human-livestock environment. **Curr Clin Microbiol Reports**. p. 1-9, 2016.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food control**, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.

PATERSON, D. L.; et al. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum beta-lactamases. **Clinical Infectious Diseases**. v.39, n.1, p.31-37, 2004.

PEREZ, F.; et al. Treatment Options for Infections Caused by Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Can We Apply "Precision Medicine" to Antimicrobial Chemotherapy? **Expert Opinion on Pharmacotherapy**. v.17, n.6, p.761-81, 2016.

PITOUT, J. D. D.; LAUPLAND, K. B. Extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae; an emerging public health concern. **The Lancet Infectious Diseases**. v.8, p.159-66, 2008.

RIPABELLI, G. et al. *Klebsiella pneumoniae* isolated from intensive care unit patients with respiratory tract infections: characterization by pulsed-field gel electrophoresis, antimicrobial resistance and pcrs for carbapenemase genes detection. **J Respir Med Lung Dis**. 2017; 2 (1), v. 1008, 2017.

SÁNCHEZ, E.; GARCÍA, S.; HEREDIA, N. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, n. 20, p. 6888-6894, 2010.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant growth regulation**, v. 34, n. 1, p. 3-21, 2001.

SANTELLA, G. et al. First clonal spread of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Buenos Aires, Argentina. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 12, p. 2003-2005, 2012.

SANTOS, S. F.; NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 23, n. 2, p. 136-141, 2012.

SCHELZ, Z.; HOHMANN, J.; MOLNÁR, J. Recent advances in research of antimicrobial effects of essential oils and plant derived compounds on bacteria. 2010.

SIHEM, M.; et al. Overview of ESBL-producing *Escherichia coli* of Animal Origin in Tunisia: In the Way of the Global Spread of CTX-M β -Lactamases. **iMedPub Journals**. v. 6, n. 2:4, p. 1-7, 2015.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. v. 2, n. 5, 2010.

STEWARTSON A.; *et al.* Burden of bloodstream infection caused by extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae determined using multistate modeling at a Swiss university hospital and a nationwide predictive model. **Infection Control & Hospital Epidemiology**. v.34, n.2, p.133-43, 2013.

SUWANTARAT, N. et al. The prevalence and molecular epidemiology of multidrug-resistant Enterobacteriaceae colonization in a pediatric intensive care unit. **Infection control & hospital epidemiology**, v. 37, n. 5, p. 535-543, 2016.

TENOVER, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **The American Journal of Medicine**. v.119, n.6, p.S3-S10, 2006.

TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005.

TWETMAN, S.; PETERSSON, L. G. Effect of Different Chlorhexidine Varnish Regimens on Mutans Streptococci Levels in Interdental Plaque and Saliva. **Caries Research**. v. 31, n. 3, p. 189-193, 1997.

UZAIR, B. et al. Essential oils showing in vitro anti MRSA and synergistic activity with penicillin group of antibiotics. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 30, 2017.

VAN LOON, K.; VOOR, A. F.; VOS, M. C. A systematic review and meta-analyses of the clinical epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 1, p. e01730-17, 2018.

VIAU, R. et al. Intestinal carriage of carbapenemase-producing organisms: current status of surveillance methods. **Clinical microbiology reviews**, v. 29, n. 1, p. 1-27, 2016.

WALSH, S. E.; et al. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on gram-positive and -negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology**. v. 94, n. 2, p. 240-7, 2003.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 10, p. 1451-1470, 2005.

YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151-1161, 2001.

YUE, L. et al. Geraniol grafted chitosan oligosaccharide as a potential antibacterial agent. **Carbohydrate polymers**, v. 176, p. 356-364, 2017.

ZUO, X. et al. Cytochrome c oxidase is essential for copper-induced regression of cardiomyocyte hypertrophy. **Cardiovascular toxicology**, v. 10, n. 3, p. 208-215, 2010.

Anexos

Anexo A – Comprovante de submissão do manuscrito a Revista Microbial Pathogenesis.

Successfully received: submission Antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* and *Cymbopogon martini* essential oils and synergism of thymol, eugenol and geraniol constituents against multidrug-resistant bacterial isolates for Microbial Pathogenesis

10/06/2019 20:24

To: Rosângela Almeida Maciel

This message was sent automatically:

Re: YIN/AL JINR 19131

Title: Antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* and *Cymbopogon martini* essential oils and synergism of thymol, eugenol and geraniol constituents against multidrug-resistant bacterial isolates for Microbial Pathogenesis

User ID: 6674666666666666

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Microbial Pathogenesis. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please register with <https://www.elsevier.com/locate/micpath>. Next, confirm the proof (JINR) AL/AL-YIN/AL and track your submission under the label: My Submission with Journal on your MyJourney dashboard.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Microbial Pathogenesis

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Elsevier[®] via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Elsevier B.V., Keizersweg 48, 1042 NX Amsterdam, The Netherlands. Reg. No. 32168671.

Anexo B - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

UFPEL - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação do perfil de resistência de bactérias isoladas de pacientes oncológicos e associação com estresse oxidativo e formação de biofilme em materiais médico hospitalar

Pesquisador: CAMILA DE DAVID TESSELE MARTINI

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 96856118.4.0000.5317

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pelotas

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Pelotas

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.919.605

Apresentação do Projeto:

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um grave problema de saúde pública de âmbito mundial, devido a sua elevada taxa de mortalidade e restrição na opção terapêutica (NORDMANN; CORNAGLIA, 2012). Dentre os microrganismos comumente associados à mecanismos de resistência, destacam-se as bactérias da família Enterobacteriaceae, resistente aos carbapenêmicos (doripenem, ertapenem, imipenem e meropenem) (ANVISA, 2013). A produção das enzimas carbapenemases pelas enterobactérias, é um fator imprescindível que confere resistência às mesmas, visto que essas enzimas são capazes de hidrolisar os carbapenêmicos, bem como codificar genes de resistência em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, aumentando a sua disseminação (WRIGHT, 2005). Considerando essa problemática de grande impacto na saúde pública, principalmente no âmbito hospitalar, o presente trabalho terá por objetivos isolar e identificar as enterobactérias multirresistentes, pesquisando as enzimas e os genes envolvidos na resistência, assim como testar a atividade de compostos antimicrobianos com a cepa bacteriana específica.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar o perfil de resistência de bactérias isoladas provenientes de pacientes oncológicos que fazem uso de quimioterápicos.

Endereço: Av Duque de Caxias 250

Bairro: Fragata

CEP: 96.030-001

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS



Continuação do Parecer: 2.919.605

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não há riscos aos pacientes relacionados a esse projeto, tendo em vista que as amostras colhidas serão de descarte, sendo reaproveitado após a realização dos exames no laboratório do hospital.

Benefícios: Faz-se necessário um estudo a fim de isolar e identificar bactérias multirresistentes, visto que, infecções bacterianas em pacientes que fazem administração contínua de quimioterápicos são frequentes

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As amostras utilizadas para o projeto correspondem à materiais biológicos diversos, provenientes de pacientes oncológicos do Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas (HE-UFPe), analisadas e descartadas pelo laboratório de análises clínicas do HE-UFPe. Os exames solicitados de identificação bacteriana e antibiograma serão realizados e liberados pelo laboratório e, antes do seu descarte, as amostras serão utilizadas para o projeto. A partir dessas amostras, obter-se-ão os isolados bacteriano.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

OK

Recomendações:

OK

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

OK

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1140880.pdf	02/08/2018 19:08:26		Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_ROSTO.pdf	02/08/2018 19:06:59	CAMILA DE DAVID TESSELE MARTINI	Aceito
Outros	CARTA.pdf	02/08/2018 19:03:55	CAMILA DE DAVID TESSELE MARTINI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	02/08/2018 18:59:19	CAMILA DE DAVID TESSELE MARTINI	Aceito
Outros	PROJETO2.pdf	26/09/2018	Patricia Abrantes	Aceito

Endereço: Av Duque de Caxias 250

Bairro: Fragata

CEP: 96.030-001

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS



Continuação do Parecer: 2.919.605

Outros	PROJETO2.pdf	15:55:48	Duval	Aceito
--------	--------------	----------	-------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PELOTAS, 26 de Setembro de 2018

Assinado por:
Patricia Abrantes Duval
(Coordenador(a))

Endereço: Av Duque de Caxias 250

Bairro: Fragata

CEP: 96.030-001

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com