UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cinnamomum triplinerve* E *Ocotea diospyrifolia* ISOLADAMENTE E EM SINERGIA COM AMICACINA CONTRA *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTE A POLIMIXINA B

JULIA PIMENTEL ARANTES

Dourados - MS
2024

JULIA PIMENTEL ARANTES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cinnamomum triplinerve* E *Ocotea diospyrifolia* ISOLADAMENTE E EM SINERGIA COM AMICACINA CONTRA *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTE A POLIMIXINA B

Dissertação/Exame de Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Doenças Crônicas e Infecto-Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Simone Simionatto
Coorientadora: Profa. Dra. Luana Rossato

Dourados - MS
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

A662a Arantes, Julia Pimentel

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE Cinnamomum triplinerve E Ocotea diospyrifolia ISOLADAMENTE E EM SINERGIA COM AMICACINA CONTRA Klebsiella pneumoniae RESISTENTE A POLIMIXINA B [recurso eletrônico] / Julia Pimentel Arantes. -- 2024.

Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Simone Simionatto.

Coorientadora: Luana Rossato.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2024.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio

1. Óleos Essenciais. 2. Metabolitos secundários. 3. Sinergismo. 4. Checkerboard. I. Simionatto, Simone. II. Rossato, Luana. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

Ministério da Educação
Universidade Federal da Grande Dourados
PROPP - Pró-Reitoria de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR JULIA PIMENTEL ARANTES, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "DOENÇAS CRÔNICAS E INFECTO-PARASITÁRIAS".

Aos oito dias do mês de março do ano de dois mil e vinte e quatro, às treze horas e trinta minutos, em sessão pública, realizou-se na Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada **"Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de Cinnamomum triplinerve e Ocotea diospyrifolia isoladamente e em sinergia com amicacina contra Klebsiella pneumoniae resistente à polimixina B"**, apresentada pela mestranda Julia Pimentel Arantes, do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos membros: Prof.ª Dr.ª Simone Simionatto/UFGD (presidente/orientadora), Prof. Dr. Jesus Rafael Rodriguez Amado/UFGD (membro titular interno), Prof.ª Dr.ª Gleyce Hellen de Almeida de Souza/UFGD (membro titular externo), Prof. Dr. Tiago Barcelos Valiatti/UNICENTRO (membro titular externo). Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer à candidata e aos integrantes da banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após a candidata ter apresentado a sua Dissertação, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições. Terminada a Defesa, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido a candidata considerada Aprovada. A Presidente da Banca atesta a participação dos membros que estiveram presentes de forma remota, conforme declarações anexas. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Dourados/MS, 08 de março de 2024.

gov.br Documento assinado digitalmente
SIMONE SIMIONATTO
Data: 08/03/2024 16:53:17-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof.ª Dr.ª Simone Simionatto
Presidente/orientadora

gov.br Documento assinado digitalmente
JESUS RAFAEL RODRIGUEZ AMADO
Data: 08/03/2024 17:15:56-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Jesus Rafael Rodriguez Amado
Membro Titular Interno
(Participação Remota)

gov.br Documento assinado digitalmente
GLEYCE HELLEN DE ALMEIDA DE SOUZA
Data: 08/03/2024 17:41:29-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof.ª Dr.ª Gleyce Hellen de Almeida de Souza
Membro Titular Externo
(Participação Remota)

gov.br Documento assinado digitalmente
TIAGO BARCELOS VALIATTI
Data: 08/03/2024 17:30:01-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Tiago Barcelos Valiatti
Membro Titular Externo
(Participação Remota)

(PARA USO EXCLUSIVO DA PROPP)
ATA HOMOLOGADA EM: ____/____/_____, PELA PROPP/ UFGD.

ATA HOMOLOGADA PELA PROPP/ UFGD

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu noivo Bruno, aos meus pais, Audax Junior e Leidiane e a meu irmão Eduardo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, porque Ele esteve e está presente em minha vida, guiando os meus passos. Nos momentos de dúvida e incerteza, você foi minha fonte de esperança e fé. Que em todos os capítulos de minha vida promoveu a minha sustentação.

Ao meu noivo, Bruno, que em todo o meu processo de desenvolvimento no mestrado desempenhou diversos papéis em minha vida, como meu confidente, meu alicerce inabalável nos bons e maus momentos, e principalmente um dos meus apoiadores em qualquer âmbito apresentando sempre o seu incentivo. Sou eternamente grata a você por seu amor, paciência e crença em mim.

Aos meus pais, Audax Junior e Leidiane e ao meu irmão Eduardo, que são elementos essenciais em minha vida, tenho plena consciência de que minhas conquistas são em muitos aspectos um reflexo dos valores, princípios e apoio que vocês me proporcionaram ao longo da minha vida., a crença de vocês em mim me proporcionou e ainda proporciona a força e confiança para continuar superando desafios e buscar a excelência.

À minha avó Maria Aparecida, que me deu todo o suporte na cidade pela qual sinto imensa gratidão pelo apoio que me proporcionou. Sua disposição em ajudar em casa enquanto eu estudava foram fundamentais para meu sucesso. As palavras e ações de conforto nas horas certas foram sempre necessários em meio aos prazos.

À minha orientadora Professora Dra. Simone Simionatto, que teve impacto positivo não só na minha vida acadêmica, mas também em minha vida pessoal. Sou profundamente grata pelas oportunidades que foram dispostas a mim. O aprendizado que a senhora me passou permanecerá comigo por toda a minha trajetória. Obrigada por acreditar em mim mesmo quando eu duvidei.

À minha co-orientadora Professora Dra. Luana Rossato, pelo grande auxílio durante minha trajetória, sua orientação desempenhou um importante papel na formação de minha identidade acadêmica.

Aos meus colegas de trabalho do Grupo de Pesquisa em Biologia Molecular e Microrganismo pelo auxílio durante os momentos de dúvida, especialmente à Andressa Leite Ferraz de Melo, Junio Eduvirgem e o Júlio Henrique Ferreira de Sá Queiroz, meus parceiros de trocas de conhecimentos e experiências, desabafos e principalmente muitas risadas. Sou grata pelos inúmeros momentos que compartilhamos juntos. Agradeço também a aluna de Iniciação Cientifica Izadora Dillis Faccin, a qual eu tive o prazer e o desafio de orientar e compartilhar momentos da minha vida acadêmica.

À Universidade Federal da Grande Dourados por proporcionar toda a estrutura e o Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro, tornando-se possível a produção desta pesquisa.

Enfim, a todos que contribuíram na minha jornada e no meu crescimento, seja de forma direta ou indireta, não permitindo que desistisse do que mais estimava.

Obrigada!

EPÍGRAFE

“A persistência é o caminho do êxito.”
Charles Chaplin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01. Cenário da resistência antimicrobiana a) Processo de seleção e disseminação de bactérias resistentes sob tratamento antibiótico; b) Cenário farmacêutico: baixo investimento no desenvolvimento de novos antibióticos; c) Desafios no cenário hospitalar relacionados à resistência bacteriana: paciente com infecção, ineficácia no tratamento → consequências (disseminação, tempo de estadia prolongada, maior letalidade).....16

Figura 02. Mecanismo de ação dos óleos essenciais com ação antimicrobiana.....21

Figura 03. Morfologia de *Cinnamomum triplinerve.* A) Árvore completa; B) Detalhe do caule; C) Folhas; D) Frutos.....22

Figura 04. Morfologia de *Ocotea diospyrifolia*. A) Árvore completa; B) Detalhe do caule; C) Detalhe do caule; D) Folhas.....23

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CLSI	*Clinical & Laboratory Standards Institute*
COVID-19	*CoronaVirus Disease* 2019
*Ct*EO	Óleo essencial de *Cinnamomum triplinerve*
C. elegans	*Caenorhabditis elegans*
C. triplinerve	*Cinnamomum triplinerve*
EO	Essential oils
ESKAPE	*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter spp.*
FICI	*Fractional Inhibitory Concentration Index*
GAP-AMR	Plano de ação global sobre resistência antimicrobiana
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
IUCN	União Internacional para a Conservação da Natureza
KPC	*Klebsiella pneumoniae* produtora de Carbapenemase
K. pneumoniae	*Klebsiella pneumoniae*
MDR	Multirresistente
ME	Membrana externa
MGEs	Elementos Genéticos Móveis
*Od*EO	Óleo essencial de *O. diospyrifolia*
OE	Óleo essencial
OMS	Organização Mundial de Saúde
O. diospyrifolia	*Ocotea diospyrifolia*
RAM	Resistência Antimicrobiana
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave
UTI	Unidades de Terapia Intensiva

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cinnamomum triplinerve* E *Ocotea diospyrifolia* ISOLADAMENTE E EM SINERGIA COM AMICACINA CONTRA *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTE A POLIMIXINA B

RESUMO

O desafio da resitencia antimicrobiana representa uma crescente ameaça à saúde global, limitando a eficácia de terapias disponíveis para o controle da disseminação de microrganismos resistentes. Dada a urgência deste cenário, é importante a busca por abordagens alternativas para combater esses microrganismos. Os óleos essenciais (OE), devido ao seu potencial sinérgico com antimicrobianos convencionais, surgem como um caminho promissor para melhorar a eficácia do tratamento. Este estudo teve como objetivo investigar a atividade antimicrobiana dos OE, *Cinnamomum triplinerve* (*Ct*OE) e *Ocotea diospyrifolia* (*Od*OE), individualmente e em combinação com o antimicrobiano convencional amicacina, frente ao isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente. A análise química revelou (E) – nerolidol como o principal constituinte do *Ct*OE, enquanto α-bisabolol demonstrou ser o composto marjoritário de *Od*OE. A atividade antimicrobiana dos *Ct*OE e *Od*OE foi determinada por meio do método microdiluição em caldo. No entanto, ambos os óleos essenciais, quando testados isoladamente, não inibiram o crescimento do isolado clínico de *K. pneumoniae* multirresistente. Através do método *Checkerboard*, as combinações de *Ct*OE e *Od*OE com amicacina (AMK) demonstraram uma interação sinérgica, com valores de FICI = 0.5. A sinergia de ambas as combinações demonstrou a capacidade de diminuir significamente a formação de biofilme desse isolado quando comparado ao controle de crescimento. O tempo de morte do isolado quando submetido as concentrações desejadas das combinações foi apresentada no período de 3 e 2 horas sob contato com as concentrações de *Ct*EO+AMK e *Od*EO+AMK respectivamente. Bem, como o ensaio de extravasamento de proteína demonstrou elevadas concentrações de proteínas extravasadas de células bacterianas entre 71.6 e 79.16 µg/mL da combinação de *Ct*EO+AMK e *Od*EO+AMK e nos respectivos horários. As combinações também foram avaliadas através da interação com glóbulos vermelhos, nas quais demonstraram pouca ou nenhuma interação. A capacidade das combinações de CtEO+AMK e *Od*EO+AMK aumentaram a sobrevida em taxas de 71.6% e 79.16% quando comparadas ao controle de infecção em modelo alternativo *Caenorhabditis elegans*. Em resumo, as combinações avaliadas apresentaram potencial para inibir o crescimento de *K. pneumoniae* multirresistente, representando uma alternativa promissora ao desenvolvimento de novos antimicrobianos voltado ao tratamento de infecções causadas por este patógeno.

Palavras-chaves: Óleos Essenciais, Metabolitos secundários, Sinergismo, *Checker board*

EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS FROM *Cinnamomum triplinerve* AND *Ocotea diospyrifolia* ALONE AND IN SYNERGY WITH AMIKACIN AGAINST POLYMYXIN B-RESISTANT *Klebsiella pneumoniae*

ABSTRACT

The challenge of antimicrobial resistance represents a growing threat to global health, limiting the effective therapies available for controlling the spread of resistant microorganisms. Given the urgency of this scenario, it is important to search for alternative approaches to combat these microorganisms. Essential oils (EOs), due to their synergistic potential with conventional antimicrobials, emerge as a promising pathway to enhance treatment efficacy. This study aimed to investigate the antimicrobial activity of EOs, *Cinnamomum triplinerve* (*Ct*EO) and *Ocotea diospyrifolia* (*Od*EO), individually and in combination with the conventional antimicrobial amikacin, against clinical isolates of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Chemical analysis revealed (E)-nerolidol as the main constituent of *Ct*EO, while *Od*EO was dominated by α-bisabolol. The antimicrobial activity of *Ct*EO and *Od*EO was determined using the broth microdilution method. However, both essential oils, when tested alone, did not inhibit the growth of the multidrug-resistant *K. pneumoniae* clinical isolate. Through the Checkerboard method, combinations of *Ct*EO and *Od*EO with amikacin (AMK) demonstrated a synergistic interaction, with FICI values = 0.5. The synergy of both combinations demonstrated the ability to significantly decrease biofilm formation of this isolate compared to the growth control. The time to death of the isolate when subjected to the desired concentrations of the combinations was presented within the period of 3 and 2 hours upon contact with the concentrations of *Ct*EO+AMK and *Od*EO+AMK, respectively. Additionally, the protein leakage assay demonstrated high concentrations of leaked proteins from bacterial cells between 71.6 and 79.16 µg/mL of the combination of *Ct*EO+AMK and *Od*EO+AMK, respectively, at the respective time points. Both combinations were also evaluated for interaction with red blood cells, showing little to no interaction. The ability of the combinations of *Ct*EO+AMK and *Od*EO+AMK increased survival rates by 71.6% and 79.16%, respectively, when compared to the infection control in the alternative model *Caenorhabditis elegans*. In summary, the evaluated combinations showed potential to inhibit the growth of MDR *K. pneumoniae*, representing a promising alternative to the development of new antimicrobials aimed at treating infections caused by this pathogen.

Keywords: Essential Oils, Secondary metabolites, Synergism, Checkerboard.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....13

2. REVISÃO DE LITERATURA.....14

2.1. Resistência a antibióticos..…….....…… 14

2.2. Infecções causadas por isolados de *K. pneumoniae* multirresistente.....16

2.3. Mecanismos de resistência a antibióticos.....18

2.4. O impacto da pandemia de COVID-19 nos padrões de prescrição de antibióticos e as consequências para a resistência bacteriana.....19

2.5. Óleos essenciais como uma abordagem alternativa para o tratamento de infecções bacterianas.....19

2.5.1. *Cinnamomum triplinerve*.....22

2.5.2. *Ocotea diospyrifolia*.....23

2.6. Associação de antimicrobianos com óleos essenciais.....25

3. OBJETIVOS.....26

3.1. Objetivo geral.....26

3.2. Objetivos específicos.....26

4.**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**.....27

5. APENDICES.....38

5.1. Artigo 01.....38

5.2. Artigo 02.....71

6. CONCLUSÃO.....98

7. ANEXOS.....99

1. INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana (RAM) emerge como um dos principais desafios para a saúde pública. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a RAM contribuiu para 1,27 milhões de mortes em 2019, e afetou 87 países em 2020. Diante desse cenário, as projeções indicam um aumento exponencial, podendo extrapolar sete vezes os números de 2019 (ABAT et al., 2017; OMS, 2022). A ineficácia dos antibióticos convencionais frente a um número crescente de infecções bacterianas, caracteriza-se como uma preocupação global, devido aos seus significativos impactos, tais como a elevação da mortalidade entre pacientes colonizados por isolados resistentes, prolongamento de hospitalizações e consequentemente o aumento de custos médicos (ABAT et al., 2017).

O uso excessivo e indevido de antibióticos tem acelerado o fenômeno da resistência, reduzindo significativamente o número de novas classes de antimicrobianos disponíveis na indústria farmacêutica. Esse declínio tem levantado preocupações sobre capacidade da medicina de combater eficazmente as infecções bacterianas. Tal escassez pode ser atribuída a vários fatores, incluindo desafios econômicos, temporais e regulamentares, desestimulando as industrias a investir no desenvolvimento de novas classes antimicrobianas (BOUCHER et al., 2013; SPELLBERG; BARTLETT; GILBERT, 2013). Assim, a busca por terapias alternativas tornou-se crucial, levando à exploração dos óleos essenciais (OEs) e seus metabólitos secundários, que apresentam potencial para atuar em diversos mecanismos contra microrganismos, configurando-se como candidatos promissores para terapias antimicrobianas alternativas (MITTAL; RANA; JAITAK, 2019; NOSTRO; PAPALIA, 2012).

Os óleos essenciais, ao serem usados sinergicamente com antibióticos, não apenas potencializam a eficácia do tratamento mas também reduzem a necessidade de altas doses de antibióticos, minimizando o risco de emergência de resistência bacteriana (ALAM et al., 2022; DIDEHDAR et al., 2022; FURLANI et al., 2021). Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* e *in vivo*, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais frente ao isolado clínico de *K. pneumoniae* multirresistente, tanto de forma isolada e em combinação com amicacina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Resistência a antibióticos

A ação dos antimicrobianos foi uma das descobertas mais importantes capazes de garantir a melhora da qualidade da saúde humana através da prevenção de infecções bacterianas fatais (PULINGAM et al., 2022). Esses compostos desempenharam um papel crucial nas tentativas de prevenir e tratar infecções bacterianas durante a segunda metade do século XIX, resultando rapidamente no decaimento das taxas de mortalidade causadas por essas infecções em 80% (MILLER-PETRIE; PANT; LAXMINARAYAN, 2017).

Com o amplo sucesso desses medicamentos, as empresas farmacêuticas de todo o mundo começaram a expandir a produção dos mesmos no ano de 1943, chegando a bilhões de unidades produzidas por mês. Devido o sucesso de prevenção, alguns países decidiram remover as restrições de liberação desses compostos para o mercado civil no ano de 1945, tornando-se a utilização desses medicamentos de maneira desenfreada pela população, tal situação desencadeou rápidamente os fatores que contribuem para a resistência a esses medicamentos e consequentemente a perca de eficácia dos antimicrobianos (BURKI, 2018).

A RAM é considerada uma das principais ameaças à saúde pública e socioeconômico do século XXI, pois com o aumento gradativo do consumo global de antibióticos ao longo do tempo, contribui para a diminuição da eficácia e prevenção e do tratamento de um número cada vez maior de infecções, resultando assim, no aumento da taxa de mortalidade (HOU et al., 2023). Este cenário é considerado uma questão que deve ser tratada de maneira urgente, e no qual requer um plano de ação coordenado de todos os setores do governo e da sociedade para à obtenção de sucesso (OMS, 2014).

Diversos elementos de risco desempenham um papel significativo no desenvolvimento e na propagação da resistência bacteriana. Os fatores de risco associado ao aparecimento de resistência incluem o uso excessivo e indevido de antibióticos, práticas inadequadas de controle de infecções em ambientes de saúde, tratamento secundário para contenção de pandemia, saneamento e higiene deficientes e o uso generalizado de antibióticos na agricultura e na pecuária. Contribuindo para o surgindo e a rápida propagação de isolados rmultirresistentes(ALARA; ALARA, 2024; CANAN-ROCHENBACH et al., 2022; REHMAN, 2023).

No ano de 2019, houve uma estimativa de que a resistência antimicrobiana foi responsável diretamente por alcançar 4,95 milhões de mortes no ano (O'NEILL, 2016), caso nada for feito para frear esse fenômeno estima-se que o número de mortes aumente em todo o mundo para mais de 10 milhões por ano até 2050. Esse impacto será expandido ao cenário

economico pois de acordo com a expansão da RAM, as despesas com os cuidados de saúde também aumentarão, podendo resultar em uma perca mundial de 3,8% de seu PIB anual até 2050, resultando no gasto de US$ 6,1 trilhões (ABAT et al., 2017; PACIOS et al., 2020; ZHANG et al., 2024).

Quando ocorre a associação de resistência aos antimicrobianos as infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), o cenário se torna ainda mais alarmante. Segundo a OMS, as IRAS são infecções adquiridas pelo paciente durante o atendimento em um hospital e não estavam presentes ou em incubação no momento da admissão, essas infecções podem ser causadas por microrganismos com diversos mecanismos de resistência a antibióticos, no qual acomete cerca de um em cada 10 pacientes hospitalizados (Figura 1A)(OMS, 2016).

Os hospitais constituem uma forte e importante fonte de infecções (SANTOS DE QUEIROZ, 2004), e as consequências dessas infecções incluem a rápida deterioração da saúde dos pacientes e um prolongamento do tempo de internação. As altas taxas de ocorrência das infecções hospitalares ocorre de acordo com a unidade de tratamento, sendo que nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) encontram-se pacientes em estado mais grave e com defesa imunológica comprometida, condições clínicas predisponentes ao surgimento de infecção (Figura 1C) (LOYOLA-CRUZ et al., 2023).

O aumento constante de casos de IRAS causadas por microrganismo com resistência a antibióticos resultou na necessidade da emissão de um relatório com a temática da necessidade de novas terapias para combater os microrganismos patógenos, principalmente para os microrganismos do grupo denominado ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumanni, Pseudomonas aeroginosa e Enterobacter spp*.) (LOYOLA-CRUZ et al., 2023).

Esses patógenos contribuem significativamente para a carga de doenças em países desenvolvidos e em desenvolvimento (DENISSEN et al., 2022). Pois apresentam habilidades intrínsecas para desenvolver mecanismos de resistência, exibindo assim, a capacidade de desenvolver resistência a várias classes de antimicrobianos presentes no mercado, principalmente os antimicrobianos considerados de última linha de tratamento, como os glicopeptídeos, carbapenêmicos e polimixinas (ZAMAN et al., 2017).

Portanto, para limitar o uso excessivo de antibióticos no ano de 2015, a OMS desenvolveu um documento denominado Plano de Ação Global sobre RAM (GAP-AMR) (OMS, 2017), com o objetivo de atuar na prevenção de infecções e controlar a administração dos antimicrobianos (KHOUJA; TADROUS; SUDA, 2022). O plano tem como principais estratégias, aumentar a conscientização e a compreensão sobre a resistência através de

educação, fortalecer a pesquisa e a vigilância, reduzir a incidência de infecções com medidas de higiene e prevenção, otimizar o uso de antimicrobianos em humanos e animais por meio de diretrizes de prescrição e promover a inovação em novos tratamentos e diagnósticos.

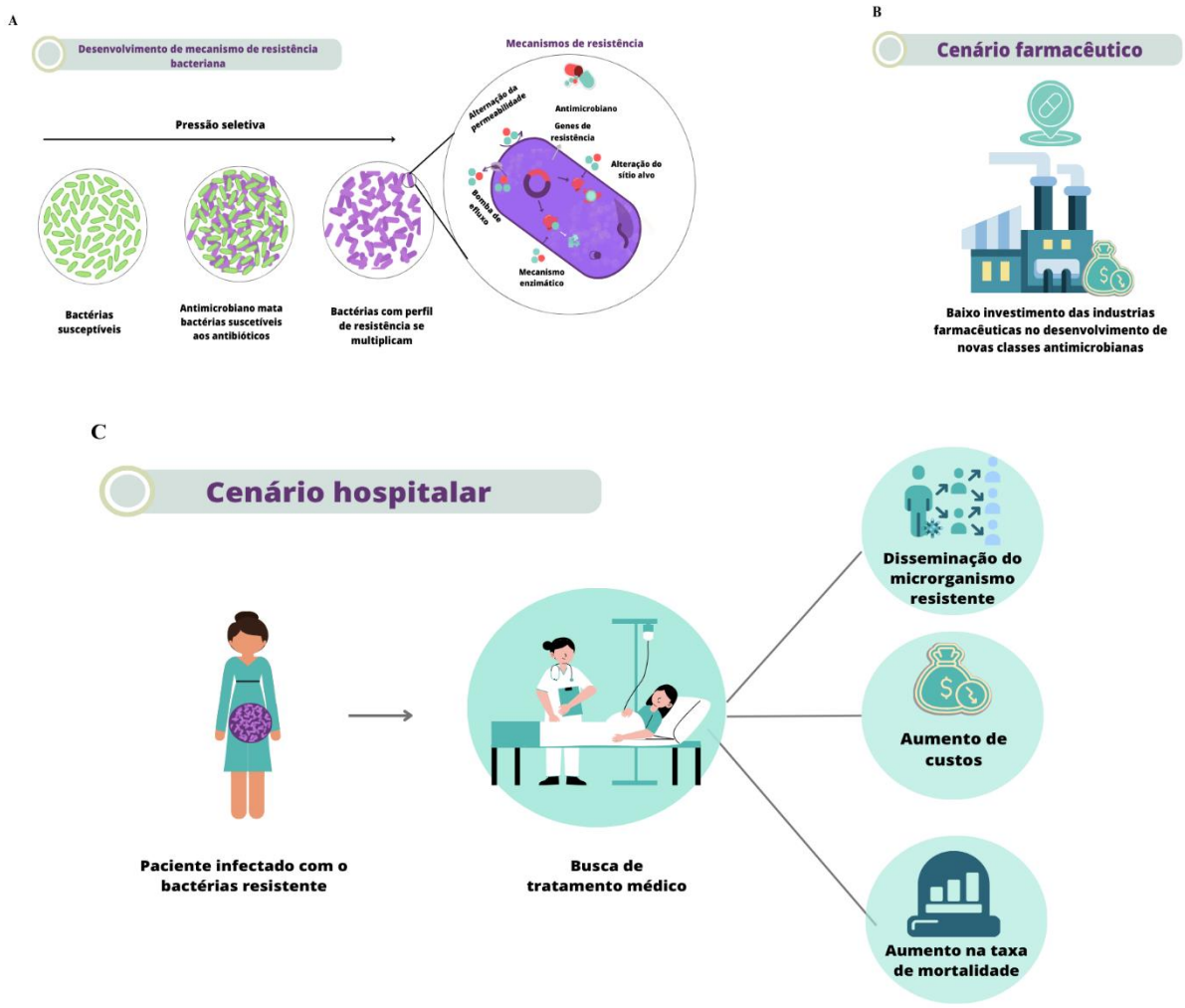

Figura 01. Cenário da resistência antimicrobiana a) Processo de seleção e disseminação de bactérias resistentes sob tratamento antibiótico; b) Cenário farmacêutico: baixo investimento no desenvolvimento de novos antibióticos; c) Desafios no cenário hospitalar relacionados à resistência bacteriana: paciente com infecção, ineficácia no tratamento → consequências (disseminação, tempo de estadia prolongada, maior letalidade). **Fonte:** Próprio autor, 2023.

2.2. Infecções causadas por isolados de *K. pneumoniae* multirresistente

Klebsiella pneumoniae é um patógeno oportunista Gram-negativo pertencente à família Enterobacteriaceae, responsável por aproximadamente 10% das infecções bacterianas

nosocomiais, e responsável por uma taxa de mortalidade de 50% entre pacientes que apresenta um quadro de pneumonia causada por esse microrganismo. No ano de 2019, a *K. pneumoniae* foi classificada como o terceiro microrganismo mais fatal. Portanto, a OMS reconheceu o isolado resistente como questão prioritária, pois possui alta capacidade de adquirir características de resistência a antibióticos, resultando na indisponibilidade de terapia eficaz frente a esse microrganismo (KARAMPATAKIS; TSERGOULI; BEHZADI, 2023; MARTIN; BACHMAN, 2018; MURRAY et al., 2022; ZHEN et al., 2020).

O aumento na prevalência de *K. pneumoniae* multirresistente é observado em áreas urbanas densamente povoadas e com alta utilização de serviços de saúde, resultando em taxas de infecção por esses microrganismos de aproximadamente 12% em países desenvolvidos e 19,1% em países em desenvolvimento. A Ásia é o continente que ocorre a maior incidência de aparecimento de isolados de *K. pneumoniae* MDR com 98.1%, América do Sul aparece em segundo lugar com uma estimativa de 72.4%, seguido da América do Norte com 13% e Túnisia com 3.1%. Eventualmente, os surtos de propagação desse isolado clínico ocorre em ambientes de saúde, especialmente em unidades de terapia intensiva (UTI) e instalações de cuidados de longo prazo (ASRI et al., 2021; GHASHGHAEE et al., 2018).

O relatório elaborado pela OMS, revela que microrganismos como *K. pneumoniae* está entre os principais responsáveis por alta frequência de sepse em hospitais e apresentou níveis de acima de 50% de resistência aos antimicrobianos. De acordo com dados relatados, no entanto, 8% das sepses causadas por *K. pneumoniae* eram resistentes aos carbapenêmicos, aumentando a possibilidade de morte por uma infecção intratável (OMS, 2022). Devido a limitação de antimicrobianos para a realização de tratamentos em isolados que já apresentava resistência, as polimixinas voltaram a se tornar alvo para clínica médica (AYE et al., 2020).

Contudo, o aparecimento e disseminação de isolados de *K. pneumoniae* resistente à polimixina já vem sendo observado em diferentes partes do mundo. Muitos mecanismos estão envolvidos na resistência à polimixina, incluindo a alteração do gene mgrB e aquisição de plasmídeo com MCR (DA SILVA et al., 2020). Motivo de grande apreensão para a saúde pública, pois tal cenário resulta em elevadas taxas de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados. A polimixina é uma das poucas opções terapêuticas restantes para infecções causadas por patógenos Gram-negativos multirresistentes. Esse fato reduz substancialmente as escolhas de tratamento disponíveis, aumentando o risco de condições fatais para pacientes colonizados por esses microrganismos (BURKI, 2018).

Além disso, a facilidade com que as bactérias resistentes aos antibióticos podem espalhar dentro e fora dos ambientes de saúde sublinha a urgência de abordar este problema

através de medidas reforçadas de controle de infecções. Tornando-se a propagação de infecções causadas por *K. pneumoniae* resistente à polimixina B um problema significativo no domínio dos cuidados de saúde e da gestão (DE OLIVEIRA et al., 2020; MOUBARECK, 2020).

2.3.Mecanismos de resistência a antibióticos

A resistência bacteriana aos antibióticos pode surgir por meio de mecanismos intrínsecos ou adquiridos. A resistência intrínseca refere-se à capacidade natural de uma espécie de se adaptar à ação de um antibiótico específico devido às suas características estruturais e funcionais inatas, sem a necessidade de adquirir novos genes ou sofrer mutações. Essas características podem incluir barreiras físicas, como a presença de membranas externas espessas em algumas bactérias Gram-negativas, que dificultam a penetração dos antibióticos. Além disso, algumas bactérias podem produzir enzimas que inativam os antibióticos, tornando-os menos eficazes. Essas características intrínsecas podem ser geneticamente determinadas e são fundamentais para a sobrevivência das bactérias em seu ambiente natural.

Em contraste, a resistência adquirida pode surgir de várias maneiras, incluindo mutações no DNA bacteriano ou pela aquisição de genes de resistência através de mecanismos como a transferência horizontal de genes. Tal situação, pode resultar na produção de enzimas que inativam os antibióticos, ou o desenvolvimento de bombas de efluxo que removem os antibióticos das células bacterianas. Além disso, mutações genéticas podem ocorrer naturalmente, levando a modificações nas proteínas alvo dos antibióticos ou em sistemas de regulação gênica. Essas alterações permitem que as bactérias resistam aos efeitos dos antibióticos, dificultando o tratamento de infecções bacterianas e aumentando os riscos de complicações graves e morte (BAPTISTA, 2013; DAVIES; DAVIES, 2010; DE OLIVEIRA et al., 2020). Esses mecanismos são adquiridos ao longo do tempo em resposta à pressão seletiva exercida pela exposição repetida aos antibióticos (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014; WRIGHT, 2003).

O surgimento de cepas resistentes à polimixina representa uma ameaça significativa para a saúde pública, sublinhando a necessidade urgente de investigação contínua e de estratégias inovadoras para combater eficazmente a resistência aos antibióticos (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014). Nesses cenários, a resistência bacteriana pode se espalhar rapidamente entre a população, exacerbando ainda mais o problema.

2.4.O impacto da pandemia de COVID-19 na resistência bacteriana.

O surgimento e rápida disseminação do vírus SARS-CoV-2 (síndrome respiratória aguda grave), agente causador da doença de coronavírus 2019 (COVID-19), culminou em mais de 6,8 milhões de mortes em todo o mundo, criando um estado de alerta global (LI et al., 2023). Os sistemas de saúde, enfrentando uma enfermidade pouco compreendida, tiveram que se adaptar rapidamente não apenas ao gerenciamento da pandemia, mas também aos efeitos secundários causadas pela mesma (LOYOLA-CRUZ et al., 2023; PATTON et al., 2024).

A pressão sob os sistemas de saúde levou, indiretamente, ao uso indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro. Devido a sobrecarga dos hospitais e à escassez de recursos para a prevenção e controle de infecções, muitos optaram por prescrever esses medicamentos na tentativa de prevenir doenças secundárias em pacientes com COVID-19 (RAWSON et al., 2020; SHARMA et al., 2020). Contudo, essa prática pode intensificar o surgimento e disseminação de resistência bacteriana e de microrganismos mais virulentos, agravando ainda mais as infecções associadas à assistência à saúde (INTRA et al., 2020).

Um estudo retrospectivo relatou que a colonização por Enterobacteriaceae resistentes aos carbapenêmicos, aumentou de 6,7% para 50% entre 2019 a 2020 (REHMAN, 2023). LI *et al.*,(2020) isolaram 159 cepas bacterianas de 102 pacientes com COVID-19 e infecções secundárias, desses isolados *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *Stenotrophomonas maltophilia* foram as mais comuns, com taxa de resistência aos carbapenêmicos de 91,2% para *A. baumannii* e 75,5% para *K. pneumoniae* (LI et al., 2020). Na França, identificaram que 26 pacientes com COVID-19 em UTI apresentavam uma co-infecção bacteriana, entre os quais os isolados apresentavam multiresistência (CONTOU et al., 2020).

Diante desse cenário preocupante, torna-se imperativo adotar medidas e estratégias robustas para controlar e tratar o avanço da resistência bacteriana, particularmente em um ambiente já estressado pela pandemia de COVID-19.

2.5. Óleos essenciais como uma abordagem alternativa para o tratamento de infecções bacterianas

Diante da crescente disseminação de microrganismos resistentes aos antibióticos convencionais, torna-se essencial explorar terapias alternativas.Neste contexto, a utilização de óleos essenciais (OE) para tratamento de saúde, pode ser utilizada como abordagem complementar à medicina tradicional, oferecendo uma abordagem natural, segura e economicamente viável (CHELOUATI et al., 2023).Os OE são compostos aromáticos altamente concentrados, extraídos de várias partes das plantas, como folhas, caules, flores, sementes ou raízes possuem as propriedades terapêuticas da planta de origem.

Os OE são obtidos através de processos como destilação possuem uma gama de compostos orgânicos voláteis, incluindo terpenos, aldeídos, fenóis e entre outros compostos imbuem de uma ampla gama de benefícios potenciais à saúde. Inúmeras investigações científicas relacionam os compostos presentes nos OEs aos seus efeitos antimicrobianos, antifúngicos, antivirais, antitumoral, antioxidante e anti-inflamatórios (ALI et al., 2015; D'AGOSTINO et al., 2019).

A utilização de óleos essenciais surgiu como um agente promissor de terapias alternativas para o tratamento de bactérias resistentes. Estudos demostram que a combinação de vários compostos presentes nos OEs resulta em uma eficácia potencializadora da ação antimicrobiana do que do seu composto majoritário isolado (D'AGOSTINO et al., 2019). Porém a composição dos OEs pode sofrer variações por fatores sazonais, estágio de maturidade, variação geográfica, genética, subespécies e até mesmo pelo método de extração pois podem gerar degradação térmica e hidrolítica dos compostos, e tais fatores podem resultar em consequências para sua aplicação e sua atividade antibacteriana (DA SILVA et al., 2022; DRINIĆ et al., 2020).

A vantagem da utilização de OE como uma terapia alternativa se dá pelo fato que os OE podem apresentar diversos mecanismo de ação dos óleos essenciais devido a interação complexa dos seus compostos bioativos. Quando aplicados, esses óleos podem atuar de diversas maneiras, podendo gerar o rompimento das membranas celulares como também podem interferir nas enzimas microbianas e nos processos metabólicos, perturbando a sua capacidade de replicação e desenvolvimento (Figura 02) (KON; RAI, 2012).Vários estudos presentes na literatura analisa as propriedades antimicrobianas e mecanismo de ação dos OE com potencial de inibir o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas (MOHAMED; ALOTAIBI, 2023).

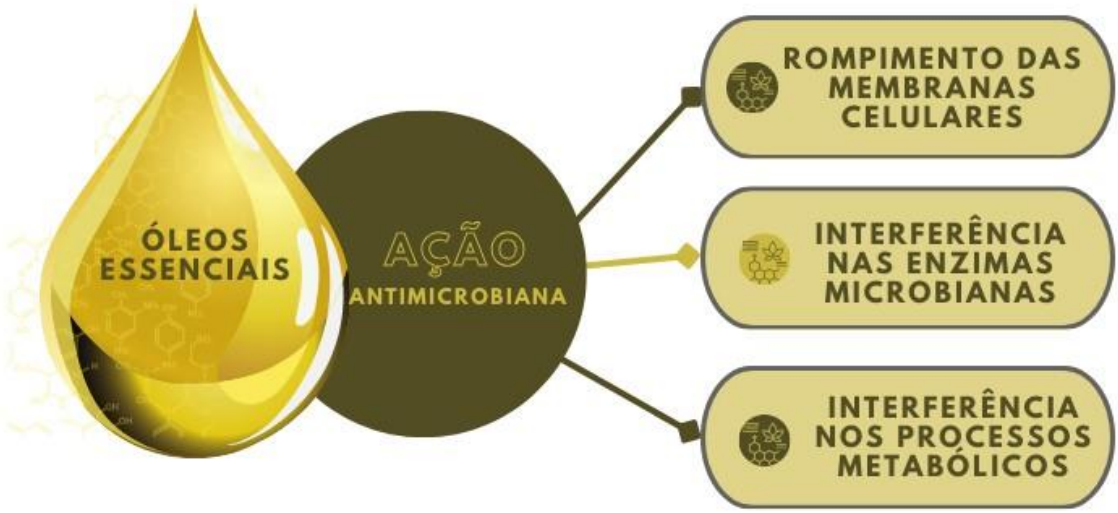

Figura 02. Mecanismos de ação dos óleos essenciais com ação antimicrobiana**. Fonte:** Próprio autor, 2023**.**

O cinamaldeído é muito explorado em vários estudos, no qual demonstra a ação antimicrobiana, seu efeito pode ser explicado através das interações do composto com as membranas celulares dos microrganismos, resultando em uma perturbação da membrana celular como também na inibição da glicose (GILL; HOLLEY, 2004; KON; RAI, 2012). Evidências corroboram em ensaios *in vivo,* no descreve o potencial do cinamaldeído frente a isolados clínicos de *K. pneumoniae* multirresistente (VAZ et al., 2023).

Da mesma forma, o carvacrol apresentou potencial antimicrobianos *in vivo* frente a isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase (KPC) (DE SOUZA et al., 2021a) no qual corroboram com resultados *in vitro,* a partir da elucidação do mecanismo de ação do composto que também é gerado a partir da perturbação a membrana externa das bactérias gram-negativas, libertando lipopolissacarídeos interferindo nos seus processos metabólicos e dificultando a sua capacidade de desenvolver mecanismos de resistência.

Além de estudos que utilizaram os compostos majoritários retirados dos óleos essenciais frente aos microrgarnismos resistentes, a literatura desmontra resultados utilizando toda a composição dos óleos essenciais como o de tea tree, cravo, tomilho, eucalipto e hortelã-pimenta com propriedades antimicrobianas. Esses óleos essenciais demonstraram eficácia contra uma variedade de bactérias resistentes, incluindo *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), *E. faecalis* resistente à vancomicina (VRE) e diversas cepas de *E. coli* multirresistentes (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017; PEREIRA et al., 2014; SILVA, 2010).

2.5.1. Cinnamomum triplinerve

C. triplinerve é uma espécie arbórea monóica, pertencente à Família: Lauraceae (CNCFlora, 2022), possui ampla distribuição em regiões tropicais como a Ásia e subtropicais abrangendo América Central, América do Sul e na Austrália. Esse gênero é facilmente reconhecido por apresentar folhas com nervuras triplas, margem da lâmina foliar ondulada e pecíolo na maioria das vezes com coloração avermelhada, e frutos com cúpula pateliforme com 6 tépalas persistentes (SANTOS; ALVES, 2013). A espécie tem como característica a fonte de óleos essenciais nos quais são amplamente retirada das folhas e casca com múltiplos benefícios à saúde humana.

O óleo essencial de *C. triplinerve* (*Ct*OE) *obtido* através dos caules e das folhas apreseta indícios literários que a utilização do *Ct*OE apresenta propriedades imunomoduladoras, anti-hipertensivas, capacidades antioxidantes, anti-inflamatórias, antitumoral, podendo ser utilizado também como um potencial antiviral e antimicrobiano. De acordo com a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), a difusão da exploração dessa espécie devido a colheita manual voltada ao seu valor medicinal, gera a ameaça dessa espécie se tornar extintas (KUMAR; KUMARI, 2019).

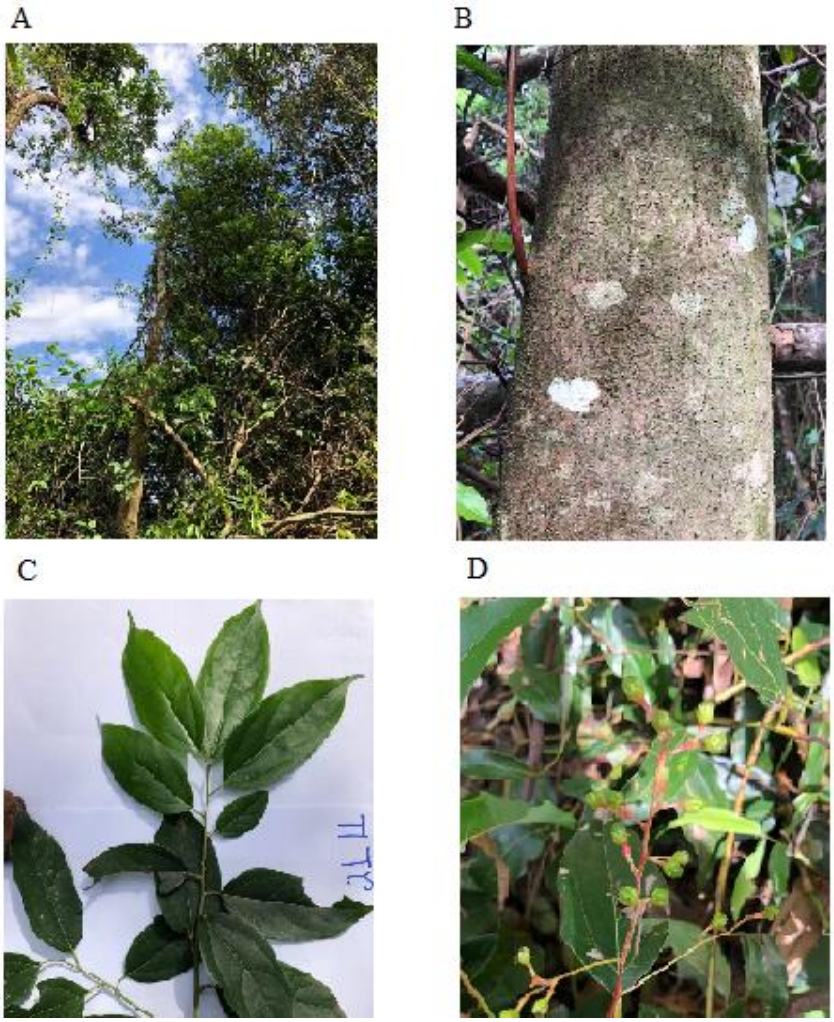

Figura 03. Morfologia de *Cinammomum triplinerve.* A) Árvore completa; B) Detalhe do caule; C) Folhas; D) Frutos. Fonte: Eduardo João Coutinho (UEMS-Naviraí), 2023.

A composição química de *Ct*OE destaca-se em terpenos, como Eugenol, Linalol, β-cariofileno, α-Pineno e β-Pineno, Terpinen-4-ol no qual é comumente encontrado em óleos essenciais derivados da espécie, compostos que possuem altas propriedades antioxidantes, antiinflamatórios e principalmente propriedades antimicrobianas. Contudo, devido condições naturais e de extrações a ordem e também o perfil químico dos OE podem apresentar diferenciações (DA SILVA et al., 2022).

2.5.2. Ocotea diospyrifolia

O. diospyrifolia é uma espécie de nativa do México e da América Central, pertencente à Família: Lauraceae. A árvore perene de característica de copa piramidal a oval, pode atingir alturas de até 12 metros, com suas folhas são brilhantes, coriáceas e de formato elíptico e sua casca lisa marrom-acinzentada quando jovem, tornando-se gradualmente mais áspera e escura

com a idade. Tem como característica a fonte de óleos essenciais nos quais são amplamente retirada das folhas, caules e flores. A planta é grandemente valorizada pelo seu potencial em propriedades medicinais, com efeitos antioxidantes e antimicrobianos (SILVA et al., 2021).

O potencial antimicrobiano presente no óleo essencial de *O. diospyrifolia* (*Od*OE) pode ser devido ao presença de compostos majoritários como sesquiterpenos e principalmente hidrocarbonetos (FABRI et al., 2019). Os metabólitos secundários comumente encontrados nos *Od*OE são de suma importância para o controle da disseminação de microrganismos, pois esses compostos demonstraram ter atividades antimicrobianas frente a patógenos suscetíveis e resistente (MAHIZAN et al., 2019).

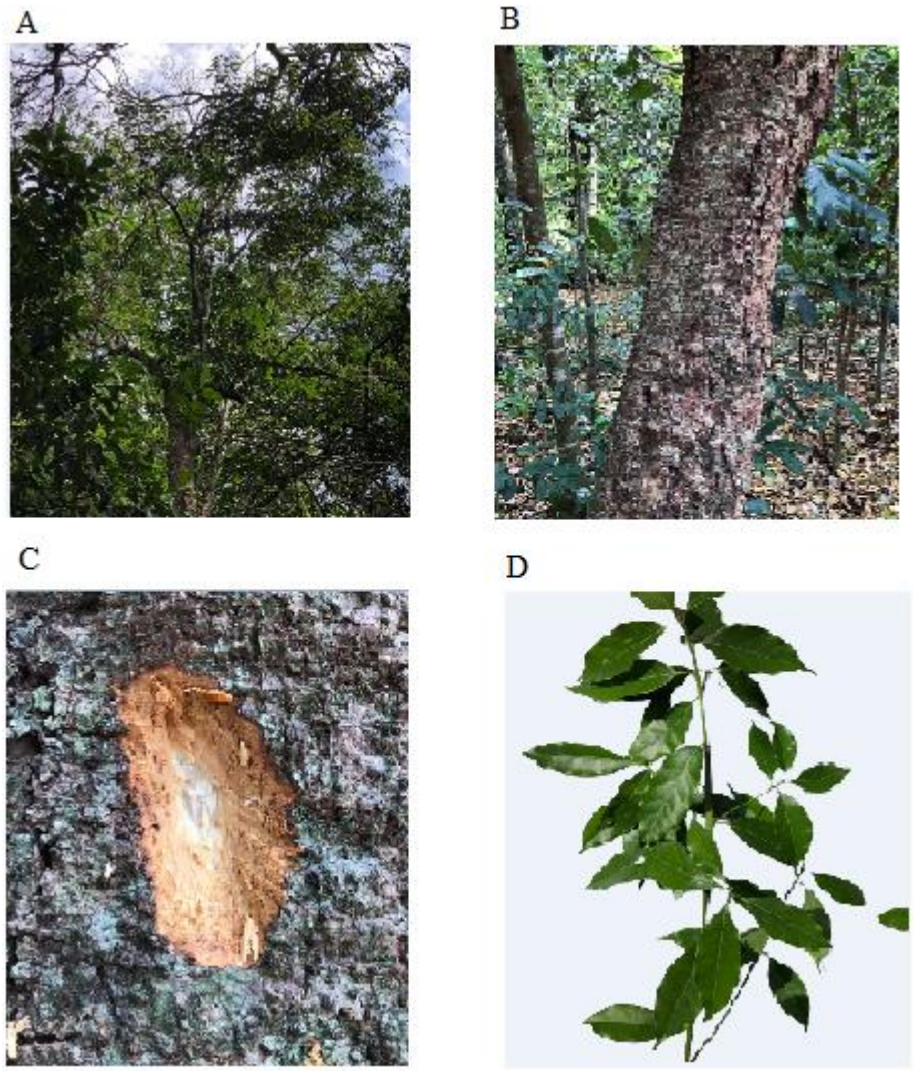

Figura 04. Morfologia de *O. diospyrifolia*. A) Árvore completa; B) Detalhe do caule; C) Detalhe do caule; D) Folhas. Fonte: Eduardo João Coutinho (UEMS-Naviraí), 2023.

2.6.Associação de antimicrobianos com óleos essenciais

Os OE, devido às suas propriedades antimicrobianas naturais, têm a capacidade de potencializar a eficácia dos agentes antimicrobianos convencionais, especialmente por causa de seus metabolismos secundários (FREITAS et al., 2020). A combinação de um antimicrobiano antimicrobiano com um produto natural, como os encontrados em OEs, tem mostrado promissoras perspectivas no controle da propagação de microrganismos, especialmente aqueles com mecanismos de resistência complexos (MAHIZAN et al., 2019).

As interações sinérgicas entre antibióticos e OEs podem permitir a administração de doses mais baixas de ambos os compostos, minimizando a ingestão de substâncias potencialmente tóxicas, mas também pode prolongar a eficácia dos tratamentos Além disso, a combinação de agentes pode dificultar o desenvolvimento de mecanismos de resistência bacteriana, destacando a viabilidade desta abordagem como uma terapia alternativa (LENHARD; NATION; TSUJI, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar *in vitro* e *in vivo* a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais *C*tOE e *Od*OE frente a um isolado clínico de *K. pneumoniae* resistente à polimixina B, isoladamente e em combinação com amicacina, buscando contribuir para o desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinação da composição química dos óleos essenciais;
- Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais, e da combinação destes com AMK, frente a *K. pneumoniae* resistente à polimixina B;
- Avaliação da cinética de atividade antimicrobiana dos tratamentos;
- Avaliação do possível mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos essenciais de maneira idenpedentes e associado com AMK;
- Avaliar a atividade hemolítica dos tratamentos isolados e em combinação;
- Avaliar a toxicidade *in vivo* dos tratamentos em modelo alternativo de infecção *C. elegans*.