



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

ISIS CAROLINE DA SILVA CIRINO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS DE PLANTAS
DA CAATINGA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *ACINETOBACTER BAUMANNII***

Recife
2019

ISIS CAROLINE DA SILVA CIRINO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS DE PLANTAS
DA CAATINGA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *ACINETOBACTER BAUMANNII***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Genética da Universidade Federal de Pernambuco
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do
título de Doutora em Genética.

Área de concentração: Genética

Orientadora: Dra. Tereza Cristina Leal-Balbino

Coorientadora: Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Cirino, Isis Caroline da Silva

Avaliação do potencial antimicrobiano de óleos de plantas da caatinga em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* / Isis Caroline da Silva Cirino. – 2019.

142 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Leal-Balbino.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2019.

Inclui referências.

1. Plantas medicinais. 2. Plantas da caatinga. 3. Bactérias. I. Leal-Balbino, Tereza Cristina (Orientadora) II. Figueiredo, Regina Célia Bressan Queiroz (Coorientadora) III. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020 - 061

ISIS CAROLINE DA SILVA CIRINO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS DE PLANTAS
DA CAATINGA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *ACINETOBACTER BAUMANNII***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Genética da Universidade Federal de Pernambuco
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do
título de Doutora em Genética.

Aprovada em 13/12/2019

BANCA EXAMINADORA

Dra. Tereza Cristina Leal-Balbino (Orientadora)
Instituto Aggeu Magalhães Fiocruz/PE

Prof. Dr. Tercílio Calsa Junior (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof^a. Dra. Jéssica Bezerra dos Santos Rodrigues (Examinadora Externa)
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Prof^a. Dra. Márcia Vanusa da Silva (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dr. André Luiz Santos de Jesus (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico este trabalho à todos aqueles que sempre estiveram ao meu lado apoiando, incentivando e nunca me permitindo desistir. Nestas linhas também há um pouco de cada um de vocês.

AGRADECIMENTOS

À minha família por serem meu porto seguro e sempre apoiarem minhas escolhas, ainda que elas me levem para longe de seu convívio diário. Amo vocês imensamente e serei sempre eternamente grata por ter cada um de vocês em minha vida.

Aos membros da banca, professoras Teresinha, Márcia e Jéssica, e aos professores Tercílio e André, pela disponibilidade, atenção e contribuições para este trabalho.

Às minhas orientadoras, Dra. Tereza Cristina Leal-Balbino pela confiança e oportunidade de explorar um mundo científico novo para mim e a Dra. Regina C. Bressan pelos ensinamentos, conselhos científicos (e de vida) e por todo apoio ao longo desses anos.

Aos meus colaboradores Larissa Oliveira, Igor Rocha e Maria Ribeiro por toda ajuda, empenho, dedicação e amizade para que esse trabalho fosse desenvolvido. Minha eterna gratidão à cada um de vocês.

À aluna de iniciação científica, Caroline Santana, pela convivência, paciência, dedicação e amizade durante este tempo. Pela oportunidade de compartilhar um pouco do meu conhecimento e de aprender com você. Espero que esta jornada tenha sido tão gratificante para você como foi para mim.

À todos que, de algum modo, contribuíram com este trabalho em especial Júlia Mariana, Taciana Higino, Ana Carla, Karla Ribeiro, Beatriz Toscano e Vanderlan Holanda. Meus sinceros obrigada à cada um de vocês.

Aos funcionários e pesquisadores do Departamento de Microbiologia, em especial à Carol, secretária do departamento, pelo carinho, disponibilidade, apoio, profissionalismo e dedicação.

Aos colegas do laboratório de microbiologia por todos os momentos de descontração dentro e fora do laboratório, pelo companheirismo e força para seguirmos fazendo ciência em tempos tão difíceis para nós.

Aos meus amigos Artur, Adriana, Allana, Felipe, Igor, Irassandra, Ludmila, Maria, Renata, Thaíse e Wagner por serem minha família, meu lar e meu porto seguro fora de casa. Por tantas vezes me segurarem e me ajudarem a seguir em frente. Nenhuma palavra escrita aqui será capaz de expressar minha amizade, amor e gratidão a cada um de vocês. Carregarei vocês sempre comigo.

Aos meus queridos Ana Paula, André e Anke por toda amizade, carinho e acolhida ao longo desse tempo. Vocês sempre terão um lugar especial em minha vida.

Às minhas amigas Clara, Débora, Helena, Jéssica e Natália por estarem ao meu lado em todos os momentos e em todas as horas, por me apoiarem e se fazerem presente não importando a distância.

À Sabrina e Michele por serem um presente inesperado, por me mostrarem a vida por outros olhares, pela amizade, carinho, pelos momentos compartilhados (de perto e também de longe), por todo apoio nas horas difíceis e pelos largos sorrisos felicidade. Obrigada e contem comigo pra tudo, todo dia.

À turma minha turma de pós-graduação, em especial Ana Paula, Adriana, Carlos, Caroline, Fernando, Ilka e Pedro (Peu) pelos inúmeros momentos compartilhados, pelas longas noites de estudos e finais de semanas insanos. Obrigada por tornarem essa jornada mais leve.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética em especial à Manassés, secretário do programa, pelo profissionalismo e dedicação em ajudar a todos da melhor forma e com todo empenho.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Genética, pelos ensinamentos e exemplos de caminhos a serem seguidos ou evitados. Obrigada por contribuírem com a minha formação pessoal e profissional.

À CAPES, ao CNPq e a FACEPE, pelo apoio financeiro para elaboração deste trabalho.

“Do alto da arrogância qualquer homem se imagina muito mais do que consegue ser. É que vendo lá de cima, a ilusão que lhe domina diz que pode muito antes de querer. Querer não é questão, não justifica o fim. Pra quê complicação, é simples assim.” (Lenine)

RESUMO

Acinetobacter baumannii é um dos principais patógenos nosocomiais resistentes a antibióticos em todo mundo, tornando necessária a busca por alternativas terapêuticas. Nesse contexto, os óleos de origem vegetal, surgem como uma opção viável. Aqui avaliamos o potencial antimicrobiano de óleos de plantas da Caatinga e dos terpenóides timol e carvacrol contra isolados clínicos de *A. baumannii* pelo método de microdiluição em caldo. Dentre os óleos testados, apenas os óleos essenciais de *Lippia alba* (OELA) e *Lippia macrophylla* (OELM), além do timol e carvacrol, apresentaram forte inibição no crescimento bacteriano (MICs entre 32-128µg/mL). A interação do OELA e do OELM com antibióticos convencionais, assim como a interação do timol com o carvacrol, pelo método de Checkerboard, resultou em efeitos aditivos e sinérgicos e, em alguns casos, reversão da resistência do isolado. A microscopia eletrônica de transmissão do OELM isoladamente e em combinação com a ceftazidima revelou alterações na célula bacteriana incluindo perda de estruturas envolvidas na adesão e inibição do processo de divisão celular. Os efeitos de timol e carvacrol no transcriptoma de *A. baumannii* foram avaliados por meio de RNA_seq sendo observadas diferenças nos níveis de expressão gênica do isolado Acb35 após os diferentes tratamentos e comparado ao controle sem tratamento. Os ensaios com eritrócitos apresentaram taxas de hemólise abaixo de 4% e efeitos citotóxicos foram observados em concentrações a partir de 128µg/mL. Nossos resultados sugerem que timol, carvacrol e LMEO aparecem como uma opção terapêutica promissora para *A. baumannii* multirresistentes, isoladamente ou como adjuvantes de antibióticos.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*. Resistência. Óleos essenciais. Adjuvantes de antibióticos. Transcriptoma.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is one of the leading antibiotic-resistant nosocomial pathogens worldwide, making the search for therapeutic alternatives necessary. In this context, oils of plant origin appear as a viable option. Here we evaluate the antimicrobial potential of Caatinga plant oils and thymol and carvacrol terpenoids against clinical isolates of *A. baumannii* by the broth microdilution method. Among the oils tested, only *Lippia alba* (LAEO) and *Lippia macrophylla* (LMEO) essential oils, besides thymol and carvacrol, showed strong inhibition in bacterial growth (MICs between 32-128µg/mL). The interaction of LAEO and LMEO with conventional antibiotics, as well as the interaction of thymol with carvacrol by the Checkerboard method, resulted in additive and synergistic effects and, in some cases, reversal of isolate resistance. Transmission electron microscopy of LMEO alone and in combination with ceftazidime revealed changes in the bacterial cell including loss of adhesion structures and inhibition of the cell division process. The effects of thymol and carvacrol on *A. baumannii* transcriptome were evaluated by RNA_seq and differences in gene expression levels of Acb35 isolate were observed after different treatments when compared to control without treatment. Erythrocyte assays showed hemolysis rates below 4% and cytotoxic effects were observed at concentrations from 128µg/mL. Our results suggest that thymol, carvacrol and LMEO appear as a promising therapeutic option for multidrug resistant *A. baumannii* alone or as adjuvant antibiotics.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*. Resistance. Essential oils. Antibiotic adjuvants. Transcriptome.

Lista de Ilustrações

Revisão da Literatura

Figura 1 –	Micrografia eletrônica de varredura de <i>A. baumannii</i> ATCC 19606	23
Figura 2 –	Fatores de virulência bacteriana	26
Figura 3 –	Ano de descoberta das principais classes antimicrobianas	32
Figura 4 –	Mecanismos intrínsecos de resistência	39
Figura 5 –	Mecanismos de resistência aos antibióticos	41
Figura 6 –	Representação esquemática dos principais sistemas de bomba de efluxo bacteriano	47
Figura 7 –	Número de mortes atribuídas à resistência antimicrobiana a partir de 2050	50
Figura 8 –	Número de novas drogas antimicrobianas aprovadas por intervalo de anos	51
Figura 9 –	Abrangência do bioma Caatinga	56
Figura 10 –	Localização geográfica do PARNA do Catimbau	57

Artigo I

Figure 1 –	Ultrastructural effects of LMEO and CTZ alone or in combination on <i>A. baumannii</i>	75
------------	--	----

Artigo II

Figure 1 – Effects of carvacrol (A) and thymol (B) on the viability of Vero cells lines cell viability	96
Figure 2 – Positively and negatively genes regulated after treatment with Thymol	99
Figure 3 – Positively and negatively genes regulated after treatment with Carvacrol.....	100
Figure 4 – Positively and negatively genes regulated after treatment with Carvacrol and Thymol	101

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1 – Classificação de Ambler das beta-lactamases presentes em <i>Acinetobacter baumannii</i>	44
Tabela 2 – Classificação de Ambler das beta-lactamases presentes em <i>Acinetobacter baumannii</i> (continuação)	45

Artigo I

Table 1 – Chemical composition of essential oil of <i>Lippia macrophylla</i>	67
Table 2 – Characterization of clinical isolates of <i>Acinetobacter baumannii</i> ...	67
Table 3 – Effect of <i>Lippia macrophylla</i> Essential Oil alone or in combination with reference antibiotics on clinical isolates of <i>A. baumannii</i> strains	69
Table 4 – Fractional inhibitory concentration index (FICI) for the combined treatment of <i>A. baumannii</i> strains with LMEO and antibiotics	70

Artigo II

Table 1 – MICs of thymol, carvacrol and antibiotics on <i>A. baumannii</i> strains	95
Table 2 – Thymol and carvacrol selectivity index	96
Table 3 – Effect of thymol and carvacrol alone or in combination on clinical isolates of <i>A. baumannii</i> strains	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Adjuvantes de antibióticos
ACB	<i>Acinetobacter baumannii</i> -calcoaceticus complex
ADC	<i>Acinetobacter-derived cephalosporinase</i>
ARDRA	<i>Amplified ribosomal DNA restriction analysis</i>
AMPc	3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico
AMEs	<i>Aminoglycoside-Modifying Enzymes</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CA-MHB	<i>Cation-adjusted Mueller-Hinton broth</i>
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacina
CRAB	<i>Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii</i>
CTX-M	<i>Cefotaxime-hydrolyzing enzyme</i>
d.C	Depois de Cristo
ESBL	β -lactamase de Espectro Estendido
EDTA	Ácido etileno diamina tetra-acético
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
Fur	<i>Ferric Uptake Regulator</i>
GEN	Gentamicina
GES	<i>Guiana-extend spectrum</i>
IAM	Instituto Aggeu Magalhães

IMP	Imipenemase
IPM	Imipenem
IS	Elemento de inserção
ITUs	Infecções do trato urinário
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
LPS	Lipopolissacarideo
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight</i>
MATE	<i>Multidrug and toxin extrusion</i>
MDR	<i>Multidrug resistant</i>
MDR-GNB	<i>MultiDrug Resistant Gram Negative Bacteria</i>
MH	Müeller-Hinton
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
mL	Mililitros
MLST	<i>Multi Locus Sequencing Typing</i>
MβL	<i>Metallo-β-lactamase</i>
NDM	<i>New Delhi metallo-β-lactamase</i>
Omps	<i>Outer-membrane proteins</i>
OMV	<i>Outer Membrane Vesicles</i>
OXA	Oxacilinase
OE	Óleos essenciais
PAV	Pneumonia associada ao ventilador

PBP	Proteína Ligadora de Penicilina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDR	<i>Pandrug resistant</i>
PE	Pernambuco
pH	Potencial hidrogeniônico
PLs	<i>Phospholipase</i>
PLA	<i>Phospholipase A</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PLD	<i>Phospholipase D</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RND	<i>Resistance-nodulation-division</i>
rep-PCR	<i>Repetitive element palindromic-polymerase chain reaction</i>
RPPs	<i>Ribosomal protection proteins</i>
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
tRNA	Ácido ribonucleico transportador
SIM	<i>Seoul imipenemase</i>
SPM	<i>São Paulo metallo-β-lactamase</i>
TEM-1	<i>Temoniera β-lactamase-1</i>
VIM	<i>Verona imipenemase</i>
VEB	<i>Vietnam extended-spectrum β-lactamase</i>
XDR	<i>Extensively drug resistant</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 OBJETIVOS	19
1.1.1 Objetivo geral	19
1.1.2 Objetivos específicos.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 GÊNERO <i>ACINETOBACTER</i>	21
2.1.1 Aspectos taxonômicos	21
2.1.2 Características gerais	22
2.1.3 Habitat	23
2.2 <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i>	24
2.2.1 Fatores de virulência.....	25
2.2.1.1 Componentes da membrana externa	26
2.2.1.2 Formação de biofilme	28
2.2.1.3 Vesículas de membrana externa.....	30
2.3.HISTÓRICO DOS ANTIMICROBIANOS	30
2.4 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i>	33
2.4.1 Opções de tratamento em <i>Acinetobacter baumannii</i>	33
2.4.1.1 Antibióticos Beta-lactâmicos.....	33
2.4.1.2 Antibióticos Aminoglicosídeos	35
2.4.1.3 Antibióticos Polimixinas	35
2.4.1.4 Antibióticos Minociclinas e Glicilciclinas	36
2.4.1.5 Terapias combinadas	37
2.4.2 Mecanismos de Resistência.....	38
2.4.2.1 Resistência Intrínseca	38
2.4.2.2 Resistência Adquirida.....	40
2.4.2.2.1 Hidrólise enzimática(Beta-lactamases)	41
2.4.2.2.2 Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos.....	46
2.4.2.2.3 Sistemas de bomba de efluxo	46
2.4.2.2.4 Modificação do sítio-alvo	48
2.4.2.2.5 Defeitos de permeabilidade.....	49
2.5 ADJUVANTES DE ANTIBIÓTICOS	49
2.6 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	52
2.6.1 Terpenóides	54

2.7. BIOMA CAATINGA	55
2.7.1 <i>Acrocomia</i> spp.	57
2.7.2 <i>Attalea speciosa</i> Mart. ex Spreng	58
2.7.3 <i>Caryocar coriaceum</i> Wittm	58
2.7.4 <i>Eugenia brejoensis</i> Mazine.....	58
2.7.5 <i>Lippia</i> spp.	59
2.7.6 <i>Syagrus coronata</i> (Mart.) Baccari	60
3 RESULTADOS.....	61
3.1 THE COMBINATORY EFFECT OF ESSENTIAL OIL FROM <i>LIPPIA MACROPHYLLA</i> ON CLINICAL RESISTANT ISALATES OF <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i>	61
3.2 COMPARATIVE TRANSCRIPTOMICS OF MULTIDRUG-RESISTANT <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> IN RESPONSE TO TREATMENT WITH THE PHENOL COMPOUNDS THYMOL AND CARVACROL	87
4 DISCUSSÃO GERAL	112
5 CONCLUSÕES	116
REFERÊNCIAS.....	117
APÊNDICES	133
ANEXO A – NORMAS PARA SUBMISSÃO ARTIGO I.....	141
ANEXO B – NORMAS PARA SUBMISSÃO ARTIGO II.....	142

1 INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii é um cocobacilos Gram-negativo estritamente aeróbico, com baixas necessidades nutricionais, capacidade de crescer em uma ampla faixa de temperatura e pH, positivo à catalase, negativo à oxidase e não fermentador de glicose. Além disso, *A. baumannii* caracteriza-se por ser um patógeno oportunista responsável por infecções de pele e tecidos moles, trato urinário, pneumonia e bacteremia; ocasionar infecções na comunidade, sendo também isolado em soldados durante guerras e desastres naturais. Os principais fatores que influenciam na predisposição às infecções por *A. baumannii* incluem internações prolongadas, supressão imunológica, idade avançada, presença de comorbidades, traumas graves ou queimaduras, uso prévio de antibióticos, procedimentos invasivos e presença de cateteres internos ou ventilação mecânica.

Embora seja considerado um patógeno de baixa virulência alguns fatores responsáveis pela patogenicidade de *A. baumannii*, já foram elucidados. No que se refere a resistência, *A. baumannii* apresenta mecanismos que contribuem na resistência a múltiplas drogas. Estes incluem beta-lactamases, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, bombas de efluxo, defeitos de permeabilidade e modificações no sítio alvo. Em decorrência da necessidade de combater a resistência aos antibióticos, há uma urgência na pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

Neste contexto, os potenciadores da atividade antibiótica, também conhecidos como adjuvantes antibióticos (AA) – compostos com pouca ou nenhuma atividade, mas que são capazes de aumentar a atividade antibiótica – surgem como uma alternativa promissora. Estudos prévios de compostos derivados de plantas identificaram alguns potenciadores de antibióticos principalmente através da inibição da bomba de efluxo. Estas características podem ser atribuídas ao fato de que muitos destes compostos são produzidos com a finalidade de proteção, para que a planta sobreviva as condições do ambiente no qual ela se encontra. As vantagens dos produtos naturais de origem vegetal já são bem conhecidas na literatura e incluem sua fácil obtenção e seleção com base em seu uso etnomedicinal.

Óleos essenciais (OEs) são uma mistura complexa do metabolismo

secundários das plantas com propriedades farmacológicas já descritas contra bactérias, fungos, vírus, protozoários e artrópodes; e quando combinado com antibióticos utilizados na clínica podem potencializar os efeitos desses por meio de interações sinérgicas e aditivas. A composição química dos OEs incluem principalmente terpenóides e fenilpropanóides, mas outros componentes como constituintes aromáticos e alifáticos também podem estar presentes.

Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos voláteis são os monoterpenos, os quais já são descritos por diversas propriedades, dentre elas as atividades antifúngica e antibacteriana. Como, por exemplo, os monoterpenos timol e carvacrol os quais são componentes comuns de muitos óleos essenciais e que têm sido amplamente estudados como agentes antimicrobianos.

Considerando a necessidade de identificar novos agentes terapêuticos para o tratamento e controle de infecções ocasionadas por bactérias resistentes, o presente trabalho avaliou o potencial antimicrobiano de *Attalea speciosa*; *Caryocar coriaceum*; *Acrocomia intumescens*; *Acrocomia aculeata*; *Syagrus coronata*; *Eugenia brejoensis*; *Lippia alba* e *Lippia macrophylla*, além dos efeitos dos terpenóides timol e carvacrol na expressão gênica em *A. baumannii*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar óleos fixos e essenciais isoladamente ou como potenciais adjuvantes de antibióticos em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Determinar o potencial antimicrobiano de óleos fixos e essenciais e seus componentes majoritários em isolados resistentes de *Acinetobacter baumannii*;
2. Analisar o efeito citotóxico dos Óleos Essenciais (OEs) e Compostos majoritários (CMs) sobre células de mamífero;

3. Avaliar os efeitos da interação entre os OEs do gênero *Lippia* e antimicrobianos convencionais frente aos isolados de *A. baumannii*;
4. Identificar alterações morfo-fisiológicas induzidas pelo Óleo Essencial de *Lippia macrophylla* (OELM) em isolados de *A. baumannii* resistentes e susceptíveis;
5. Investigar alterações no transcriptoma de *A. baumannii* devido a ação do timol e carvacrol.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GÊNERO *ACINETOBACTER*

2.1.1 Aspectos taxonômicos

O gênero *Acinetobacter* está atualmente classificado na família *Moraxellaceae*, dentro da ordem *Pseudomonadales* (Rossau et al. 1991). No entanto, devido à capacidade que os membros desse gênero possuem de se adaptar a maioria dos substratos por diferentes vias catabólicas – o que, por sua vez, pode resultar em interpretações equivocadas de testes bioquímicos – este gênero passou por extensas mudanças taxonômicas desde sua descoberta em 1911 (Peleg et al. 2008).

A primeira bactéria pertencente a este gênero foi identificada pelo microbiologista holandês Martinus Willem Beijerinck no ano de 1911, tendo sido isolada de uma amostra ambiental, sendo denominada *Micrococcus calcoaceticus* (Howard et al. 2012). O nome *Acinetobacter* (proveniente do grego “*akinetos*”, que significa imóvel) só foi proposto 43 anos depois (1954) por Brisou e Prevot com o intuito de diferenciar as espécies deste gênero dos organismos móveis presentes no gênero *Achromobacter* (Almasaudi 2018).

Um grande avanço na classificação dos indivíduos pertencentes ao gênero *Acinetobacter* se deu em 1986, a partir dos estudos de hibridação DNA-DNA de Bouvet e Grimont que resultaram na descrição de 12 espécies deste gênero, incluindo *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter junii* e *Acinetobacter lwoffii* (Vijayakumar et al. 2019). Nos anos subsequentes, um total de 31 espécies genômicas foram identificadas, 17 das quais receberam nomes de espécies, sendo as demais referidas como "Espécies Genômicas". Atualmente 59 espécies desse gênero já foram identificadas e receberam nomes válidos ou provisórios (Peleg et al. 2012; Vijayakumar et al. 2019).

Os estudos utilizando hibridação DNA-DNA mostraram ainda que dentro do gênero *Acinetobacter*, as espécies *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* (anteriormente denominada espécie genômica 3) e *Acinetobacter nosocomialis* (anteriormente denominada como espécies genômicas 13TU) compartilhavam um alto grau de semelhança entre si (em comparação com outras espécies) sendo, por isso, reunidas em um único grupo

denominado complexo *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* (complexo ACB). Além das espécies já mencionadas, recentemente duas novas espécies, *Acinetobacter seifertii* (anteriormente conhecidas como espécies genômicas próximas a 13TU) e *Acinetobacter dijkshoorniae* (intimamente relacionadas a *A. pittii*) foram identificadas como parte desse complexo (Rani et al. 2017; Vijayakumar et al. 2019).

Dentro do complexo ACB apenas a espécie ambiental *A. calcoaceticus* não é considerada patogênica (Peleg et al., 2008). Entretanto, todas as espécies deste grupo exibem propriedades fenotípicas e bioquímicas semelhantes, o que torna a identificação taxonômica das espécies que compõem este complexo extremamente difícil, de maneira que a identificação precisa dos membros clinicamente importante deve ser realizada por métodos moleculares (Harding et al. 2017; Lee et al. 2017).

Embora o esquema de hibridação DNA-DNA proposto por Bouvet e Grimont (1986) continue sendo um método de identificação válido para a detecção de várias espécies de *Acinetobacter*, com os avanços tecnológicos uma grande variedade de métodos genômicos foram desenvolvidos com forma de identificar as espécies deste gênero de maneira mais precisa (Lee et al. 2017). Dentre os quais podemos citar a reação em cadeia da polimerase baseada na sequência repetitiva extragênica palindrômica (rep-PCR), eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz tempo de voo (MALDI-TOF MS), ribotipagem, análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA), análise de DNA amplificado de forma aleatória (RAPD) e tipagem de sequências multilocus (MLST) (Lee et al. 2017; Vijayakumar et al. 2019).

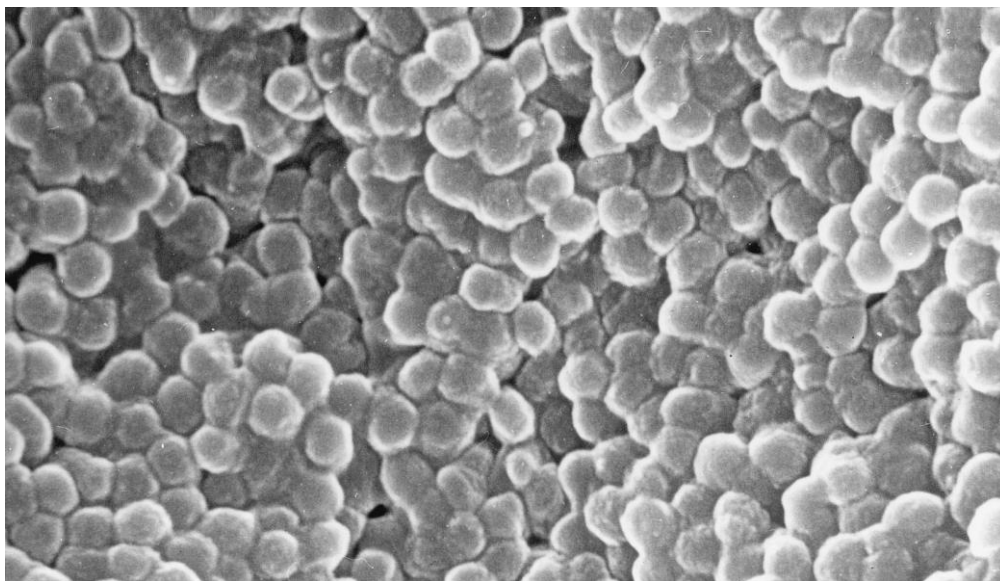
2.1.2 Características gerais

Acinetobacter spp. são cocobacilos Gram-negativos que caracterizam-se por apresentar de 1,0 a 1,5 por 1,5 a 2,5µm na fase logarítmica de crescimento, mas geralmente tornando-se mais cocóides na fase estacionária (Figura 1) (Bergogne-Bérézin and Towner 1996; Almasaudi 2018). São facilmente cultivadas em meios sólidos e líquidos comuns, tendo a maioria das espécies deste gênero crescimento em temperaturas que variam de 25°C a 45°C, sendo a temperatura de 37°C ideal para o crescimento de espécies implicadas em infecções humanas

e temperaturas abaixo de 30°C favorecem, preferencialmente, o crescimento de espécies ambientais (Towner 1992; Peleg et al. 2008; Antunes et al. 2011).

Pelo fato de não terem reagido de forma positiva a testes tradicionais de motilidade, as espécies pertencentes ao gênero *Acinetobacter* foram, durante muito tempo, classificadas como não móveis. Contudo, estudos mais recentes demonstraram que alguns microrganismos deste gênero são capazes de exibir motilidade de superfície ou de contração (Brisou e Prevot, 1954; Peleg et al. 2008; Antunes et al., 2011). Além disso, as espécies deste gênero caracterizam-se por serem estritamente aeróbios, não fastidiosos, não fermentadores, positivos à catalase e negativos à oxidase, além de apresentarem um conteúdo de G + C que varia de 39% a 47% (Howard et al. 2012; Lee et al. 2017; Almasaudi 2018).

Figura 1: Micrografia eletrônica de varredura de *A. baumannii* ATCC 19606 (ampliação final, x 18.000)



Fonte: Bergogne-Bérézin e Towner (1996)

2.1.3 Habitat

Acinetobacter spp. são organismos saprófitos, de vida livre e encontram-se amplamente distribuídas nas mais variadas partes do mundo e em diferentes ambientes, podendo ser isoladas de solo, água e águas residuais, plantas, artrópodes e pele de animais e humanos. Durante as décadas dos anos 60 e 70, o gênero *Acinetobacter* começou a ser relatado em hospitais e, devido a sua capacidade de sobreviver por períodos prolongados em objetos inanimados, passa a ser isolado nos mais variados sítios (Peleg et al. 2008; Atrouni et al.

2016; Gonzalez-Villoria e Valverde-Garduno 2016; Asif et al. 2018).

Embora o primeiro relato de infecções ocasionadas por *Acinetobacter* em ambiente hospitalar seja da década de 1960, até o início dos anos 70 as espécies deste gênero costumavam ser suscetíveis à maioria dos agentes antimicrobianos; contudo, nas décadas de 80 e 90 as taxas de resistência aumentaram significativamente (Peleg et al. 2008; Antunes et al. 2014).

Entre as espécies que compõe o complexo ACB, *A. baumannii* é clinicamente a mais importante, visto que a mesma é responsável por cerca de 80% das infecções e tem sido associada ao aumento nas taxas de mortalidade, despontando como um patógeno nosocomial de alta prioridade por se tornar um desafio no combate às infecções (Doi et al. 2015; Gonzalez-Villoria e Valverde-Garduno 2016; Vijayakumar et al. 2019).

2.2 ACINETOBACTER BAUMANNII

Atualmente, os patógenos nosocomiais que apresentam notória resistência aos antibióticos, bem como são responsáveis por elevadas taxas de morbimortalidade, são referidos pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas como “patógenos ESKAPE” e incluem: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter* spp. (Santajit and Indrawattana 2016).

Como já mencionado anteriormente, *Acinetobacter baumannii* é o membro mais importante do gênero *Acinetobacter* estando associado a infecções adquiridas em hospitais em todo o mundo (Lee et al. 2017). Ademais, esta espécie caracteriza-se por apresentar baixas necessidades nutricionais, além da capacidade de crescer em uma ampla faixa de temperatura e pH, e de resistir em superfícies abióticas por longos períodos, possibilitando sua sobrevivência e, conseqüentemente, sua disseminação no ambiente (Harding et al. 2017; Almasaudi 2018; Asif et al. 2018). Embora seja descrito na literatura por ocasionar taxas crescentes de infecções na comunidade, especialmente casos de pneumonia relacionados à pacientes com histórico de abuso de álcool (Dexter et al. 2015; Lee et al. 2017), *A. baumannii* também é descrita por estar relacionada à infecções decorrentes de ferimentos em soldados durante guerras (Camp e Tatum, 2010; Huang et al., 2012; Salloum et al., 2018), além de ter sido isolada de ferimentos em sobreviventes de desastres naturais (Hiransuthikul et al. 2005; Tao

et al. 2009; Potron et al. 2011). Contudo, é no contexto das infecções hospitalares que este patógeno apresenta maior notoriedade, sendo os principais fatores que influenciam na predisposição às infecções por *A. baumannii* internações prolongadas, supressão imunológica, idade avançada, presença de comorbidades, traumas graves ou queimaduras, uso prévio de antibióticos, procedimentos invasivos e presença de cateteres internos ou ventilação mecânica (Nowak and Paluchowska 2016; Asif et al. 2018; Morris et al. 2019; Palmer et al. 2019).

No que se refere às infecções, *A. baumannii* tem sido implicada, principalmente, por ocasionar quadros de pneumonia associada ao ventilador (PAV), que consiste em uma inflamação nos pulmões, sendo comumente observada em pacientes mais graves e que apresentem comorbidades; infecções do trato urinário (ITUs), podendo afetar qualquer um dos órgãos do trato urinário, incluindo a bexiga, os rins e a uretra; infecções de feridas na pele e das camadas de tecidos moles ao redor de uma ferida aberta, principalmente em pacientes que apresentem feridas por queimaduras; Bacteremia, que pode ser fatal em casos que evoluem para choque séptico; além de relatos de casos de endocardites e endoftalmites, ambas relacionadas a procedimentos cirúrgicos anteriores e/ou ao uso de válvulas cardíacas e lentes de contato, respectivamente; e meningite, sendo esta associada a várias comorbidades, podendo em alguns casos ser fatal (Peleg et al. 2008; Antunes et al. 2014; Almasaudi 2018; Morris et al. 2019).

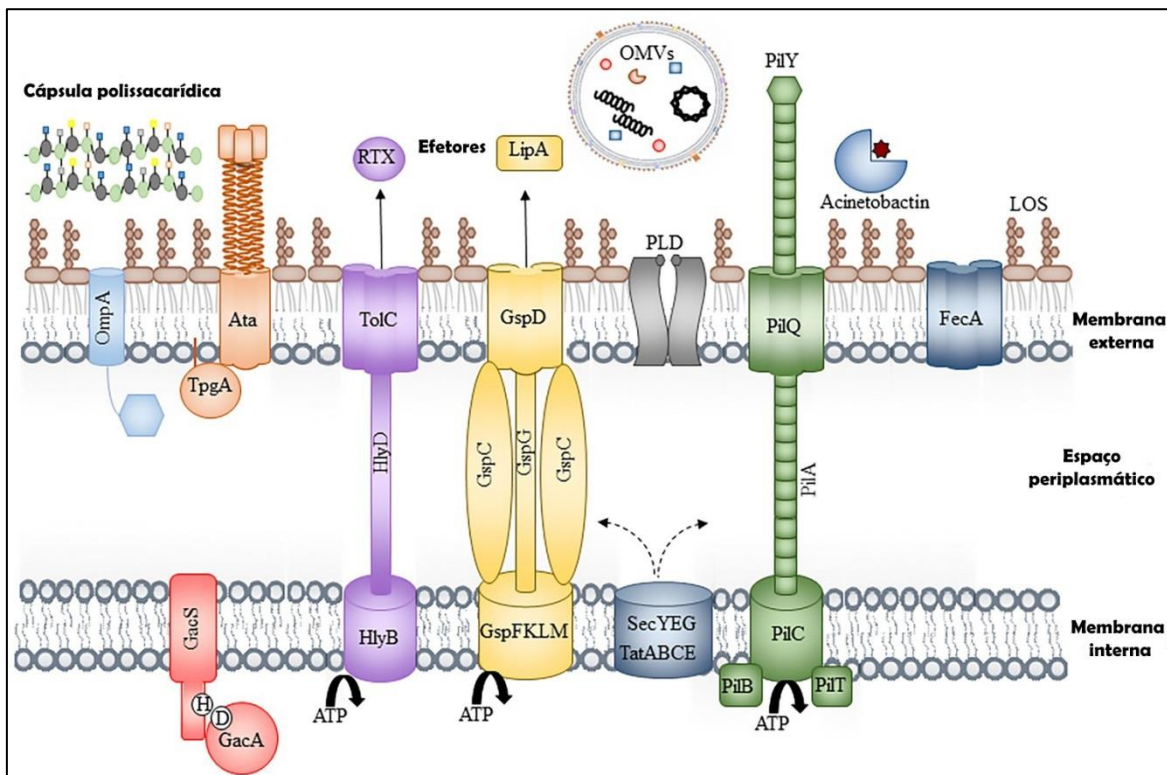
Com relação às taxas de mortalidade ocasionadas por *A. baumannii*, devido ao prognóstico crítico dos pacientes que adquirem as infecções é difícil atribuir uma taxa de mortalidade definitiva. No entanto, as taxas brutas de mortalidade variaram de 23 a 68% no casos de infecções hospitalares e chegam até 64% em casos de infecções adquiridas na comunidade (Morris et al. 2019). Todo o conjunto de características apresentadas por *A. baumannii* contribuem para seu sucesso como patógeno e reforçam a necessidade de compreender sua biologia e, desta forma, criar estratégias para conter seus avanços.

2.2.1 Fatores de virulência em *A. baumannii*

A. baumannii é considerado um patógeno de baixa virulência, visto que possui um número limitado de fatores de virulência “tradicionais”, que nem sempre estão presentes ou são conservados em todas as linhagens (Morris et al.

2019). Contudo alguns fatores, que são responsáveis pela sua patogenicidade, já foram elucidados. Na figura 2 são apresentados alguns dos fatores de virulência encontrado nas bactérias, senos os principais encontrado em *A. baumannii* brevemente apresentados nos tópicos seguintes.

Figura 2. Fatores de virulência bacteriana



Legenda: Diagrama esquemático do envelope celular bacteriano que descreve alguns dos fatores de virulência conhecidos, incluindo OmpA, os sistemas de secreção Tipo II, IV e V, fosfolipase D (PLD), sistemas de aquisição de ferro (Acinetobactin e FecA), o sistema de dois componentes da membrana interna, GacAS e fatores extracelulares, incluindo oligossacarídeo lipídico, polissacarídeo capsular e vesículas da membrana externa. **Fonte:** Adaptado de Morris et al. (2019)

2.2.1.1 Componentes da membrana externa

No contexto das interações hospedeiro-patógeno, as proteínas da membrana externa (Omps) desempenham um papel fundamental na adesão celular, transdução de sinal e patogênese. Além disso as Omps também atuam na regulação da entrada de antibióticos nas células por meio da redução da permeabilidade da membrana externa e pela ativação de bombas de efluxo de

múltiplas drogas (Vashist et al. 2010). As porinas são proteínas da membrana externa associadas à modulação da permeabilidade celular. A proteína de membrana externa A (OmpA, anteriormente denominada de Omp38) é a proteína de membrana externa mais abundante em *A. baumannii* e um dos fatores de virulência mais bem caracterizados. (Lee et al. 2017; Morris et al. 2019). A OmpA consiste em uma porina do tipo barril β e possui uma variedade de propriedades biológicas já identificadas *in vitro* as quais incluem, a capacidade de ligar-se às células epiteliais do hospedeiro, atingindo as mitocôndrias e induzindo a apoptose e desempenhar um papel importante na adesão e invasão de células epiteliais. Além disso, OmpA também está envolvida na resistência antimicrobiana de *A. baumannii* uma vez que, a interrupção do gene *ompA* ocasiona uma diminuição significativa nas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de vários antibióticos, sugerindo que esta proteína participa da extrusão de antibióticos do espaço periplásmico através da membrana externa e se une à membrana interna de sistemas de efluxo (Lee et al. 2017; Iyer et al. 2018; Morris et al. 2019). Ademais, OmpA melhora a sobrevivência e persistência de *A. baumannii*, facilitando a motilidade superficial e a formação de biofilme, além de regular a biogênese das vesículas da membrana externa. Desta forma, a proteína OmpA desponta um alvo interessante para o desenvolvimento de novos antibióticos e estratégias de prevenção (Ahmad et al. 2016; Lee et al. 2017).

As fosfolipases (PLs), que também constituem os componentes da membrana externa, são enzimas com capacidade de hidrolisar fosfolipídios e contribuem para a patogênese de bactérias Gram-negativas facilitando a lise na membrana da célula hospedeira (Kareem et al. 2017). Três classes de fosfolipases foram definidas de acordo com sua preferência de posição de clivagem: fosfolipase A (PLA) que hidrolisa os ácidos graxos do esqueleto do glicerol, fosfolipase C (PLC) que cliva o grupo principal fosforilado do fosfolipídio e fosfolipase D (PLD) que consiste em uma transfosfatidilase que atua na separação do grupo principal. A degradação dos fosfolipídios afeta a estabilidade das membranas celulares do hospedeiro, e o grupo principal clivado pode interferir na sinalização celular, resultando em alterações na resposta imune do hospedeiro (Kareem et al. 2017; Lee et al. 2017). Duas enzimas fosfolipase C e três fosfolipase D, todas com especificidade de substrato em relação ao

componente da membrana eucariótica, a fosfatidilcolina, foram identificadas como fatores de virulência em *A. baumannii*, ambas são reguladas transcricionalmente pelo regulador de captação férrica (Fur) e exibem atividade hemolítica contra eritrócitos humanos, auxiliando na aquisição de ferro (Morris et al. 2019).

Outros fatores de virulência relacionados aos componentes da membrana externa incluem a produção de exopolissacarídeos capsulares e Lipopolissacarídeos (LPS). *A. baumannii* é capaz de produzir o polissacarídeo capsular K1 o qual desempenha a função de proteger a bactéria contra as adversidades encontradas no hospedeiro, além de estar envolvido na resistência antimicrobiana, uma vez que foi observado que mutantes deficientes em polissacarídeos capsulares apresentam menor resistência intrínseca aos antibióticos peptídicos e que a presença de antibióticos induz a hiperprodução de polissacarídeos capsulares (Harding et al. 2017; Lee et al. 2017).

O LPS é o principal componente do folheto externo da membrana externa na maioria das bactérias Gram-negativas e, além de desempenhar função de proteção para a célula bacteriana, também está atrelado a respostas imunológicas do paciente. São tipicamente formados pelo lipídeo A, um núcleo interno, um núcleo externo e o antígeno O. O lipídeo A é o que ancora o LPS na membrana externa da bactéria e corresponde ao componente imunoestimulador dos LPSs. Os núcleos interno e externo são oligossacarídeos não repetidos que são proximais ao lipídeo A, e o antígeno O é um segmento de oligossacarídeos repetidos de comprimentos variáveis (Harding et al. 2017; Morris et al. 2019). Estudos mostram que o bloqueio da síntese de LPS pode ser uma estratégia eficiente na identificação de novos antimicrobianos, uma vez que modificações no LPS são capazes de diminuir a susceptibilidade de *A. baumannii* a muitos antibióticos importantes, como a colistina. Evidenciando, assim, o seu papel na resistência aos antibióticos (Lee et al. 2017).

2.2.1.2 Formação de Biofilme

Os biofilmes podem ser definidos como um estilo de vida bacteriano, constituindo ambientes comunitários dinâmicos, que apresentam em sua composição uma matriz heterogênea de proteínas, ácidos nucléicos, polissacarídeos e microcolônias bacterianas, dispersas pelos canais de água.

Além disso, os biofilmes desempenham a função de proteção das células bacterianas contra agentes antimicrobianos e ataques de macrófagos além de condições de estresse, como dessecação e desinfecção (McConnell et al. 2013; Morris et al. 2019).

A. baumannii possui a habilidade de formar biofilmes tanto em superfícies bióticas quanto abióticas, promovendo a sobrevivência em dispositivos médicos residentes, superfícies hospitalares ou em condições desfavoráveis. Essa capacidade de *A. baumannii* de crescer como biofilme em superfícies abióticas desempenha um papel importante nas infecções nosocomiais, devido à colonização superficial de equipamentos hospitalares e dispositivos médicos de permanência, como cateteres urinários, cateteres venosos e tubos endotraqueais (Longo et al. 2014; Doi et al. 2015; Eze et al. 2018).

A formação de biofilme consiste em um processo de vários estágios, que se inicia com a ligação, seguida de forte adesão e agregação de células em microcolônias e, por fim, crescimento e maturação do biofilme (Morris et al. 2019). Vários genes estão envolvidos na formação de biofilme em *A. baumannii*. O *bap*, *OmpA* e *pgaABCD*, além do operon que contém seis genes *csuA/B*, *A*, *B*, *C*, *D*, e *E*, são alguns deles. No entanto, inúmeras cepas de *A. baumannii* contêm mutações que interrompem a produção de alguns desses genes que formam biofilme, indicando a presença de mecanismos compensatórios alternativos para que a sua formação seja mantida (McConnell et al. 2013; Harding et al. 2017; Eze et al. 2018; Pakharukova et al. 2018).

Ainda que alguns estudos relatem a relação entre a formação de biofilme e a resistência aos antibióticos (Qi et al. 2016; Yang et al. 2019; Zeighami et al. 2019), sugerindo que a formação do biofilme proporciona uma diminuição na difusão de drogas através das células bacterianas e possibilitam a persistência de isolados clínicos com resistência a múltiplas drogas em ambientes agressivos, atualmente não está claro se existe uma correlação quantitativa entre a formação de biofilme e a resistência a antibióticos (Qi et al. 2016; Yang et al. 2019).

2.2.1.3 Vesícula de membrana externa

As vesículas de membrana externa (OMVs) são pequenas vesículas esféricas que medem de 10 a 300nm de diâmetro e são secretadas pelas membranas externas de várias bactérias patogênicas Gram-negativas. São compostas de LPS, membrana externa e proteínas periplásmicas, fosfolipídios e DNA ou RNA, e participam da virulência bacteriana, fornecendo fatores de virulência para o interior das células hospedeiras, facilitando a transferência horizontal de genes e protegendo as bactérias da resposta imune do hospedeiro (Koning et al. 2013; McConnell et al. 2013; Morris et al. 2019).

Por meio de análise de proteômica foi possível identificar cepas de *A. baumannii* capazes de secretar OMVs que apresentam vários fatores de virulência, incluindo OmpA, proteases e fosfolipases. Além disso, acredita-se que as OMVs funcionam como mecanismo de defesa bacteriana contra o sistema imunológico inato do hospedeiro devido à sua associação com sinalização bacteriana, modulação das interações patógeno-hospedeiro e evasão imune (Beceiro et al. 2013; Lee et al. 2017). Estudos mostram que *A. baumannii* utilizam OMVs como veículos de disseminação de plasmídeos contendo genes de resistência aos carbapenêmicos, incluindo blaOXA-24 e blaNDM-1 (Lee et al. 2017; Morris et al. 2019)

Considerando a importância que as vesículas de membrana externa apresentam na virulência de *A. baumannii*, acredita-se que as OMVs poderiam ser utilizadas como vacina acelular com o propósito de elevar a imunidade do hospedeiro e, desta forma, controlar as infecções por *A. baumannii* (Lee et al. 2017).

2.3. HISTÓRICO DOS ANTIMICROBIANOS

A era pré-antibiótica corresponde ao período no qual não se havia entendimento sobre o percurso, prevenção e formas de tratamento das infecções. Desse modo, por séculos a humanidade sofreu com inúmeras epidemias que dizimaram milhões de vida em todo mundo (Mohr 2016).

Ainda durante o século XIX, a Revolução Industrial e o processo de urbanização culminaram na mudança da população para as cidades o que, consequentemente, aumentou a incidência de doenças como a tuberculose e

sífilis devido às precárias condições de higiene e saneamento dentro dos centros urbanos (Zaffiri et al. 2012).

O século XX marca o início da era antibiótica e, embora haja a crença comum de que a exposição aos antibióticos esteja limitada a este período, os estudos realizados por Nelson (Nelson et al. 2010) e Bassett (Bassett et al. 1980) revelaram a existência de vestígios de tetraciclina em restos de esqueletos humanos da antiga Núbia Sudanesa, datados de 350-550 d.C. , assim como os trabalhos de Cokk e colaboradores que identificaram, por meio de estudos histológicos de amostras femorais de esqueletos, que datam do período romano antigo, a presença do mesmo antibiótico (Cook et al. 1989).

Em meados de 1904 o bacteriologista alemão Paul Ehrlich, juntamente com o químico Alfred Bertheim e o bacteriologista Sahatshiro Hata, iniciam suas pesquisas na busca por um medicamento contra a sífilis. No ano de 1909 – Paul Ehrlich chega ao Salvarsan – uma droga que se mostra promissora, mesmo diante dos efeitos colaterais apresentados (Aminov et al. 2010; Mohr 2016).

Embora uma das maiores conquistas científicas tenha se dado com a descoberta de uma substância produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum* (anteriormente denominado *Penicillium notatum*) capaz de inibir o crescimento bacteriano, no ano de 1928 pelo britânico Alexander Fleming, foi a descoberta das sulfonamidas – a classe mais antiga de antibióticos sintéticos sendo, até os dias atuais, muitos de seus derivados uma opção viável para terapia – em 1932 por Gerhard Domagk, que ganharam maior notoriedade no mundo científico (Zaffiri et al. 2012; Gould 2016; Mohr 2016).

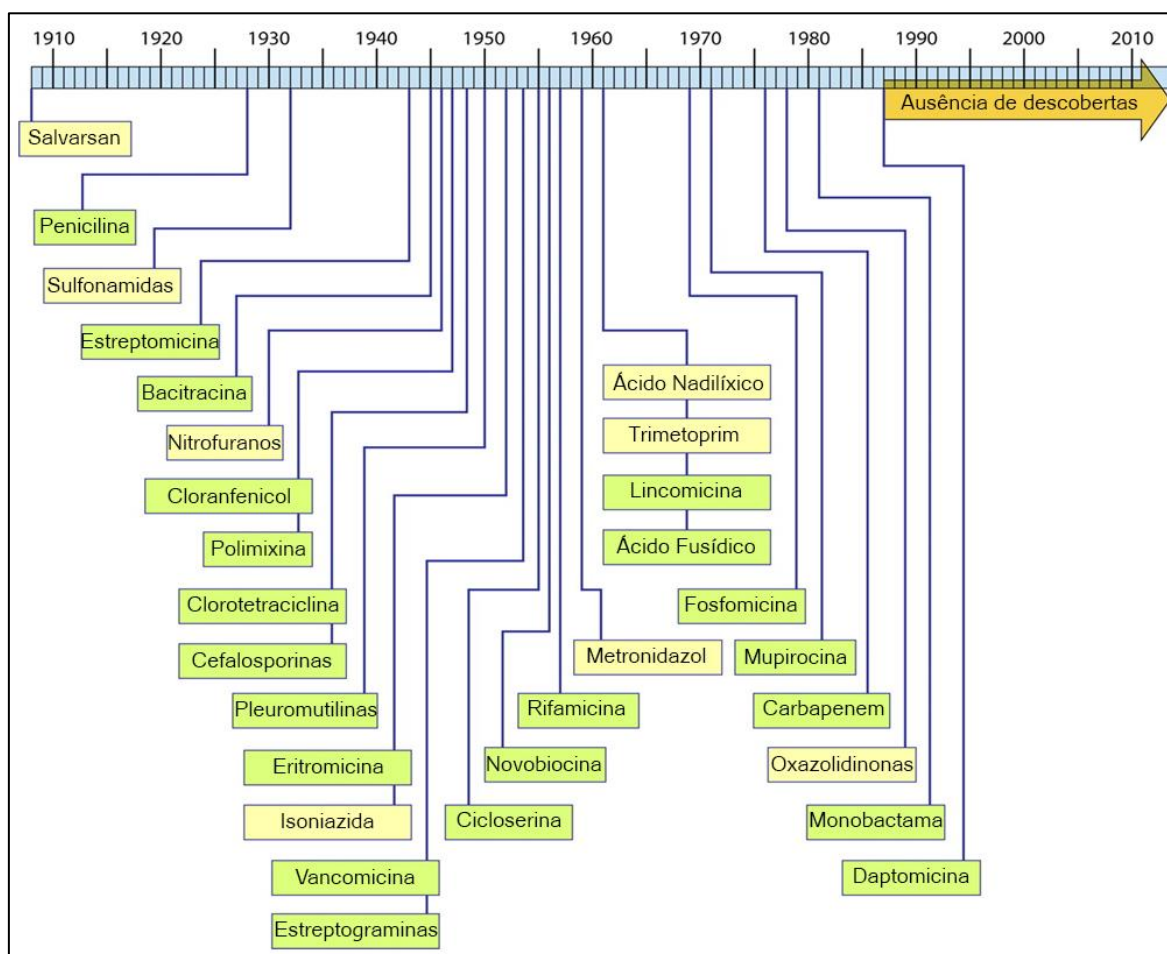
Estas descobertas iniciais fomentaram a indústria farmacêutica que buscava por novas formas de terapia e levaram a chamada “era de ouro” na descoberta de antibióticos – ou seus derivados – entre os anos de 1940 a 1960 na qual, quase todos os antibióticos em uso hoje foram descobertos (Figura 1) (Gould 2016).

No ano de 1942, Selman Waksman – bioquímico e ganhador do prêmio Nobel de Fisiologia/Medicina de 1952, pela descoberta da estreptomicina – e colaboradores, definiram o termo antibiótico como “uma substância química, de origem microbiana, com capacidade de inibir o crescimento ou as atividades metabólicas de bactérias e outros microrganismos” (Waksman 1947). Com o passar dos anos alguns outros significados foram sendo aplicados a este termo

como “um produto químico orgânico de origem natural ou sintética que inibe ou mata bactérias patogênicas”; “qualquer substância antimicrobiana” ou ainda, “substâncias antimicrobianas de origem microbiana” (Mohr 2016).

Independentemente da definição aplicada, é notório que a descoberta e introdução dos antimicrobianos na prática clínica foi uma das maiores revoluções na história da medicina (Aminov et al. 2010). Estes contribuíram, não apenas, para o controle de doenças infecciosas – principais responsáveis por morbidades e mortalidade humana durante boa parte de nossa existência – como possibilitaram avanços nas intervenções médicas, como quimioterapia contra o câncer, transplantes de órgãos e essencialmente todas as principais cirurgias invasivas (Wright 2010), proporcionando uma diminuição nas taxas de infecção cirúrgica de 40% para 2% (Zaffiri et al. 2012).

Figura 3. Ano de descoberta das diferentes classes de antimicrobianos



Fonte: Adaptado de Silver (2011)

2.4 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *ACINETOBACTER BAUMANNII*

A. baumannii possui diversos mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos, podendo um mesmo isolado apresentar mais de um mecanismo. Este fato, garante à bactéria a capacidade de resistir à um número variado de antibióticos das diferentes classes existentes. De acordo com seu perfil de resistência os isolados podem ser classificados como Resistente à múltiplas drogas (*Multidrug resistant* – MDR), quando apresentam resistência a pelo menos um agente antimicrobiano em três ou mais classes; Extensivamente resistente à drogas (*Extensively drug resistant* – XDR), quando não suscetível a pelo menos um agente antimicrobiano em todas, exceto duas ou menos classes de antibióticos; e Pan resistente à drogas (*Pandrug resistant* – PDR) não susceptível para todos os agentes em todas as categorias antimicrobianas (Basak et al. 2016).

2.4.1 Opções de tratamento em *Acinetobacter baumannii*

O tratamento de infecções por *A. baumannii* MDR, bem como por bactérias Gram-negativas multirresistentes (MDR-GNB) em pacientes críticos apresenta muitos desafios, uma vez que a resistência a muitas classes antimicrobianas proporciona uma redução na probabilidade de cobertura empírica adequada, ocasionando consequências desfavoráveis (Basseti et al. 2019). Nos tópicos a seguir os agentes antimicrobianos atualmente utilizados no tratamento de infecções por *A. baumannii* serão, brevemente, apresentados e, posteriormente, os mecanismos de resistência presentes neste patógeno serão descritos.

2.4.1.1 Antibióticos Beta-lactâmicos

Os beta-lactâmicos constituem uma classe de agentes antimicrobianos que abrangem uma ampla gama de moléculas com ação bactericidas administradas no tratamento das infecções ocasionadas por diversos patógenos, incluindo *A. baumannii* (Kong et al. 2010). A presença de um anel beta-lactâmico define quimicamente essa família de antibióticos, os quais são agrupados em penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, além de inibidores de beta-lactamase (Marín and Gudíol 2003). O mecanismo de ação dos beta-lactâmicos está relacionado à inibição da síntese da camada bacteriana do peptidoglicano, ligando-se com diferentes afinidades às Proteínas de Ligação à Penicilina (PBPs)

o que, conseqüentemente, ocasiona a interrupção da síntese da parede celular (Bush e Bradford, 2016).

Os carbapenêmicos são os agentes antimicrobianos de amplo espectro de maior potência dentro da classe dos beta-lactâmicos, tendo por isso seu uso restrito ao ambiente hospitalar como terapia de última escolha no tratamento de pacientes críticos (Nowak e Paluchowska, 2016). Os carbapenêmicos incluindo imipenem, meropenem e doripenem, geralmente têm sido considerados os agentes para tratar infecções por *A. baumannii*, devido à sua atividade efetiva contra esse organismo e à sua segurança favorável (Lee et al. 2017). Contudo, o uso extensivo desses antimicrobianos tem promovido, nos últimos anos, um aumento acentuado na resistência entre isolados de *A. baumannii* (Chen et al. 2015)

As beta-lactamases (que serão abordadas adequadamente mais adiante) são enzimas que rompem o anel beta-lactâmico inativando o antibiótico, conferindo às bactérias resistência a esta classe de antimicrobiano (Kong et al. 2010). O sulbactam é um potente inibidor de beta-lactamases e, da mesma forma que os demais componentes desta classe, também apresenta afinidade pelas PBPs de *A. baumannii* (Doi et al. 2015). Devido às semelhanças estruturais entre os inibidores de beta-lactamases e antibióticos peptídicos, alguns autores sugerem que os inibidores de beta-lactamase podem atuar potencializando a atividade de antibióticos peptídicos (Lee et al. 2017). A utilização do sulbactam em terapias combinadas com ampicilina é eficaz no tratamento de infecções da corrente sanguínea por *A. baumannii* MDR, da mesma forma que a combinação entre ampicilina / sulbactam / Carbapenem. Entretanto, um aumento constante na resistência ao sulbactam em isolados clínicos de *A. baumannii* tem sido observada na última década (Garnacho-Montero et al. 2015).

As cefalosporinas de terceira geração, ceftazidima e ceftriaxone, assim como a cefepima, que corresponde a uma cefalosporina de quarta geração ainda podem ser consideradas como opção no tratamento das infecções por *A. baumannii*. Entretanto, alguns estudos têm apontado um declínio na susceptibilidade na *A. baumannii* a estes agentes antimicrobianos em decorrência do aumento da resistência sugerindo que a utilização destas opções terapêuticas no tratamento das infecções está ameaçado (Chen et al., 2015; Harrison e Bratcher, 2019).

2.4.1.2 Antibióticos Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são agentes antimicrobianos bactericidas que atuam inibindo a síntese proteica por meio de uma ligação, com alta afinidade, ao sítio A da região decodificadora na porção 16S da subunidade 30S do RNA ribossômico bacteriano. Como consequência, ocorrem erros de tradução do mRNA, causando a interrupção dos processos metabólicos das células (Krause et al. 2016). Esta classe tem antibióticos frequentemente empregado no tratamento das infecções ocasionadas por bactérias Gram-negativas resistentes aos carbapenêmicos. Entretanto, o potencial nefrotóxico e ototóxico apresentado pelos aminoglicosídeos são fatores que, juntamente com o aumento das taxas de resistência, poderiam inviabilizar seu uso clínico (Ahmed et al. 2012; Bassetti et al. 2019).

Dentre os antibióticos desta classe, gentamicina, tobramicina e ampicacina, são os indicados no tratamento de infecções por *A. baumannii*. Desta forma, uma revisão sobre uma posologia mais adequada, que atenuem seus efeitos tóxicos, é de extrema importância para a manutenção desta opção terapêutica no tratamento das infecções ocasionadas por este patógeno (Durante-Mangoni et al. 2009).

2.4.1.3 Antibióticos Polimixinas

As polimixinas constituem um grupo de antibióticos peptídicos policatiônicos, sendo eficientes contra a maioria das bactérias Gram-negativas. Dos cinco tipos de polimixinas existentes, apenas polimixina B e E (também denominada de colistina) são utilizados na clínica (Lee et al. 2017). A colistina tem ação bactericida contra as espécies de *Acinetobacter* e atua perturbando a membrana celular bacteriana, aumentando assim a permeabilidade, levando à morte celular (Maragakis e Perl, 2008). Apresenta ainda efeito dependente da concentração, sendo administrada por via intravenosa de forma inativa, levando até 72h para ser convertida em sua forma ativa no plasma. Desta forma, a colistina costuma ser administrada, inicialmente, com uma dose elevada e, posteriormente, o tratamento segue com doses de manutenção (Mohamed et al. 2012).

Casos de nefrotoxicidade e neurotoxicidade têm sido associados à colistina e permanecem como uma das principais preocupações no uso de altas doses,

além disso, foi relatado que isolados de *A. baumannii* adquirem resistência à colistina durante o tratamento e com propensão a ocasionarem surtos hospitalares. Contudo, devido às opções terapêuticas limitadas, tanto a colistina quanto a polimixina B são utilizadas no tratamento das infecções por *Acinetobacter* (Cai et al., 2012; Fishbain e Peleg, 2010; Maragakis e Perl, 2008).

Diferentemente da colistina, a polimixina B é administrada em sua forma ativa, além de apresentar efeitos nefrotóxicos mais baixos em comparação à colistina. Entretanto, o aumento da intensidade da dose deste antimicrobiano amplifica a resistência à polimixina B em *A. baumannii*. Portanto, as terapias combinadas com polimixina B parecem ser uma das opções mais promissoras para minimizar o surgimento de resistência à polimixina (Doi et al. 2015; Lee et al. 2017). De maneira geral, o uso de polimixinas deve ser otimizado o máximo possível em termos de dosagens e indicações, tanto para maximizar sua eficácia quanto para coibir o surgimento de mais resistência (Basseti et al. 2019).

2.4.1.4 Antibióticos Minociclina e Glicilciclinas

Minociclina é uma tetraciclina de amplo espectro, proposta para o tratamento de *A. baumannii* resistentes devido ao seu alto grau de suscetibilidade a esse medicamento e seu perfil farmacocinético favorável (Lee et al. 2017). As tetraciclinas se ligam à subunidade ribossômica 30S e impedem a incorporação do aminoacil-tRNA no sítio A, inibindo a síntese de proteínas (Haghi-Aminjan et al. 2017). A terapia com minociclina apresenta altas taxas de sucesso no tratamento das infecções por *A. baumannii* em todo mundo (cerca de 80% dos isolados são susceptíveis). Contudo, desde a sua introdução na clínica, aproximadamente 20% dos isolados de *A. baumannii* apresentam resistência à minociclina (Lee et al. 2017).

A ampla disseminação de bombas de efluxo TetB, além da presença de proteínas de proteção ribossômica (RPPs) em *A. baumannii* são os principais determinantes da resistência à minociclina (Doi et al. 2015). Desta forma, a combinação da minociclina com outros antimicrobianos tais como rifampicina, colistina ou imipenem, torna-se uma boa opção no tratamento de infecções por *A. baumannii* resistentes a minociclina (Lee et al. 2017)

A tigeciclina é o primeiro antibiótico a ser desenvolvido em uma nova classe de antibióticos denominada glicilciclinas e consiste em um derivado

semissintético que apresenta uma excelente atividade *in vitro* contra *A. baumannii* multirresistentes (Lynch et al. 2017). A resistência à tigeciclina em isolados clínicos de *A. baumannii* já foi relatada em vários centros médicos e identificada em diferentes clones, sendo esta resistência associada à superexpressão de bombas de efluxo (Doi et al. 2015). Entretanto, devido a sua toxicidade relativamente baixa e resultados clínicos positivos a tigeciclina ainda pode ser utilizada em alguns casos de infecções por *A. baumannii*, sendo seu uso, mais comumente observado, em combinação com outros agentes antimicrobianos para o tratamento de infecções graves por CRAB. (Lee et al. 2017; Bassetti et al. 2019).

2.4.1.5 Terapias combinadas

A. baumannii vem apresentando taxas crescentes de resistência a diferentes agentes antimicrobianos, o que dificulta o tratamento das infecções ocasionadas por este patógeno. Desta forma, as terapias combinatórias têm sido aplicadas como uma alternativa para viabilizar o uso de antibióticos disponíveis e, consequentemente, combater a resistência (Xu et al. 2018). A avaliação dos efeitos sinérgicos decorrente da combinação entre antibióticos tem sido amplamente avaliada, ainda que a monoterapia de algum dos antibióticos utilizados não seja recomendada (Karakonstantis et al. 2019). Alguns exemplos deste tipo de interação serão mencionados abaixo.

A rifampicina é um antibiótico que exerce sua atividade ligando-se à RNA polimerase bacteriana e inibindo o início da transcrição. Embora seu uso em monoterapia não seja indicado no tratamento das infecções por *A. baumannii*, devido aos vários mecanismos de resistência apresentados pela bactéria a este antibiótico, sua combinação com, colistina ou imipenem mostrou resultados sinérgicos promissores (Pachón-Ibáñez et al. 2010; Doi et al. 2015). De modo semelhante ao observado na rifampicina, a fosfomicina – que consiste em um inibidor da biossíntese de peptidoglicano - não é ativa contra *A. baumannii*, mas os efeitos sinérgicos da sua interação com a colistina ou sulbactam entre isolados resistentes aos carbapenêmicos já foram relatados, bem como os efeitos da sua combinação com a amicacina (Doi et al., 2015; Leite et al., 2016; Sirijatuphat e Thamlikitkul, 2014). Outros estudos descrevem ainda a interação da vancomicina, um glicopeptídeo utilizado no tratamento das infecções ocasionadas

por bactérias Gram-positivas, com a colistina em isolados de *A. baumannii* (Gordon et al. 2010; Wareham et al. 2011; Liu et al. 2016)

A combinação entre antibióticos carbapenêmicos com a rifampicina ou sulbactam se mostrou promissora quando aplicada em modelos animais, sugerindo que infecções causadas por CRAB poderiam ser tratadas por este tipo de terapia. Contudo, testes clínicos em pacientes com bacteremia CRAB não foram satisfatórios (Garnacho-Montero et al. 2015).

Embora boa parte das combinações entre os antimicrobianos tenham seus resultados *in vitro*, vários estudos apontam uma redução nas taxas de mortalidade após infecção por *A. baumannii* multirresistentes, quando aplicados na terapia combinada com antimicrobianos (Batirel et al. 2014). Reforçando a importância dos testes de sinergia como forma de controlar a resistência bactéria.

2.4.2 Mecanismos de resistência

A resistência antimicrobiana é um fenômeno antigo que antecede a descoberta dos antimicrobianos e pode ser considerado como um resultado esperado da interação destes organismos com o meio ambiente (Munita e Arias, 2016). *A. baumannii* apresenta um número variado de mecanismos de resistência às diferentes classes de antibióticos existentes, estes incluem beta-lactamases, bombas de efluxo, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, defeitos de permeabilidade e alteração dos locais-alvo.

Embora a maioria desses mecanismos de resistência afetem classes distintas de antibióticos, sabe-se que vários mecanismos diferentes podem trabalhar juntos para contribuir para a resistência a uma única classe de antibióticos (Lin e Lan, 2014; Lupo et al., 2018).

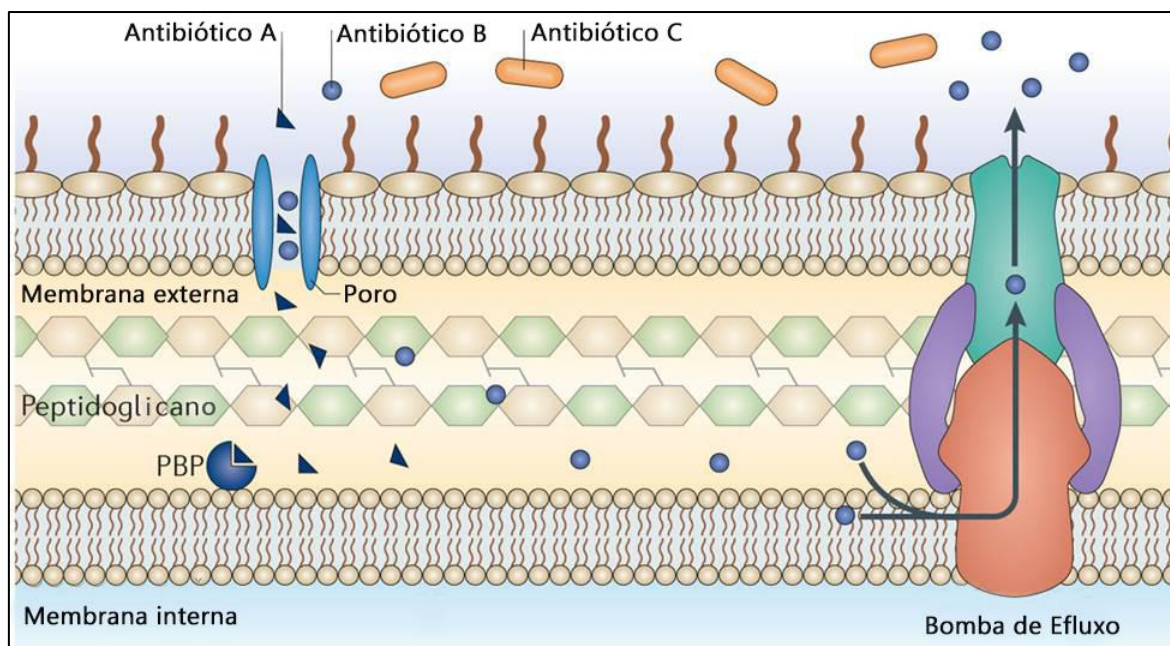
2.4.2.1 Resistência Intrínseca

Considerando que a maioria dos compostos antimicrobianos são moléculas produzidas naturalmente é natural que as bactérias co-residentes desenvolvam mecanismos resistência e, desta forma, garantindo a sua sobrevivência. Assim sendo, esses organismos são considerados "intrinsecamente" resistentes a um ou mais antimicrobianos (Munita e Arias, 2016). Na figura 4 são apresentados exemplos de resistência intrínseca que podem ser encontradas em bactérias.

Acinetobacter baumannii possui mecanismos de resistência intrínseca à

diversos antibióticos. Dentre estes, podemos mencionar a cefalosporinase AmpC que confere resistência à grande parte das cefalosporinas espectro ampliado e a sequência de inserção IS_{Aba1} que promove a resistência subsequente à ceftazidima e cefepima (Howard et al. 2012).

Figura 4. Mecanismos intrínsecos de resistência



Legenda: Ex: antibióticos beta-lactâmicos direcionados proteína de ligação à penicilina (PBP). O antibiótico A entrar na célula atingindo seu alvo e inibindo a síntese de peptidoglicano. O antibiótico B também pode entrar na célula através de uma porina, mas, ao contrário do antibiótico A, é eficientemente removido pelo sistema de efluxo. O antibiótico C não pode atravessar a membrana externa e, portanto, é incapaz de acessar a PBP. **Fonte:** Adaptado de Blair et al. (2014)

Além das cefalosporinases intrínsecas, também se observa, nos diversos clones de *A. baumannii*, a presença de bla_{OXA-51-like} que consiste em uma oxacillinase pertencente a Classe D de Ambler, naturalmente encontradas no cromossomo dessa espécie, sendo comumente utilizada como método de identificação (Cherkaoui et al., 2015; Evans e Amyes, 2014). Esta OXA normalmente não resulta em resistência aos antibióticos de amplo espectro, a menos que haja superexpressão decorrente da sua associação com o IS_{Aba1} (Evans e Amyes, 2014).

Ademais, sabe-se que *A. baumannii* expressa constitutivamente bombas de efluxo em nível basal que desempenham um papel em sua resistência

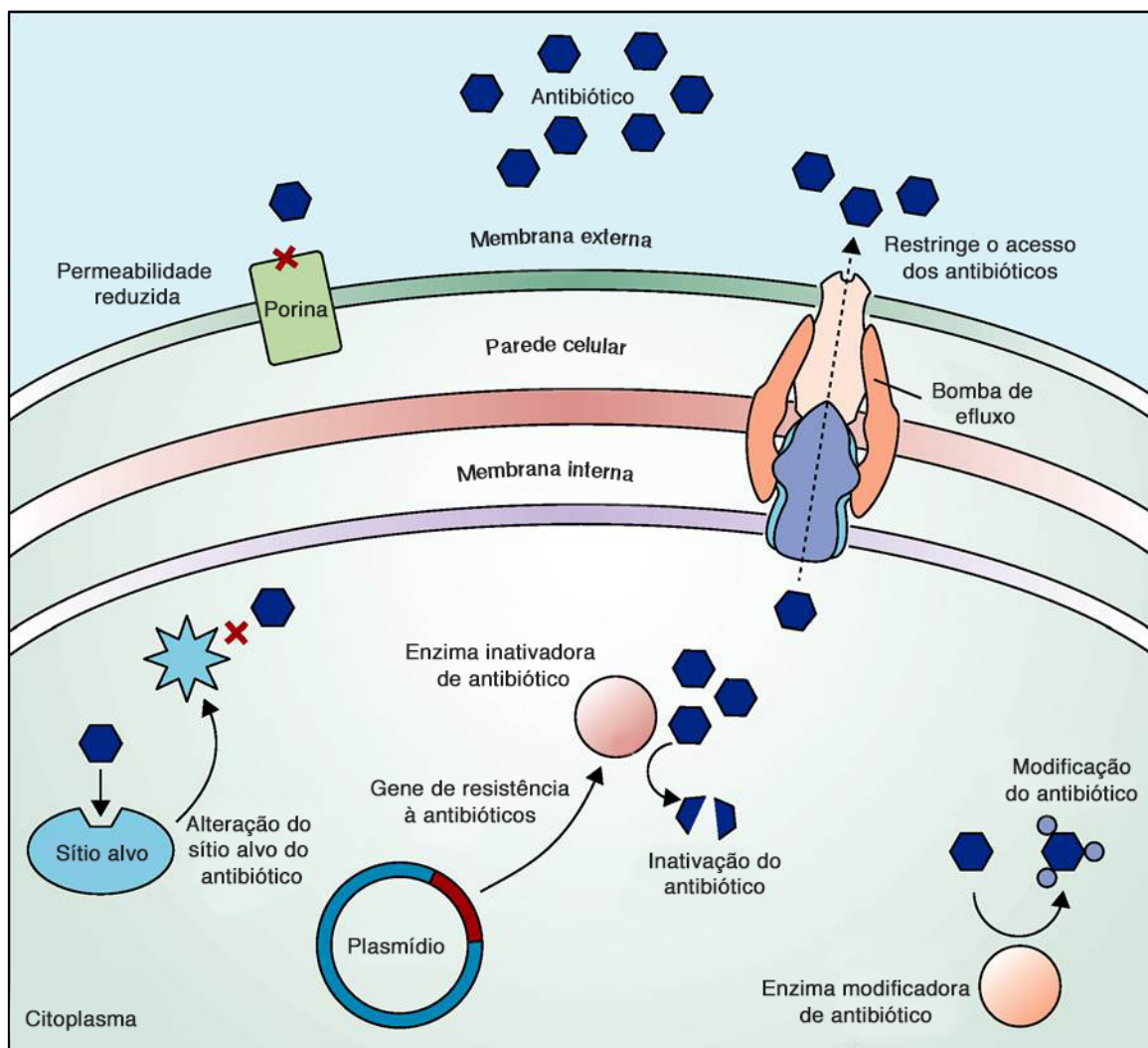
intrínseca a vários agentes antimicrobianos, sendo a bomba de efluxo do tipo *adeIJK*, a principal identificada nesta espécie (Xu et al. 2019). De maneira geral, todos esses fatores contribuem para a resistência intrínseca de *A. baumannii* a uma ampla gama de agentes antimicrobianos.

2.4.2.2 Resistência Adquirida

Acinetobacter spp. podem adquirir novos determinantes de resistência diferentes vias que incluem elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons, integrons, sequências de inserção e ilhas de resistência (Lynch et al. 2017). Os mecanismos de resistência antimicrobiana (**Figura 5**) são numerosos e incluem (1) inativação enzimática ou modificação de antimicrobianos; (2) alteração nos sítios alvos; (3) barreiras de permeabilidade à captação de antimicrobianos; (4) bombas de efluxo; (5) combinações de mecanismos, que podem ocorrer como resultado de grandes ilhas genômicas contendo múltiplos genes de resistência (Lee et al. 2017; Lynch et al. 2017).

Devido à sua plasticidade genômica, *A. baumannii* pode montar e modular uma série de mecanismos de resistência antimicrobiana para sobreviver à pressão seletiva que encontram, o que lhes confere uma forte vantagem ecológica no ambiente hospitalar (Antunes et al. 2014; Doi et al. 2015). Nos tópicos seguintes os principais mecanismos de resistência em *A. baumannii* serão brevemente apresentados.

Figura 5. Mecanismos de resistência aos antibióticos



Fonte: Adaptado de Sherrard et al. (2014)

2.4.2.2.1 Hidrólise enzimática (Beta-lactamases)

A inativação dos beta-lactâmicos pelas beta-lactamases, através da hidrólise da ligação amida do anel beta-lactâmico, representa um importante mecanismo de resistência em *A. baumannii*. Com base na homologia de sequência, as beta-lactamases são agrupadas em classes moleculares, A, B, C e D, de acordo com a classificação de Ambler, sendo os quatro tipos identificados em *A. baumannii* (Tabela 1 e Tabela 2) (Ambler 1980; Lee et al. 2017). As classes A, C e D atuam por um mecanismo baseado em serina, enquanto a classe B ou metalo-beta-lactamases precisam de zinco para sua ação (Kong et al. 2010).

As beta-lactamases de classe A são responsáveis, principalmente, pela

hidrólise de penicilinas e cefalosporinas e são inibidas pelo ácido clavulânico (Nowak e Paluchowska, 2016). Alguns destes tipos de beta-lactamases foram identificados em *A. baumannii* incluindo TEM, SHV, GES, CTX-M, SCO, PER, VEB, KPC e CARB, sendo algumas dessas enzimas, como TEM-1, CARB-4 e SCO-1, classificadas como beta-lactamases de espectro estreito, enquanto outras enzimas (por exemplo, PER-1, TEM-92 CARB-10, SHV-5, PER -2, CTX-M-2, CTX-M-15, VEB-1, GES-14 e PER-7) são beta-lactamases de amplo espectro (ESBLs) (Lee et al. 2017; Almasaudi 2018).

As ESBLs são responsáveis pela resistência às cefalosporinas, incluindo cefotaxima e são consideradas de grande importância clínica devido ao fato de serem plasmidiais, o que possibilita sua transferência horizontal (Munita e Arias, 2016; Peleg et al., 2008; Peterson and Kaur, 2018). *Acinetobacter. baumannii* apresenta mecanismos específicos para a aquisição de uma variedade de ESBL. Contudo, devido à presença de outros mecanismos que interferem nos testes de ESBLs, sua identificação fenotípica laboratorial apresenta algumas dificuldades (Peleg et al. 2008). Dentre as quais a presença da cefalosporinase AmpC, que pertence às beta-lactamases de Classe C, codificada cromossomicamente e que em nível basal não confere resistência às cefalosporinas; entretanto, a presença do elemento de inserção, IS*Aba1*, atua na sua regulação gênica resultando na resistência a penicilinas e às cefalosporinas de 1^a a 3^a gerações (Howard et al. 2012). Além da AmpC, algumas variantes ainda sem significado clínico bem definido, como ADC-33 e ADC-56, e que apresentam um espectro mais amplo de atividade contra as cefalosporinas, também foram identificadas (Potron et al. 2015).

Ao contrário das beta-lactamases de classes A, C e D (dependentes de serina), as beta-lactamases da classe B são metalo-beta-lactamases (MBLs) que requerem zinco ou outro metal pesado para a catálise (Jeon et al. 2015; Lee et al. 2017). As MBLs apresentam um amplo espectro de substrato e podem catalisar a hidrólise de praticamente todos os antibióticos beta-lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, exceto os monobactams. Eles não são inibidos por inibidores baseados em mecanismos, como clavulanato, sulbactam e tazobactam e sim por quelantes de metais como EDTA (ácido etileno diamina tetraacético) (Bonomo, 2017; Queenan e Bush, 2007).

As famílias mais comuns de MBLs classe B adquiridas incluem os grupos

Imipenemase (IMP), Vernona imipenemase (VIM), e a metalo beta-lactamase de Nova Déli (NDM). Todos os três tipos foram identificados em isolados de *A. baumannii* (Tabela 1), sendo IMP e VIM mais frequentemente encontrados (Bonomo 2017; Lee et al. 2017).

As beta-lactamases de classe D são chamadas oxacilinases (OXAs), pelo fato de hidrolisarem de maneira rápida e eficiente a isoxazolilpenicilina oxacilina. Até o momento, mais de 400 enzimas do tipo OXA foram identificadas e muitas variantes realmente possuem atividade de carbapenemases (Evans e Amyes 2014; Cavalcanti et al. 2017; Lee et al. 2017). As oxacilinases são classificadas em nove subgrupos de acordo com os tipos de sequência de aminoácidos, sendo os subgrupos OXA-23, OXA-24, OXA-51 e OXA-58, são predominantes em *A. baumannii* (Rodríguez et al. 2018). O subgrupo OXA-51 é o maior grupo identificado até o momento, sendo a enzima OXA-51, que nomeia o grupo, intrínseca em *A. baumannii* e encontradas naturalmente no cromossomo da espécie (Cherkaoui et al. 2015).

A enzima OXA-23 foi inicialmente identificada em isolados de *A. baumannii* em 1985 no Reino Unido, sendo o gene *bla*_{OXA-23} amplamente disseminado e altamente frequente nesta espécie (Rodríguez et al. 2018). Um relatório da Índia mostrou que *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-23} estavam presentes em todos os 103 isolados de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos e quase 80% dos isolados tinham *ISAba1* a montante do gene *bla*_{OXA-23}, indicando a prevalência da inserção de *ISAba1* (Vijayakumar et al. 2016). De modo semelhante ao que ocorre com a *AmpC*, a sequência de inserção de *ISAba1* na sequência está associada à superexpressão de *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} ou *bla*_{OXA-58} em *A. baumannii* (Lee et al., 2017; Walther-Rasmussen e Høiby, 2006)

Embora *A. baumannii* apresente diferentes classes de beta-lactamases, as carbapenemases adquiridas têm sido relacionadas a surtos decorrentes de isolados resistente aos carbapenêmicos e, desta forma, têm se tornado um problema de saúde pública nos últimos anos. As Oxacilinases (OXAs) e Metallo-beta-Lactamases (MBLs) são as enzimas mais comumente identificadas, embora haja uma elevada prevalências das OXAs em *A. baumannii* (Jeon et al., 2015; Nowak e Paluchowska, 2016)

Tabela 1: Classificação de Ambler das beta-lactamases presentes em *Acinetobacter baumannii*.

Beta-lactamase	Sítio ativo	Classe /subgrupo	Enzima	Substratos
Penicillinases	Serina	Classe A	TEM-1, TEM-92	Penicilinas / 3º geração de Cefalosporinas
			GES-1, GES-5, GES-11, GES-12, GES-14	
			PER-1, PER-2, PER-7	
			CTX-M-2, CTX-M-15	Penicilinas
			VEB-1	
			SCO-1	
Metallo-beta-lactamases	Zinco	Classe B	CARB-4, CARB-10	Todos os β -lactâmicos
			KPC-2, KPC-10	
			IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5, IMP-6, IMP-8,	Todos os β -lactâmicos exceto Monobactâmicos
			IMP-11, IMP-19, IMP-24	
			VIM-1, VIM-2, VIM-3, VIM-4, VIM-11	
Cefalosporinases	Serina	Classe C	NDM-1, NDM-2, NDM-3	Cefamicinas/ 3º geração de Cefalosporinas
			SIM-1	
			AmpC	

Fonte: Adaptado de Lee et al. 2017; Jamal et al. 2018; Eichenberger e Thaden 2019

Tabela 2: Classificação de Ambler das beta-lactamases presentes em *Acinetobacter baumannii*. (Continuação)

Beta-lactamase	Sítio ativo	Classe /subgrupo	Enzima	Substratos
Oxacillinases	Serina	Classe D		Todos os beta-lactâmicos (embora as enzimas da classe D apresentem variados espectros de atividade)
		Subgrupo OXA-2	OXA-21	
		Subgrupo OXA-10	OXA-128	
		Subgrupo OXA-20	OXA-37	
		Subgrupo OXA-23	OXA-23, OXA-133, OXA-239	
		Subgrupo OXA-24	OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, OXA-72, OXA-143, OXA-182	
			OXA-51, OXA-64, OXA-65, OXA-66, OXA-68, OXA-70, OXA-71, OXA-69, OXA-75, OXA-76, OXA-77, OXA-79, OXA-80, OXA-104,	
		Subgrupo OXA-51	OXA-106~OXA-112, OXA-82, OXA-83, OXA-83, OXA-84, OXA-86, OXA-87, OXA-88, OXA-91, OXA-93, OXA-94, OXA-95, OXA-96, OXA-92, OXA-113	
		Subgrupo OXA-58	OXA-58, OXA-96, OXA-97	
		Subgrupo OXA-143	OXA-253	
		Subgrupo OXA-235	OXA-235	

Fonte: Adaptado de Lee et al. 2017; Jamal et al. 2018; Eichenberger e Thaden 2019

2.4.2.2.2 Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos

Como já descrito anteriormente, os antibióticos pertencentes à classe dos aminoglicosídeos caracterizam-se pela inibição da síntese proteica e atuam por meio de sua ligação ao ribossomo bacteriano. Assim sendo, um dos mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos presente em *A. baumannii* é a modificação do sítio ribossomal através da metilação (Krause et al. 2016). Devido às suas características moleculares, estes antimicrobianos são particularmente susceptíveis a ação de enzimas, que agem por meio da adição de grupos químicos a sítios vulneráveis na molécula do antibiótico, denominadas de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (*Aminoglycoside-Modifying Enzymes* AMEs) (Esterly et al. 2011; Krause et al. 2016).

As AMEs podem ser classificadas em acetiltransferases, adeniltransferases e fosfotransferases. Essas enzimas são evolutivamente diversas e variam nos aminoglicosídeos que são capazes de modificar e estão tipicamente presentes em elementos transponíveis e são transferidas entre bactérias patogênicas (Jamal et al., 2018; Lee et al., 2017; Munita e Arias, 2016). No que se refere a *A. baumannii*, vários estudos mostram que todos os isolados apresentam enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, com produção de não apenas uma enzima, mas uma combinação delas, conferindo altos níveis de resistência às estes antimicrobianos (Lee et al. 2017).

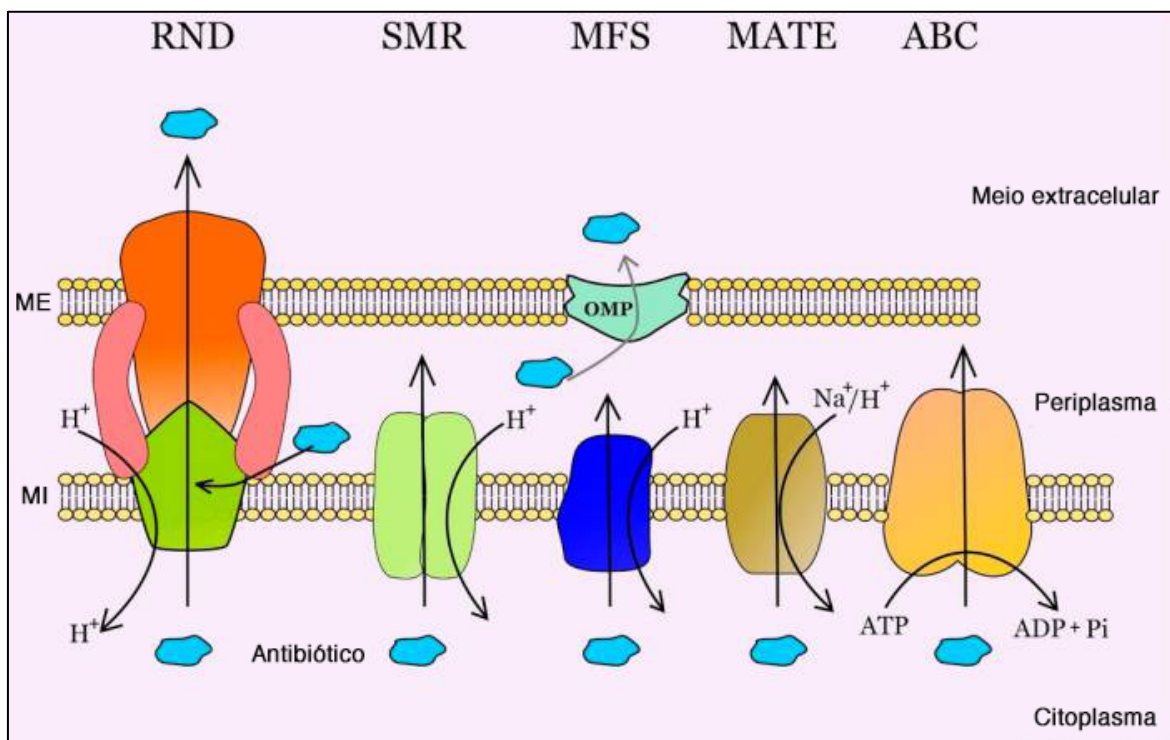
Além dos fatores acima mencionados, a resistência a aminoglicosídeos também está associada a bombas de efluxo ativas. A superexpressão da bomba de efluxo do tipo AdeABC pode aumentar a resistência aos aminoglicosídeos e, soma-se a isto, o fato de que a gentamicina e canamicina são substratos da bomba AbeM, um membro da família de bombas de efluxo do tipo MATE (multidrogas e extrusão de compostos tóxicos) (Almasaudi 2018; Jamal et al. 2018).

2.4.2.2.3 Sistemas de bomba de efluxo

Os sistemas de bomba de efluxo constituem um mecanismo de resistência que se encontra presente em todas as células desempenhando função de proteção contra a ação de compostos que venham a ser tóxicos para as mesmas (**Figura 6**). A superexpressão deste mecanismo tem sido constantemente associada ao surgimento de cepas multirresistentes. Embora o efluxo de

composto ocorra com gasto energético, este processo não tem por característica alterações ou mesmo a degradação do antibiótico (Blanco et al. 2016; Du et al. 2018).

Figura 6. Representação esquemática dos principais sistemas de efluxo bacteriano



Legenda: Superfamília de resistência-nodulação-divisão (RND), a família de pequenas resistências a múltiplas drogas (SMR), superfamília de facilitadores principais (MFS) a família de múltiplas drogas e extrusão de compostos tóxicos (MATE) e a superfamília do cassete de ligação à adenosina trifosfato (ATP) (ABC). Mi: Membrana interna. ME: Membrana externa. OMP: Proteína da membrana externa. **Fonte:** Adaptado de Blanco et al. (2016)

Dentre as várias classe de sistemas de efluxo já identificados, quatro categorias, como a superfamília de resistência-nodulação-divisão (RND), a família de extrusão de multidrogas compostos tóxicos (MATE) , a superfamília de facilitadores principais (MFS) e a família de pequena resistência a multidrogas (SMR), estão relacionados à resistência antimicrobiana em *A. baumannii* (Courvalin e Pe, 2011; Coyne et al., 2011; Temgoua e Wu, 2019). O sistema de bomba de efluxo do tipo AdeABC, que pertence a superfamília RND e está relacionado a resistência aos aminoglicosídeos, a diminuição da suscetibilidade à tigeciclina, além de antibióticos não fluoroquinolonas, foi o primeiro a ser descrito em *Acinetobacter* spp. e é regulado por um sistema de dois componentes

denominado AdeRS (Vila et al. 2007; Lee et al. 2017).

Outros dois sistemas da família RND, também estão relacionados com o efluxo e, conseqüentemente, resistência de antimicrobianos em *A. baumannii*. Os sistemas AdeFGH e AdeIJK que são regulados, respectivamente, pelos sistemas AdeL e AdeN e estão sinergicamente associadas à resistência à tigeciclina. Algumas outras bombas de efluxo também já foram descritas em *A. baumannii* tais como a EmrAB-TolC, A1S_1535, A1S_2795 e ABAYE_0913 que conferem resistência à vários antibióticos e estão sendo melhor estudadas (Lee et al., 2017; Nowak e Paluchowska, 2016; Rumbo et al., 2013).

De maneira geral, as bombas de efluxo estão associadas à resistência a muitas classes diferentes de antibióticos em *A. baumannii*, como imipenem e tigeciclina. Com isso, a reversão da resistência a antibióticos por inibidores da bomba de efluxo (Zechini and Versace 2009), como a 1- (1-naftilmetil) -piperazina e o cianeto de carbonila 3-clorofenil-hidrazona, tem se mostrado promissora e reforça a importância destes sistemas na aquisição da resistência aos antibióticos neste patógeno (Lee et al. 2017).

2.4.2.2.4 Modificação no sítio alvo

A modificação do alvo de agentes antimicrobianos corresponde a outro mecanismo de resistência presente em *A. baumannii*. A resistência às quinolonas está associada à mutações pontuais em GyrA (uma subunidade da DNA girase) e ParC (uma subunidade da topoisomerase IV), sendo mutações Ser83Leu em *gyrA* e Ser80Leu em *parC* as mais comuns nos genes da topoisomerase em *A. baumannii* (Esterly et al. 2011; Kwon et al. 2017; Lupo et al. 2018).

Além dos mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos já descritos, a alteração de seu alvo pelas metilases 16S rRNA (Doi e Arakawa, 2007a) também pode ser observada, sendo ArmA e RmtB os tipos mais prevalentes entre *A. baumannii*. A análise do conteúdo de G + C dos genes que codificam essas enzimas sugeriu que elas não são intrínsecas a esta espécie, mas foram adquiridas por transferência horizontal de genes e incorporadas ao genoma (Esterly et al. 2011; Doi et al. 2015; Lynch et al. 2017).

Outra modificação de alvo identificada em *A. baumannii* é o mecanismo de proteção ribossômica em decorrência da ação de genes *tet*. Nesse mecanismo, proteínas de proteção ribossômica se ligam ao ribossomo capturando-o e, desta

forma, inviabilizando a ação das tetraciclínas (Esterly et al. 2011). Além de ser amplamente difundido entre isolados de *A. baumannii*, este mecanismo funciona de maneira conjunta com bombas de efluxo, conferindo níveis elevados de resistência à esta classe de antibióticos (Esterly et al. 2011; Potron et al. 2015; Lee et al. 2017).

2.4.2.2.5 Defeitos de permeabilidade

Porinas são proteínas da membrana externa que formam canais que permitem o transporte de moléculas através da membrana externa e desempenham um papel significativo na virulência de *A. baumannii* (Lee et al. 2017). Contudo, uma vez que as porinas afetam a permeabilidade da membrana, elas também desempenham um papel significativo no mecanismo de resistência (Peleg et al. 2008). A regulação negativa de porinas é outro mecanismo que atua concomitantemente com bombas de efluxo, exercendo sua função através da diminuição da permeabilidade da membrana da bactéria, impedindo a entrada do antibiótico na célula após o efluxo (Fernández e Hancock, 2012; Vila et al., 2007).

Algumas das porinas presentes em *A. baumannii* e que estão associadas à resistência aos carbapenêmicos incluem a CarO, Omp22-33, Omp33-36, Omp37, Omp43, Omp44 e Omp47 (Lee et al. 2017). Além disso, estudos mostram que OmpA e CarO interagem fisicamente com o OXA-23, e essas interações estão associadas à resistência a antibióticos (Wu et al. 2016)

Além das proteínas da membrana externa, os componentes do envelope, como LPS e peptidoglicanos, também afetam a resistência a *A. baumannii* aos antibióticos., uma vez que a perda ou modificação do LPS diminui a integridade da membrana e, desta forma, aumenta a resistência à colistina em *A. baumannii* (Moffatt et al. 2010).

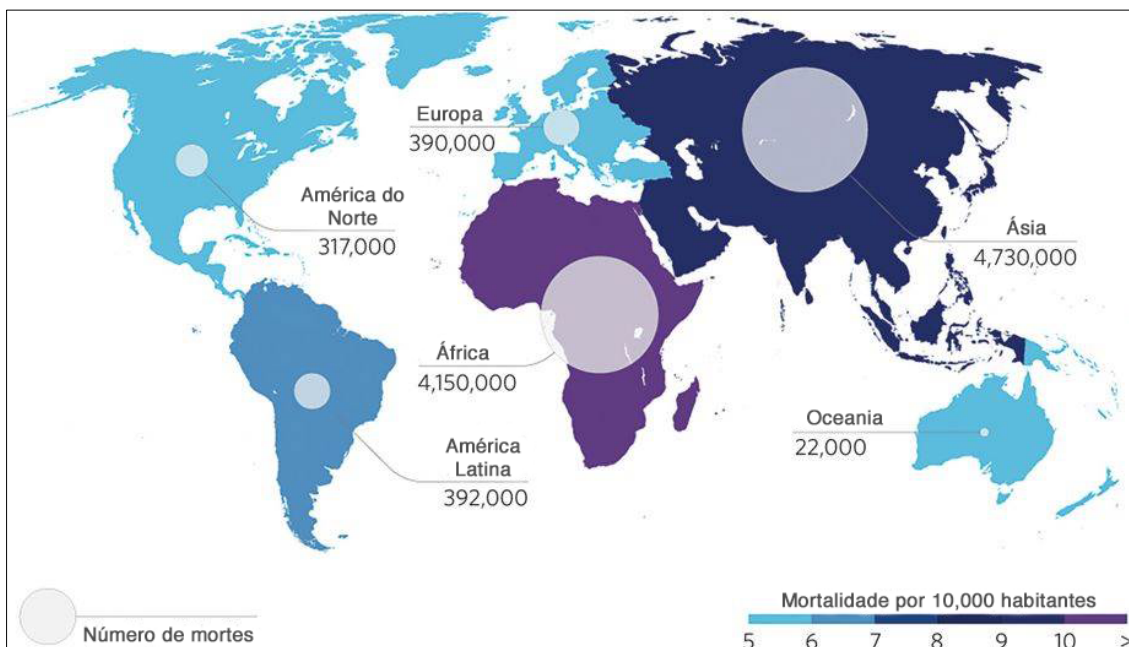
2.5 ADJUVANTES DE ANTIBIÓTICOS

Embora a resistência bacteriana seja um fenômeno natural relacionado ao caráter evolutivo intrínseco e à adaptabilidade das bactérias, o comportamento humano foi, sem dúvidas, determinante para que este processo tenha alcançado os níveis alarmantes atuais (González-Bello 2017). O uso indiscriminado, inapropriado e inadequado de antibióticos ao longo dos anos em seres humanos, animais e plantas, inclusive no tratamento de doenças não bacterianas, favoreceu o desenvolvimento da resistência de forma que esta se tornou um dos problemas

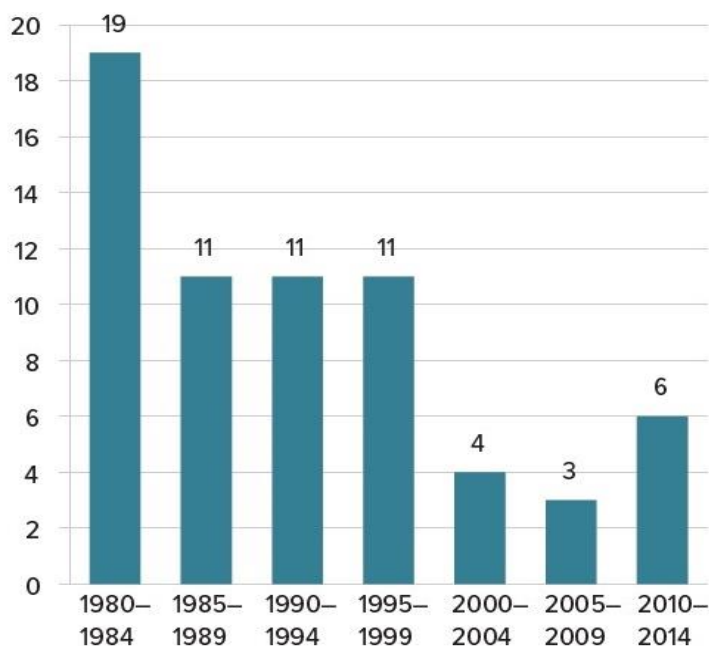
de saúde mais urgentes em todo mundo (Acharya e Wilson, 2019; Munita e Arias, 2016).

A combinação dos vários mecanismos de resistência a antibióticos levou ao surgimento de agentes patogênicos multirresistentes, que constituem uma séria ameaça para os cuidados médicos (Bernal et al., 2013; Peterson e Kaur, 2018). Estima-se que a partir de 2050 as bactérias resistentes aos antibióticos serão responsáveis por 10 milhões de mortes por ano em todo o mundo (**Figura 7**), além de ocasionarem perdas econômicas de cerca de 100 trilhões de dólares (O'Neill 2016; Liu et al. 2019). Além disso, o desenvolvimento de antibióticos pela indústria farmacêutica – que se mostrou bastante eficaz durante a chamada “era de ouro” antibiótica – sofreu uma enorme desaceleração (**Figura 8**) devido a obstáculos econômicos e regulatórios (O'Neill 2016; González-bello 2017). Cabe ressaltar que os antibióticos são usados por períodos relativamente curtos e, geralmente, são curativos o que os torna menos lucrativos que os medicamentos utilizados no tratamentos de doenças crônicas (Ventola 2015; González-bello 2017).

Figura 7. Número de mortes atribuídas à resistência antimicrobiana a partir de 2050



Fonte: Adaptado de O'Neill (2014)

Figura 8. Número de novas drogas antimicrobianas aprovadas por intervalo de anos

Fonte: Adaptado de Ventola (2015)

Em contraste com o desenvolvimento de antibióticos, os esforços em abordagens alternativas que incluem, dentre outros, a utilização de potenciadores de antibióticos foram intensificados nos últimos anos (Pieren and Tigges 2012)

Os potenciadores da atividade antibiótica, também conhecidos como adjuvantes antibióticos (AA) são compostos com pouca ou nenhuma atividade, mas que são capazes de aumentar a atividade antibiótica bloqueando a resistência através de vários mecanismos tais como: favorecendo a entrada e o acúmulo de antibióticos no interior da célula; atuando em mecanismos bactericidas complementares, inibindo vias de sinalização e reguladoras ou ainda, aumentando a resposta do hospedeiro à infecção (Bernal et al. 2013; Liu et al. 2019).

Os AA podem ser agrupados em duas classes gerais de acordo com mecanismo de ação. A classe I que atua juntamente com antibióticos em alvos bacterianos e a Classe II que age melhorando a atividade antibiótica no hospedeiro. Os adjuvantes de classe I podem ser ainda mais diferenciados com base em seus mecanismos, sendo os compostos da Classe I. responsáveis pela inibição direta à resistência aos antibióticos (enzimas inativadoras, sistemas de bombas de efluxo ou alvos alternativos) enquanto que os de Classe IB que

aumentam a atividade antibiótica, contornando os mecanismos de resistência intrínseca, incluindo vias metabólicas ou fisiologia, além da inibição direta de elementos de resistência específicos (Wright 2016).

Os AA de classe IA são os únicos adjuvantes no uso clínico atual e três principais já foram desenvolvidos. Estes incluem: (a) inibidores de beta-lactamase (ex.: ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam); (b) inibidores de bomba de efluxo (ex.: reserpina, rhamnoside e pheophorbide A); e (c) permeabilizantes da membrana externa (ex.: colistina, aminoglicosídeos, peptídeos catiônicos) (Schindler et al. 2013; González-Bello 2017).

Para resolver a crise atual relacionada à resistência aos antibióticos, é necessário que haja várias abordagens paralelas, as quais incluem identificação de novos antibióticos capazes de contornar os mecanismos de resistência dos patógenos, preservação do arsenal antibiótico já disponível e, por fim, exploração de estratégias anti-infecciosas não tradicionais. Neste contexto, os produtos naturais podem contribuir na resolução de todas estas questões (Wright 2017).

Estudos prévios de compostos derivados de plantas identificaram alguns potenciadores de antibióticos (Barreto et al. 2014; Yap et al. 2014), principalmente através da inibição da bomba de efluxo. As vantagens dos produtos naturais de origem vegetal já são bem conhecidas na literatura e incluem sua fácil obtenção e seleção com base em seu uso etnomedicinal. (Chusri et al. 2009; Bernal et al. 2013).

2.6 ÓLEOS ESSENCIAIS

As plantas aromáticas têm sido empregadas na medicina popular desde a antiguidade – particularmente devido à sua atividade antimicrobiana – e suas propriedades medicinais têm sido objeto de estudo científico frequente (Vale-Silva et al. 2010a).

Os óleos essenciais (OEs) são misturas líquidas, voláteis, naturais e complexas de compostos de baixo peso molecular e são naturalmente sintetizados como metabólitos secundários, pelas plantas em resposta a ataques de insetos, herbívoros e outros organismos (Bassolé e Juliani, 2012; Vale-Silva et al., 2010b). Os óleos essenciais são caracterizados por um odor forte, podendo ser produzido por todos os órgãos da planta (sementes, flores, folhas, brotos, caules, frutas, raízes, madeira ou casca) e armazenados em células secretoras,

cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (Bakkali et al. 2008; Chávez-González et al. 2016).

A composição química dos OEs incluem principalmente terpenóides e fenilpropanóides, mas outros componentes como constituintes aromáticos e alifáticos também podem estar presentes. Dentro do grupo terpenos são encontrados monoterpenos, sesquiterpenos e seus derivados oxigenados de baixo peso molecular. De maneira geral, pode-se dizer que os principais componentes dos OEs são responsáveis pelas propriedades biológicas observadas; entretanto, a interação entre as moléculas presentes na sua constituição também podem exercer atividades sinérgicas ou antagônicas (Faleiro M.L., 2011; Faleiro e Miguel, 2013). Embora pouco se saiba sobre o que rege este sinergismo/antagonismo entre os constituintes dos OEs, foram propostos quatro mecanismos para interações sinérgicas: (I) inibição sequencial de vários passos de uma via bioquímica particular; (II) inibição de enzimas que degradam antimicrobianos; (III) interação de vários antimicrobianos com a parede celular; (IV) interação com a parede celular ou membrana que leva ao aumento da entrada de outros componentes. Outros três mecanismos foram propostos para as interações antagônicas: (I) combinação entre antimicrobianos bacteriostáticos e bactericidas, (II) antimicrobianos concorrem pelo mesmo sítio de ação, e (III) antimicrobianos que interagem entre si (Hyltdgaard et al. 2012).

Conhecidos por seus efeitos antissépticos, bactericidas, virucidas e fungicidas, além das suas propriedades medicinais e a sua fragrância, os OEs são comumente utilizados como agentes aromatizantes em produtos alimentícios, bebidas, perfumarias, produtos farmacêuticos e cosméticos (Bakkali et al. 2008). Os óleos essenciais sozinhos ou em combinação possuem propriedades medicinais significativas, e por isso, podem ser usados na quimioterapia de doenças infecciosas e não infecciosas, na embalagem e preservação de alimentos e como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, espasmolíticos e anestésicos locais (Chávez-González et al. 2016)

A atividade antimicrobiana apresentada pelos OEs relaciona-se diretamente com a presença de seus componentes voláteis bioativos. A composição do óleo essencial de qualquer planta em particular depende da parte da planta usada, sejam as flores, as partes verdes (folhas e caules), casca,

madeira, frutos inteiros, pericarpo, semente ou raízes (Chávez-González et al. 2016). Dependendo da sua composição e concentrações utilizadas, os óleos essenciais podem apresentar efeitos citotóxicos nas células vivas. Contudo, eles ainda constituem uma rica fonte de substâncias que desempenham um papel importante na descoberta de novos medicamentos (Sayeed Akthar et al. 2014).

Além disso, devido ao fato de que os OEs não possuem um único alvo específico, mas podem ter modos de ação distintos; a presença de vários componentes com atividade antibacteriana pode dificultar a indução de resistência aos OEs. Considerando que a membrana é um potencial alvo dos OEs, pode ser difícil desenvolver um mecanismo de resistência que proteja um alvo bacteriano tão grande, uma vez que a alteração das estruturas e/ou composição da membrana é provavelmente ineficaz para a viabilidade da bactéria (Langeveld et al. 2013).

2.6.1 Terpenóides

Os terpenóides são terpenos que sofrem modificações bioquímicas por meio de enzimas que atuam adicionando moléculas de oxigênio e movendo ou removendo grupos metil e representam a maior e mais diversa classe de produtos químicos produzidos pelas plantas (Hylgaard et al. 2012). Embora desempenhem função no crescimento e desenvolvimento das plantas, os terpenóides estão mais relacionados a processos de interações químicas especializadas e na proteção da planta. (Tholl 2015). Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos voláteis são os monoterpenos (~ 90%) e os sesquiterpenos. Os monoterpenos podem ser divididos em três subgrupos: acíclicos; monocíclicos e bicíclicos; tendo cada um destes subgrupos outras subdivisões (Simões e Spitzer, 2004).

Os monoterpenos (C₁₀H₁₆) são formados por duas unidades de isopreno (C₅H₈) e incluem, no sentido estrito, apenas hidrocarbonetos. Contudo, o termo monoterpeno costuma ser aplicado à monoterpenóides que são caracterizados por grupos funcionais contendo oxigênio (Marmulla e Harder 2014). Muitas propriedades dos monoterpenos já foram descritas na literatura, dentre elas as atividades antifúngica (Abbaszadeh et al. 2014) e antibacteriana (García-Salinas et al. 2018). O Carvacrol e seu isômero timol são monoterpenos amplamente encontrados em óleos essenciais e apresentam diversas atividades

antibacterianas e antifúngicas e também efeitos anti-inflamatórios e analgésicos (Costa et al. 2019).

Alguns mecanismos de ação que explicam os efeitos biológicos observados para timol e carvacrol incluem o fato de ambos serem compostos hidrofóbicos que se integram às membranas celulares bacterianas, causando alterações na função normal da membrana, se acumulam nas cadeias de ácidos graxos da membrana, resultando em alterações conformacionais da bicamada lipídica da membrana (Kachur and Suntres 2019), além da presença do grupo hidroxila que permitem que o carvacrol e o timol atuem como um trocador de prótons, reduzindo assim o gradiente através da membrana citoplasmática, resultando em colapso da força motriz do próton e depleção do pool de ATP e, subsequentemente, levando à morte celular (Guimarães et al. 2019).

2.7 BIOMA CAATINGA

A Caatinga é um bioma coberto por vegetação semiárida e abrange uma área com cerca de 844.453 km² do interior da região Nordeste, que corresponde a 11% do território nacional (**Figura 9**). Com características únicas, este bioma exclusivamente brasileiro, possui uma enorme biodiversidade endêmica, e cerca de 50% de sua cobertura vegetal original permanece relativamente intacta, apesar da alta densidade populacional humana e elevadas taxas de desmatamento (Gariglio et al. 2010; Ribeiro et al. 2016).

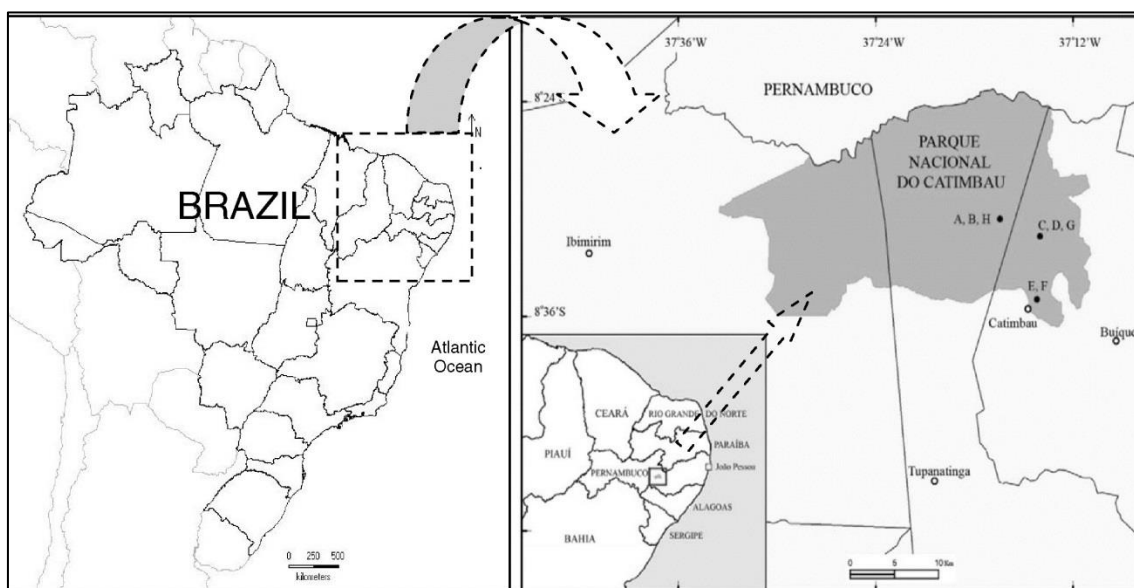
A Caatinga possui uma rica biodiversidade vegetal e muitas destas plantas são utilizadas na medicina tradicional, a exemplo da *Lippia macrophylla*, *Attalea speciosa*; *Caryocar coriaceum*; *Acrocomia intumescens*; *Acrocomia aculeata*; *Syagrus coronata*; *Eugenia brejoensis* e *Lippia alba*. Além disso, as características climáticas e do solo possibilitam à estas plantas desenvolver características químicas únicas que as tornaram uma excelente fonte de compostos antibacterianos bioativos (Nascimento Da Silva et al. 2013).

Figura 9. Abrangência do bioma Caatinga

Fonte: Ribeiro et al. (2016)

Por ser um bioma único, pouco explorado cientificamente e que vem sendo grandemente ameaçado e afetado pelas ações antrópicas, existe a enorme necessidade de criação de áreas de proteção. Entre as áreas protegidas já implementadas, o Parque Nacional Vale do Catimbau (**Figura 10**) (PARNA Catimbau) – criado em 13 de dezembro de 2002 e localizado no estado de Pernambuco, com uma extensão de 607 km² – encontra-se inserido em uma região definida como uma área prioritária para pesquisas científicas (Moura et al. 2015).

Figura 10. Localização geográfica do PARNA do Catimbau (municípios de Buíque, Tupanatinga e Ibimirim), estado de Pernambuco, Brasil



Fonte: Adaptado de Trentin et al. (2011)

2.7.1 *Acrocomia* spp.

Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. Ex Mart. pertence ao gênero *Acrocomia* da família Arecaceae é uma palmeira nativa da América tropical e subtropical, sendo amplamente distribuída no Brasil e em países como México, Paraguai e Argentina. Devido a sua abrangência no território nacional, apresenta um número variado de nomes populares que incluem macaúba, macaúva, coco-de-catarro, macaibeira, mucajá, mucaia, chiclete-de-baiano (Magosso et al. 2016). Na medicina popular a polpa da fruta é utilizada como laxante e o óleo exibe propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, além de ser aplicado no tratamento de doenças respiratórias e como diurético. As raízes de *A. aculeata* são usadas pelos povos indígenas no México no tratamento da diabetes e, devido às propriedades antioxidantes da planta, há descrições de seu uso na produção de cosméticos para hidratação e rejuvenescimento da pele (Magosso et al. 2016; Arena et al. 2018; da Silva et al. 2019).

Acrocomia intumescens Drude, mais conhecida popularmente pôr macaíba, macaúba ou palmeira, é uma planta encontrada na Mata Atlântica e mata de brejos de altitude do Nordeste, ocorrendo ao longo do sul de Alagoas, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Bahia (Lorenzi et al., 2004; Lorenzi et al., 2010). Apresenta importância econômica, social e ecológica; seu óleo possui

propriedades anti-inflamatória, seu fruto é uma fonte potencial de lipídeos, proteínas e carotenoides, além de ácidos graxos de interesse na indústria alimentícia, energética e cosmética (Bora e Rocha, 2004; Silva et al., 2015).

2.7.2 *Attalea speciosa* Mart. ex Spreng

Attalea speciosa Mart, conhecida popularmente como babaçu, também pertence à família Arecaceae e destaca-se por ser uma das palmeiras mais abundantes da Amazônia, com ampla distribuição no sul da região e especialmente nas zonas de transição entre a bacia amazônica e o semiárido nordestino do Brasil. É encontrada no Piauí, Maranhão e, em menor escala, nos estados do Tocantins, Goiás, Mato Grosso e Pará (González-Pérez et al. 2012; de Almeida et al. 2016). Sob o ponto de vista econômico, trata-se de uma das espécies de grande importância na cultura de subsistência de muitas comunidades tradicionais (Arruda et al. 2014). Além disso, esta espécie é de grande interesse para indústria cosmética, principalmente na preparação de sabões e glicerina (González-Pérez et al. 2012)

2.7.3 *Caryocar coriaceum* Wittm

Caryocar coriaceum Wittm. é uma planta pertencente a família Caryocaraceae e encontra-se amplamente distribuída no planalto de Araripe, localizado na região Nordeste do Brasil. Seu fruto popularmente chamado Pequi, é muito apreciado na culinária local devido ao seu sabor único e à sua relevância nutricional em termos de antioxidante e de ácidos graxos essenciais (Alves et al. 2017; Oliveira et al. 2017).

Na medicina popular a polpa do pequi e os óleos extraídos das suas sementes têm sido utilizados na cicatrização de feridas, como um agente anti-inflamatório e no tratamento de doenças do trato respiratório, incluindo tosse, bronquites e asma e no tratamento de dores reumáticas e musculares. Além disso, suas atividades bactericida, fungicida, leishmanicida e nematocida já foram relatadas na literatura (Alves et al. 2017)

2.7.4 *Eugenia brejoensis* Mazine

Eugenia brejoensis Mazine é uma planta pertencente a família Myrtaceae e encontra-se predominantemente na região da Caatinga com relatos de sua ocorrência também na região sul do país (Giaretta e Peixoto, 2014; Mazine e

Souza, 2008). Com relação às suas propriedades farmacológicas, estudos *in vitro* demonstram que os extratos de folhas, frutos e ramos de *E. brejoensis*, conhecida popularmente por Cutia, apresentam atividade antimicrobiana frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas e seu óleo essencial (Azevedo et al. 2012) é descrito por suas atividades larvicida e tripanocida (da Silva et al. 2015; De Souza et al. 2017).

2.7.5 *Lippia* spp.

O gênero *Lippia* pertence a família Verbenaceae e compreende cerca de 200 espécies de ervas, arbustos e árvores de pequeno porte distribuídas em países das Américas Central e do Sul, além de territórios da África Tropical (Reis et al. 2014; Gomes et al. 2019). Tradicionalmente, espécies do gênero *Lippia* são utilizadas para o tratamento de desordens respiratórias (resfriados, gripes, bronquites, tosse e asma) e gastrointestinais. (Pascual et al. 2001; Escobar et al. 2010). Na literatura já são descritos o potencial farmacológico do óleo essencial e extratos de diversas espécies deste gênero tais como suas atividades antimicrobianas, antifúngica, antimalárica, larvicida e antiespasmódica, bem como seus efeitos analgésico, anti-inflamatório e anestésico (Pascual et al. 2001).

Lippia alba (Mill.) NE Brown é uma planta nativa da América do Sul, conhecida popularmente como “erva cidreira”, “erva-cidreira-brasileira” ou “alecrim”. Na medicina popular, suas raízes e folhas são utilizadas no tratamento de doenças gástricas, antipiréticas, como analgésicos e sedativos (Machado et al. 2014). Na literatura são descritas suas atividades antibacteriana, antiparasitária, inseticida, antiinflamatório e antiespasmódico (Santos et al. 2016).

Lippia macrophylla (Cham.) Linnaea (anteriormente denominada de *Lantana macrophylla*) (Silva e Salimena 2002), conhecida popularmente por “Cambará-de-folha-grande”, é uma planta subarbustiva caracterizada por ser nativa e endêmica do Brasil sendo predominantemente encontrada no bioma da Caatinga. Na medicina popular é utilizada para o tratamento de desordens respiratórias e menstruais (Conceição et al. 2012). Na literatura, apenas as atividades tripanocida e antifúngica desta espécie já foram relatadas (Oliveira et al. 2013; De Souza et al. 2017). Contudo, com base no potencial farmacológico apresentado por outras espécies do mesmo gênero, assim como o potencial antimicrobiano apresentado por plantas da Caatinga, a *Lippia macrophylla*

apresenta-se como uma rica fonte de estudos para a descoberta de propriedades ainda não conhecidas.

2.7.6 *Syagrus coronata* (Mart.) Beccari.

Syagrus coronata (Mart.) Becc., conhecida popularmente como ouricuri ou licuri, é uma planta que pertence a família Arecaceae, distribuída na região Nordeste (Rufino et al. 2008). Na medicina popular, algumas das partes desta planta são utilizadas no tratamento de picadas de cobra, inflamação ocular, micoses e cicatrização de feridas. Além disso, o extrato do fruto possui atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (Hughes et al. 2013). Por outro lado, o extrato aquoso isolado da casca do fruto de *S. coronata* apresentou atividade leishmanicida (De Souza et al., 2017). (Rodrigues et al. 2011; De Souza et al. 2017) também relataram a atividade tripanocida desta planta

Tendo em vista o aumento na resistência bacteriana, a possibilidade de utilizar os óleos essenciais e/ou seus componentes majoritários diretamente como agentes antibacterianos ou em combinação com antibióticos de uso clínico, pode ser uma ferramenta útil no tratamento/controle das infecções ocasionadas por estes patógenos. Desta forma, neste trabalho avaliamos o potencial antimicrobiano de *Attalea speciosa*; *Caryocar coriaceum*; *Acrocomia intumescens*; *Acrocomia aculeata*; *Syagrus coronata*; *Eugenia brejoensis*; *Lippia alba* e *Lippia macrophylla*, além dos efeitos dos terpenóides timol e carvacrol na expressão gênica em *A. baumannii*.

3 Resultados

ARTIGO I – THE COMBINATORY EFFECT OF ESSENTIAL OIL FROM *LIPPIA MACROPHYLLA* ON CLINICAL RESISTANT ISOLATES OF *ACINETOBACTER BAUMANNII*

Manuscrito submetido à revista Journal of Natural Products (Qualis A1) em novembro de 2019. Manuscrito atualmente em análise pelo periódico.

The combinatory effect of Essential oil from *Lippia macrophylla* on clinical resistant isolates of *Acinetobacter baumannii*

Isis C. S. Cirino †, Igor V. Rocha†, Larissa I. O. Souza‡, Márcia V. Silva§, Regina C. B. Q. Figueiredo†, Tereza C. Leal-Balbino †**

†Departamento de Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães IAM-FIOCRUZ/PE, Av. Moraes Rego s/n, Campus da UFPE, 50670-420 Pernambuco - Brazil

‡Centro Universitário CESMAC, Alagoas - Brazil

§Núcleo de Bioprospecção e Conservação da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido/Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações - INSA/MCTIC, Av. Francisco Lopes de Almeida, s/n, Serrotão, 58429-970 Campina Grande, Paraíba - Brazil

‡Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco UFPE, Av. Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, Pernambuco - Brazil

KEYWORDS: *Acinetobacter baumannii*, essential oils, combination therapy, ultrastructure

ABSTRACT

Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* causes a serious life-threatening infection to health-care facility inpatients. In this work we investigated the antibacterial activity of essential oil from *Lippia macrophylla* (LMEO), alone or in combination with reference antibiotics, against clinical resistant isolates of *A. baumannii*. Our results showed that LMEO strongly inhibited the bacteria growth (MIC < 500 µg/mL). This oil in combination with antibiotics presented synergism (FICI ≤ 0.5) or additive effects (0.5 < FICI ≤ 4) on selected resistant clinical isolates and proven to revert *A. baumannii* resistance or/and decrease the MIC values for the antibiotics. The combination of LMEO with imipenem was the most effective presenting synergism for most of tested-isolates. The ultrastructural analysis corroborated the synergism for the combination of LMEO +CTZ on the Acb35 isolate, showing loss of membrane integrity, leakage of cytoplasmic content and increased formation of Outer Membrane Vesicles (OMVs). Taken together our results point for the use of LMEO alone or in combination as antibacterial agent against *A. baumannii*.

The indiscriminate and inappropriate use of conventional antibiotics and synthetic antimicrobial drugs have led to the widespread emergence of drug resistant bacteria¹. Nowadays, multidrug-resistant nosocomial pathogens, referred by the American Society of Infectious Disease as ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter spp*), have been responsible for higher levels of morbimortality worldwide. In this regard, such nosocomial infections posing a challenge to scientists to find alternatives to combat them^{2,3}.

Acinetobacter baumannii is a coccobacillus Gram-negative, nonfermentative, nonmotile, oxidase-negative, and responsible for healthcare-associated infection with elevated morbidity and mortality. These infections are difficult to treat because the causative strains often show broad antimicrobial resistance^{4,5}. This pathogen is an opportunistic microorganism, which causes skin and soft-tissue infections, mainly in elderly, immunocompromised patients and those submitted to invasive procedures or treated with broad-spectrum antibiotics for long periods⁶. Furthermore, *A. baumannii* is also associated with urinary tract infections, pneumonia and bacteremia⁷.

The increased antibiotic-resistant bacteria make the search of new alternatives to cope with infections an urgent need. An attractive strategy to circumvent the bacterial resistance may be the combination of phytochemicals and antibiotics to enhance the efficacy of these latter. Essential oils are a mixture of lipophilic, highly volatile, small weight (molecular mass <300) molecules resulting from the secondary plant metabolism. These compounds have shown different antimicrobial properties against Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi and protozoa⁸. The antibacterial activity of EOs is attributed to their constituents, mainly those belonging to the class of monoterpenes and sesquiterpenes, and their oxygenated derivatives. These constituents can interact synergically, by different mechanisms, reducing the possibility of occurrence of resistance⁸. On the other hand, the interaction of EOs constituents with bacterial membranes proteins or enzymes can alter its permeability leading to cell rupture and cytoplasmic content leakage. EOs can also protect the active substance (antibiotic) from enzymatic degradation by the pathogen or/and facilitating its passage throughout the bacterial membranes^{8,9}.

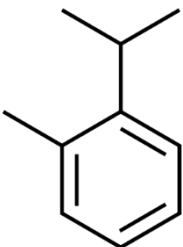
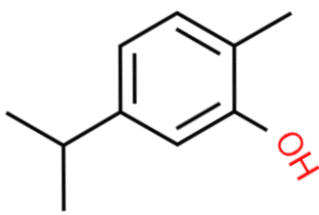
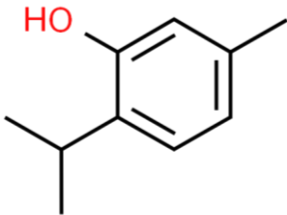
The genus *Lippia* (Verbenaceae) comprises about 200 species of plants widely distributed in African, South and Central America countries. These plants are known as aromatic species commonly used in the folk medicine for the treatment of a number of pathological conditions, including those associated with diseases of respiratory/ gastrointestinal tracts and skin disorders. A number of species from this genus were also reported as having antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities¹⁰⁻¹². *Lippia macrophylla* (Cham) (Synonym: *Lantana macrophylla* (Cham.) Schauer) are commonly used in indigenous medicine for treatment of respiratory and menstrual disorders¹³. Previous study of our group showed that *Lippia macrophylla* essential oil has an inhibitory effect on the protozoan *Trypanosoma cruzi*, moderate cytotoxicity to mammalian cell and an hemolytic activity below 4% for all the concentrations tested¹⁰. However, the biological activity of essential oil of *L. macrophylla* against multiresistant bacteria was not yet explored. In this work, we investigated the antimicrobial essential oil from *Lippia macrophylla* (LMEO) alone or in combination with antibiotics, on clinic MDR isolates of *A. baumannii*.

RESULTS AND DISCUSSION

Gram-negative bacteria, as *A. baumannii*, cause serious infections that are difficult to treated due to their membrane structure and the emergence of multidrug-resistant (MDR) strains^{14,15}. The decreased efficacy of conventional antibiotics have motivated scientist to explore novel sources of chemicals with antimicrobial activity¹⁶. One of the promising methods in coping with bacterial resistance is combining conventional antibiotic and natural products, especially those derived from secondary metabolism of plants, as essential oils^{9,17–22}. Therefore, in this study we have investigated, for the first time, the effect of essential oil from *Lippia macrophylla* alone or in combination with reference antibiotics against resistant strains of *A. baumannii*.

The chemical composition of LMEO was previously elucidated by de Souza et al.¹⁰ and it is in agreement with those found for other species from *Lippia* genus²³. According to Souza et al.¹⁰ 13 compounds were identified as constituents of LMEO, with a prevalence of monoterpenes (98%). The main constituents of this essential oil were thymol (49.81%) carvacrol (31.62%) and o-cymene (10.27%) (Table 1). Thymol and its isomer carvacrol are naturally occurring phenolic compounds usually found as main constituents of essential oils from plants belonging to the *Lippia* genus^{10,12,24,25}. The antibacterial activity of thymol and carvacrol has been already also reported in the literature against Gram-positive and Gram-negative bacteria^{25,26}. Monoterpenes, as p-cymene, a precursor of thymol and carvacrol, have been reported as having antibacterial and antifungal activities. O-cymene, the third more abundant compound in LMEO, was also reported as the major component of essential oil from *Echinophora platyloba*²⁷. This oil was effective against bacteria present in food as well as the pathogenic gram-negative bacteria *Escherichia coli*. The activity of cymene and their isomers on microorganisms is variable and used in combination with carvacrol can enhance the activity of this latter compound against *V. cholera* and other foodborne pathogens²⁸.

Table 1: Chemical composition of essential oil of *Lippia macrophylla*¹⁰

Compound	Composition in % of total essential oil	Chemical formula	Chemical structure
O-Cymene	10.27	C ₁₀ H ₁₄	
Carvacrol	31.62	C ₁₀ H ₁₄ O	
Thymol	49.81	C ₁₀ H ₁₄ O	

The MIC values of LMEO and reference antibiotics were evaluated for clinical isolates of *A. baumannii* from different hospital sources (Table 2).

Table 2: Characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*

Strain ID	Hosp.	Source	Year	STs
Acb06	Hp1	Cerebrospinal fluid	2012	ST79
Acb09	Hp1	Bloodstream	2012	ST1
Acb34	Hp2	Urinary tract	2014	ST15
Acb35	Hp2	Catheter tip	2014	ST113
Acb45	Hp3	Catheter tip	2010	ST1

Hosp= Hospital; STs = sequence types

In order to confirm the resistance profile of our clinical isolates, the MIC for the antibiotics ceftazidime (CTZ), gentamicin (GEN) and imipenem (IPM) were also determined, using the reference strains, *Escherichia coli* (ATCC® 25922) and *A. baumannii* (ATCC® 19606), as a control of antibiotic susceptibility. According to the breakpoints established by CLSI²⁹, all the isolates analyzed were characterized as resistant to CTZ (MIC $\geq$ 64) and IPM (MIC $\geq$ 16). The isolates Acb06 e Acb34 were sensible to GEN with a MIC of 4 μ g/mL and 2 μ g/mL, respectively, whereas Acb09, Acb35 and Acb45 were resistant (MIC $\geq$ 64).

According to Espinoza et al.³⁰ the efficacy of a hit-compound as antimicrobial agent can be classified by their MIC values as; strong inhibitors (MIC < 500 μ g/mL), moderate inhibitors (MIC ranging 600-1,500 μ g/mL) and weak inhibitors (MIC > 1,600 μ g/mL). Therefore, LMEO presented a strong inhibitory effect on all of the *A. baumannii* strains tested (MIC< 500 μ g/mL). Except for Acb34, which presented a MIC of 64 μ g/mL, the other four isolates presented the same value of MIC (128 μ g/mL) for LMEO. This result, suggest that the mechanisms of action of LMEO is conserved between these strains.

Because Gram-negative bacteria have an additional outer membrane, acting as an effective barrier to compounds, and frequently overexpressing efflux pumps responsible for innate antimicrobial resistance, most natural products have shown activity predominantly on Gram-positive bacteria¹⁴. In this regard, an active compound against Gram-negative bacteria, or having the ability of modulate the antibiotic susceptibility, can be a promissory as chemotherapeutic^{17,18,21,22}. The analysis of checkerboard testing method³¹ was used to evaluate the effect of LMEO in combination with the reference antibiotics (CTZ, GEN, IPM) on our clinical isolates. All the LMEO + antibiotic combinations were characterized as having only synergic or additive effect on the isolates. None of combinations presented antagonistic effect. The values of MIC for LMEO alone or in combination with antibiotics and the FICI were depicted in (Table 3 and 4).

Table 3: Effect of *Lippia macrophylla* Essential Oil alone or in combination with reference antibiotics on clinical isolates of *A. baumannii* strains.

<i>A. baumannii</i> strains	MIC (µg/mL)					
	Antibiotic	LMEO	CTZ + LMEO	GEN + LMEO	IPM + LMEO	
Acb06	CTZ	>256				
	GEN	4	128	256 (2)	0.5 (8)	1 (64)
	IPM	64				
Acb09	CTZ	64				
	GEN	64	128	16 (4)	1 (64)	1 (16)
	IPM	16				
Acb34	CTZ	128				
	GEN	2	64	64 (2)	0.25 (8)	4 (8)
	IPM	32				
Acb35	CTZ	>256				
	GEN	>128	128	4 (128)	64 (4)	2 (16)
	IPM	32				
Acb45	CTZ	>256				
	GEN	128	128	128 (4)	8 (16)	16 (4)
	IPM	64				

CTZ – ceftazidime; GEN – Gentamicin, IPM- Imipenem, LMEO – *Lippia macrophylla* essential oil. The numbers between parentheses represents the fold of MIC reduction for the antibiotic in combination with LMEO

Table 4: Fractional inhibitory concentration index (FICI) for the combined treatment of *A. baumannii* strains with LMEO and antibiotics

<i>A. baumannii</i> strains	FICI		
	CAZ + LMEO	GEN + LMEO	IPM + LMEO
Acb06	2.0 (A)	0.6 (A)	0.5 (S)
Acb09	0.7 (A)	0.5 (S)	0.5 (S)
Acb34	0.7 (A)	0.6 (A)	0.6 (A)
Acb35	0.5 (S)	1.5 (A)	0.3 (S)
Acb45	1.0 (A)	0.5 (S)	0.5 (S)

CAZ – Ceftazidime, GEN – Gentamicin, IPM – Imipenem and LMEO – *Lippia macrophylla* Essential Oil. The letter between parentheses corresponding to (A) additive and (S) synergism

Gentamicin is an aminoglycoside antibiotic that binds to the subunit 30S of bacterial ribosome impairing the protein synthesis³². The main mechanism of aminoglycosides resistance towards Gram-negative bacteria is by the modification of amino or hydroxyl groups of these antibiotics by bacterial enzymes³³. However, alterations of the binding site of antibiotic to ribosome and changes in cell permeability were also found in GEN-resistant strains³³. In our study, the combination of LMEO with gentamicin (LMEO + GEN) resulted in additive effect on Acb06 (FICI = 0.6), Acb34 (FICI = 0.6), and Acb35 (FICI = 1.5), with reduction of MIC ranging 4 – 8-fold. Synergism was observed for Acb09 and Acb45 (FICI = 0.5), with 16 and 64-fold MIC reductions, respectively. Synergism and additive effects of essential oils with GEN have been already reported in the literature^{18,22,34}. Although the isolates Acb06 and Acb34 have been previously characterized as susceptible to GEN treatment, its combination with LMEO was able to reduce considerably the MIC value for this antibiotic. This finding was particularly important taking in account that high doses and prolonged treatment with GEN can lead to serious side effects as nephrotoxicity and ototoxicity³⁵.

The combination of LMEO and IMP was the most efficient with a synergistic effect for Acb06 (FICI = 0.5), Acb09 (FICI = 0.5), Acb35 (FICI = 0.3), and Acb45

(FICI = 0.5) and MIC reductions ranging 4 – 64 fold. LMEO + IMP was also able to revert the resistance of Acb06, Acb09, Acb35, but not for Acb45, which presented a MIC reduction of only 4-fold. For this combination, an additive effect was observed for Acb34, with 8-fold MIC reduction of Imipenem. The imipenem is carbapenem antibiotic that acts inactivating penicillin-binding proteins (PBP) leading to the lysis of bacteria or inhibition of cell wall formation³⁶. The resistance of *A. baumannii* to imipenem is mainly associated to the enzymatic hydrolysis of antibiotic by bacterial carbapenemases³⁷. On the other hand, the antimicrobial activity of essential oil is attributed to various mechanism of action and/or multiple targets. The synergic effect of LMEO in combination with IMP can be related to its ability to permeate cytoplasmic membrane, increasing the membrane permeability, which ultimately can lead to the rupture of bacterial energetic metabolism^{16,38}. The presence of thymol and carvacrol as major constituents of LMEO may favour the antibacterial activity of this oil. These monoterpenes have a reactive hydroxyl with ability to form hydrogen bounds with proteins and other molecular targets essential for bacteria integrity and survival³⁹.

Differently from LMEO+IMP, which presented synergism for most tested-isolates, the combination of LMEO with CTZ was predominantly additive for Acb06 (FICI = 2), Acb09 (FICI = 0.7), Acb34 (FICI = 0.7), e Acb45 (FICI = 1), with a 2 to 4-fold reduction in the values of MIC for this antibiotic. Interestingly, the combination LMEO+CTZ presented a synergism only for Acb35 (FICI =0.5) and stronger ability to revert the resistance of this isolate, with 128-fold reduction of MIC. Ceftazidime (CTZ) is a third-generation cephalosporin with broad-spectrum activity against Gram-negative bacteria, including *A. baumannii*⁴⁰. As IMP, CTZ also binds to PBP (penicillin-binding protein) enzymes responsible for the polymerization of peptidoglycan, the main component of the bacterial cell wall. However, the IMP and CTZ may have different affinity for PBPs, which explains the diverse spectrum of action existing between these β -lactams.

For long time, synergism has been the main focus for combinatory therapy as it greatly reduced the effective dosage of antimicrobial required for antibiotic treatment. Therefore, only synergic combination was considered for further investigation of mechanism of action⁴¹. However, additive effects, as observed in our work for most LMEO combinations and strains, should be not neglected. Yang et al.⁴¹ investigating the additive interactions of cinnamon bark oil (CBO) and

Meropenem in combinatory therapy, unequivocally showed that additive and synergistic interaction between CBO and antibiotic were comparable in their ability to cause bacterial membrane disruption. According to these authors, the additive interaction may not be able to substitute synergic interaction, but its importance in studies on combinatory therapy must have to be taken in account.

Because the isolate Acb 35 presented the best results in the combinatory assays, this strain was chosen for the evaluation of the effects of LMEO, alone or in combination with the antibiotic ceftazidime (CTZ), on the morphology of *A. baumannii* (Fig. 1). Untreated control cells presented characteristic morphology with well-preserved wall and cytoplasmic membrane (Figs. 1A-B). The cell surface of untreated *A. baumannii* was decorated with fimbriae (Fig.1B). The control cells also presented homogeneous cytoplasm in which scanty distributed electrondense deposits could be found. Although not all cells were affected by tested-drugs (confirming the resistant profile of this clinical isolate), in the most cells treated with both CTZ (Figs. 1C-D) and LMEO alone (Figs 1E-F) there was an intense peeling of bacteria surface and loss of bacteria fimbriae, as compared with control. The pili/fimbriae are thin proteinaceous non-flagellar structures present at the surface of Gram-negative bacteria and play pivotal role on the bacteria-host cell interactions during infection. The fimbriae also reflect the bacterial adaptations to the environmental conditions⁴² and mediate the contact between bacteria and other surfaces, or between neighbouring bacteria, being essential for biofilm formation⁴³. Therefore, the pathogenicity of *A. baumannii* is mainly attributed to its high ability to adhere to and form biofilms on both biotic and abiotic surfaces. Outer membrane protein A (OmpA) and fimbriae play a key role in this process, whereas pili and biofilm-associated protein are involved in biofilm formation¹⁴. The loss of fimbriae, as observed in LMEO and CTZ-treated bacteria, can lead to impairment of biofilm formation and other processes relevant for the success of bacterial infection, as adhesion and virulence⁴⁴. The treatment with both LMEO and CTZ alone also caused the appearance of bacterial ghost (BG). However, ruptured cell wall was not usually observed in cells treated with both drugs alone. BG, are referred as non-living cell envelope of gram-negative bacteria produced by the controlled expression of lytic gene *E* of bacteriophage phiX174. In *E. coli* this gene encodes for a transmembrane protein of 91 amino acids, possessing non-enzymatic lytic activity. The oligomerization of E-protein

lead to tunnel formation associated with the fusion of the inner and outer membrane⁴⁵. Then, the high intracellular osmotic pressure causes the cytoplasmic content to be expelled through the tunnel, whereas the entire cell surface structures, including outer membrane proteins and peptidoglycan layer remain preserved⁴⁶. Previous ultrastructural study showed that the tunnel structures are preferentially located at site of cell division⁴⁶. Consistently, our results showed high number of incomplete dividing cells on samples treated with LME0 compared with the control.

Interestingly, our ultrastructural observations showed that the combination of antibiotic with LME0 (Figs. 1G-H) altered the treated-bacteria in different way when compared with the effects of CTZ (Figs 1C-D) or LME0 (Figs.1E-F) alone. The treatment with CTZ and LME0 in combination caused severe rupture of bacterial membranes and extravasation of the full intracellular content in the affected cells (Fig 1H) Bulk of bacterial cytoplasm could be observed at extracellular space (Fig. 1G). However, BG was not usually found in cell treated with LME0+CTZ. It is possible that LME0 alters the permeability of bacteria membranes causing an osmotic imbalance, which was strong enough to cause their rupture. These results reinforce the synergic effect of the combination of LME0 e CTZ, as observed in checkerboard assay.

In both LME0 and CTZ-treated cell alone or in combination was possible to observe an increased production of outer membrane vesicles (OMVs), as compared with non-treated cells (Figs 1A-B) or *A. baumannii* susceptible strain (Fig.1J). This activity was higher on CTZ-treated cells than on LME0-treated ones, but it is lower in cells submitted to the combined treatment compared with cells treated only with CTZ (Figure 1C, inset). Gram-negative bacteria constitutively secrete various biologically active molecules and virulence factors via OMVs, throughout non-conventional secretory systems. The OMVs are 10 to 300 nm⁴⁷ spherical membrane-bound vesicles usually composed of lipopolysaccharides (LPS), proteins, lipids, and DNA or RNA⁴⁸. Their role in intracellular and intercellular signalling, transfer of virulence factors and eliciting immune response in host cells has been established in many pathogens, including *Acinetobacter*^{48,49}. The higher production of OMVs in *A. baumannii* treated with CTZ can be an important factor of resistance of this isolate against the deleterious effect of this antibiotic. Our results are in accordance with previous work showing that the

exposure of *A. baumannii* to sub-inhibitory concentration of the antibiotic ceftazidime (CTZ), resulted in an increased formation of OMVs⁵⁰. No difference between untreated Acb35 resistant isolate (Figs 1A-B) and *A. baumannii* susceptible strain (ATCC® 19606) (Fig. 1I) was observed. On the other hand, the treatment of susceptible strain with LMEO (Fig. 1J) caused intense surface peeling, as also observed in Acb35 treated with LMEO and CTZ alone or in combination and severe alteration of bacterial nucleoid. No OMVs production was observed in susceptible treated-cells samples, corroborating the hypothesis that these vesicles are associated to the drug resistance in our *A. baumannii* isolates.

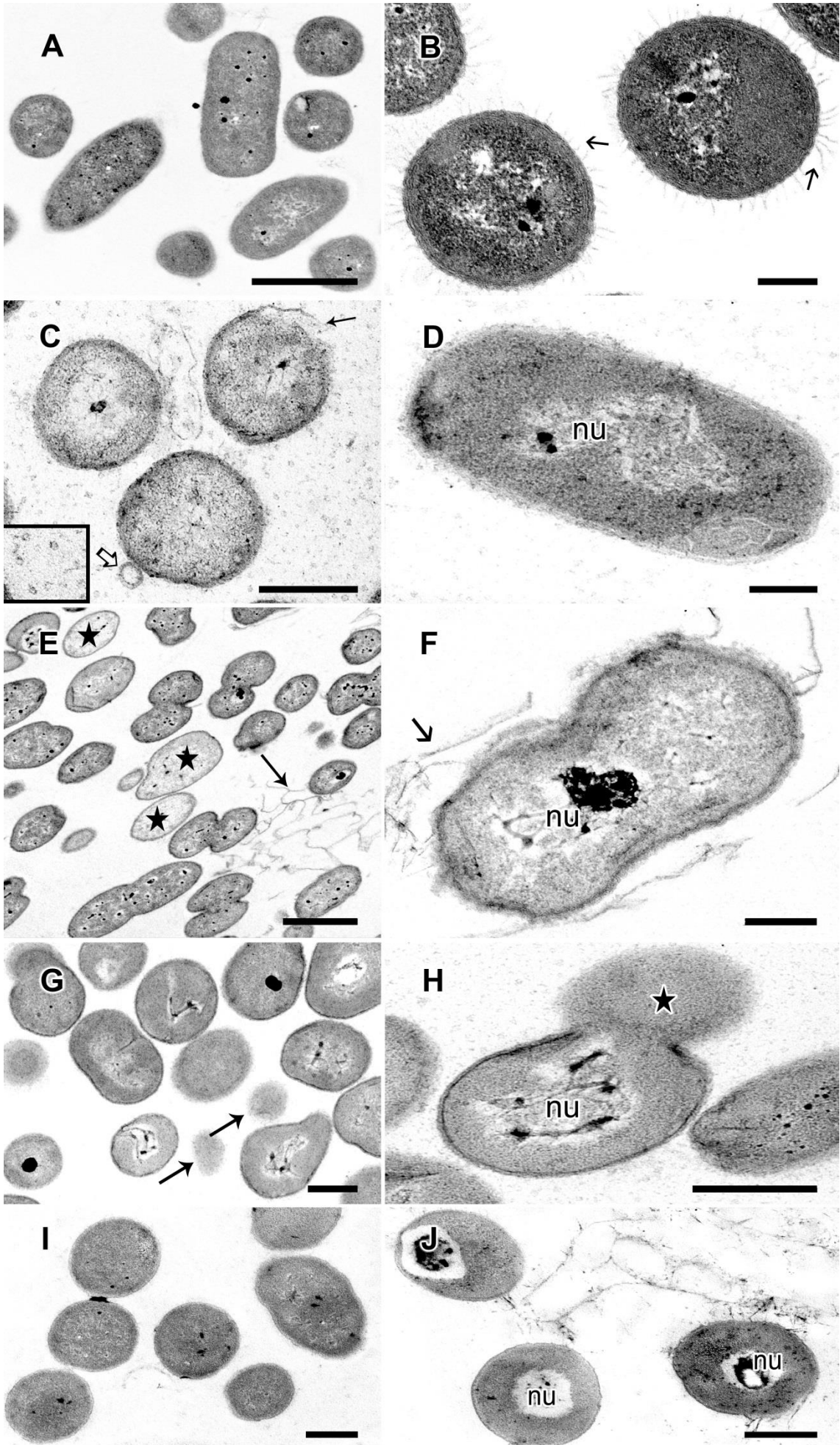


Figure 1- Ultrastructural effects of LMEO and CTZ alone or in combination on *A. baumannii* (A-B) Untreated Acb35 resistant isolate cells presenting an intact membrane and preserved cytoplasm. (B) High magnification of control bacterial cell surface decorated with numerous fimbriae (black arrow). (C-D) CTZ-treated Acb35 cells. Note in (C) the presence of smaller OMVs in extracellular space (inset) and a vesicle budding from the cell surface (white arrow). (D) High magnification of CTZ-treated cell showing the absence of fimbriae at the cell surface. (E-F) LMEO-treated Acb35 cells. (E) Low magnification of bacterial culture showing the presence of bacterial ghost (black star) and membrane peeling (black arrow). (F) Detail of damaged bacteria presenting intense surface peeling, the appearance of membrane profiles in extracellular space and absence of fimbriae at cell surface, and condensation of nucleoid. (G-H) Acb35 treated with LMEO+CTZ. (G) Low magnification of cell culture showing bulk of cell cytoplasm in the extracellular space (arrow). (H) Detail of cell showing the extravasation of cytoplasm content (black star) and condensed nucleoid (nu). (J) Untreated susceptible ATTC strain of *A. baumannii* (H) Susceptible strain treated with LMEO. Bars: A, C, G, H, I and J =500 nm; B, D, F= 200 nm; E= 1µm

Taken together, our results demonstrated the high antibacterial activity of LMEO, alone or in combination with reference antibiotics, on resistant isolates of *A. baumannii*. These results pointed to the use of LMEO alone or in combination as potential antibacterial agent. In addition, LMEO can be also applied as a surface sanitizer for management of MDR *A. baumannii* in health-care units

Experimental Section

Plant material and essential oil - The essential oil from *Lippia Macrophylla* was obtained from the leaves of mature plants collected (March 2013) at the Parque Nacional do Catimbau (8° 24 00 and 8° 36 35 S and 37° 09 30 and 37° 14 40 WG), in the state of Pernambuco, Brazil. The plant were identified by Dr. Alexandre.Gomes da. Silva and voucher specimen were deposited (IPA 93,622) at the Herbarium of the Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA). The LMEO was extracted by hydrodestillation and kindly provided by Dra. Marcia Vanusa da Silva (Departament of Biochemistry, Federal University of Pernambuco). The chemical characterization of LMEO was previously performed by Dr. Daniela Navarro (Chemistry Department, Federal University of Pernambuco) ¹⁰. The sample collections were carried out in accordance with the principles adopted by Brazilian environmental law and authorized by Brazilian Ministry of Environment (SISBIO under number 26743-3).

Bacterial strains – Five clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* (Acb06, Acb09, Acb34, Acb35 and Acb45) with different STs, were obtained from three hospitals in the Metropolitan Region of Recife/Pernambuco state, in the years 2010, 2012 and 2014. The isolates were collected from different sites of infection (blood, catheter, cerebrospinal fluid and urinary tract). The reference susceptible *A. baumannii* ATCC 19606 was also included. The bacterial samples were stored in the Department of Microbiology at the Instituto Aggeu Magalhães (IAM, Fiocruz-PE). The identification of genus and species were performed in previous study by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) technique⁵¹ using the software MALDI Biotyper system version 2.0 (Bruker Daltonics).

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Determination - The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by broth microdilution test, accordingly to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2005). The reference antibiotics used in this study were ceftazidime, gentamicin and imipenem. A stock solution of LME0 and the antibiotics were prepared in DMSO and ultrapure water at 100 µg/mL for the LME0 and 64-256 µg/mL for antibiotics, respectively. At this concentration, DMSO did not exert any antibacterial effect on bacterial isolates or the reference strains of (data not shown). *A. baumannii* strains were incubated overnight agar MH (Sigma-Aldrich, United States) at 37°C. The bacterial cultures were then diluted in MH broth (Cation-adjusted Mueller-Hinton broth, Fluka – Sigma-Aldrich, United States) to McFarland 0.5 (1×10^8 CFU/mL). To each well, 50 µL of dilution of the LME0 or antibiotic (2–256 µg/mL), and 50 µL of a bacterial suspension were added to McFarland 0.5 to achieve a final volume of 100 µL. Wells containing only culture medium were used as a blank. *E. coli* (ATCC® 25922) and *A. baumannii* (ATCC® 19606) were used as control. After incubation, 20 µL of 0.01% of resazurin (Sigma Aldrich – USA) was added to each well. The plates were reincubated for 2h at 37°C and subsequently evaluated visually for colour change. Blue/purple colour indicated no bacterial growth while pink/colourless indicated bacterial growth. The MIC value was taken at the lowest concentration of antibacterial agents that inhibits the growth of bacteria (colour remained in blue)⁵³. These assays were performed in duplicate in two independent experiments.

Checkerboard Assays - The analysis of the effect of LMEO in combination with antibiotics (ceftazidime, gentamicin and imipenem), against multidrug resistant *A. baumannii* strains, were performed by using the checkerboard method described by Motyl et al. (2005), with modifications. Briefly, the bacterial suspension (50 μ L at McFarland 0.5/1x10⁸ CFU/mL) were added to previously prepared 96-well plates containing combined serial twofold dilutions of LMEO along horizontal rows and the reference antibiotic along the vertical rows. Bacteria cultivated with LMEO or antibiotic alone (first horizontal and vertical rows, respectively) were used as a control. The concentrations used ranged from 4 to 256 μ g/mL for LMEO, 0.25 to 256 μ g/mL for ceftazidime and 0,125 to 128 μ g/mL for gentamicin and imipenem. The plates were incubated at 37°C for 24h and the Fractional inhibitory concentration index (FICIs) were calculated by the formula

$$FICI = (MIC_a \text{ combination} / MIC_a \text{ alone}) + (MIC_b \text{ combination} / MIC_b \text{ alone}).$$

Where, a=LMEO and b= reference antibiotic

The results were interpreted as follows: $FICI \leq 0.5$ synergic effect, $0.5 < FICI \leq 4$ additive effect and $FICI > 4$ as a antagonistic effect.

Transmission Electron Microscopy analysis - Suspensions of resistant *Acinetobacter baumannii* (isolate Acb 35) growth in MH broth (Cation-adjusted Müller-Hinton broth, Fluka – Sigma-Aldrich, United States) were exposed to LMEO alone or LMEO + CTZ CTZ (1/2 MIC LMEO + 1/128 MIC CAZ) in culture medium for 24 hours, at 37°C. Untreated cells and susceptible *A. baumannii* ATCC strains were used as a control. After incubation time, the samples were centrifugated at 1,500 $\times$ g for 5 min, the pellets were fixed for 1 hour in 2.5% glutaraldehyde/4% paraformaldehyde/ in 0.1 M cacodylate buffer at room temperature. After fixation, the cells were washed in the same buffer and post-fixed in 1% osmium tetroxide/0.8 % potassium ferricyanide/5mM CaCl₂ in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2 at room temperature for 1 hour in dark conditions. Then, the samples were dehydrated in a graded acetone and embedded in PolyBed 812 resin. Ultrathin sections were collected in grids of 300 mesh, stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a Tecnai Spirit Biotwin G2 (FEI Company, Germany) transmission electron microscope operated at 80 KV.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Dr. Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo (bressan@cpqam.fiocruz.br)

*Dr. Tereza Cristina Leal-Balbino (cristina@cpqam.fiocruz.br)

Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ/PE

Departamento de Microbiologia

Av. Professor Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Campus da UFPE. 50.740-465, Recife, PE – Brazil.

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. Dr. Tereza Cristina Leal-Balbino and Dr. Regina C. B. Q. Figueiredo contributed equality for this work

Funding Sources

This work was supported by FACEPE, CAPES, CNPq..

ACKNOWLEDGMENT

We are thankful to Dr. Karina L. A. Saraiva for her technical assistance and the Program for Technical Development of Health Inputs (PDTIS)/FIOCRUZ for the use of its facilities.

REFERENCES

- (1) Acharya, K. P.; Wilson, R. T. Antimicrobial Resistance in Nepal : A Review Antimicrobial Resistance in Nepal. **2019**, 6 (May), 1–10.
- (2) Santajit, S.; Indrawattana, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res. Int.* **2016**, 2016, 1–8.
- (3) Nowak, P.; Paluchowska, P. *Acinetobacter baumannii*: Biology and Drug Resistance — Role of Carbapenemases. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2016**, 54 (2), 61–74.
- (4) Durante-Mangoni, E.; Utili, R.; Zarrilli, R. Combination Therapy in Severe *Acinetobacter baumannii* Infections: An Update on the Evidence to Date. *Future Microbiol.* **2014**, 9 (6), 773–789.
- (5) Lin, M.-F.; Lan, C.-Y. Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter baumannii*: From Bench to Bedside. *World J. Clin. Cases* **2014**, 2 (12), 787–814.
- (6) Perez, F.; Hujer, A. M.; Hujer, K. M.; Decker, B. K.; Rather, P. N.; Bonomo, R. A. Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, 51 (10), 3471–3484.
- (7) McConnell, M. J.; Actis, L.; Pachón, J. *Acinetobacter baumannii*: Human Infections, Factors Contributing to Pathogenesis and Animal Models. *FEMS Microbiol. Rev.* **2013**, 37 (2), 130–155.
- (8) Perez, A. P.; Perez, N.; Lozano, C. M. S.; Altube, M. J.; de Farias, M. A.; Portugal, R. V.; Buzzola, F.; Morilla, M. J.; Romero, E. L. The Anti MRSA Biofilm Activity of *Thymus vulgaris* Essential Oil in Nanovesicles. *Phytomedicine* **2019**, 57, 339–351.
- (9) Langeveld, W. T.; Veldhuizen, E. J. A.; Burt, S. A.; Langeveld, W. T.; Veldhuizen, E. J. A.; Synergy, S. A. B. Synergy between Essential Oil Components and Antibiotics : A Review. *Crit. Rev. Microbiol.* **2012**, 40 (1), 76–94.
- (10) De Souza, L. I. O.; Bezzera-Silva, P. C.; Navarro, D. M. do A. F.; Da Silva, A. G.; Correia, M. T. dos S.; da Silva, M. V.; De Figueiredo, R. C. B. Q. The Chemical Composition and Trypanocidal Activity of Volatile Oils from

- Brazilian Caatinga Plants. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, 96 (August), 1055–1064.
- (11) Herrera-Rodríguez, S. E.; López-Rivera, R. J.; García-Márquez, E.; Estarrón-Espinosa, M.; Espinosa-Andrews, H. Mexican Oregano (*Lippia Graveolens*) Essential Oil-in-Water Emulsions: Impact of Emulsifier Type on the Antifungal Activity of *Candida albicans*. *Food Sci. Biotechnol.* **2019**, 28 (2), 441–448.
 - (12) Porfírio, E. M.; Melo, H. M.; Pereira, A. M. G.; Cavalcante, T. T. A.; Gomes, G. A.; De Carvalho, M. G.; Costa, R. A.; Catunda, F. E. A. In Vitro Antibacterial and Antibiofilm Activity of *Lippia alba* Essential Oil, Citral, and Carvone against *Staphylococcus aureus*. *Sci. World J.* **2017**, 2017, 1–7.
 - (13) Conceição, A. O. da; Oliveira, F. F. de; Oliveira, R. A. de; Junior, A. de J. da S.; Takser, L.; Reyes-Moreno, C.; Lafond, J. *Lantana macrophylla* Schauer (Verbenaceae) Ethanolic Extract Induces Activation of ERK1/2 and P38 MAPKs Pathway and Ca²⁺ Imbalance in Human Trophoblasts Derived Cell Lines. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, 50 (3–4), 1001–1012.
 - (14) Aelenei, P.; Miron, A.; Trifan, A.; Bujor, A.; Gille, E.; Aprotosoiaie, A. Essential Oils and Their Components as Modulators of Antibiotic Activity against Gram-Negative Bacteria. *Medicines* **2016**, 3 (3), 19.
 - (15) WHO. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria To Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. **2017**.
 - (16) Vasconcelos, N. G.; Croda, J.; Silva, K. E.; Lorenza, M.; Motta, L.; Maciel, W. G.; Limiere, L. C.; Simionatto, S. Short Communication *Origanum vulgare* L . Essential Oil Inhibits the Growth of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria. **2019**, 1–5.
 - (17) Aleksic, V.; Mimica-dukic, N.; Simin, N.; Stankovic, N.; Knezevic, P. Phytomedicine Synergistic Effect of *Myrtus communis* L . Essential Oils and Conventional Antibiotics against Multi-Drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Wound Isolates. *Eur. J. Integr. Med.* **2014**, 21 (12), 1666–1674.
 - (18) Duarte, a.; Ferreira, S.; Silva, F.; Domingues, F. C. Synergistic Activity of Coriander Oil and Conventional Antibiotics against *Acinetobacter baumannii*.

Phytomedicine **2012**, *19* (3–4), 236–238.

- (19) Manoraj, A.; Thevanesam, V.; Bandara, B. M. R.; Ekanayake, A.; Liyanapathirana, V. Synergistic Activity between Triphala and Selected Antibiotics against Drug Resistant Clinical Isolates. *BMC Complement. Altern. Med.* **2019**, *19* (1), 1–7.
- (20) Moussaoui, F.; Alaoui, T. Evaluation of Antibacterial Activity and Synergistic Effect between Antibiotic and the Essential Oils of Some Medicinal Plants. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2016**, *6* (1), 32–37.
- (21) Rao, H.; Lai, P.; Gao, Y. Chemical Composition, Antibacterial Activity, and Synergistic Effects with Conventional Antibiotics and Nitric Oxide Production Inhibitory Activity of Essential Oil from *Geophila repens* (L.) I.M. Johnst. *Molecules* **2017**, *22* (9), 1–13.
- (22) Rosato, a; Piarulli, M.; Corbo, F.; Muraglia, M.; Carone, a; Vitali, M. E.; Vitali, C. *In Vitro* Synergistic Antibacterial Action of Certain Combinations of Gentamicin and Essential Oils. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17* (28), 3289–3295.
- (23) Zamora, C. M. P.; Torres, C. A.; Nuñez, M. B. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oils from Verbenaceae Species Growing in South America. *Molecules* **2018**, *23* (3), 1–21.
- (24) Pascual, M. E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Sánchez Mata, D.; Villar, A. *Lippia*: Traditional Uses, Chemistry and Pharmacology: A Review. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *76* (3), 201–214.
- (25) Marchese, A.; Orhan, I. E.; Daglia, M.; Barbieri, R.; Di Lorenzo, A.; Nabavi, S. F.; Gortzi, O.; Izadi, M.; Nabavi, S. M. Antibacterial and Antifungal Activities of Thymol: A Brief Review of the Literature. *Food Chem.* **2016**, *210*, 402–414.
- (26) Kachur, K.; Suntres, Z. The Antibacterial Properties of Phenolic Isomers , Carvacrol and Thymol. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, *0* (0), 1–12.
- (27) Hashemi, M.; Ehsani, A.; Hosseini Jazani, N.; Aliakbarlu, J.; Mahmoudi, R. Chemical Composition and *in vitro* Antibacterial Activity of Essential Oil and Methanol Extract of *Echinophora platyloba* D.C against Some of Food-Borne Pathogenic Bacteria. *Vet. Res. forum an Int. Q. J.* **2013**, *4* (2), 123–127.

- (28) Marchese, A.; Arciola, C. R.; Barbieri, R.; Silva, A. S.; Nabavi, S. F.; Sokeng, A. J. T.; Izadi, M.; Jafari, N. J.; Suntar, I.; Daglia, M.; et al. Update on Monoterpenes as Antimicrobial Agents: A Particular Focus on p-Cymene. *Materials (Basel)*. **2017**, *10* (8), 1–15.
- (29) Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]. *M100 Performance Standards for Antimicrobial Saceptibility Testing*, 27th ed.; Wayne, PA 119087 USA, 2017.
- (30) Espinoza, J.; Urzúa, A.; Sanhueza, L.; Walter, M. Essential Oil , Extracts , and Sesquiterpenes Obtained From the Heartwood of *Pilgerodendron uviferum* Act as Potential Inhibitors of the *Staphylococcus aureus* NorA Multidrug Efflux Pump. **2019**, *10* (February), 1–15.
- (31) Motyl, M.; Dorso, K.; Barrett, J.; Giacobbe, R. Basic Microbiological Techniques Used in Antibacterial Drug Discovery. *Curr. Protoc. Pharmacol. Anti-Infectives* **2005**, *31* (1), 1–22.
- (32) Krause, K. M.; Serio, A. W.; Kane, T. R.; Connolly, L. E. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6* (6), 1–18.
- (33) Esterly, J. S.; Richardson, C. L.; Eltoukhy, N. S.; Qi, C.; Scheetz, M. H. Genetic Mechanisms of Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter baumannii*. *Ann. Pharmacother.* **2011**, *45* (2), 218–228.
- (34) Guerra, F. Q. S.; Mendes, J. M.; Sousa, J. P.; Morais-Braga, M. F. B.; Santos, B. H. C.; Coutinho, H. D. M.; Lima, E. O. Increasing Antibiotic Activity against a Multidrug-Resistant *Acinetobacter* Spp by Essential Oils of *Citrus limon* and *Cinnamomum zeylanicum*. *Nat. Prod. Res.* **2011**, No. October 2012, 1–4.
- (35) Ahmed, R. M.; Hannigan, I. P.; MacDougall, H. G.; Chan, R. C.; Michael Halmagyi, G. Gentamicin Ototoxicity: A 23-Year Selected Case Series of 103 Patients. *Med. J. Aust.* **2012**, *196* (11), 701–706.
- (36) Hellinger, W. C.; Brewer, N. S. Imipenem. *Mayo Clin. Proc.* **1991**, *66*, 1074–1081.
- (37) Lee, C.-R.; Lee, J. H.; Park, M.; Park, K. S.; Bae, I. K.; Kim, Y. B.; Cha, C.-J.; Jeong, B. C.; Lee, S. H. Biology of *Acinetobacter baumannii*:

- Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, 7 (March), 1–35.
- (38) Nazzaro, F.; Fratianni, F.; Martino, L. De. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **2013**, 1451–1474.
- (39) Guimarães, A. C.; Meireles, L. M.; Lemos, M. F.; Guimarães, M. C. C.; Endringer, D. C.; Fronza, M.; Scherer, R. Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules* **2019**, 24 (13), 1–12.
- (40) Bassetti, M.; Peghin, M.; Vena, A.; Giacobbe, D. R. Treatment of Infections Due to MDR Gram-Negative Bacteria. **2019**, 6 (April), 1–10.
- (41) Yang, S. K.; Yusoff, K.; Mai, C. W.; Lim, W. M.; Yap, W. S.; Lim, S. H. E.; Lai, K. S. Additivity vs. Synergism: Investigation of the Additive Interaction of *Cinnamon bark* Oil and Meropenem in Combinatory Therapy. *Molecules* **2017**, 22 (11), 1–14.
- (42) Hospenthal, M. K.; Costa, T. R. D.; Waksman, G. A Comprehensive Guide to Pilus Biogenesis in Gram-Negative Bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2017**, 15 (6), 365–379.
- (43) Lee, J.-H.; Kim, Y.-G.; Khadke, S. K.; Yamano, A.; Woo, J.-T.; Lee, J. Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Prenylated Flavanones from *Macaranga tanarius*. *Phytomedicine* **2019**, 63.
- (44) Vizcarra, I. A.; Hosseini, V.; Kollmannsberger, P.; Meier, S.; Weber, S. S.; Arnoldini, M.; Ackermann, M.; Vogel, V. How Type 1 Fimbriae Help *Escherichia coli* to Evade Extracellular Antibiotics. *Sci. Rep.* **2016**, 6 (January), 1–13.
- (45) Bernhardt, T. G.; Roof, W. D.; Young, R. Genetic Evidence That the Bacteriophage Φ X174 Lysis Protein Inhibits Cell Wall Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97 (8), 4297–4302.
- (46) Hajam, I. A.; Dar, P. A.; Won, G.; Lee, J. H. Bacterial Ghosts as Adjuvants: Mechanisms and Potential. *Vet. Res.* **2017**, 48 (1), 1–13.
- (47) Morris, F. C.; Dexter, C.; Kostoulas, X.; Uddin, M. I. The Mechanisms of Disease Caused by *Acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol.* **2019**, 10 (July).

- (48) Jha, C.; Ghosh, S.; Gautam, V.; Malhotra, P.; Ray, P. *In Vitro* Study of Virulence Potential of *Acinetobacter baumannii* Outer Membrane Vesicles. *Microb. Pathog.* **2017**, *111*, 218–224.
- (49) Chatterjee, S.; Mondal, A.; Mitra, S.; Basu, S. *Acinetobacter baumannii* Transfers the *Bla_{NDM-1}* Gene via Outer Membrane Vesicles. *J. Antimicrob. Chemother.* **2017**, *72* (8), 2201–2207.
- (50) Koning, R. I.; de Breij, A.; Oostergetel, G. T.; Nibbering, P. H.; Koster, A. J.; Dijkshoorn, L. Cryo-Electron Tomography Analysis of Membrane Vesicles from *Acinetobacter baumannii* ATCC19606T. *Res. Microbiol.* **2013**, *164* (5), 397–405.
- (51) Claydon, M. A.; Davey, S. N.; Edwards-Jones, V.; Gordon, D. B. The Rapid Identification of Intact Microorganisms Using Mass Spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14* (11), 1584–1586.
- (52) Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement M100-S15*; Wayne, PA: CLSI, 2005; Vol. 25.
- (53) Loo, Y. Y.; Rukayadi, Y.; Nor-Khaizura, M. A. R.; Kuan, C. H.; Chieng, B. W.; Nishibuchi, M.; Radu, S. In Vitro Antimicrobial Activity of Green Synthesized Silver Nanoparticles against Selected Gram-Negative Foodborne Pathogens. *Front. Microbiol.* **2018**, *9* (JUL), 1–7.

**ARTIGO II - COMPARATIVE TRANSCRIPTOMICS ANALYSIS OF MULTIDRUG-
RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII* IN RESPONSE TO THE TREATMENT
WITH THE TERPENIC COMPOUNDS THYMOL AND CARVACROL**

Manuscrito à ser submetido à revista *Frontiers in Microbiology* (Qualis A1) em 2020.

Comparative transcriptomics analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in response to the treatment with the terpenic compounds thymol and carvacrol.

Isis C. S. Cirino^{1,2}, Caroline F. Santana^{1,2}, Maria R. Bezerra^{1,2}, Igor V. Rocha¹, Regina C. B. Q. Figueiredo^{1*}, Tereza C. Leal-Balbino^{1*}.

¹ Department of Microbiology, Aggeu Magalhães Institute – Oswaldo Cruz Foundation, Recife, PE, Brazil

² Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

Corresponding Author

*Dr. Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo (bressan@cpqam.fiocruz.br)

*Dr. Tereza Cristina Leal-Balbino (cristina@cpqam.fiocruz.br)

Aggeu Magalhães Institute, FIOCRUZ/PE

Departament of Microbiology

Av. Professor Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Campus da UFPE. 50.740-465, Recife, PE – Brazil.

Keywords: *A. baumannii*, antibiotic resistance, thymol, carvacrol, transcriptomic analysis

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is a gram-negative opportunistic pathogen that due to its ability to present resistance to multi-drug, extended-drug or pan-drug resistance has become a serious problem of public health and a real medical challenge. In this work we investigated the antibacterial activity of thymol and carvacrol alone and in combination, against clinical resistant isolates of *A. baumannii*. We also carried out a comparative transcriptomic analysis through sequencing, using RNA-sequencing protocol, on Acb35 strain under different treatments with the compounds isolated or in combination. Our results showed that thymol e carvacrol alone strongly inhibited the bacteria growth (MIC< 500µg/mL) presenting synergism ($FICI \leq 0.5$) or additive effects ($0.5 < FICI \leq 4$) when used in combination on of multi-resistant *A. baumannii* clinical isolates. The cytotoxicity assays showed that at concentrations of thymol and carvacrol able to inhibiting bacterial growth these compounds were neither cytotoxic to Vero cells or presented haemolytic effect on the erythrocytes. In addition, our results indicated protein coding mRNA associated with ribosomal subunit assemble are down-regulated under all experimental conditions tested. However, the up-regulation of some genes encoding proteins in response to carvacrol and thymol varied according to the experimental condition. The combination of carvacrol and thymol caused a positive regulation of stress response genes encoding proteins and transcriptional regulators. The results suggest thymol and carvacrol as a potential chemotherapeutic agent in the control MDR *A. baumannii* infections.

INTRODUCTION

Acinetobacter baumannii is an important pathogen associated with hospital-acquired infections worldwide. This microorganism is able to survive and grow in diverse environments, including intensive care units (ICUs). Ventilator-associated pneumonia, wound and catheter-associated urinary tract infections are the most common manifestations of *Acinetobacter* in the ICUs. (Lee et al., 2017; Qin et al., 2018) (Badave and Dhananjay, 2015; Harding et al., 2017; Jha et al., 2017). Due to its ability to acquired resistance genes to a vast array of antimicrobials, the treatment of *A. baumannii*-associated infections has become a major challenge in recent decades. Recent studies strongly suggest that the acquisition of the multidrug resistant (MDR) phenotype is a determining factor for the success of *A. baumannii* as a nosocomial pathogen (Antunes et al., 2014; Bialvaei et al., 2017; Qin et al., 2018).

Traditionally, plants have been considered as an important source of biological active molecules which can be prospecting as drug candidates for treating a variety of diseases (Karumathil et al., 2018). Essential oils, from medicinal plants consist of a mixture of aromatic and volatile compounds with recognized biological properties including antibacterial, antifungal, trypanocidal and larvicidal activities (Bassolé and Juliani, 2012b; Hyldgaard et al., 2012; Cirino et al., 2015; De Souza et al., 2017; Engel ; Silva et al., 2017). Carvacrol and thymol isomers are terpenoids found as major constituents of essential oils *Origanum* spp., *Thymus* spp. and *Lippia macrophylla* with proven antimicrobial activities, related to the presence of carvacrol and thymol terpenes (Hyldgaard et al., 2012; De Souza et al., 2017; Engel et al., 2017; Kachur and Suntres, 2019; Memar et al., 2017). Additionally, carvacrol and thymol are generally considered safe and both of them have been approved by the Federal Drug Administration (FDA) for human consumption, as food additives (Kachur and Suntres, 2019). In this study, we evaluated the antimicrobial potential of thymol and carvacrol alone or in combination in clinical isolates of *A. baumannii*. We also analyzed, comparatively, the bacterial transcriptome, in attempt to identify the possible molecular mechanisms of action of thymol and carvacrol alone or in combination on this microorganism.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and preparation of stock solutions for the antimicrobial assays

The carvacrol and thymol were obtained from Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, MO). Stock solutions of carvacrol and thymol, at a final concentration of 1024µg/mL each, were freshly prepared in DMSO. The combination of carvacrol and thymol was prepared by mixing equal volumes of the stock solutions of the two compounds.

Bacterial strains

Five clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* (Acb06, Acb09, Acb34, Acb35 and Acb45) with different STs (ST1, ST15, ST79, ST113), were obtained from three hospitals in the Metropolitan Region of Recife/Pernambuco state, in previous study.. These isolates were collected in the years 2010, 2012 and 2014, from different sites of infection (blood, catheter, cerebrospinal fluid and urinary tract). The reference susceptible *A. baumannii* ATCC 19606 was also included. The bacterial samples were stored in the Department of Microbiology at the Aggeu Magalhães Institute (Fiocruz-PE). The identification of genus and species were performed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) technique (Claydon et al., 1996) using the software MALDI Biotyper system version 2.0 (Bruker Daltonics).

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Determination

The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by broth microdilution test, accordingly to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2005). The reference antibiotics used in this study were ceftazidime, gentamicin and imipenem. A stock solution of thymol, carvacrol and the antibiotics were prepared in DMSO and ultrapure water at 1024µg/mL for the thymol or carvacrol and 64-256 µg/mL for antibiotics, respectively. At this concentration, DMSO did no exert any antibacterial effect on bacterial isolates or the reference strains of (data not shown). *A. baumannii* strains were incubated overnight agar MH (Sigma-Aldrich, United States) at 37°C. The bacterial cultures were then diluted in MH broth (Cation-adjusted Mueller-Hinton broth, Fluka – Sigma-Aldrich, United States) to McFarland 0.5 (1×10^8 CFU/mL). To each well, 50 mL of dilution of the thymol or carvacrol or antibiotic (2–256 µg/mL), and 50 µL of a bacterial

suspension were added to McFarland 0.5 to achieve a final volume of 100 μL . Wells containing only culture medium were used as a blank control. *E. coli* (ATCC® 25922) and *A. baumannii* (ATCC® 19606) were used as control of susceptibility to antibiotics. After incubation, 20 μL of 0.01% of resazurin (Sigma Aldrich – USA) was added to each well. The plates were reincubated for 2h at 37°C and subsequently evaluated visually for colour change. Blue/purple colour indicated no bacterial growth while pink/colourless indicated bacterial growth. The MIC value was taken at the lowest concentration of antibacterial agents that inhibits the growth of bacteria (colour remained in blue) (Loo et al., 2018). These assays were performed in duplicate in two independent experiments.

Cytotoxicity to Vero Cells

In order to determine the cytotoxic potential of thymol and carvacrol, Vero cells lineage was used. Initially, Vero cells were seeded in a 96-well microplates at a concentration of 2×10^5 cells/mL in RPMI medium without phenol red supplemented with 10% FBS and then incubated for 24h in 5% CO_2 at 37°C. Afterwards, the cells were treated for 24h in 5% CO_2 at 37°C with different concentrations of thymol or carvacrol (512–32 $\mu\text{g/mL}$). After incubation, the cells were washed and MTT (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) at 50 $\mu\text{g/mL}$ was added to each well. The microplate was incubated for 3h in 5% CO_2 at 37°C. Cell cultivated in drug-free medium were used as a control. DMSO was added to each well to solubilize the formed-formazan crystals, and absorbance was read in 540nm in a microplate reader (Benchmark plus Bio-Rad®, California, EUA). The concentration able to kill 50% of the cells (CC_{50}) was calculated by linear regression. Each assay was carried out in quadruplicate of two individual experiments.

Hemolytic activity

The hemolytic activity was performed by incubating 75 μL of serially diluted thymol or carvacrol in saline solution (NaCl 0.85%+ CaCl_2) with 75 μL of 2% red blood cells suspension (human O+) for 3h at 37°C in a 96-well microplate (U-bottom shape) under constant agitation. The microplate was centrifuged at 1500 g for 4min. Cell lysis was measured in 540nm at microplate reader (Benchmark plus Bio-Rad®, California, EUA). Erythrocytes in saline or treated with Triton X-100 were used as negative and positive control of hemolysis, respectively. The results were

determined by the percentage of hemolysis compared to the positive control (100% hemolysis) and negative control (0% hemolysis), and all tests were performed in quadruplicate in two individual experiments.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using ANOVA. The data were analyzed by GraphPad Prism 5.0 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Checkerboard Assays

The analysis of the effect of thymol and carvacrol in combination, against multidrug resistant *A. baumannii* strains, were performed by using the checkerboard method described by Motyl et al. (2005), with modifications. Briefly, the bacterial suspension (50 μ L at McFarland 0.5/1x10⁸ CFU/mL) were added to previously prepared 96-well plates containing combined serial twofold dilutions of thymol along horizontal rows and carvacrol along the vertical rows. Bacteria cultivated only with thymol (first horizontal row) and carvacrol (first vertical row) were used as a control. The concentrations used ranged from 2 to 256 μ g/mL for both compounds. The plates were incubated at 37°C for 24h and the Fractional inhibitory concentration index (FICIs) were calculated by the formula:

$$FICI = (MIC_a \text{ combination} / MIC_a \text{ alone}) + (MIC_b \text{ combination} / MIC_b \text{ alone}).$$

Where, a=LME0 and b= reference antibiotic

The results were interpreted as follows: $FICI \leq 0.5$ synergic effect, $0.5 < FICI \leq 4$ additive effect and $FICI > 4$ as a antagonistic effect.

RNA-seq library construction

For the RNA-seq, 2.5x10⁸ cells of *Acinetobacter baumannii*, treated with thymol, carvacrol or both combined were incubated for 24h at 37°C. Non-treated cells were used as the negative control. The RNA was extracted with SV Total RNA Isolation System Kit (Promega, Wisconsin) and the RNAs obtained were quantified using Qubit® 2.0 fluorochemical apparatus (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts) with the HS Assay Kit RNA reagent (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts). Depletion of ribosomal RNA was realized with the RiboMinus™ Transcriptome Isolation Kit (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts) and the samples having ≥ 100 ng RNA were used to make the cDNA libraries with TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit system

175 (Illumina Inc.). The sequencing was performed in the MiSeq (Illumina Inc.). with
 176 MiSeq® Reagent Kit v3 cartridge 150 cycles (Illumina Inc.).

177 **RNA-seq analysis**

178 Data from Illumina were analyzed by FastQC to check the sequences quality, the
 179 adapters and low quality sequences were removed using Trimmomatic 0.36
 180 (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>), STAR (DOBIN, et al., 2012) was
 181 used to map the sequences to *A. baumannii* genome (Abaumannii_35_Genome.fasta)
 182 and to count the number of reads.

183 The identification of differentially expressed genes was performed using Galaxy package
 184 and EdgeR package (Robinson et al., 2009). This package normalizes the data by
 185 negative binomial distribution to compare the samples with the highest accuracy. Once
 186 the p-values of each gene were obtained, the False Discovery Rate (FDR) correction was
 187 applied in order to correct errors associated with multiple tests. Differentially expressed
 188 genes were those that had a corrected p-value of less than 0.05. The results were plotted
 189 on graphs according to protein annotation. The minimum of 2-fold increase over the
 190 negative control ($\text{Log}_2(\text{I Ratio}) > 1$) was considered.

191 **RESULTS**

192 **Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Determination**

193 MICs of carvacrol, thymol and antibiotics were evaluated in *A. baumannii* strains
 194 Acb06 (ST79), Acb09 (ST1), Acb34 (ST15), Acb35 (ST113) and Acb45 (ST1)
 195 (Table 1). Carvacrol MIC values remained constant ($\text{MIC} = 128\mu\text{g/mL}$), varying
 196 only for Acb34 and Acb35 isolates ($64\mu\text{g/mL}$). Regarding thymol, MICs were
 197 slightly lower compared to carvacrol, showing values between 32 and $64\mu\text{g/mL}$.
 198 MICs of ceftazidime (CAZ), ciprofloxacin (CIP), gentamicin (GEN) and imipenem
 199 (IPM) were determined against *A. baumannii* clinical isolates to confirm the
 200 resistance of these isolates. *E. coli* (ATCC® 25922) and *A. baumannii* (ATCC®
 201 19606) strains were used as controls. Based on Clinical and Laboratory Standards
 202 Institute (CLSI, 2017) breakpoints, all isolates were classified as resistant to CAZ
 203 ($\text{MIC} > 64\mu\text{g/mL}$), CIP ($\text{MIC} > 32\mu\text{g/mL}$) and IPM ($\text{MIC} > 16\mu\text{g/mL}$). Regarding
 204 GEN, isolates Acb06 and Acb34 were considered susceptible with MICs of $4\mu\text{g/mL}$
 205 and $2\mu\text{g/mL}$, respectively. Acb09, Acb35 and Acb45 isolates showed GEN
 206 resistance with $\text{MIC} > 64\mu\text{g/mL}$.

207

208 **Table 1: MICs of thymol, carvacrol and antibiotics on *A. baumannii* strains**

Strain	Sequence type	MIC (µg/mL)					
		CAZ	CIP	GEN	IPM	Thymol	Carvacrol
Ab06	ST79	>128	>32	4	32	64	64
Ab09	ST1	64	>32	>64	16	64	64
Ab34	ST15	128	>32	2	32	32	64
Ab35	ST113	>128	>32	>64	32	32	32
Ab45	ST1	>128	>32	>64	64	64	128

209 Cytotoxicity assay

210 The cytotoxic potential of thymol and carvacrol on the Vero Cells was
 211 evaluated by MTT methodology (Figures 1A e 1B). Compared to the control cells
 212 (100% of viability), a significant decrease of *A. baumannii* viability was observed
 213 only at higher concentrations (128 and 256µg/mL) for both compounds. For
 214 concentrations bellow 128µg/mL the percentage of cell viability varied from 80 to
 215 90% for thymol and carvacrol, respectively. The concentration able to reduce the
 216 cell viability by 50% (CC₅₀) was estimated 242.3 ± 4.2 µg/mL for carvacrol and
 217 232.5± 19.7 for thymol. Independent on the bacterial isolate, our results showed
 218 that both thymol and carvacrol were more selective against the bacteria than to
 219 mammalian cell, when the cytotoxicity for Vero cells was compared with the
 220 antibacterial effect of these compounds. The selectivity index of these molecules
 221 varying from 1.89 to 7.57 (Table 2). No significant haemolytic activity was
 222 observed in all the concentrations tested of both compounds tested and the
 223 concentration able to cause haemolysis to 50% of erythrocytes was estimated as
 224 higher than 256µg/mL.

225

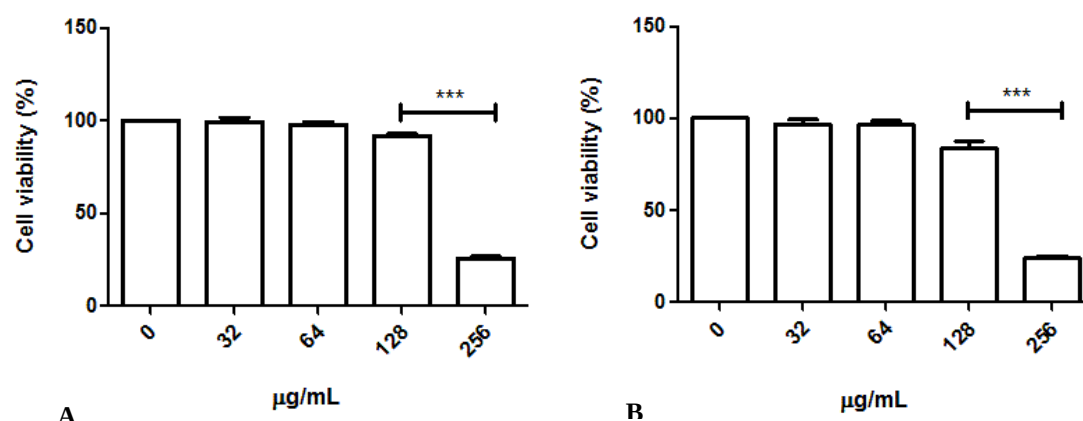
226

227

228 **Table 2: Thymol and carvacrol selectivity index**

<i>A. baumannii</i> Strain	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		Selectivity Index (SI)	
	Thymol	Carvacrol	Thymol	Carvacrol
Acb06	64	64	3.63	3.78
Acb09	64	64	3.63	3.78
Acb34	32	64	7.26	3.78
Acb35	32	32	7.26	7.57
Acb45	64	128	3.63	1.89

229 **Figure 1: Effects of carvacrol (A) and thymol (B) on the viability of Vero cells lines cell**
 230 **viability. The asterisk indicates no significant differences between the concentrations tested**
 231 **(***P < 0.0001)**

232 **Checkerboard Analysis**

234 The effects of the interaction between thymol and carvacrol were determined by
 235 the Checkerboard assay. Data of the MICs of compounds alone and in
 236 combination, as well as fractional inhibitory concentration indices (ICFs) are
 237 showed in Table 2. The meaning of FICI as synergistic effect ($\text{FICI} \leq 0.5$), additive
 238 effect ($0.5 < \text{FICI} \leq 4$) and antagonism ($\text{FICI} > 4$) have been previously described.
 239 The combination of thymol with carvacrol had an additive effect on Acb06 (FICI
 240 0.62) and Acb35 (FICI 0.75) isolates, with a reduction in MIC values of 2-4 fold
 241 and 2-8 fold for timol and carvacrol, respectively. As a result of the interaction

between these compounds against Acb09 (FICI 0.50), Acb34 (FICI 0.50) and Acb45 (FICI 0.37) isolates, a synergistic effect was observed with reductions of 2-4 fold and 2-8 fold for thymol and carvacrol MICs respectively.

Table 3: Effect of thymol and carvacrol alone or in combination on clinical isolates of *A. baumannii* strains.

<i>A. baumannii</i> strains	MIC (µg/mL)				FICI
	Thymol alone	Carvacrol alone	Thymol in combination	Carvacrol in combination	
Acb06	64	64	32 (2)	8 (8)	0.62 (A)
Acb09	64	64	16 (4)	16 (4)	0.50 (S)
Acb34	32	64	16 (2)	16 (4)	0.50 (S)
Acb35	32	32	8 (4)	16 (2)	0.75 (A)
Acb45	64	128	32 (2)	16 (8)	0.37 (S)

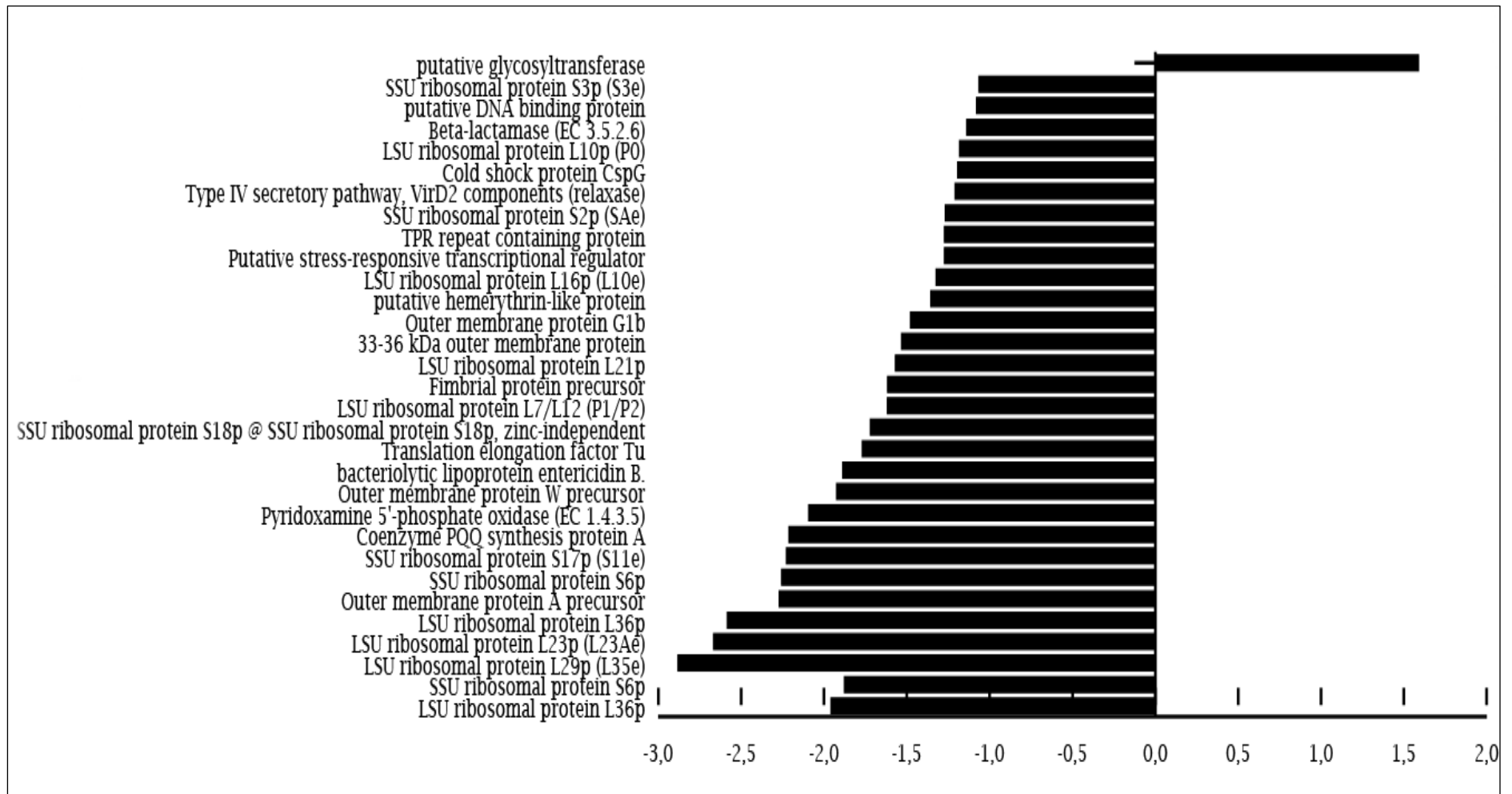
The numbers between parentheses represents the fold of MIC reduction for the thymol and carvacrol in combination. The letter between parentheses corresponding to (A) additive and (S) synergism.

RNA_Seq

To investigate which genes were significantly modulated after treatment with thymol, carvacrol and the combination of both, the untreated Acb35 isolate transcriptome (control) was compared with the same isolate transcriptome after treatment (S1). A total of 64 genes were up-regulated and 63 genes were down-regulated. However, most of them consisted of genes encoding hypothetical proteins and were excluded from the analysis. Thus, 55 genes remained for further analysis, of which 20 were up-regulated and 35 down-regulated. Among the down-

259 regulated genes, 14 were present under the three previously described treatment
260 conditions. Protein-encoding mRNA involved in the structural composition of
261 ribosomes constituted the largest gene group. The expression of genes encoding
262 outer membrane proteins, precursor proteins in the formation of fimbriae and the
263 type IV secretory pathway were also altered. Although Acb35 presented similar
264 responses with regard to down-regulated genes, it was observed that the strain
265 produced distinct responses to up-regulated genes. Thymol specifically induced
266 down-regulation of 28 genes, but only one was up-regulated (Fig. 2). When
267 exposed to carvacrol treatment, nine genes (involved with cellular stress response,
268 ribosomal hibernation processes and iron and sulfur metabolism) were up-
269 regulated (Fig. 3). Considering the combination of thymol and carvacrol treatment,
270 it was observed that a total of 11 genes (which encodes proteins related to
271 biological processes, transcriptional regulation of resistance mechanism and
272 virulence and protein exportation) were up-regulated (Fig 4).

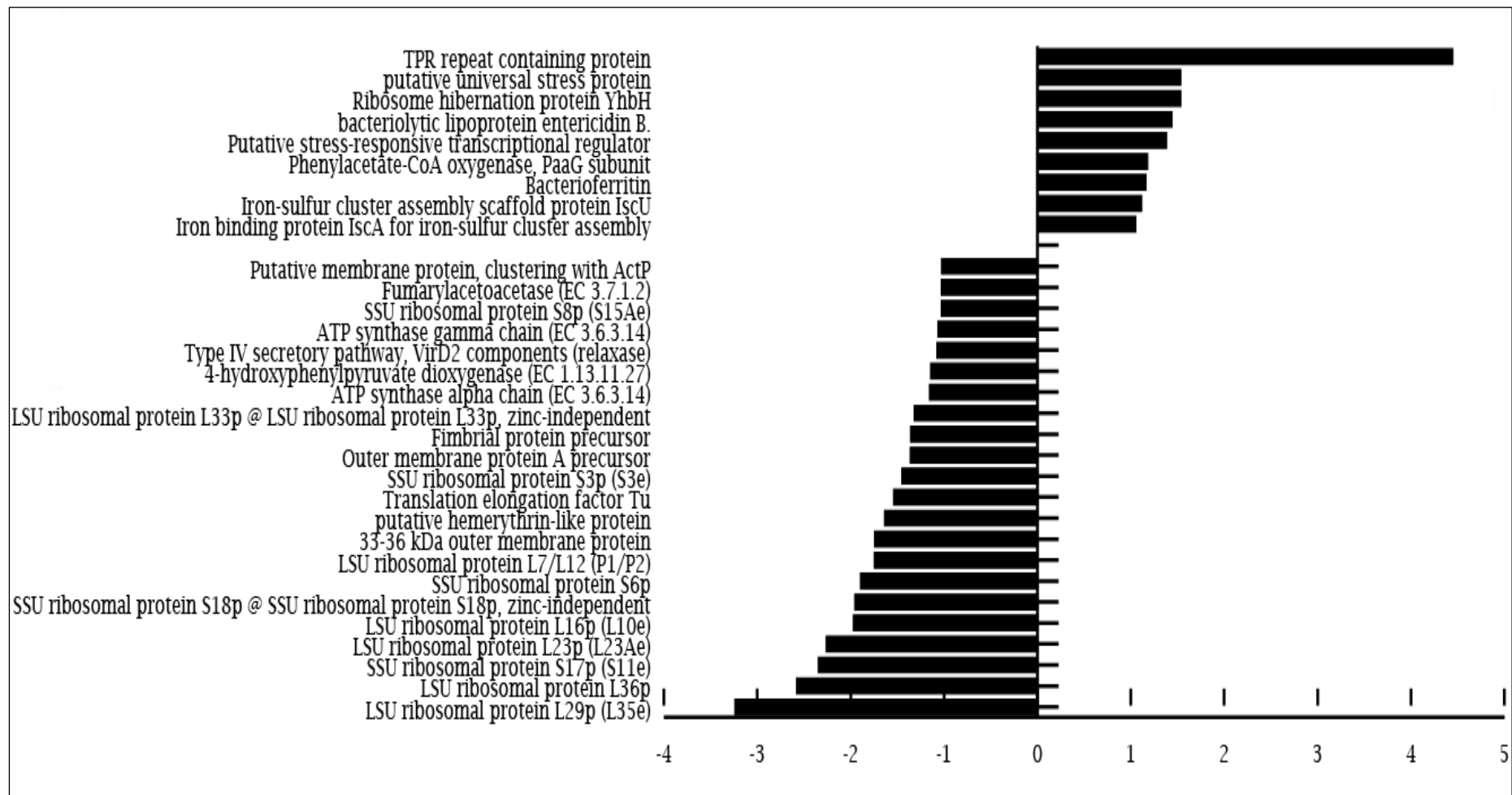
273 **Figure 2: Positively and negatively genes regulated after treatment with Thymol**



274

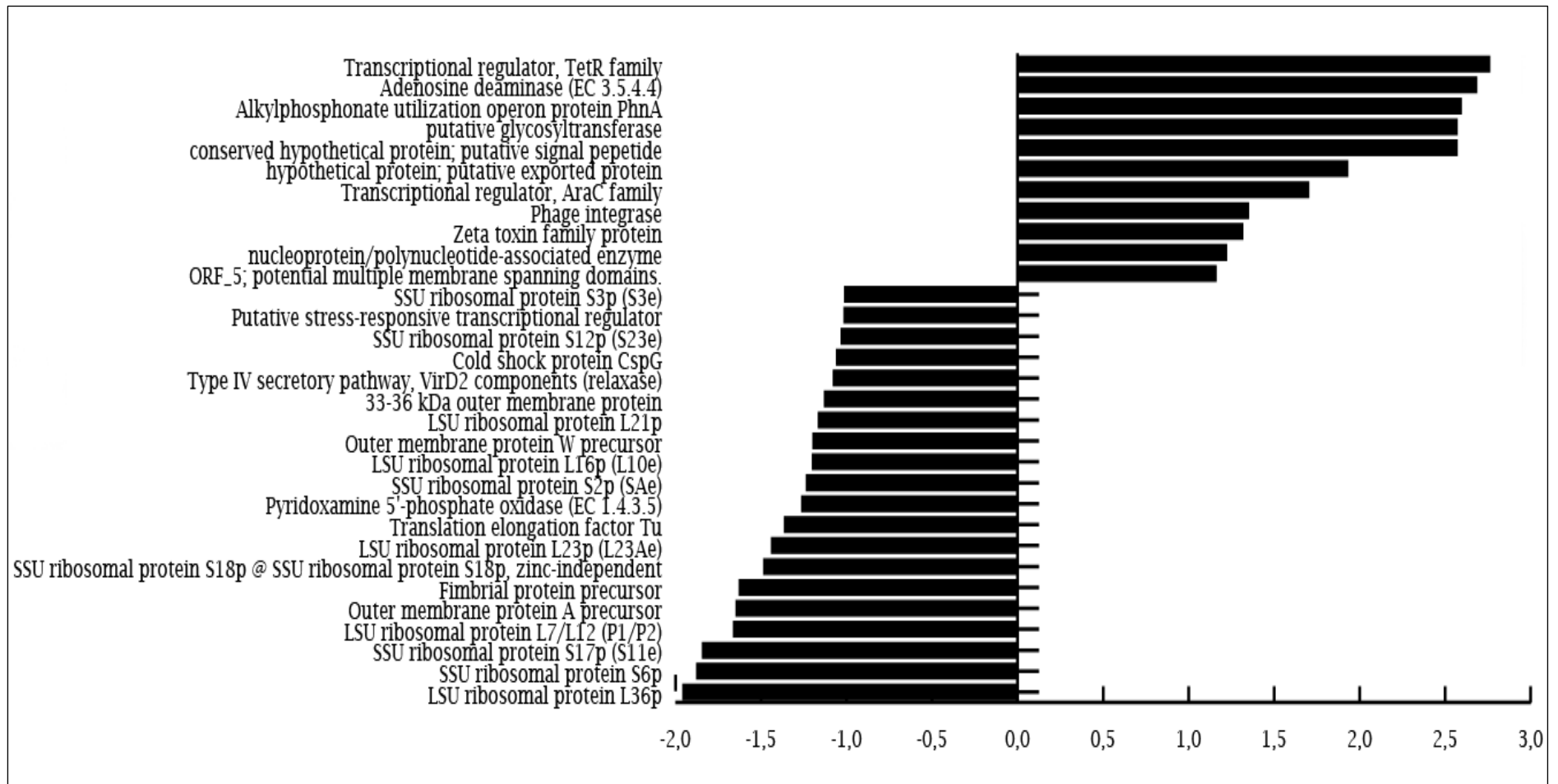
275 Right side up-regulated proteins and left down-regulated proteins compared to the control. The minimum of 2-fold increase over the negative control ($\log_2$ (I
276 Ratio) >1) and p-value < 0.05.

277 **Figure 3: Positively and negatively genes regulated after treatment with Carvacrol**



278
 279 Right side up-regulated proteins and left down-regulated proteins compared to the control. The minimum of 2-fold increase over the negative control (Log2 (Ratio) >1) and p-value < 0.05.
 280

281 **Figure 4: Positively and negatively genes regulated after treatment with Thymol plus Carvacrol**



282

283 Right side up-regulated proteins and left down-regulated proteins compared to the control. The minimum of 2-fold increase over the negative control (Log₂ (I

284 Ratio) >1) and p-value < 0.05

DISCUSSION

Carvacrol and its isomer thymol, has been identified as the main constituents of essential oils from medicinal plants, with recognized antibacterial activity (ref). These compounds alone have been also evaluated for their biological activity against Gram positive and Gram negative pathogens (Cirino et al., 2015; Memar et al., 2017; Raei et al., 2017). However, most of these studies are limited by the use of reference susceptible strains, which are usually strikingly different from relevant multi-resistant clinical isolates (Fux et al., 2005). In this regard, in this study we investigated, for the first time, the bactericidal effect of carvacrol and thymol alone or in combination on multiresistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from different hospital source, as well as their impact on the gene expression using comparative transcriptome analysis.

Our results showed that both compounds alone are able to significantly decrease the bacterial growth in a similar way, with MIC values varying from 32-64 and 32-128µg/mL for thymol and carvacrol, respectively. Compared to reference antibiotics our results showed that carvacrol and thymol present lower MIC values. These promissory results prompted us to investigate whether the antibacterial effect of carvacrol and thymol could be enhanced by their use in combination. Taking in account the current scenario of antibiotic resistance worldwide and the urgent need for the discovery of novel efficacious drug against *A. baumannii*, the association of different molecules can be an interesting strategy for the discovery of novel antimicrobial drugs against *A. baumannii*. (WHO, 2017). Accordingly, the synergism between drugs has been considered a important weapon in the prevention and combat of resistance in bacteria, including *A. baumannii* (Li et al., 2017). Our checkboard assay indicated that the combination of carvacrol and thymol presented a synergic effect for most of isolates whereas against the isolates Acb06 and Acb35 carvacrol-thymol association presented additive effect. The difference existing between the isolates may be due to the distinct resistance profile of these distinct clones. In agreement with this hypothesis the previous genomic analysis demonstrated that the clone Acb35 presents higher resistance among these clinical isolates (data not shown).

The bactericidal activity of thymol and carvacrol has been mainly attributed to the presence of reactive hydroxyl, which can form hydrogen bounds with

catalytic site of relevant membrane enzymes, leading to its inactivation and ultimately, the bacteria rupture (Guimarães et al., 2019). However, our previous ultrastructural studies, using these same *Acinetobacter baumannii* isolates tested in the present study, revealed no significant cell membrane rupture when these bacteria were treated with thymol and carvacrol-rich essential oil from *Lippia macrophylla* (unpublished data). Thus, it is possible that other antibacterial mechanism are been trigger by these compounds. To better investigate the mechanism behind the effect of thymol and carvacrol alone or in combination on *A. baumannii* isolates a comparative transcriptome analysis was performed.

Concerning to down-regulated genes thymol and carvacrol alone or in combination induced similar response. Interestingly, a set of gene related to ribosomal proteins of both small and large ribosomal subunits is affected by the treatments. These proteins play an important role in the assemble and binding of mature ribosomes. They also are related to t-RNA binding. Some of these gene products are usually found circling the exit of polypeptide channel (Gabashvili et al., 2001; Lecompte et al., 2002). As carvacrol and thymol, ribosomal structures are the target of several antibiotics. Macrolide antibiotics, for instance was shown to inhibit the bacterial protein biosynthesis by preventing peptidyltransferase from adding the growing peptide in the nascent peptide exit tunnel (Gabashvili et al., 2001). The expression of genes coding for proteins responsible for the virulence of bacteria, as those acting as precursors of out membrane, fimbriae formation, and belonging to type IV secretion system are also negatively affected by these compound. As a possible consequence, the bacteria may become more permeable and susceptible to lysis. The down regulation of transcript products of fimbriae could lead to impairment of bacteria adhesion and biofilm formation, a pivotal process for the success of infection. Finally, by negatively interfere with the type IV secretion the treatment with the compounds alone or in combination could reduce the conjugative transference of DNA, plasmids and other mobile genetic elements (Morris et al., 2019). Individually, thymol down-regulated the expression of genes encoding outer membrane proteins, DNA-bind proteins and one beta-lactamase, suggesting this compound as promissory adjuvant in combination with beta-lactam antibiotics. This compound also inhibited coding mRNA entericidin B a bacteriolytic lipoprotein responsible for the response to toxic substance (López et al., 2017).

The comparative transcriptome analysis of *A. baumannii* treated with carvacrol alone revealed other negatively regulated genes for proteins as ATP-synthases, which are responsible for the coupled transport of protons, synthesis or hydrolysis of ATP (Nakanishi-Matsui et al., 2016). The down regulation of ATP-synthase together with the deleterious effect of carvacrol on the membrane potential can result in collapse of the proton motive force and depletion of ATP pool, leading to bacteria death (Ultee et al., 2002; Kachur and Suntres, 2019). Differently from thymol, which down regulated the expression of gene for bacteriolytic lipoprotein entericidin B, the treatment with carvacrol caused a up regulation of genes for this protein as well as other genes related to stress responsible for dimerization of 70S yield inactive hibernating 100S complexes. Because the protein synthesis is one the most energy demanding cellular process, the ability of bacteria to control this process is essential for life. The inactivation of 100S complexes via 70 S ribosome is a reversible response which tend to be revert at more favourable environmental conditions (Beckert et al., 2018; Matzov et al., 2019). Thus, a compound able to induce ribosome hibernation could be an attractive target for the development of novel antimicrobial agents (Matzov et al., 2019). Genes coding for proteins related to iron metabolism were also affected by the treatment of *A. baumannii* with carvacrol alone. Iron-sulphur cluster are considered a key cofactors on proteins intervening in a multiple conserved cellular process, such as gene expression, DNA repair, RNA modification, central metabolism and respiration. Here, we demonstrated an up-regulation of genes for iron-sulphur cluster proteins IscA and IscU which participate in the iron metabolism as well as in the bacterial response to oxidative stress (Brzóška et al., 2006; Zimblet et al., 2012).

For the combination carvacrol-thymol the down-regulated genes were mainly those related to ribosomal assemble and function as observed for cells treated with these compounds alone. Interestingly, the transcriptome analysis for the combination of compounds showed up-regulated response that differs from those found for these molecules alone. For instance, genes for transcriptional regulator belongs to the TetR family were positively regulated in presence of the combination of carvacrol-thymol. These proteins have a key role on the gene regulation of virulence factors responsible for the commutation between opaque and transparent phenotypes (Morris et al., 2019). The genes for AraC proteins

were up-regulated in presence of carvacrol-Thymol combination. These proteins are positive transcriptional activators related to sugar degradation, as arabinose (Gallegos et al., 1997). Genes for phage integrase were also positively regulated. These enzymes mediate the unidirectional site-specific recombination between a short sequence of phage DNA, the phage attachment site, attP, and a short sequence of bacterial DNA, the bacterial attachment site, attB (Groth and Calos, 2004).

The cytotoxicity of carvacrol and thymol to mammalian cell has been a matter of controversies. Ruiz-Cabello et al. (2014) showed that high concentrations of carvacrol and its mixture with thymol cause cytotoxic effect in Caco-2 Cells. Paradoxically, these same authors demonstrated that these molecules have a protective effect on these cells and are able to reverse oxidative damage. In this work we showed that both compound did not exert significant cytotoxicity on Vero cells or haemolytic effect on human erythrocytes. Carvacrol and thymol have also reported as nontoxic for dermal fibroblast and keratinocytes with cell viability higher than 80%, at analogous concentration used in our study (García-Salinas et al., 2018). Furthermore, the CC₅₀ for Vero cells were higher than MIC values for bacteria.

CONCLUSION

Taken together, our results showed that treatment of bacteria with carvacrol and thymol alone or in combination caused up-regulation of gene transcripts mainly involved in stress response and energy metabolism. The most common down-regulated genes were related to ribosome assembling and processing of polypeptide chain. Interestingly, Rao et al, demonstrated that treatment of fungus *Saccharomyces cerevisiae* with terpenoid phenols including thymol and carvacrol also caused down-regulation of gene involved in ribosomal biogenesis (Rao et al., 2010) . These data corroborate the hypothesis that the thymol and carvacrol activate a complex cascade of bacterial responses besides the simply induce membrane injury (Rao et al., 2010). The low cytotoxicity of carvacrol and the antibacterial activity of these compounds reinforce the use of these molecules as a start point for the development of new drugs against multiresistant *A. baumannii* infection.

419 **Author Contributions**

420 The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have
421 given approval to the final version of the manuscript. Dr. Tereza Cristina Leal-
422 Balbino and Dr. Regina C. B. Q. Figueiredo contributed equality for this work

423 **Funding Sources**

424 This work was supported by FACEPE, CAPES, CNPq

425

REFERENCES

- Antunes, L. C. S., Visca, P., and Towner, K. J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: Evolution of a global pathogen. *Pathog. Dis.* 71, 292–301. doi:10.1111/2049-632X.12125.
- Badave, G. K., and Dhananjay, K. (2015). Biofilm Producing Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: An Emerging Challenge. *J. Clin. Diagn. Res.* 9, 9–11. doi:10.7860/JCDR/2015/11014.5398.
- Bassolé, I. H. N., and Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 17, 3989–4006. doi:10.3390/molecules17043989.
- Beckert, B., Turk, M., Czech, A., Berninghausen, O., Beckmann, R., Ignatova, Z., et al. (2018). Structure of a hibernating 100S ribosome reveals an inactive conformation of the ribosomal protein S1. *Nat. Microbiol.* 3, 1115–1121. doi:10.1038/s41564-018-0237-0.
- Bialvaei, A. Z., Kouhsari, E., Salehi-Abargouei, A., Amirmozafari, N., Ramazanzadeh, R., Ghadimi-Daresajini, A., et al. (2017). Epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in Iran: a systematic review and meta-analysis. *J. Chemother.* 9478, 1–11. doi:10.1080/1120009X.2017.1338377.
- Brzóška, K., Męczyńska, S., and Kruszewski, M. (2006). Iron-sulfur cluster proteins: Electron transfer and beyond. *Acta Biochim. Pol.* 53, 685–691.
- Cirino, I. C. S., Menezes-Silva, S. M. P., Silva, H. T. D., De Souza, E. L., and Siqueira-Júnior, J. P. (2015). The Essential Oil from *Origanum vulgare* L. and Its Individual Constituents Carvacrol and Thymol Enhance the Effect of Tetracycline against *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy* 60, 290–293. doi:10.1159/000381175.
- Claydon, M. A., Davey, S. N., Edwards-Jones, V., and Gordon, D. B. (1996). The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 14, 1584–6. doi:10.1038/nbt1196-1584.
- Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI] (2005). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement M100-S15*. Wayne, PA: CLSI.
- Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI] (2017). *M100 Performance Standards for Antimicrobial Sceptibility Testing*. 27th ed. Wayne, PA 119087

- 460 USA.
- 461 De Souza, L. I. O., Bezzerá-Silva, P. C., Navarro, D. M. do A. F., Da Silva, A. G.,
 462 Correia, M. T. dos S., da Silva, M. V., et al. (2017). The chemical composition
 463 and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants.
 464 *Biomed. Pharmacother.* 96, 1055–1064. doi:10.1016/j.biopha.2017.11.121.
- 465 Engel, J. B., Heckler, C., Tondo, E. C., Daroit, D. J., and da Silva Malheiros, P.
 466 (2017). Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and
 467 carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless
 468 steel. *Int. J. Food Microbiol.* 252, 18–23.
 469 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.003.
- 470 Fux, C. A., Shirtliff, M., Stoodley, P., and Costerton, J. W. (2005). Can laboratory
 471 reference strains mirror “real-world” pathogenesis? *Trends Microbiol.* 13, 58–
 472 63. doi:10.1016/j.tim.2004.11.001.
- 473 Gabashvili, I. S., Gregory, S. T., Valle, M., Grassucci, R., Worbs, M., Wahl, M. C.,
 474 et al. (2001). The polypeptide tunnel system in the ribosome and its gating in
 475 erythromycin resistance mutants of L4 and L22. *Mol. Cell* 8, 181–188.
 476 doi:10.1016/S1097-2765(01)00293-3.
- 477 Gallegos, M. T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., and Ramos, J. L. (1997).
 478 Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61,
 479 393–410. Available at:
 480 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9409145>
 481 <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC232617>.
- 482 García-Salinas, S., Elizondo-Castillo, H., Arruebo, M., Mendoza, G., and Irusta, S.
 483 (2018). Evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of different
 484 components of natural origin present in essential oils. *Molecules* 23, 1–18.
 485 doi:10.3390/molecules23061399.
- 486 Groth, A. C., and Calos, M. P. (2004). Phage integrases: Biology and applications.
 487 *J. Mol. Biol.* 335, 667–678. doi:10.1016/j.jmb.2003.09.082.
- 488 Guimarães, A. C., Meireles, L. M., Lemos, M. F., Guimarães, M. C. C., Endringer,
 489 D. C., Fronza, M., et al. (2019). Antibacterial activity of terpenes and
 490 terpenoids present in essential oils. *Molecules* 24, 1–12.
 491 doi:10.3390/molecules24132471.
- 492 Harding, C. M., Hennon, S. W., and Feldman, M. F. (2017). Uncovering the
 493 mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat. Publ. Gr.*

- doi:10.1038/nrmicro.2017.148.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., and Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* 3, 1–24. doi:10.3389/fmicb.2012.00012.
- Jha, C., Ghosh, S., Gautam, V., Malhotra, P., and Ray, P. (2017). In vitro study of virulence potential of *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles. *Microb. Pathog.* 111, 218–224. doi:10.1016/j.micpath.2017.08.048.
- Kachur, K., and Suntres, Z. (2019). The antibacterial properties of phenolic isomers , carvacrol and thymol. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 0, 1–12. doi:10.1080/10408398.2019.1675585.
- Karumathil, D. P., Nair, M. S., Gaffney, J., Kollanoor-Johny, A., and Venkitanarayanan, K. (2018). Trans-Cinnamaldehyde and eugenol increase *Acinetobacter baumannii* sensitivity to beta-lactam antibiotics. *Front. Microbiol.* 9, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2018.01011.
- Lecompte, O., Ripp, R., Thierry, J. C., Moras, D., and Poch, O. (2002). Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: An example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic Acids Res.* 30, 5382–5390. doi:10.1093/nar/gkf693.
- Lee, C.-R., Lee, J. H., Park, M., Park, K. S., Bae, I. K., Kim, Y. B., et al. (2017). Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 1–35.
- Li, J., Yang, X., Chen, L., Duan, X., and Jiang, Z. (2017). In Vitro Activity of Various Antibiotics in Combination with Tigecycline Against *Acinetobacter baumannii*: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Microb. Drug Resist.* 23, 982–993. doi:10.1089/mdr.2016.0279.
- Loo, Y. Y., Rukayadi, Y., Nor-Khaizura, M. A. R., Kuan, C. H., Chieng, B. W., Nishibuchi, M., et al. (2018). In Vitro antimicrobial activity of green synthesized silver nanoparticles against selected Gram-negative foodborne pathogens. *Front. Microbiol.* 9, 1–7. doi:10.3389/fmicb.2018.01555.
- López, M., Blasco, L., Gato, E., Perez, A., Fernández-Garcia, L., Martínez-Martinez, L., et al. (2017). Response to bile salts in clinical strains of *Acinetobacter baumannii* lacking the adeABC efflux pump: Virulence associated with quorum sensing. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 1–13.

- doi:10.3389/fcimb.2017.00143.
- Matzov, D., Bashan, A., Yap, M. F., and Yonath, A. (2019). Stress response as implemented by hibernating ribosomes: a structural overview. *FEBS J.* 286, 3558–3565. doi:10.1111/febs.14968.
- Memar, M. Y., Raei, P., Alizadeh, N., Aghdam, M. A., and Kafil, H. S. (2017). Carvacrol and thymol: Strong antimicrobial agents against resistant isolates. *Rev. Med. Microbiol.* 28, 63–68. doi:10.1097/MRM.0000000000000100.
- Morris, F. C., Dexter, C., Kostoulas, X., and Uddin, M. I. (2019). The Mechanisms of Disease Caused by *Acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol.* 10. doi:10.3389/fmicb.2019.01601.
- Motyl, M., Dorso, K., Barrett, J., and Giacobbe, R. (2005). Basic Microbiological Techniques Used in Antibacterial Drug Discovery. *Curr. Protoc. Pharmacol. Anti-Infectives* 31, 1–22. doi:10.1002/0471141755.ph13a03s31.
- Nakanishi-Matsui, M., Sekiya, M., and Futai, M. (2016). ATP synthase from *Escherichia coli*: Mechanism of rotational catalysis, and inhibition with the ϵ subunit and phytopolyphenols. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1857, 129–140. doi:10.1016/j.bbabi.2015.11.005.
- Qin, H., Lo, N. W. S., Loo, J. F. C., Lin, X., Yim, A. K. Y., Tsui, S. K. W., et al. (2018). Comparative transcriptomics of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in response to antibiotic treatments. *Sci. Rep.* 8, 1–11. doi:10.1038/s41598-018-21841-9.
- Raei, P., Poulak, T., Memar, M. Y., Alizadeh, N., Aghamali, M., Zeinalzadeh, E., et al. (2017). Thymol and carvacrol strongly inhibit biofilm formation and growth of carbapenemase-producing Gram negative bacilli. *Cell. Mol. Biol.* 63, 108–112. doi:10.14715/cmb/2017.63.5.20.
- Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., and Rao, R. (2010). Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 5062–5069. doi:10.1128/AAC.01050-10.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140. doi:10.1093/bioinformatics/btp616.
- Silva, V. B., Travassos, D. L., Nepel, A., Barison, A., Costa, E. V., Scotti, L., et al.

- 562 (2017). Synthesis and chemometrics of thymol and carvacrol derivatives as
563 larvicides against *Aedes aegypti*. *J. Arthropod. Borne. Dis.* 11, 305–320.
- 564 WHO (2017). Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria To Guide
565 Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. Available at:
566 [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1)
567 [Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1).
- 568 Zimble, D. L., Park, T. M., Arivett, B. A., Penwell, W. F., Greer, S. M., Woodruff, T.
569 M., et al. (2012). Stress response and virulence functions of the *Acinetobacter*
570 *baumannii* NfuA Fe-S scaffold protein. *J. Bacteriol.* 194, 2884–2893.
571 doi:10.1128/JB.00213-12.

4 DISCUSSÃO GERAL

Há uma enorme variedade de óleos essenciais que podem ser obtidos de diferentes plantas e, tem sido demonstrado que a maioria deles exercem atividade antimicrobiana bem caracterizada contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de outros microrganismos, como leveduras e tripanossomatídeos (Bassolé and Juliani 2012a; De Souza et al. 2017; Valdivieso-Ugarte et al. 2019). Neste trabalho, avaliamos o potencial antimicrobiano dos óleos fixos de *Attalea speciosa* (OFAS); *Acrocomia intumescens* (OFAl); *Acrocomia aculeata* (OFAA); *Caryocar coriaceum* (OFCC) e os óleos essenciais de *Syagrus coronata* (OESC); *Eugenia brejoensis* (OEEB); *Lippia alba* (OELA) e *Lippia macrophylla* (OELM). Seguindo a classificação adotada por Espinoza (Espinoza et al. 2019) para valores de MIC (MIC<500µg/mL inibidores fortes, MIC entre 600 e 1.500µg/mL inibidores moderados e MIC> 1.600µg/mL inibidores fracos), podemos dizer que apenas os óleos essenciais das espécies do gênero *Lippia* apresentaram forte inibição da atividade bacteriana, com MICs entre 64 e 128µg/mL (Tabela 1 – apêndice). Os resultados obtidos confirmam a atividade antimicrobiana característica do gênero *Lippia* (Pascual et al. 2001; de Souza et al. 2017; Porfírio et al. 2017)

As propriedades antimicrobianas observadas nos óleos essenciais têm sido atribuídas aos seus constituintes, que, normalmente, agem de forma sinérgica ou aditiva para exercer seus efeitos. Alguns mecanismos de ação descritos incluem a ruptura da parede celular e da membrana, levando ao vazamento do conteúdo intracelular e lise da bactéria; inibição de bombas de efluxo; distúrbios no equilíbrio do ATP que alteram as atividades celulares mediadas por energia; alteração na síntese proteica; inibição da formação de biofilme e distúrbios no pH (Kachur e Suntres 2019; Valdivieso-Ugarte et al. 2019).

As análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS) realizadas no OELM e OELA (Tabelas 2 e 3 -apêndice) revelaram que a composição química de ambos é quase que em sua totalidade representada por monoterpenos, sendo carvacrol e seu isômero timol os compostos em maior proporção. O timol e carvacrol caracterizam-se pela presença de uma hidroxila reativa capaz de formar ligações de hidrogênio com sítios ativos de enzimas alvo, ocasionando sua inativação e levando a uma disfunção ou ruptura da membrana

celular (Guimarães et al. 2019).

Com base na boa atividade apresentada pelos óleos do gênero *Lippia* frente aos isolados de *A. baumannii*, foi realizada a interação destes com antibióticos de uso clínico para os quais os isolados apresentavam resistência. Tanto a interação do OELM (dados presente no capítulo I) quanto a interação do OELA (tabelas 3 e 4 – apêndice) produziram efeitos aditivos e sinérgicos. Embora a literatura descreva com mais interesse as interações do tipo sinérgica, os efeitos aditivos observados não devem ser ignorados visto que a aditividade também pode diminuir a dose mínima eficaz de qualquer agente antimicrobiano (Yang et al. 2017)

Os efeitos biológicos observados no óleos essenciais são comumente creditados aos componentes majoritários e alguns estudos mostram que vários desses compostos exibem propriedades antimicrobianas significativas quando testados isoladamente (Bassolé e Juliani 2012). Desta forma, avaliamos o efeitos do carvacrol e seu isômero timol contra isolados clínicos de *A. baumannii* multirresistentes. Os resultados obtidos para os compostos demonstraram que ambos foram capazes de inibir o crescimento bacteriano de forma semelhante com valores de MICs entre 32-64µg/mL e 32-128µg/mL para timol e carvacrol, respectivamente. Em comparação com os dados obtidos da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Lippia macrophylla* e *Lippia alba*, podemos dizer não houve diferença nas concentração necessárias para inibir o crescimento bacteriano.

O efeito da interação entre timol e carvacrol também foi avaliado nos isolados de *A. baumannii* sendo observada uma redução no valor da MIC tanto de timol quanto de carvacrol. Quando comparamos os valores das concentrações inibitórias dos antibióticos com os obtidos da interação entre os compostos podemos dizer que tanto timol quanto carvacrol tiveram um efeito antimicrobiano mais eficaz frente aos isolados. Os resultados obtidos tem uma significativa relevância considerando que timol e carvacrol são geralmente considerados seguros para consumo humano, sendo ambos aprovados pela *Federal Drug Administration* (FDA) para uso em alimentos, bem como aditivos alimentares (Kachur e Suntres 2019), o que torna ainda mais promissora a utilização destes compostos como agentes antimicrobianos.

Considerando os possíveis efeitos já descritos dos óleos essências e do

timol e carvacrol nas células bacterianas (Bassolé e Juliani 2012; Memar et al. 2017; Kachur e Suntres 2019), avaliamos por meio da microscopia eletrônica de transmissão os efeitos do OELM e do antibiótico ceftazidima isoladamente e em combinação no isolado Acb35, bem como realizamos uma análise comparativa do transcriptoma deste mesmo isolado quando tratado com timol e carvacrol isoladamente e com a combinação dos dois compostos. (FIGURAS 1, 2 e 3 – Apêndice)

Os dados obtidos da análise da microscopia das células tratadas com OELM e CAZ isoladamente revelaram a presença de descamação na superfície da célula e perda de fímbrias – uma importante estrutura relacionada a adesão da bactéria nas superfícies bióticas e abióticas e na comunicação celular (Eijkelkamp et al. 2014). Estes dados foram confirmados com os resultados obtidos na análise dos transcriptomas os quais apresentaram uma regulação negativa de genes que codificam proteínas precursoras de fímbrias e genes que codificam precursores da proteína de membrana externa A (OmpA). Os resultados similares obtidos nos ensaios com o OELM e seus componentes majoritários timol e carvacrol podem ser explicados devido a alta concentração dos terpenóides na composição do óleo, o que sugere que timol e carvacrol sejam os responsáveis pela atividade observada no OELM.

Com relação ao timol e ao carvacrol, a literatura descreva que seus feitos estão, principalmente, relacionados a alterações na estrutura da membrana da célula bacteriana (Memar et al. 2017; Raei et al. 2017; Kachur e Suntres 2019), informações estas confirmadas em nosso estudo pela análise comparativa do transcriptoma da bactéria após o tratamento com os compostos isoladamente e em combinação, visto que houve majoritariamente uma regulação negativa dos genes que codificam proteínas envolvidas na formação e ligação dos ribossomos. Desta forma, há um comprometimento no processo de síntese proteica na bactéria o que, conseqüentemente irá ocasionar alterações na sua estrutura.

Interessante observar também que carvacrol e a combinação de timol e carvacrol induziram uma regulação positiva de genes relacionado a resposta a substâncias tóxicas, algo ainda não relatado na literatura e que se torna um interessante alvo nas terapias antimicrobianas. Outros genes regulados positivamente envolvem os relacionados ao metabolismo de açúcares e virulência, sugerindo que sob pressão das drogas, vários mecanismos de defesa

são ativados ao mesmo tempo, o que pode explicar os efeitos sinérgicos e aditivos encontrados para a combinação destes compostos.

Em conjunto, a baixa citotoxicidade do óleo essencial de *Lippia macrophylla* e seus compostos majoritários, aliada a sua forte atividade antimicrobiana, tanto de maneira isolada quanto em combinação, apontam para o uso dos óleos essenciais bem como seus compostos majoritários como promissores no tratamento de infecções causadas por cepas resistentes de *A. baumannii*.

5 CONCLUSÕES

- a) Os óleos essenciais do gênero *Lippia* e seus componentes majoritários atuam como fortes inibidores do crescimento bacteriano em concentrações mais baixas que antimicrobianos de uso clínico;
- b) Os óleos essenciais de *Lippia alba* e *Lippia macrophylla* potencializam a atividade antimicrobiana de antibióticos convencionais com potencial reversão da resistência nos isolados clínicos de *A. baumannii*;
- c) O Óleo Essencial de *Lippia macrophylla* isoladamente ou em combinação com ceftazidima provocam danos nas estruturas interna e externa da célula bacteriana;
- d) O timol e carvacrol provocam alterações no transcriptoma bacteriano de maneira significativa com indução de resposta ao estresse e danos na síntese proteica;
- e) Considerando a baixa toxicidade em células de mamíferos e a não indução de hemólise em eritrócitos, o Óleo Essencial de *Lippia macrophylla*, timol e carvacrol podem ser considerados uma opção terapêutica no tratamento das infecções por *A. baumannii*.

REFERÊNCIAS

- Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi AR and Abbaszadeh A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **J Mycol Med**, Iran, v. 24, p. e51-e56, 2014.
- Acharya, K.P.; Wilson, R.T. Antimicrobial Resistance in Nepal. **Frontiers in Medicine**, Nepal, v. 6, p.1–10, 2019.
- Ahmad, T.A.; Tawfik, D.M.; Sheweita, S.A.; Haroun, M.; El-Sayed, L.H. Development of immunization trials against *Acinetobacter baumannii*. **Trials Vaccinology**, Egito, v. 5, p. 53–60, 2016.
- Ahmed, R.M.; Hannigan, I.P.; MacDougall, H.G.; Chan, R.C.; Halmagyi, G. M. Gentamicin ototoxicity: A 23-year selected case series of 103 patients. **Med. J. Aust.**, Sydney, v. 196, p. 701–706, 2012.
- Almasaudi, S.B. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. **Saudi J Biol Sci**, Arábia Saudita, v. 25, p. 586–596, 2018.
- Alves, D.R.; Morais, S. M.; Tomiotto-Pellissier, F.; Miranda-Sapla, M.M.; Vasconcelos, F.R., Silva, I.N.G.; Sousa, H.,A.; Assolini, J.P.; Conchon-Costa, I.; Pavanelli, W.R. et al. Flavonoid Composition and Biological Activities of Ethanol Extracts of *Caryocar coriaceum* Wittm., a Native Plant from Caatinga Biome. **Evidence-based Complement Altern Med.**, Brasil, v. 2017, p. 1-7, 2017.
- Ambler, R.P. The structure of beta-lactamases. **Philos Trans R Soc L B Biol Sci**, Edimburgo, v. 289, p. 321–331, 1980.
- Aminov, R.I.; Otto, M.; Sommer, A. A brief history of the antibiotic era : lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**, Reino Unido, v.1, p. 1–7, 2010.
- Antunes, L.C.S.; Imperi, F.; Carattoli, A.; Visca, P. Deciphering the Multifactorial Nature of *Acinetobacter baumannii* Pathogenicity. **PloS One**, Itália, v. 6, p. 1-10, 2011.
- Antunes, L.C. S.; Visca, P.; Towner, K.J. *Acinetobacter baumannii*: Evolution of a global pathogen. **Pathog Dis**, Itália, v. 71, p. 292–301, 2014.
- Arena, A.C.; Jorge, B.C.; Silva, M.C.; de Barros, A.L.; Fernandes, A.A.H.; Nóbrega, R.H.; Martinez, E.R.M.; Cardoso, C.A.L.; Anselmo-Franci, J.A.; Muzzi, R.M. *Acrocomia aculeata* oil: Beneficial effects on cyclophosphamide-induced reproductive toxicity in male rats. **Andrologia**, Brasil, v.50, p. 1–11, 2018.
- Arruda, J.C.; Silva, C.J.; Sander, N.L. Conhecimento e Uso do Babaçu (*Attalea Speciosa* Mart.) por Quilombolas em Mato Grosso. **Fragm Cult**, Brasil, v. 24, p. 239–252, 2014.
- Asif, M.; Alvi, I.A.; Rehman, S.U. Insight into *Acinetobacter baumannii* : pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options,

and alternative modalities. **Infect Drug Resist.**, Paquistão, v. 11, p.1249–1260, 2018.

Atrouni, A. Al.; Hamze, M.; Kempf, M. Reservoirs of Non- *baumannii* *Acinetobacter* Species. **Frontiers in Microbiology**, Líbano, v. 7, p. 1–12, 2016.

Azevedo, P.R.; Silva, L.C.N.; Silva, A.G.; Macedo, A.J.; Araújo, J.M. Antimicrobial activity and phytochemical screening of branches, fruits and leaves of *Eugenia brejoensis*. **Sci. Plena**, Brasil, v. 8, p. 1-4, 2012.

Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food Chem Toxicol**, Marrocos, v. 46, p. 446–475, 2008.

Barreto, H.M.; Silva Filho, E.C.; Lima, E. O.; Coutinho, H.D.M.; Moraes-Braga, M.F.B.; Tavares, C.C.A.; Tintino, S.R.; Rego, J. V.; De Abreu, A.P.L.; Lustosa, M. C.G. et al. Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Ind Crops Prod**, Brasil, v. 59, p. 290–294, 2014.

Basak, S.; Singh, P.; Rajurkar, M. Multidrug Resistant and Extensively Drug Resistant Bacteria: A Study. **J Pathog**, Índia, v. 2016, p. 1–5, 2016.

Bassett, E.J.; Keith, M.S.; Armelagos, G.J.; Martin, D.L.; Villanueva, A. R. Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). **Science**, Massachusetts, v. 209, p.1532–4, 1980.

Bassetti, M.; Peghin, M.; Vena, A.; Giacobbe, D.R. Treatment of Infections Due to MDR Gram-Negative Bacteria. **Frontiers in Medicine**, Itália, v. 6, p. 1–10, 2019.

Bassolé, I.H.N.; Juliani, H.R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, Burquina, v. 17, p. 3989–4006, 2012.

Batirel, A.; Balkan, I.I.; Karabay, O.; Agalar, C.; Akalin, S.; Alici, O.; Alp, E.; Altay, F.A.; Altin, N.; Arslan, F. et al. Comparison Of Colistin-Carbapenem, Colistin-Sulbactam, And Colistin Plus Other Antibacterial Agents For The Treatment Of Extremely Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Bloodstream Infections. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, Turquia, v. 33, p.1311–1322, 2014.

Beceiro, A.; Tomás, M.; Bou, G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? **Clin Microbiol Rev**, Espanha, v. 26, p. 185–230, 2013.

Beckert, B.; Turk, M.; Czech, A.; Berninghausen, O.; Beckmann, R.; Ignatova, Z.; Plitzko, J.M.; Wilson, D.N. Structure Of A Hibernating 100S Ribosome Reveals An Inactive Conformation Of The Ribosomal Protein S1. **Nat Microbiol**, Alemanha, v. 3, p. 1115–1121, 2018.

Bergogne-Bérézin, E.; Towner, K.J. *Acinetobacter* spp . as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical and Epidemiological Features. **Clin Microbiol Rev**, Paris, v. 9, p. 148–165, 1996.

Bernal, P.; Molina-Santiago, C.; Daddaoua, A.; Llamas, M.A. Antibiotic adjuvants:

Identification and clinical use. **Microb Biotechnol**, Espanha, v. 6, p. 445–449, 2013.

Blair, J.M.A.; Webber, M.A.; Baylay, A.J.; Ogbolu, D.O.; Piddock, L.J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nat Publ Gr**, v. 13, p. 42–51, 2014.

Blanco, P.; Hernando-Amado, S.; Reales-Calderon, J.A.; Corona, F.; Lira, F.; Alcalde-Rico, M.; Bernardini, A.; Sanchez, M.B.; Martinez, J.L. Bacterial Multidrug Efflux Pumps : Much More Than Antibiotic Resistance Determinants, **Microorganisms**, Espanha, v. 4, p. 1–19, 2016.

Bonomo, R.A. β -Lactamases: A focus on current challenges. **Cold Spring Harb Perspect Med**, Ohio, v 7, p. 1–16, 2017.

Bora, P.S.; Rocha, R.V.M. Macaiba Palm: Fatty and Amino Acids Composition of Fruits. **Cienc y Tecnol Aliment**, Brasil, v. 4, p. 158–162, 2004.

Bush, K.; Bradford, P.A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.**, Indiana, v. 6, p. 1-22, 2016.

Cai, Y.; Chai, D.; Wang, R.; Liang, B.; Bai, N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: Clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. **J Antimicrob Chemother**, China, v. 67, p. 1607–1615, 2012.

Camp, C.; Tatum, O.L. A Review of *Acinetobacter baumannii* as a Highly Successful Pathogen in Times of War. **LabMedicine**, Texas, v. 41, p. 649–657, 2010.

Cavalcanti, F.L. de S.; Mendes- Marques, C.L; Vasconcelos, C.R. dos S.; Campos, T. L.; Rezende, A.M.; Xavier, D.E.; Leal, N.C.; De-Melo-Neto, O.P.; Morais, M.M.C.; Leal-Balbino, T.C. High Frequency of OXA-253-Producing *Acinetobacter baumannii* in Different Hospitals in Recife, Brazil. **Antimicrobail Agents Chemother**, Brasil, v. 61, p. 2010–2012, 2017.

Chávez-González, M.L.; Rodríguez-Herrera, R.; Aguilar, C.N. Essential Oils: A Natural Alternative to Combat Antibiotics Resistance. **Antibiot Resist Mech New Antimicrob Approaches**, México, v. 11 , p. 227–237, 2016.

Chen, Y-P.; Lu, P-L.; Kuo, C-M. An Increasing Trend Of Carbapenems Resistance *Acinetobacter baumannii* (CRAB) and CRAB's Co-Resistance To Ceftazidime, Gentamicin, Cefepime, Levofloxacin And Amikacin In A Taiwan Regional Hospital. **J Microbiol Immunol Infect**, Taiwan, v. 48, p. S126–S127, 2015.

Cherkaoui, A.; Emonet, S.; Renzi, G.; Schrenzel, J. Characteristics Of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated In Geneva During Colonization Or Infection. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.**, Suíça, v. 14 p. 1–7, 2015.

Chusri, S.; Villanueva, I.; Voravuthikunchai, S.P.; Davies, J. Enhancing Antibiotic Activity: A Strategy To Control *Acinetobacter* Infections. **J Antimicrob Chemother**, Tailândia, v. 64, p. 1203–1211, 2009.

Conceição, A.O. da; Oliveira, F.F. de; Oliveira, R.A. de; Junior, A. J.S.; Takser, L.;

Reyes-Moreno, C.; Lafond, J. *Lantana macrophylla* Schauer (Verbenaceae) Ethanolic Extract Induces Activation Of ERK1/2 and p38 MAPKs Pathway and Ca^{2+} Imbalance In Human Trophoblasts Derived Cell Lines. **Food Chem Toxicol**, Canadá, v. 50, p. 1001–1012, 2012.

Cook, M.; Molto, E.L.; Anderson, C. Fluorochrome Labelling in Roman Period Skeletons From Dakhleh Oasis, Egypt. **Am J Phys Anthropol**, Canadá, v. 143, p. 137–143, 1989.

Costa, M.F.; Durço, A.O.; Rabelo, T.K.; Barreto, R. de S.S.; Guimarães, A.G. Effects Of Carvacrol, Thymol And Essential Oils Containing Such Monoterpenes On Wound Healing: A Systematic Review. **J Pharm Pharmacol**, Brasil, v. 71, p. 141–155, 2019.

Coyne, S.; Courvalin, P.; Périchon, B. Efflux-Mediated Antibiotic Resistance In *Acinetobacter* spp. **Antimicrob Agents Chemother**, Paris, v. 55, p. 947–953, 2011.

Da Silva, A.G.; Alves, R.C.C.; Filho, C.M.B.; Bezerra-Silva, P.C.; Santos, L.M.M.; Foglio, M.A.; Navarro, D.M.A.F.; Silva, M.V. da; Correia, M.T. dos S. Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oil from Leaves of *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae). **J Essent Oil-Bearing Plants**, Brasil, v. 18, p. 1441–1447, 2015.

Da Silva, P.V.B.; Ramiro, M.M.; Iriguchi, E.K.K.; Corrêa, W.A.; Lowe, J.; Cardoso, C.A.L.; Arena, A.C.; Kassuya, C.A.L.; Muzzi, R.M. Antidiabetic, Cytotoxic And Antioxidant Activities Of Oil Extracted From *Acrocomia aculeata* Pulp. **Nat Prod Res**, Brasil, v.33, p. 2413–2416, 2019.

De Almeida, G.M.A.; Ramos, M.A.; Araújo, E.L.; Baldauf, C.; Albuquerque, U.P. Human Perceptions Of Landscape Change: The Case Of A Monodominant Forest Of *Attalea speciosa* Mart ex. Spreng (Northeast Brazil). **Ambio**, Brasil, v. 45, p.458–467, 2016.

De Souza, L.I.O.; Bezerra-Silva, P.C.; Navarro, D.M. do A.F.; Da Silva, A.G.; Correia, M.T. dos S.; da Silva, M.V.; De Figueiredo, R.C.B.Q. The Chemical Composition And Trypanocidal Activity Of Volatile Oils From Brazilian Caatinga Plants. **Biomed Pharmacother**, Brasil, v. 96, p. 1055–1064, 2017.

De Souza, R.C.; da Costa, M.M.; Baldisserotto, B.; Heinzmann, B.M.; Schmidt, D.; Caron, B.O.; Copatti, C.E. Antimicrobial And Synergistic Activity Of Essential Oils Of *Aloysia triphylla* And *Lippia alba* Against *Aeromonas* Spp. **Microb Pathog**, Brasilv. 113 p. 29–33, 2017.

Dexter, C.; Murray, G.L.; Paulsen, I.T.; Peleg, A.Y. Community-Acquired *Acinetobacter baumannii*: Clinical Characteristics, Epidemiology And Pathogenesis. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, Austrália, v. 13 p. 567–573, 2015.

Doi, Y.; Murray, G.L.; Peleg, A.Y. *Acinetobacter baumannii*: Evolution of Antimicrobial Resistance —Treatment Options. **Semin Respir Crit Care Med.**, Pensilvânia, v. 36, p. 85–98, 2015.

- Du, D.; Kan, X.W.; Neuberger, A. Multidrug Efflux Pumps: Structure, Function And Regulation. **Nat Rev Microbiol**, Reino Unido, v. 16, p. 523-539, 2018.
- Durante-Mangoni, E.; Grammatikos, A.; Utili, R.; Falagas, M.E. Do We Still Need The Aminoglycosides?. **Int J Antimicrob Agents**, Itália, v. 33, p. 201–205, 2009.
- Eichenberger, E.M.; Thaden, J.T. Epidemiology And Mechanisms Of Resistance Of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. **Antibiotics (Basel)**, Estados Unidos, v. 8, p. 1- 22 2019.
- Eijkelkamp, B.A.; Stroehrer, U.H.; Hassan, K.A.; Paulsen, I.T.; Brown, M.H. Comparative Analysis Of Surface-Exposed Virulence Factors Of *Acinetobacter baumannii*. **BMC Genomics**, Austrália, v. 15, p. 1–12, 2014.
- Escobar, P.; Leal, S.M.; Herrera, L.V.; Martinez, J.R.; Stashenko, E. Chemical Composition And Antiprotozoal Activities Of Colombian *Lippia* Spp Essential Oils And Their Major Components. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Colômbia, v. 105, p. 184–190, 2010.
- Espinoza, J.; Urzúa, A.; Sanhueza, L.; Walter, M. (2019) Essential Oil , Extracts , And Sesquiterpenes Obtained From The Heartwood Of *Pilgerodendron uviferum* Act as Potential Inhibitors of the *Staphylococcus aureus* NorA Multidrug Efflux Pump. **Frontiers in Microbiology**, Chile, v. 10, p. 1–15, 2019.
- Esterly, J.S.; Richardson, C.L.; Eltoukhy, N.S.; Qi, C.; Scheetz, M.H. Genetic Mechanisms Of Antimicrobial Resistance Of *Acinetobacter baumannii*. **Ann Pharmacother**, Chicago, v. 45, p. 218–228, 2011.
- Evans, B.A.; Amyes, S.G.B. OXA β -lactamases. **Clin Microbiol Rev**, Reino Unido, v. 27, p. 241–263, 2014.
- Eze, E.C.; Chenia, H.Y.; El Zowalaty, M.E. *Acinetobacter baumannii* Biofilms: Effects Of Physicochemical Factors, Virulence, Antibiotic Resistance Determinants, Gene Regulation, And Future Antimicrobial Treatments. **Infect Drug Resist.**, África do Sul, v. 11, p. 2277–2299, 2018.
- Faleiro, M.L. The mode of antibacterial action of essential oils. **Sci against Microb Pathog Commun Curr Res Technol Adv**, Portugal, v. 3, p.1143–1156, 2011.
- Faleiro, M.L.; Miguel, M.G. Use of Essential Oils and Their Components against Multidrug-Resistant Bacteria. **Fight Multidrug Resist with Herb Extr Essent Oils their Components**, Portugal, v. 1, p. 64-95, 2013.
- Fernández, L.; Hancock, R.E.W. Adaptive and Mutational Resistance : Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. **Clin Microbiol Rev.** ,Canadá, v. 25, p. 661–681, 2012.
- Fishbain, J.; Peleg, A.Y. Treatment of *Acinetobacter* Infections. **Rev Anti-Infective Agents**, Michigan, v. 51, p. 79–84, 2010.
- Gabashvili, I.S.; Gregory, S.T.; Valle, M.; Grassucci, R.; Worbs, M.; Wahl, M.C.; Dahlberg, A.E.; Frank. J. The Polypeptide Tunnel System In The Ribosome And

Its Gating In Erythromycin Resistance Mutants Of L4 And L22. **Mol Cell**, Estados Unidos, v. 8, p. 181–188, 2001.

Gallegos, M.T.; Schleif, R.; Bairoch, A.; Hofmann, K.; Ramos, J.L. Arac/XylS Family Of Transcriptional Regulators. **Microbiol Mol Biol Rev**, Espanha, v. 61, p. 393–410, 1997.

García-Salinas, S.; Elizondo-Castillo, H.; Arruebo, M.; Mendoza, G.; Irusta, S. Evaluation Of The Antimicrobial Activity And Cytotoxicity Of Different Components Of Natural Origin Present In Essential Oils. **Molecules**, Espanha, v. 23, p. 1–18, 2018.

Gariglio, M.A.; Sampaio, E.V.S.B.; Cestaro, L.A.; Kageyama, P.Y. Uso sustentável e Conservação dos Recursos Florestais da Caatinga. **Ministério do Meio Ambiente**, v. 1 p. 1-369, 2010.

Garnacho-Montero, J.; Amaya-Villar, R.; Ferrándiz-Millón, C.; Díaz-Martín, A.; López-Sánchez, J.M.; Gutiérrez-Pizarra, A. Optimum Treatment Strategies For Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Bacteremia. **Expert Rev Anti Infect Ther**, Espanha, v.13, p. 769–777, 2015.

Giaretta, A.; Peixoto, A.L. New Records Of *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae) And Complementary Description. **Check List**, Brasil v.10, p. 1176–1178, 2014.

Gomes, A.F.; Almeida, M.P.; Leite, M.F.; Schwaiger, S.; Stuppner, H.; Halabalaki, M.; Amaral, J.G.; David, J.M. Seasonal Variation In The Chemical Composition Of Two Chemotypes Of *Lippia alba*. **Food Chem**, Brasil, v. 273, p. 186–193, 2019.

González-Bello, C. Antibiotic Adjuvants - A Strategy to Unlock Bacterial Resistance to Antibiotics. **Bioorg Med Chem Lett.**, Espanha, v. 27, p. 4221-4228, 2017.

González-Pérez, S.E.; Coelho-Ferreira, M.; de Robert, P.; López Garcés, C.L. Conhecimento e Usos do Babaçu (*Attalea speciosa* Mart. e *Attalea eichleri* (Drude) A. J. Hend.) Entre os Mebêngôkre-Kayapó da Terra Indígena Las Casas, Estado do Pará, Brasil. **Acta Bot Brasilica**, Brasil, v. 26, p. 295–308, 2012.

Gonzalez-Villoria, A.M.; Valverde-Garduno, V. Antibiotic-Resistant *Acinetobacter baumannii* Increasing Success Remains a Challenge as a Nosocomial Pathogen. **J Pathog.**, México, v. 2016, p. 1-10, 2016.

Gordon, N.C.; Png, K; Wareham, D.W. Potent Synergy And Sustained Bactericidal Activity Of A Vancomycin-Colistin Combination Versus Multidrug-Resistant Strains Of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, Reino Unido, v. 54, p. 5316–5322, 2010.

Gould, K. Antibiotics : from prehistory to the present day. **J. Antimicrob Chemother.**, Reino Unido, v. , p. 572–575, 2016.

Groth, A.C.; Calos, M.P. Phage integrases: Biology and applications. **J Mol Biol**, Stanford, v. 335, p. 667–678, 2004.

Guimarães, A.C.; Meireles, L.M.; Lemos, M.F.; Guimarães, M.C.C.; Endringer, D.C.; Fronza, M.; Scherer, R. Antibacterial Activity Of Terpenes And Terpenoids Present In Essential Oils. **Molecules**, Brasil, v. 24, p. 1–12, 2019.

Haghi-Aminjan, H.; Asghari, M.H.; Goharbari, M.H.; Abdollahi, M. A systematic review on potential mechanisms of minocycline in kidney diseases. **Pharmacol Reports**, Irã, v. 69, p. 602–609, 2017.

Harding, C.M.; Hennon, S.W.; Feldman, M.F. Uncovering The Mechanisms Of *Acinetobacter baumannii* Virulence. **Nat Rev Microbiol.**, Estados Unidos, v. 16, p. 91-102, 2018.

Harrison, C.J.; Bratcher, D. Cephalosporins : A Review. **Pediatrics Rev**, Estados Unidos, v. 29, p. 264–273, 2019.

Hiransuthikul, N.; Tantisiriwat, W.; Lertutsahakul, K.; Vibhagool, A.; Boonma, P. Skin and Soft-Tissue Infections among Tsunami Survivors in Southern Thailand. **Clin Infect Dis**, Tailândia, v. 41, p. e93–e96, 2005.

Howard, A.; O'Donoghue, M.; Feeney, A.; Sleator, R.D. *Acinetobacter baumannii*: An Emerging Opportunistic Pathogen. **Virulence**, Irlanda v. 3, p. 243–250, 2012.

Huang, X.Z.; Chahine, M.A.; Frye, J.G.; Cash, D.M.; Lesho, E.P.; Craft, D.W.; Lindler, L.E.; Nikolich, M.P. Molecular Analysis Of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated From Us Service Members Wounded In Iraq, 2003-2008. **Epidemiol Infect**, Estados Unidos, v. 140, p. 2302–2307, 2012.

Hughes, A.F. da S.; De Lima, F.G.; Lucchese, A.M.; Neto, A.G.; Uetanabaro, A.P.T. Antimicrobial Activity Of *Syagrus coronata* (Martius) Beccari. **Brazilian Arch Biol Technol**, Brasil, v. 56, p. 269–274, 2013.

Hyldgaard, M.; Mygind, T.; Meyer, R.L. Essential Oils In Food Preservation: Mode Of Action, Synergies, and Interactions With Food Matrix Components. **Front Microbiol**, Dinamarca, v. 3, p. 1–24, 2012.

Iyer, R.; Moussa, S.H.; Durand-Réville, T.F.; Tommasi, R.; Miller, A. *Acinetobacter baumannii* OmpA Is a Selective Antibiotic Permeant Porin. **ACS Infect Dis**, Estados Unidos, v. 4, p. 373–381, 2018.

Jamal, S.; Atrouni, A. A.I.; Rafei, R.; Dabboussi, F.; Hamze, M.; Osman, M. Molecular Mechanisms Of Antimicrobial Resistance In *Acinetobacter baumannii* , With A Special Focus On Its Epidemiology In Lebanon. **J Glob Antimicrob Resist**, Líbano, v. 15, p. 154–163, 2018.

Jeon, J.H.; Lee, J.H.; Lee, J.J.; Park, K.S.; Karim, A.M. Structural Basis for Carbapenem-Hydrolyzing Mechanisms of Carbapenemases Conferring Antibiotic Resistance. **Int J Mol Sci**, Coréia, v. 16, p. 9654–9692, 2015.

Kachur , K.; Suntres, Z. The Antibacterial Properties of Phenolic Isomers, Carvacrol and Thymol. **Crit Rev Food Sci Nutr**, Canadá, v. 1, p. 1–12, 2019.

Karakonstantis, S.; Kritsotakis, E.I.; Gikas, A. Pandrug-resistant Gram-negative

Bacteria: A Systematic Review Of Current Epidemiology, Prognosis And Treatment Options. **J Antimicrob Chemother**, Grécia, v. 75, p. 1–12, 2019.

Kareem, S.M.; Al-Kadmy, I.M.S.; Al-Kaabi, M.H.; Aziz, S.N.; Ahmad, M. *Acinetobacter baumannii* Virulence Is Enhanced By The Combined Presence Of Virulence Factors Genes Phospholipase C (Plcn) And Elastase (Lasb). **Microb Pathog**, Iraque, v. 110, p. 568–572, 2017.

Kong, K-F.; Schneper, L.; Mathee, K. Beta-lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. **Apmis**, Estados Unidos, v. 118, p. 1–47, 2010.

Koning, R.I.; de Breij, A.; Oostergetel, G.T.; Nibbering, P.H.; Koster, A.J.; Dijkshoorn, L. Cryo-electron Tomography Analysis Of Membrane Vesicles From *Acinetobacter baumannii* ATCC19606T. **Res Microbiol**, Holanda, v. 164, p. 397–405, 2013.

Krause, K.M.; Serio, A.W.; Kane, T.R.; Connolly, L.E. Aminoglycosides: An Overview. **Cold Spring Harb Perspect Med**, Califórniav. 6, p.1–18, 2016.

Kwon, H.I.I.; Kim, S.; Oh, M.H.; Na, S.H.; Kim, Y.J.; Jeon, Y.H.; Lee, J.C. Outer Membrane Protein A Contributes To Antimicrobial Resistance Of *Acinetobacter baumannii* Through The OmpA-like Domain. **J Antimicrob Chemother**, Coréia, v. 72, p. 3012–3015, 2017.

Langeveld, W.T.; Veldhuizen, E.J.A.; Burt, S.A. Synergy Between Essential Oil Components And Antibiotics: A Review. **Crit Rev Microbiol**, Holanda, v. 40, p. 1–19, 2013.

Lecompte, O.; Ripp, R.; Thierry, J.C.; Moras, D.; Poch, O. Comparative Analysis Of Ribosomal Proteins In Complete Genomes: An Example Of Reductive Evolution At The Domain Scale. **Nucleic Acids Res**, França, v. 30, p. 5382–5390, 2002.

Lee, C-R.; Lee, J.H.; Park, M.; Park, K.S.; Bae, I.K.; Kim, Y.B.; Cha, C-J.; Jeong, B.C.; Lee, S.H. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. **Front Cell Infect Microbiol**, Coréia do Sul, v. 7, p. 1–35, 2017.

Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ Prokarya Collection Catalogue. Occurrence dataset <https://doi.org/10.15468/wnk737> accessed via GBIF.org on 2019-10-03. <https://www.gbif.org/occurrence/345679017>, 2015.

Leite, G.C.; Oliveira, M.S.; Perdigão-Neto, L.V.; Rocha, C.K.D.; Guimarães, T.; Rizek, C.; Levin, A.S.; Costa, S.F. Antimicrobial Combinations Against Pan-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates With Different Resistance Mechanisms. **PLoS One**, Brasil, v. 11, p. 1–16, 2016.

Lin, M-F.; Lan, C-Y. Antimicrobial Resistance In *Acinetobacter baumannii* : From Bench To Bedside. **World J Clin Cases**, Taiwan, v. 2, p. 787–814, 2014.

Liu, X.; Yin, H.; Weng, C.X.; Cai, Y. Low-Frequency Ultrasound Enhances

Antimicrobial Activity of Colistin-Vancomycin Combination Against Pan-Resistant Biofilm of *Acinetobacter baumannii*. **Ultrasound Med Biol**, China, v. 42, p. 1968–1975, 2016.

Liu, Y.; Li, R.; Xiao, X.; Wang, Z. Antibiotic Adjuvants: An Alternative Approach To Overcome Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. **Crit Rev Microbiol**, China, v. 45, p. 301–314, 2019.

Longo, F.; Vuotto, C.; Donelli, G. Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii*. **New Microbiol**, Roma, v. 37, p. 119–27, 2014.

López, M.; Blasco, L.; Gato, E.; Perez, A.; Fernández-Garcia, L.; Martínez-Martínez, L.; Fernández-Cuenca, F.; Rodríguez-Baño, J.; Pascual, A.; Bou, G. et al. Response To Bile Salts In Clinical Strains Of *Acinetobacter Baumannii* Lacking the adeABC Efflux Pump: Virulence Associated With Quorum Sensing. **Front Cell Infect Microbiol**, Espanha, v. 7, p. 1–13, 2017.

Lorenzi, H.; Souza, H. M.; Medeiros-Costa, J. T.; Cerqueira, I. S. C.; Ferreira, E. Palmeiras Brasileiras e Exóticas Cultivadas.. **Nova Odessa**, Brasil, v. 1 p. 1-416, 2004.

Lorenzi, H.; Noblick, L.; Khan, F.; Ferreira, E. Flora brasileira Lorenzi: Arecaceae (palmeiras). Instituto Plantarum de Estudos da Flora. **Nova Odessa**, Brasil, v. 1, 1-368, 2010.

Lupo, A.; Haenni, M.; Madec, J. Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. **Microbiol Spectr**, França, v. 6, p. 1–16, 2018.

Lynch, J.P.; Zhanel, G.G.; Clark, N.M. Infections Due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU: Treatment Options. **Semin Respir Crit Care Med**, Califórnia, v. 38, p.311–325, 2017.

Machado, T.F.; Nogueira, N.A.P.; Pereira, R. de C.A.; de Sousa, C.T.; Batista, V.C.V. The Antimicrobial Efficacy Of *Lippia alba* Essential Oil And Its Interaction With Food Ingredients. **Brazilian J Microbiol**, Brasil, v. 45, p. 699–705, 2014.

Magosso, M.F.; Carvalho, P.C.; Shneider, B.U.C.; Pessatto, L.R.; Pesarini, J.R.; Silva, P.V.B.; Correa, W.A.; Kassuya, C.A.L.; Muzzi, R.M.; Oliveira, R.J. *Acrocomia aculeata* Prevents Toxicogenetic Damage Caused By The Antitumor Agent Cyclophosphamide. **Genet Mol Res**, Brasil, v. 15, p. 1-14, 2016.

Maragakis, L.L.; Perl, T.M. Antimicrobial Resistance: *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options. **Clin Infect Dis**, Estados Unidos, v. 46, p. 1254–1263, 2008.

Marín, M.; Gudiol, F. Antibióticos betalactámicos. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, Espanha, v. 21, p. 42–55, 2003.

Marmulla, R.; Harder, J. Microbial Monoterpene Transformations - A Review. **Front Microbiol**, v. 5, p. 1-14, 2014.

Matzov, D.; Bashan, A.; Yap, M.F.; Yonath, A. Stress Response As Implemented

By Hibernating Ribosomes: A Structural Overview. **FEBS J**, Israel, v. 286, p. 3558–3565, 2019.

Mazine, F.F.; Souza, V.C. A new species of *Psidium* L. (Myrtaceae) from southern Brazil. **Bot J Linn Soc**, Brasil, v. 158 p. 51–54, 2008.

McConnell, M.J.; Actis, L.; Pachón, J. *Acinetobacter baumannii*: Human Infections, Factors Contributing To Pathogenesis And Animal Models. **FEMS Microbiol Rev**, Espanha, v. 37, p. 130–155, 2013.

Memar MY, Raei P, Alizadeh N, Aghdam MA and Kafil HS (2017) Carvacrol and thymol: Strong antimicrobial agents against resistant isolates. *Rev Med Microbiol* 28:63–68.

Moffatt, J.H.; Harper, M.; Harrison, P.; Hale, J.D.F.; Vinogradov, E.; Seemann, T.; Henry, R.; Crane, B.; St. Michael, F.; Cox, A.D. et al. Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii* is Mediated by Complete Loss of Lipopolysaccharide Production. **Antimicrob Agents Chemother**, Austrália, v. 54, p. 4971–4977, 2010.

Mohamed, A.F.; Karaiskos, I.; Plachouras, D.; Karvanen, M.; Pontikis, K.; Jansson, B.; Papadomichelakis, E.; Antoniadou, A.; Giamarellou, H.; Armaganidis, A. et al. Application Of A Loading Dose Of Colistin Methanesulfonate In Critically Ill Patients: Population Pharmacokinetics, Protein Binding, And Prediction Of Bacterial Kill. **Antimicrob Agents Chemother**, Suécia, v. 56, p. 4241–4249, 2012.

Mohr, K.I. History of Antibiotics Research. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Alemanha, v. 1, p. 1-20, 2016.

Morris, F.C.; Dexter, C.; Kostoulas, X.; Uddin, M.I. The Mechanisms of Disease Caused by *Acinetobacter baumannii*. **Front Microbiol**, Austrália, v. 10, p. 1-20, 2019.

Moura, P.A.; Filho, C.M.B.; Silva, L.C.N.; Silva, M. V.; Correia, M.T.S. Caatinga Plants As Weapons Against Microorganisms : Advances And Challenges. **The Battle Against Microbial Pathogens**, Brasil, v. 1, p. 117–124, 2015.

Munita, J.M.; Arias, C.A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiol Spectr**, Chile, v. 4, p. 1–24, 2016.

Mutschler, H.; Gebhardt, M.; Shoeman, R.L.; Meinhart, A. A Novel Mechanism Of Programmed Cell Death In Bacteria By Toxin-Antitoxin Systems Corrupts Peptidoglycan Synthesis. **PLoS Biol**, Alemanha, v. 6, p. 1-12, 2011.

Nakanishi-Matsui, M.; Sekiya, M.; Futai, M. ATP Synthase From *Escherichia coli*: Mechanism Of Rotational Catalysis, And Inhibition With The E Subunit And Phytopolyphenols. **Biochim Biophys Acta - Bioenerg**, Japão, v. 1857, p. 129–140, 2016.

Nascimento Da Silva, L.C.; Messias Sandes, J.; De Paiva, M.M.; De Araújo, J.M.; De Figueiredo, R.C.B.Q.; Da Silva, M.V.; Correia, M.T.D.S.. Anti-*Staphylococcus aureus* Action Of Three Caatinga Fruits Evaluated By Electron Microscopy. **Nat**

Prod Res, Brasil, v. 27, p. 1492–1496, 2013.

Nelson, M.L.; Dinardo, A.; Hochberg, J.; Armelagos, G.J. Brief Communication: Mass Spectroscopic Characterization Of Tetracycline In The Skeletal Remains Of An Ancient Population From Sudanese Nubia 350-550 CE. **Am J Phys Anthropol**, Boston, v. 143, p. 151–4, 2010.

Nowak, P.; Paluchowska, P. (2016) *Acinetobacter baumannii*: Biology And Drug Resistance — Role Of Carbapenemases. **Folia Histochem Cytobiol**, Polônia, v. 54, p. 61–74, 2016.

O'Neill, J. Antimicrobial Resistance : Tackling A Crisis For The Health And Wealth Of Nations. **Review on Antimicrobial Resistance**, USA, v. 1, p. 1-20, 2014.

O'Neill, J. (2016) Tackling Drug-Resistant Infections Globally : Final Report And Recommendations The Review On Antibiotic Resistance. **Rev. Antimicrob. Resist**, USA, v. 1, p. 1-84, 2016.

Oliveira, C.C.; Oliveira, C.V.; Grigoletto, J.; Ribeiro, L.R.; Funck, V.R.; Meier, L.; Figuera, M.R.; Royes, L.F.F.; Furian, A.F.; Menezes, I.R.A. et al. Anticonvulsant Activity of *Caryocar coriaceum* Wittm. Fixed Pulp Oil Against Pentylene-tetrazol-Induced Seizures. **Neurol Res**, Brasil, v. 39, p. 667–674, 2017.

Oliveira, G.S.A.; Oliveira, F.F. de; Oliveira, M.C.H. de; Uetanabaro, A.P.T.; Sousa, Z.L.; Andrioli, J.L. In vitro Antifungal Activity of *Irlbachia purpurascens*, *Lantana macrophylla* and *Kielmeyera neglecta* Extracts Against *Candida* Isolates Collected from Patients with Vulvovaginal Candidiasis. **Res J Med Plant**, Brasil, v. 7, p. 141–149, 2013.

Pachón-Ibáñez, M.E.; Docobo-Pérez, F.; López-Rojas, R.; Domínguez-Herrera, J.; Jiménez-Mejías, M.E.; García-Curiel, A.; Pichardo, C.; Jiménez, L.; Pachón, J. Efficacy Of Rifampin And Its Combinations With Imipenem, Sulbactam, And Colistin In Experimental Models Of Infection Caused By Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, Espanha, v. 54, p. 1165–1172, 2012.

Pakharukova, N.; Tuittila, M.; Paavilainen, S.; Malmi, H.; Parilova, O.; Teneberg, S. Structural Basis for *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation. **PNAS - Proc Natl Acad Sci**, Suécia, v. 115, p. 5558–5563, 2018.

Palmer, L.D.; Green, E.R.; Sheldon, J.R.; Skaar, E.P. Assessing *Acinetobacter baumannii* Virulence And Persistence In A Murine Model Of Lung Infection. **Methods Mol Biol**, USA, v. 1946, p. 289–305, 2019.

Pascual, M.E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Sánchez Mata, D.; Villar, A. *Lippia*: Traditional Uses, Chemistry And Pharmacology: A Review. **J Ethnopharmacol**, Espanha, v. 76, p. 201–214, 2001..

Peleg, A.Y.; de Breij, A.; Adams, M.D.; Cerqueira, G.M.; Mocali, S.; Galardini, M.; Nibbering, P.H.; Earl, A.M.; Ward, D. V.; Paterson, D.L. et al. The Success of *Acinetobacter* Species; Genetic, Metabolic and Virulence Attributes. **PLoS One**, Austrália, v. 7, p. 1-11, 2012.

Peleg, A.Y.; Seifert, H.; Paterson, D.L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. **Clin Microbiol Rev**, Boston, v. 21, p. 538–582, 2008.

Peterson, E.; Kaur, P. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. **Front Microbiol**, USA, v. 9, p. 1–21, 2018.

Pieren, M.; Tigges, M. Adjuvant Strategies For Potentiation Of Antibiotics To Overcome Antimicrobial Resistance. **Curr Opin Pharmacol**, Suíça, v. 12, p. 551–555, 2012.

Porfírio, E.M.; Melo, H.M.; Pereira, A.M.G.; Cavalcante, T.T.A.; Gomes, G.A.; De Carvalho, M.G.; Costa, R.A.; Catunda, F.E.A. In Vitro Antibacterial And Antibiofilm Activity Of *Lippia alba* Essential Oil, Citral, And Carvone Against *Staphylococcus aureus*. **Sci World J**, Brasil, v. 2017, p. 1–7, 2017.

Potron, A.; Munoz-Price, L.S.; Nordmann, P.; Cleary, T.; Poirel, L. Genetic Features of CTX-M-15-Producing *Acinetobacter baumannii* from Haiti. **Antimicrob Agents Chemother**, França v. 55, p. 5946–5948, 2011.

Potron, A.; Poirel, L.; Nordmann, P. Emerging Broad-Spectrum Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and Epidemiology. **Int J Antimicrob Agents**, França, v. 45, p. 568–585, 2015.

Qi, L.; Li, H.; Zhang, C.; Liang, B.; Li, J.; Wang, L.; Du, X.; Liu, X.; Qiu, S.; Song, H. Relationship Between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, And Biofilm-Specific Resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Front Microbiol**, China, v. 7, p.1–10, 2016.

Queenan, A.M.; Bush, K. Carbapenemases : The Versatile β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, USA, v. 20, p. 440–458, 2007.

Raei, P.; Poulak, T.; Memar, M.Y.; Alizadeh, N.; Aghamali, M.; Zeinalzadeh, E.; Asgharzadeh, M.; Kafil, H.S. Thymol and Carvacrol Strongly Inhibit Biofilm Formation And Growth Of Carbapenemase-Producing Gram Negative Bacilli. **Cell Mol Biol**, Iran, v. 63, p. 108–112, 2017.

Rani, F.M.; Rahman, N.I.A.; Ismail, S.; Alattraqchi, A.G. *Acinetobacter* spp . Infections in Malaysia : A Review of Antimicrobial Resistance Trends, Mechanisms and Epidemiology. **Frontiers in Microbiology**, Malásia, v. 8, p. 1–13, 2017.

Reis, A.C.; Sousa, S.M.; Vale, A.A.; Pierre, P.M.O.; Franco, A.L.; Campos, J.M.S.; Vieira, R.F.; Viccini, L.F. *Lippia alba* (Verbenaceae): A New Tropical Autopolyploid Complex? **Am J Bot**, Brasil, v.101, p.1002–1012, 2014.

Ribeiro, K.; Sousa-Neto, E.R. de; Carvalho, J.A. de; Sousa Lima, J.R. de; Menezes, R.S.C.; Duarte-Neto, P.J.; da Silva Guerra, G.; Ometto, J.P.H.B. Land Cover Changes And Greenhouse Gas Emissions In Two Different Soil Covers In The Brazilian Caatinga. **Sci Total Environ**, Brasil, v. 571, p. 1048–1057, 2016.

Rodrigues, I.A.; Alviano, D.S.; Gomes, M.T.; Silva, D.O.; Antoniassi, R.; Silva, A.J.R.; Bizzo, H.R.; Alviano, C.S.; Vermelho, A.B.; do Socorro, M. In Vitro Anti-*Leishmania amazonensis* Activity Of The Polymeric Procyanidin-Rich Aqueous Extract From *Syagrus coronata*. **J Med Plants Res**, Brasil, v. 5, p. 3781–3790, 2011.

Rodríguez, C.H.; Nastro, M.; Famiglietti, A. Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* - Review of Their Dissemination in Latin America. **Rev Argent Microbiol**, Argentina, v. 50, p. 327–333, 2018.

Rossau, R.; Landschoot, A.V.A.N.; Gillis, M.; Ley, J.D.E. Taxonomy of Moraxellaceae fam. nov., a New Bacterial Family To Accommodate the Genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and Related Organisms. **Int J Syst Bacteriol.**, Bélgica, v. 41, p. 310–319, 1991.

Rufino, M.U. de L.; De Medeiros Costa, J.T.; Da Silva, V.A.; De Holanda Cavalcanti Andrade, L. Knowledge And Use Of Ouricuri (*Syagrus coronata*) and Babaçu (*Orbignya phalerata*) in Buíque, Pernambuco state, Brazil. **Acta Bot Brasilica**, Brasil, v. 22, p. 1141–1149, 2008.

Rumbo, C.; Gato, E.; Alegría, C.R. de; Fernández-Cuenca, F. Contribution of Efflux Pumps, Porins, and β -Lactamases to Multidrug Resistance in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobail Agents Chemother**, Espanha, v. 57, p. 5247–5257, 2013.

Salloum, T.; Tannous, E.; Alousi, S.; Arabaghian, H.; Rafei, R.; Hamze, M.; Tokajian, S. Genomic Mapping of ST85 blaNDM-1 and blaOXA-94 Producing *Acinetobacter baumannii* Isolates From Syrian Civil War Victims. **Int J Infect Dis**, Líbano, v. 74, p.100–108, 2018.

Santajit, S.; Indrawattana, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Biomed Res Int**, Tailândia, v. 2016, p. 1–8, 2016.

Santos, N.; Pascon, R.; Vallim, M.; Figueiredo, C.; Soares, M.; Lago, J.; Sartorelli, P. Cytotoxic and Antimicrobial Constituents from the Essential Oil of *Lippia alba* (Verbenaceae). **Medicines**, Brasil, v. 3, p. 1-9, 2016.

Sayeed Akthar, M.; Degaga, B.; Azam, T. Antimicrobial Activity Of Essential Oils Extracted From Medicinal Plants Against The Pathogenic Microorganisms: A Review. **Issues Biol Sci Pharm Res**, Etiópia v. 2, p. 1–7, 2014.

Schindler, B.D.; Jacinto, P.; Kaatz, G.W. Inhibition Of Drug Efflux Pumps In *Staphylococcus aureus*: Current Status Of Potentiating Existing Antibiotics. **Future Microbiology**, USA, v. 8, p. 491–507, 2013.

Sherrard, L.J.; Tunney, M.M.; Elborn, J.S. Infections In Chronic Lung Diseases 2 Antimicrobial Resistance In The Respiratory Microbiota Of People With Cystic FiBrosis. **Lancet**, Reino Unido, v. 384, p. 703–713, 2014.

Silva, R.B.; Silva-Júnior, E. V.; Rodrigues, L.C.; Andrade, L.H.C.; Da Silva, S.I.; Harand, W.; Oliveira, A.F.M. A Comparative Study Of Nutritional Composition And Potential Use Of Some Underutilized Tropical Fruits Of Arecaceae. **An Acad Bras**

Cienc, Brasil, v. 87, p. 1701–1709, 2015.

Silva, T.R. dos S.; Salimena, F.R.G. Novas Combinações e Novos Sinônimos em *Lippia* e *Lantana* (Verbenaceae). **Darwiniana**, Brasil, v. 4, p. 57–59, 2002.

Silver, L.L. Challenges Of Antibacterial Discovery. **Clin Microbiol Rev**, USA, v. 24, p. 71–109, 2011.

Simões, C. M. O.; Spitzer, V. Óleos Voláteis. In: Simões CMO, Schenkel EP; Gosmann G, Mello JCP de, Mentz LA, Petrovick PR (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: **Editora da UFRGS / Editora da UFSC**, cap. 18, p. 475, 2004.

Sirijatuphat, R.; Thamlikitkul, V. Preliminary Study Of Colistin Versus Colistin Plus Fosfomycin For Treatment Of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections. **Antimicrob Agents Chemother**, Tailândia, v.58, p. 5598–5601, 2014.

Tao, C.; Kang, M.; Chen, Z.; Xie, Y.; Fan, H.; Qin, L.; Ma, Y. Microbiologic Study Of The Pathogens Isolated From Wound Culture Among Wenchuan Earthquake Survivors. **Diagn Microbiol Infect Dis**, China, v. 63, p. 268–270, 2009.

Temgoua, F.T.D.; Wu, L. Mechanisms Efflux Pumps of *Acinetobacter baumannii* (MDR): Increasing Resistance to Antibiotics. **Journal of Biosciences and Medicines**, China, v. 7, p. 48–70, 2019.

Tholl, D. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, USA, v. 148, p. 63–106, 2015.

Towner, K.J. The Genus *Acinetobacter*. **The Prokaryotes**, USA, v. 164, p. 3137–3143, 1992.

Trentin, D.D.S.; Giordani, R.B.; Zimmer, K.R.; Da Silva, A.G, Da Silva, M.V.; Correia, M.T.D.S.; Baumvol, I.J.R.; Macêdo, A.J. Potential Of Medicinal Plants From The Brazilian Semi-Arid Region (Caatinga) Against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **J Ethnopharmacol**, Brasil, v. 137, p. 327–335, 2011.

Valdivieso-Ugarte, M.; Gomez-Llorente, C.; Plaza-Díaz, J.; Gil, Á. Antimicrobial, Antioxidant, and Immunomodulatory Properties of Essential Oils: A Systematic Review. **Nutrients**, Espanha, v. 11, p.1–29, 2019.

Vale-Silva, L.A.; Gonçalves, M.J.; Cavaleiro, C.; Salgueiro, L.; Pinto, E. (2010a) Antifungal Activity Of The Essential Oil Of Thymus X Viciosoi Against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* And Dermatophyte Species. **Planta Med**, Portugal, v. 76, p. 882–888, 2010.

Vashist, J.; Tiwari, V.; Kapil, A.; Rajeswari, M.R. Quantitative Profiling And Identification Of Outer Membrane Proteins Of β -Lactam Resistant Strain Of *Acinetobacter baumannii*. **J Proteome Res**, Índia, v. 9, p. 1121–1128, 2010.

Ventola, C.L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P&T**, USA, v. 40, p. 277–83, 2015.

Vijayakumar, S.; Biswas, I.; Veeraraghavan, B. Accurate Identification of Clinically Important *Acinetobacter* spp.: an Update. **Futur Sci OA**, Índia, v.5, p. 1-14, 2019.

Vijayakumar, S.; Gopi, R.; Gunasekaran, P.; Bharathy, M. Molecular Characterization of Invasive Carbapenem- Resistant *Acinetobacter baumannii* from a Tertiary Care Hospital in South India. *Infect Dis Ther*, Índia, v. 5, p. 379–387, 2016.

Vila, J.; Martí, S.; Sánchez-Céspedes, J. Porins, Efflux Pumps And Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, Espanha, v. 59, p. 1210–1215, 2007.

Waksman, S.A. What Is An Antibiotic Or An Antibiotic Substance ?. **Mycologia**, USA, v. 39, p. 565–569, 1947.

Walther-Rasmussen, J.; Høiby, N. OXA-type Carbapenemases. **J Antimicrob Chemother**, Dinamarca, v. 57, p. 373–383, 2006.

Wareham, D.W.; Gordon, N.C.; Hornsey, M. In Vitro Activity of Teicoplanin Combined With Colistin Versus Multidrug-Resistant Strains of *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, Londres, v. 66, p.1047–1051, 2011.

Wright, G.D. Opportunities For Natural Products In 21 St Century Antibiotic Discovery. **Nat Prod Rep**, Canadá, v. 34, p. 694–701, 2017.

Wright, G.D. Q&A: Antibiotic Resistance: Where Does It Come From And What Can We Do About It? **BMC Biol**, Canadá, v. 8, p. 1-6, 2010.

Wright, G.D. Antibiotic Adjuvants : Rescuing Antibiotics from Resistance. **Trends Microbiol**, Canadá, v. 24, p. 862–871, 2016.

Wu, X.; Chavez, J.D.; Schweppe, D.K.; Zheng, C.; Weisbrod, C.R.; Eng, J.K.; Murali, A.; Lee, S.A.; Ramage, E.; Gallagher, L.A. et al. In Vivo Protein Interaction Network Analysis Reveals Porin-Localized Antibiotic Inactivation in *Acinetobacter baumannii* Strain AB5075. **Nat Commun**, USA, v. 7, p. 1–14, 2016.

Xu, C.; Bilya, S.R.; Xu, W. adeABC Efflux Gene in *Acinetobacter baumannii*. **New Microbe and New Infect**, China, v. 30, p. 1-6, 2019.

Xu, X.; Xu, L.; Yuan, G.; Wang, Y.; Qu, Y.; Zhou, M. Synergistic Combination Of Two Antimicrobial Agents Closing Each Other's Mutant Selection Windows To Prevent Antimicrobial Resistance. **Sci Rep**, China, v. 8, p. 1–7, 2018.

Yang, C.H.; Su, P.W.; Moi, S.H.; Chuang, L.Y. Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii*: Genotype-phenotype Correlation. **Molecules**, Taiwan, v. 24, p. 1–12, 2019.

Yang, S.K.; Yusoff, K.; Mai, C.W.; Lim, W.M.; Yap, W.S.; Lim, S.H.E.; Lai, K.S. Additivity vs. Synergism: Investigation of the Additive Interaction of *Cinnamon* Bark Oil and Meropenem in Combinatory Therapy. **Molecules**, Malásia, v. 22, p.1–14, 2017.

Yap, P.S.X.; Yiap, B.C.; Ping, H.C.; Lim, S.H.E. Essential Oils - A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. **Open Microbiol J**, Malásia, v. 8, p.6–14, 2014.

Zaffiri, L.; Gardner, J.; Toledo-Pereyra, L.H. History of Antibiotics . From Salvarsan to Cephalosporins. **J Invest Surg**, USA, v. 25, p. 67–77, 2012.

Zechini, B.; Versace, I. Inhibitors Of Multidrug Resistant Efflux Systems In Bacteria. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, Itália, v. 4, p. 37–50, 2019.

Zeighami, H.; Valadkhani, F.; Shapouri, R.; Samadi, E.; Haghi, F. Virulence Characteristics Of Multidrug Resistant Biofilm Forming *Acinetobacter baumannii* Isolated From Intensive Care Unit Patients. **BMC Infect Dis**, Irã, v. 19, p. 1–9, 2019.

[illegible]

APÊNDICE B - Tabela 4: Composição química do óleo essencial de *Lippia macrophylla*.

Composto	Kratz		Kovatz		Composição (% total do óleo essencial)
	Calc	Lit ⁽¹⁾	Calc	Lit ⁽¹⁾	<i>Lippia macrophylla</i>
Myrcene	991	988	992	990	1,01
o-Cymene	1023	1022	1026	1026	10,27
γ-Terpinene	1059	1054	1062	1059	1,62
Terpinene-4-ol	1178	1174	1180	1177	0,44
Thymol methyl ether	1236	1232	1238	1235	0,27
Thymol	1294	1289	1294	1290	49,81
Carvacrol	1303	1298	1303	1299	31,62
Thymol acetate	1356	1349	1358	1352	1,68
Carvacrol acetate	1375	1370	1376	1372	1,36
<i>trans</i> -Caryophyllene	1423	1417	1424	1419	0,47
Butylated hydroxyanisole	1487	1488	1487	1489	0,40
β-Bisabolene	1512	1505	1512	1505	0,32
Caryophyllene oxide	1588	1582	1588	1583	0,74
Compostos identificados (%)					100
Total					100

Dados obtidos em estudos anteriores de De Souza et al. 2017

APÊNDICE C - Tabela 3: Composição química do óleo essencial de *Lippia alba*

Composto	Índice de retenção		Composição (% total do óleo essencial)
	Cal.	Lit.	<i>Lippia alba</i>
α -thujene	925	924	0,09
myrcene	991	988	1,07
α -phellandrene	1003	1002	0,06
δ -3-carene	1009	1008	0,04
α -terpinene	1016	1014	0,81
o-cymene	1024	1022	7,17
limonene	1028	1024	0,27
1,8-cineole	1030	1026	0,28
(Z)- β -ocimene	1039	1032	0,15
(E)- β -ocimene	1049	1044	0,13
γ-terpinene	1059	1054	5,09
trans-sabinene hydrate	1067	1065	0,19
terpinolene	1089	1086	0,05
trans-sabinene hydrate	1099	1098	0,25
linalool	1102	1095	0,28
ipsdienol	1148	1140	0,61
borneol	1167	1165	0,13
umbellulone	1177	1167	0,03
terpinen-4-ol	1179	1174	0,02
α -terpineol	1193	1186	0,02
methyl ether thymol	1238	1232	3,29
methyl ether carvacrol	1247	1241	0,37
thymol	1289	1289	5,00
carvacrol	1298	1298	48,63
thymol acetate	1358	1349	0,04
cyclosativene	1371	1369	0,07
carvacrol acetate	1376	1370	0,72
α -copaene	1380	1374	0,25
(E)-caryophyllene	1424	1417	1,29
α -trans-bergamotene	1440	1432	0,11
aromadendrene	1444	1439	0,04
α -humulene	1458	1452	1,35
β -bisabolene	1513	1505	0,24
δ -cadinene	1529	1522	0,32
spathulenol	1583	1577	0,15
caryophyllene oxide	1589	1582	0,43
Total			79,03

APÊNDICE D - Tabela 4: Efeito do óleo essencial de *Lippia alba* sozinho e em combinação com antibióticos de referência em isolados clínicos de *A. baumannii*

Isolado de <i>A. baumannii</i>	Antibiótico	MIC (µg/mL)			
		OELA	CTZ + OELA	GEN + OELA	IPM + OELA
Acb06	CTZ	>128			
	GEN	2	128 (2)	0.25 (8)	2 (8)
	IPM	16			
Acb09	CTZ	32			
	GEN	8	32	0,125 (64)	0,125 (32)
	IPM	4			
Acb34	CTZ	64			
	GEN	0,5	32 (2)	0.125 (4)	2 (8)
	IPM	16			
Acb35	CTZ	>128			
	GEN	>32	128 (2)	>32	0,25 (32)
	IPM	8			
Acb45	CTZ	>128			
	GEN	>32	>128	0,5 (128)	8 (2)
	IPM	16			

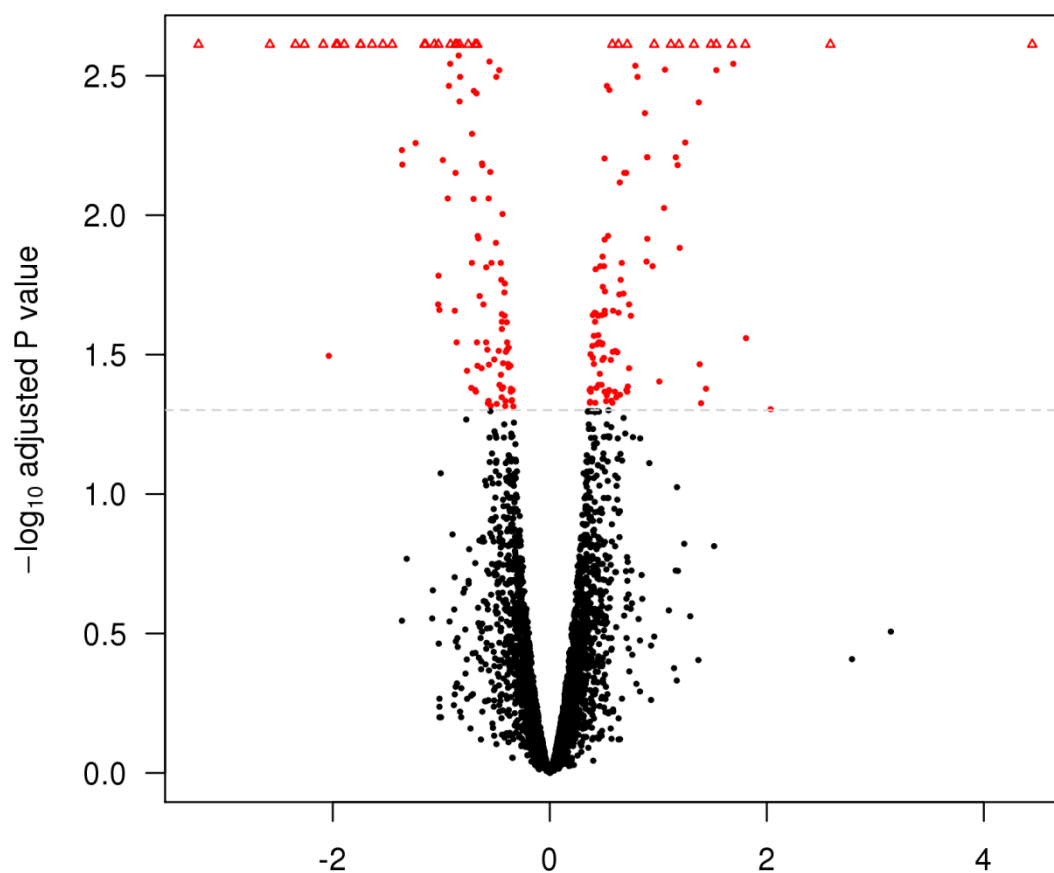
CTZ – ceftazidima; GEN – Gentamicina, IPM- Imipenem, OELA – óleo essencial de *Lippia alba*. O número entre parêntese representa o valor de redução da MIC do antibiótico em combinação com OELA.

APÊNDICE E - Tabela 5: Índice de Concentração inibitória fracional (FIC_I) para o tratamento combinado dos isolados de *A. baumannii* com OELA e antibióticos.

Isolado de <i>A. baumannii</i>	FIC _I		
	CAZ + OELA	GEN + OELA	IPM + OELA
Acb06	1,0 (A)	0.6 (A)	0,6 (A)
Acb09	1,5 (A)	0.5 (S)	0,5 (S)
Acb34	1,5 (A)	0.70 (A)	0,3 (S)
Acb35	1,5 (A)	2,0 (A)	0,2 (S)
Acb45	2,0 (A)	1,0 (S)	1,0 (A)

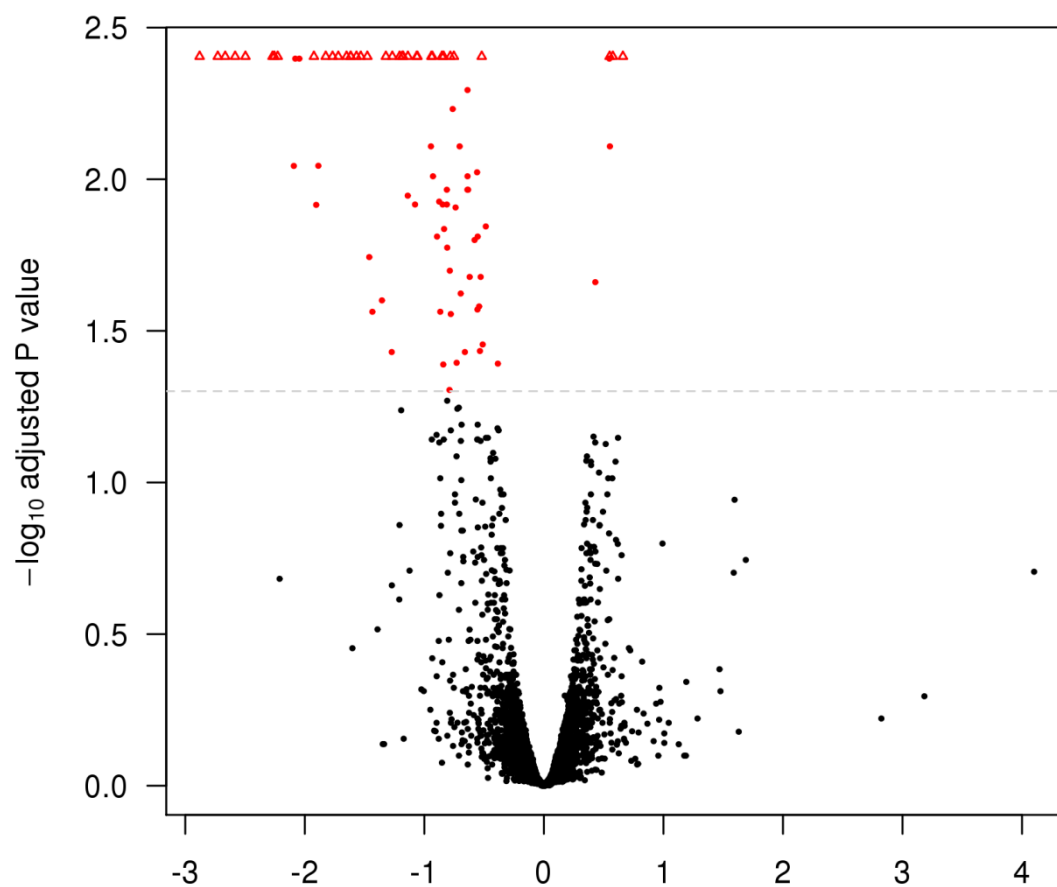
CAZ – Ceftazidima, GEN – Gentamicina, IPM – Imipenem e OELA – óleo essencial de *Lippia alba*. A letra entre parêntese corresponde a (A) aditivo e (S) sinergismo.

APÊNDICE F - Figure 5: Expressão diferencial de genes no isolado ACB35 após o tratamento com carvacrol



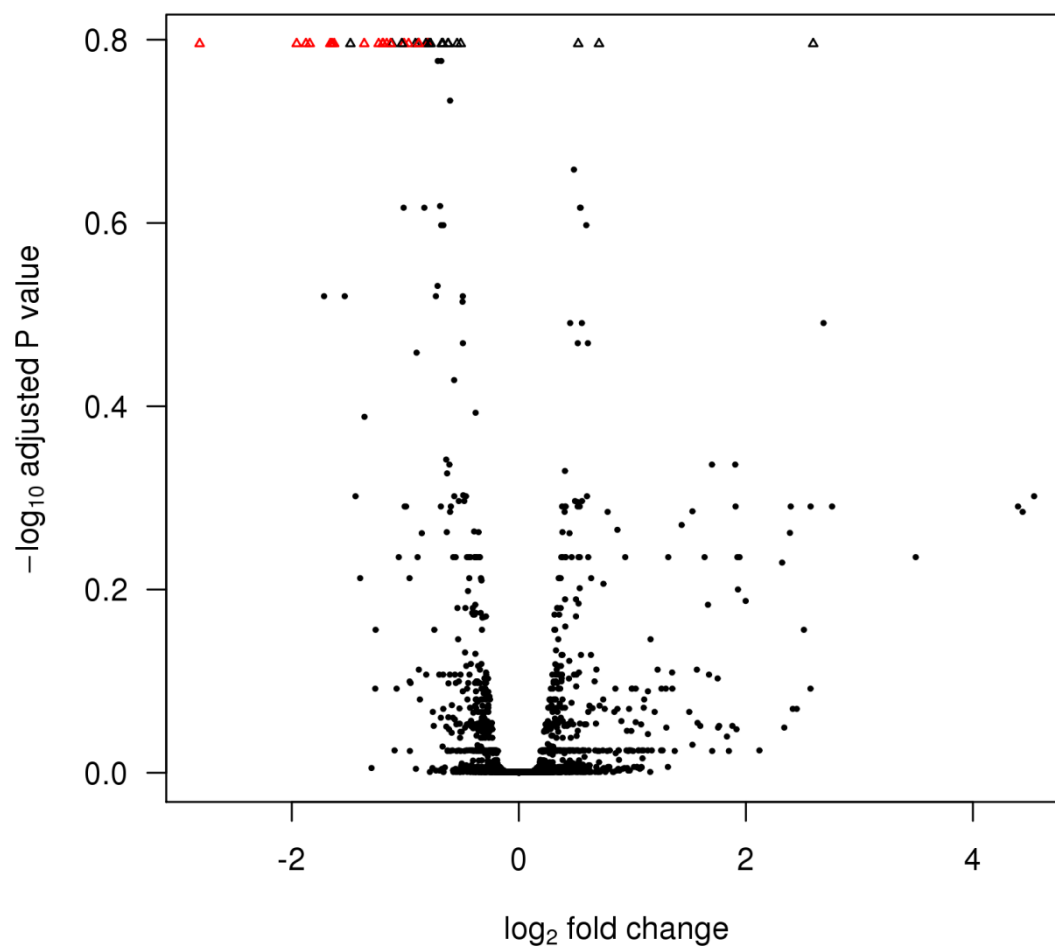
Legenda: em vermelho genes com diferença de expressão significativa em comparação ao controle sem tratamento.

APÊNDICE G - Figure 6 Expressão diferencial de genes no isolado ACB35 após o tratamento com timol



Legenda: em vermelho genes com diferença de expressão significativa em comparação ao controle sem tratamento.

APÊNDICE H - Figure 7: Expressão diferencial de genes no isolado ACB35 após o tratamento com timol e carvacrol



Legenda: em vermelho genes com diferença de expressão significativa em comparação ao controle sem tratamento.

ANEXO A - NORMAS PARA SUBMISSÃO

ARTIGO I - The combinatory effect of Essential oil from *Lippia macrophylla* on clinical resistant isolates of *Acinetobacter baumannii*

Artigo submetido

Revista: **Journal of Natural Products**

Qualis: A1

Disponível em:

http://pubsapp.acs.org/paragonplus/submission/jnprdf/jnprdf_authguide.pdf?

Arquivo anexado na mídia digital que acompanha o manuscrito

ANEXO B - NORMAS PARA SUBMISSÃO

ARTIGO II - Comparative transcriptomics analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in response to the treatment with the terpenic compounds thymol and carvacrol

Revista: **Frontiers in Mircobiology**

Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology#author-guidelines>

Arquivo anexado na mídia digital que acompanha o manuscrito