

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

**Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de canela em
bactérias produtoras de carbapenemases**

NATHALIE GAEBLER VASCONCELOS

**Dourados - MS
2018**

NATHALIE GAEBLER VASCONCELOS

Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de canela em bactérias produtoras de carbapenemases

Área do CNPq: 20202008 Genética Molecular e de Micro-organismos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Doenças Crônicas e Infecto-Parasitárias

Orientador: Dr. Júlio Henrique Rosa Croda

Co-Orientador: Dra. Simone Simionatto

Dourados - MS

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

V331a Vasconcelos, Nathalie Gaebler

Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de canela em bactérias produtoras de carbapenemases / Nathalie Gaebler Vasconcelos --
Dourados: UFGD, 2018.

102f : il. ; 30 cm.

Orientador: Júlio Henrique Rosa Croda

Co-orientadora: Simone Simionatto

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde,
Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Atividade antibacteriana. 2. Sinergismo. 3. Óleo essencial de
Cinnamomum cassia L. 4. Polimixina B. 5. bactérias Gram-negativas produtoras
de carbapenemases. I. Título.

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

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

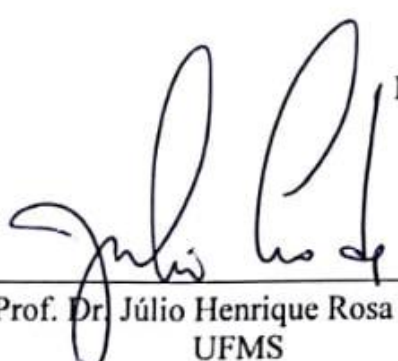
NATHALIE GAEBLER VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE CANELA EM BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
CARBAPENEMASES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em: Dourados, 11 de setembro de 2018.

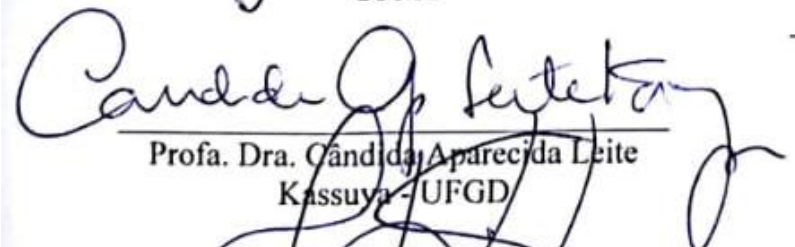
BANCA EXAMINADORA



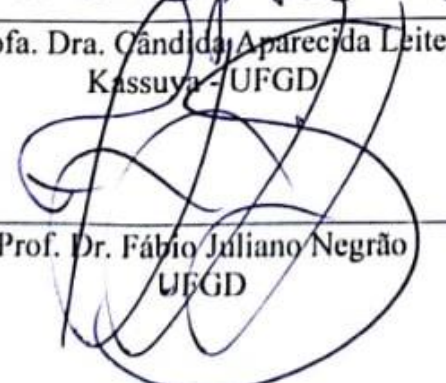
Prof. Dr. Júlio Henrique Rosa Croda
UFMS



Profa. Dra. Suzana Meira Ribeiro
UFGD



Profa. Dra. Cândida Aparecida Leite
Kassuya - UFGD



Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão
UFGD



Prof. Dr. Ary Fernandes Junior
UNESP

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida cheia de oportunidades e pela força concedida a mim para nunca desistir frente às dificuldades;

Ao meu marido Paulo César P. Vasconcelos, pelos sempre maravilhosos momentos divididos, principalmente aqueles onde me faz enxergar caminhos novos, por sempre estar ao meu lado e pelo amor dedicado;

Ao meu filho Caio Gaebler Vasconcelos que é o meu primeiro amor incondicional e por quem eu luto todas as batalhas para que eu possa ser um exemplo cada vez melhor;

Aos meus filhos Heitor Gaebler Vasconcelos e Sofia Gaebler Vasconcelos que me trouxeram o privilégio e a bênção de poder gerar tanto amor ao mesmo tempo;

Ao meu pai Wolfram Gaebler pelo apoio incondicional e por sempre ter acreditado em mim por mais improváveis que fossem meus sonhos;

À minha mãe Elisabete Simon Gaebler que nunca mediu esforços para que eu hoje pudesse estar onde estou, que sempre me permitiu ser independente e pelos conselhos valiosos ao longo da vida;

Ao meu irmão Fernando Gaebler pelo eterno amor concedido e sempre disponível a filosofar;

Aos meus sogros Mirian Paula Vasconcelos e Cláudio Alves Vasconcelos por estarem sempre presentes quando precisamos;

Ao meu orientador Prof. Dr. Júlio H. R. Croda pela oportunidade, paciência e ensinamentos;

À minha co-orientadora Prof. Dra. Simone Simionatto pela constante presença e aconselhamento, pela sempre disponibilidade em ajudar, pela amizade e incentivo pessoal;

Aos professores do Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde que estiveram disponíveis para ajudar na prática e/ou na teoria;

Às técnicas do Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde pela atenção e preciosa ajuda sempre que precisei;

A todos os alunos do Grupo de Pesquisa em Biologia Molecular de Micro-organismos com os quais sempre passei bons momentos e sempre estiveram dispostos a ajudar, em especial ao Júlio Henrique Queiroz, Gleyce Hellen Souza, Maria Lorenza Leal, Késia Silva, Elaine Costa Souza e Wirlaine Maciel;

Aos alunos que tive e me fizeram ver a importância de se passar adiante os conhecimentos adquiridos;

A todos os professores e funcionários da Universidade Federal da Grande Dourados que passaram por esta trajetória;

Ao programa de pós-graduação Ciências da Saúde da UFGD que oportunizou a realização deste doutorado;

Ao Hospital Universitário HU-UFGD por ter me concedido períodos de afastamento para que eu pudesse me aprimorar e futuramente estar mais qualificada para o meu trabalho.

EPÍGRAFE

“Nunca ande apenas pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde os outros já foram”.

(Alexander Graham Bell)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão Bibliográfica:

Tabela 1. Frequência de isolados bacterianos por espécie e por perfil de resistência no Hospital Universitário da UFGD no ano de 2017.....27

Artigo 1: Synergistic effects of *Cinnamomum cassia* essential oil in combination with polymyxin B on carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*

Table 1. Primers used for amplification of *arnB* and *16S* genes.....62

Table S1 (Supplementar material). Sensitivity of bacterial strains to the action of different antibiotics (results expressed in $\mu\text{g.mL}^{-1}$) assessed by Vitek[®] 2.....66

Figure S1 (Supplementar material). Agarose gels electrophoresis for the detection of the expression of *arnB* mRNA (169 bp) in *S. marcescens* strain by RT-PCR stained with GelRed. A: CCeo + POL. Lane 1: molecular weight marker Ludwig 50x (50 bp); lane 2: negative control; lane 3: before treatment; lane 4: after 1 hour of treatment. B: POL. Lane 1: molecular weight marker Ludwig 50x (50 bp); lane 2: negative control; lane 3: before treatment; lane 4: after 1 hour of treatment.....67

Table 2. Antibacterial action of CCeo and TC using disk-diffusion and broth microdilution and synergism between CCeo and antibiotics using disk-diffusion as screening.....68

Figure 2. Time-kill curves against the studied carbapenemase-producing strains. A: CCeo x POL against *S. marcescens*. B: CCeo x POL against *K. pneumoniae*. C: CCeo x IPM against *S. marcescens*. D: CCeo x IPM against *K. pneumoniae*. C+: positive control; C-: negative control (*S. marcescens* or *K. pneumoniae* and BHI – Brain Heart Infusion broth); CCeo: *C. cassia* essential oil; GEN: gentamicin; IPM: imipenem; MIC: minimal inhibitory concentration; POL: polymyxin B.....69

Figure 3. Checkboard against the studied carbapenemase-producing strains. A: *K. pneumoniae* and B: *S. marcescens* - checkboard assays with CCeo and POL against carbapenemase-producing bacteria. Shading: visible growth; *: optimal association concentrations; CT: tween 80 control; C-: negative control; S: sterility control of saline; C- H₂O: water control; C CCeo: sterility control of *C. cassia* essential oil; C POL: sterility control of polymyxin B.....70

Figure 4. A: Protein leakage from *S. marcescens* after 1 hour of treatment with CCeo (MIC, $281.25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CCeo + POL (MIC CCeo, $281.25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ + MIC POL, $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and POL

(MIC, 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Control: saline with *S. marcescens*. CCeo: *C. cassia* essential oil; MIC: minimal inhibitory concentration; POL: polymyxin B. B: Müller-Hinton agar plates seeded with 0 h, 1 h, 2 h, and 4 h aliquots of *S. marcescens* treated with CCeo + POL 1 x MIC and CCeo 1 x MIC. C: Relative expression of 16S rRNA *S. marcescens* gene by RT-qPCR. Green lines: *S. marcescens* without CCeo + POL treatment; blue lines: *S. marcescens* after 1 hour with CCeo + POL treatment; red lines: negative control. Electroforese gel: RT-qPCR products. RFU: Relative fluorescence units.....71

Artigo 2: Antibacterial activity of *Cinnamomum cassia* L. essential oil in a polymyxin-carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* strain

Table 1. Antimicrobial susceptibility patterns (MICs in $\mu\text{g.mL}^{-1}$) assessed by Vitek® 2.....86

Figure 1. Time-kill curves with CCeo against the carbapenem and polymyxin-resistant *E. cloacae* strain. CCeo, *C. cassia* L. essential oil; MIC, Minimal Inhibitory Concentration, POL, polymyxin B; C+: positive control; C-: negative control (*E. cloacae* and BHI – Brain Heart Infusion broth).....86

Anexos:

Tabela 2. Relação dos extratos de plantas e óleos essenciais triados para atividade antibacteriana e sinergismo com antibióticos contra bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemases.....93

Organograma 1. Esquema organizacional e cronológico das avaliações realizadas no presente estudo.....95

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AMI	Amikacin
AmpC	cefalosporinase cromossomal
ARI-1	carbapenemase <i>Acinetobacter</i> Resistente a Imipenem
bp	base pairs
CAPES	Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCeo	<i>Cinnamomum cassia</i> L. essential oil
cDNA	complementar Desoxirribonucleic Acid
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFU	Colony Forming Units
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CMS	Colistimetato de Sódio
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CT	Cycle Threshold
CTX-M	cefotaximase
DNA	Ácido Desoxirribonuclêico
EDTA	Ácido Etileno-Diamino-Tetracético
ESAC	<i>Extended-Spectrum</i> AmpC
ESBL	<i>Extended-Spectrum Beta-Lactamase</i>
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter</i>
FDA	Food and Drug Administration
FIC	Fractional Inhibitory Concentration
FUNDECT	Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul
GEN	Gentamicin
GIM	German Imipenemase
hvKP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> hipervirulenta e hiper mucoviscosa
IMI-1	Imipenem-hydrolyzing beta-lactamase
IMP	Imipenemase

IPM	Imipenem
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
L-Ara4N	4-amino-4-deoxy-L-arabinose
LPS	lipopolysaccharides
MALDI-ToF ToF	Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry
MBL	Metallo-Beta-Lactamase
mCIM	modified Carbapenem Inactivation Method
MDR-GN	Multidrug Resistant Gram-Negative
MHT	Modified Hodge Test
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NDM	New Delhi Metallo-beta-lactamase
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilinase
PCR	Polimerase Chain Reaction
PEtN	Phosphoethanolamine
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
POL	Polymyxin B
PPT	Pipracillin/tazobactam
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RFU	Relative Fluorescence Units
RNAr / rRNA	Ácido Ribonucléico ribossomal / ribosomal nucleic acid
RNAt	Ácido Ribonucléico transportador
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction
RT-qPCR	Reverse Transcriptase quantitative real-time Polimerase Chain Reaction
SIM	Seoul Imipenemase
SME-1	<i>Serratia marcescens</i> enzyme
SPM	São Paulo Metallo-beta-lactamase
SUS	Sistema Único de Saúde
TC	Trans-cinnamaldehyde

TEM	Temoniera beta-lactamase
TGC	Tigecycline
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VIM	Verona Imipenemase
WHO	World Health Organization

Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de canela em bactérias produtoras de carbapenemases

RESUMO

Introdução: O surgimento da multirresistência bacteriana é um problema de saúde pública que resulta na necessidade de explorar novas opções terapêuticas. Há uma grande variedade de alvos antibacterianos não utilizados pelos fármacos atuais para serem explorados. O objetivo do presente estudo foi investigar a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Cinnamomum cassia* L. (CCeo) sozinho e em combinação com polimixina B (POL) contra bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemase: *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens*. **Metodologia:** A identificação bacteriana foi realizada por Vitek[®] 2, BD Phoenix[™]100 e MALDI-ToF ToF. A susceptibilidade antibacteriana foi determinada por microdiluição em caldo e MALDI-ToF ToF. A presença de genes que codificam beta-lactamases foi avaliada por PCR. A atividade antibacteriana foi avaliada utilizando disco-difusão em ágar, microdiluição em caldo, time kill e checkboard. O possível mecanismo de ação da CCeo foi avaliado por PCR, RT-PCR, RT-qPCR e ensaio de extravasamento de proteínas. **Resultados:** A produção de carbapenemase foi confirmada por MALDI-ToF ToF e a PCR mostrou a presença dos genes *bla*_{KPC-2} para todas as cepas e também *bla*_{IMP-10} para *S. marcescens*. CCeo apresentou efeito inibitório contra *E. cloacae* (MIC, 17,57 µg.mL⁻¹), *K. pneumoniae* (MIC, 281,25 µg.mL⁻¹) e *S. marcescens* (MIC, 281,25 µg.mL⁻¹). As curvas de sobrevivência das cepas mostraram uma diminuição na contagem de células viáveis ao longo do tempo e quando CCeo foi testado em associação com a POL contra *K. pneumoniae* e *S. marcescens*, foi confirmado o sinergismo. Foi observado vazamento de proteínas quando *S. marcescens* foi tratada com concentrações crescentes de CCeo e CCeo combinada com POL. **Conclusões:** CCeo apresentou atividade antibacteriana contra as cepas estudadas e quando associado à POL apresentou um efeito sinérgico capaz de inibir o crescimento bacteriano de forma rápida e consistente. CCeo desestabiliza a membrana externa da bactéria, o que leva à morte celular devido à entrada da POL no espaço periplasmático permitindo sua ação.

Palavras-chave: atividade antibacteriana; sinergismo; óleo essencial de *Cinnamomum cassia* L.; polimixina B; bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemases.

Antibacterial activity assessment of cinnamon essential oil in carbapenemases producing bacteria

ABSTRACT

Introduction: The emergence of bacterial multidrug resistance is an important public health problem that has resulted in the need to explore novel therapeutic options. There is a wide variety of antibacterial targets not used by the current drugs to be exploited. The objective of the present study was the investigation of the antibacterial activity of *Cinnamomum cassia* L. essential oil (CCeo) alone and in combination with polymyxin B (POL) against carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Methodology:** Bacterial identification was performed by Vitek[®] 2, BD Phoenix[™]100 and MALDI-ToF ToF. Antibacterial susceptibility was determined by broth microdilution and MALDI-ToF ToF. The presence of beta-lactamase-encoding genes was assessed by PCR. The antibacterial activity of CCeo was evaluated using the agar disk diffusion, broth microdilution, time-kill and checkboard methods. Possible CCeo mechanism of action was assessed by PCR, RT-PCR, RT-qPCR, and protein leakage assay. **Results:** The carbapenemase production was confirmed by MALDI-ToF ToF and PCR showed the presence of *bla*_{KPC-2} for all the studied strains and also *bla*_{IMP-10} for *S. marcescens*. CCeo exhibited an inhibitory effect against carbapenem-resistant *E. cloacae* (MIC, 17,57 µg.mL⁻¹), *K. pneumoniae* (MIC, 281.25 µg.mL⁻¹) and *S. marcescens* (MIC, 281.25 µg.mL⁻¹). The survival curves of the strains showed a decrease in viable cell counts over time and when CCeo was tested in association with POL against *K. pneumoniae* and *S. marcescens*, synergism was confirmed. It was observed protein leakage when *S. marcescens* was treated with increasing concentrations of CCeo and CCeo + POL. **Conclusions:** CCeo presents antibacterial activity against the studied strains and when CCeo is associated with POL, a synergistic effect is able to inhibit bacterial growth rapidly and consistently, making it an interesting candidate for development of alternative treatment for carbapenemase-producing strains. CCeo destabilizes the outer membrane of the bacterium, making possible the cell entrance of the POL in the periplasmic space allowing its action and leading to cell death.

Keywords: antibacterial activity; synergism; *Cinnamomum cassia* L. essential oil; polymyxin B; carbapenem-resistant Gram-negative bacteria.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Resistência bacteriana	19
2.1.1 KPC	23
2.1.2 Métodos para detecção de carbapenemases	24
2.1.3 Bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemases	26
2.2 Tratamento farmacológico das infecções causadas por bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemases	30
2.3 Plantas medicinais	32
2.3.1 Óleos essenciais	34
2.3.2 <i>Cinnamomum</i> sp.	36
2.4 Interação de plantas medicinais com drogas antimicrobianas	38
3 OBJETIVOS	40
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
5 APÊNDICES	56
5.1 Artigo 1: Synergistic effects of <i>Cinnamomum cassia</i> essential oil in combination with polymyxin B against carbapenemase-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> and <i>Serratia marcescens</i>	57
5.2 Artigo 2: Antibacterial activity of <i>Cinnamomum cassia</i> L. essential oil in a polymyxin-carbapenemase-producing <i>Enterobacter cloacae</i> strain	81
6 CONCLUSÕES	91
7 ANEXOS	92
7.1 Artigo 3: Antibacterial Mechanisms of Cinnamon and its Constituents: a Review	96
7.2 Artigo 4: <i>Origanum vulgare</i> L. essential oil inhibits the growth of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria	97
7.3 Artigo 5: Antibacterial activity and synergism of <i>Nectandra megapotamica</i> (L.) flowers essential oil against OXA-23-producing <i>Acinetobacter baumannii</i>	97

7.4 Artigo 6: Genetic toxicological studies and antibacterial activity against carbapenemase-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> of <i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) (Murici) extract	97
7.5 Artigo 7: Chemical composition, antitumoral and antibacterial activities of essential oils from leaves and stem bark of <i>Nectandra lanceolata</i> (Lauraceae)	98
7.6 Artigo 8: High mortality rate associated with KPC-producing <i>Enterobacter cloacae</i> in a brazilian hospital	99
7.7 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)	100

1 INTRODUÇÃO

Cepas bacterianas produtoras de carbapenemase têm sido observadas em todo o mundo, geralmente associadas a infecções relacionadas à assistência à saúde e a altos índices de morbidade e mortalidade. Carbapenemases conferem resistência a uma grande variedade de beta-lactamases (HAMMOUDI; MOUBARECK; SARKIS, 2014). Atualmente, um problema de saúde pública preocupante é a ampla disseminação entre as bactérias Gram-negativas da resistência aos carbapenêmicos. *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens* são bacilos Gram-negativos da família Enterobacteriaceae e *Acinetobacter baumannii*, um coco-bacilo Gram-negativo da família Moraxellaceae que adquirem e transferem genes de resistência muito facilmente proporcionando multirresistência e causando graves infecções (VAN HOEK et al., 2011).

Genes codificadores de carbapenemases geralmente estão situados em transposons, transportados por plasmídeos auto-conjugativos que podem também transportar outros determinantes de resistência que levam à falha no tratamento com outras classes de antibióticos (NORDMANN; POIREL, 2013) além do grande potencial de espalhar esses plasmídeos entre espécies ou até gêneros bacterianos (GUPTA et al., 2011). Atualmente, entre as opções para tratamento dessas infecções estão tigeciclina, polimixinas, aminoglicosídeos e fosfomicina (CAMPOS et al., 2016). No entanto, o uso destes antibióticos é limitado devido às suas características farmacocinéticas e de toxicidade (JAVAN; SHOKOUHI; SAHRAEI, 2015). A maioria das cepas de *Enterobacter* spp., *K. pneumoniae* e *S. marcescens* são produtoras de carbapenemases, gerando uma grande preocupação epidemiológica e terapêutica (CAMPOS et al., 2016), especialmente *S. marcescens* que tem resistência intrínseca a vários agentes antimicrobianos, como a polimixina B (POL) (SILVA et al., 2015).

A resistência intrínseca ou adquirida à maioria dos antibióticos está presente em vários agentes patogênicos. Há aproximadamente 265 a 350 alvos antibacterianos geneticamente validados e não mais do que 20 destes são alvos de fármacos atualmente comercializados, o que proporciona grande oportunidade para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes com novo modo de ação, sem resistência cruzada, particularmente mecanismos com múltiplos alvos (SINGH, 2014). Os óleos essenciais são compostos por múltiplos componentes e podem fornecer esta nova abordagem terapêutica, cada componente com possibilidade de atuação em um alvo diferente na célula bacteriana. Vários estudos mostram este potencial antimicrobiano dos óleos essenciais com ação antibacteriana, antifúngica, propriedades antivirais e

antiparasitárias (KUETE, 2010; NAZZARO et al., 2013). Os óleos essenciais e os seus componentes têm uma variedade de alvos, em particular na membrana e no citoplasma, e em certas situações, podem alterar completamente a morfologia das células (NAZZARO et al., 2013).

Um óleo essencial bastante utilizado na medicina popular é o da canela que é uma especiaria usada em todo o mundo, não apenas como condimento, mas também como medicamento. As cascas secas são popularmente utilizadas para tratar várias doenças, tais como amenorréia, artrite reumatóide, palpitação cardíaca, diarreia e neurose gastrointestinal (HE et al., 2016). *Cinnamomum cassia* também é usada na medicina popular como antibiótico, várias atividades antibacterianas de partes da *C. cassia* e seu óleo essencial têm sido relatadas em diversos estudos com bactérias sensíveis, tanto em bactérias Gram-positivas (MELO et al., 2015; TRINH et al., 2015) quanto em Gram-negativas (MAU; CHEN; HSIEH, 2001; OOI et al., 2006; OUSSALAH et al., 2006). É considerada uma planta segura, não apresentando toxicidade aguda ou crônica significativa, não mutagênica e sem genotoxicidade e carcinogenicidade detectada em estudos em mamíferos (BICKERS *et al.*, 2005).

Com base na propagação global de bactérias e limitações dos tratamentos atuais para as infecções por bactérias produtoras de carbapenemase, a busca por novas alternativas terapêuticas é imperativa. A resistência bacteriana tem sido inevitável, ela irá ocorrer ao longo do tempo e para combater a resistência, são necessários novos antibióticos com novos mecanismos de ação. Este estudo propôs verificar a eficácia antibacteriana do óleo essencial de *C. cassia* contra *E. cloacae*, *K. pneumoniae* e *S. marcescens* produtoras de carbapenemase e também a presença de efeitos sinérgicos de *C. cassia*, quando associada a antibióticos como imipenem (IPM) ou POL.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Resistência bacteriana

A resistência bacteriana é atualmente um dos problemas de saúde pública mais relevantes, representa um risco à qualidade de vida humana conquistada ao longo dos anos com o avanço da microbiologia, da engenharia genética, da farmácia e da medicina, comprometendo o orçamento dos sistemas de saúde (COSTA; SILVA JÚNIOR, 2017). As doenças infecciosas afetam milhões de pessoas em todo o mundo e sempre representaram uma das principais causas de morte na história da humanidade (WHO, 1998). O surgimento de micro-organismos multirresistentes tem agravado a situação, estando presentes tanto em infecções hospitalares quanto comunitárias, diminuindo as opções de antibioticoterapia (LEVY, 2005; ANDRADE, LEOPOLDO; HAAS, 2006). As infecções de difícil tratamento resultam em maiores complicações clínicas na recuperação de pacientes hospitalizados, risco para os pacientes acometidos por doença crônica e imunossuprimidos, propiciando um número maior de óbitos nos hospitais, os quais vêm se tornando reservatórios ambientais de patógenos.

Os antibióticos são fármacos que revolucionaram o tratamento de doenças infecciosas e reduziram mundialmente as taxas de morbidade e mortalidade associadas a infecções bacterianas. Entretanto, o uso dessas drogas acelera o processo natural de seleção de mutações que favorecem a resistência das bactérias. É preocupante a forma como esses medicamentos são utilizados em ambientes hospitalares, domésticos - utilização de produtos cosméticos sem finalidade terapêutica e de limpeza que possuem antibióticos em suas formulações (ORÚS et al., 2015), e na pecuária – antibióticos utilizados como “promotores de crescimento” na produção de animais de corte (BARTON, 2000).

O uso dos antimicrobianos inclui erros de prescrição que vão desde indicação não apropriada para a infecção em questão, incluindo infecções virais, erros técnicos por parte dos prescritores, relacionados à duração do tratamento, dosagem, intervalo entre doses e via de administração incorreta a erros dos próprios pacientes ao não seguirem estritamente as instruções de uso para o tratamento (WITH et al., 2016). Outro problema é a antibioticoprofilaxia, ocorrendo erros quanto à sua indicação, seleção do antibiótico, momento da administração, à não repetição das doses durante os procedimentos prolongados, à duração

excessiva da profilaxia e ao uso inapropriado de antibióticos de amplo espectro (OLIVEIRA et al., 2011).

Deve-se ter cuidado na atenção à saúde, sobretudo em infecções de menor gravidade, pois nem sempre a etiologia é bacteriana (por exemplo, infecções respiratórias altas de origem viral em crianças), que não necessitam de antimicrobianos ou que se curam facilmente com antibióticos mais comuns e com menor potencial de indução de resistência. Esses microorganismos selecionados podem causar doenças de difícil tratamento dentro das comunidades e hospitais e gerar consequências clínicas, epidemiológicas e econômicas graves (WHO, 2011; KOLLEF et al., 1999). No Brasil, a RDC nº 44/2010 controla a venda de antibióticos, e tende a contribuir tanto para a diminuição do consumo irracional desses medicamentos quanto para a redução da resistência bacteriana (LAXMINARAYAN et al., 2013).

A aquisição de resistência aos antimicrobianos trata-se de um fenômeno genético, resultante da pressão seletiva exercida pelo uso dos mesmos e tem crescido progressivamente, tendo aumentado acentuadamente nos últimos anos (HAWKEY, 2008). A resistência bacteriana é determinada pela expressão de genes de resistência, que individualmente ou em conjunto, determinam o funcionamento dos mecanismos de resistência, maquinarias bioquímicas e/ou estruturais que promovem falha no mecanismo de ação do antibiótico. As bactérias podem expressar resistência intrínseca, ou seja, mecanismos de resistência naturais de um gênero ou espécie bacteriana, ou podem expressar resistência adquirida, originada a partir de mutações nos próprios genes ou pela aquisição de material genético de outras bactérias via conjugação (plasmídeo, transposon), transdução (bacteriófago) ou transformação (ambiente). Esses elementos extra-cromossômicos móveis que carregam genes de resistência são transferidos com facilidade de uma cepa para outra, de uma espécie para outra, ou até mesmo de um gênero a outro (BLAIR et al., 2015).

Os principais mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos são: produção de enzimas que degradam ou modificam antibióticos; (ex: destruição dos agentes beta-lactâmicos pelas enzimas beta-lactamases); a prevenção da acumulação intracelular do antibiótico através da redução da permeabilidade celular ao antibiótico; redução da permeabilidade da membrana externa (ex: resistência da *Pseudomonas aeruginosa* ao imipenem) ou da existência de bombas de efluxo hiperexpressas (ex: resistência das enterobactérias às tetraciclinas); alteração do sítio alvo (de ligação) do antibiótico (ex: resistência intrínseca do *Enterococcus* às cefalosporinas) e

bloqueio ou proteção do sítio alvo do antibiótico (ex: resistência do *Staphylococcus aureus* à meticilina) (HAWKEY, 1998; TENOVER, 2006).

Nas bactérias Gram-negativas, o mecanismo de resistência aos antibióticos mais importante é a produção de enzimas beta-lactamases (HAWKEY; JONES, 2009). As beta-lactamases hidrolisam o anel beta-lactâmico impossibilitando a atividade do antibiótico. Elas apresentam diversidade considerável conforme substrato de ação (antibiótico), origem genética (cromossômica ou plasmidial) e sensibilidade a compostos inibidores da enzima (EDTA e ácido clavulânico). A primeira beta-lactamase foi descrita em 1940 antes mesmo do uso da penicilina para o tratamento de infecções bacterianas (ABRAHAM; CHAIN, 1988). Desde a descoberta e introdução clínica das penicilinas e das sucessivas classes e subclasses de beta-lactâmicos, várias beta-lactamases têm sido descritas (GHAFOURIAN et al., 2015).

As beta-lactamases foram classificadas segundo a estrutura primária (classe A a D – classificação de Ambler) (AMBLER, 1980) e as características funcionais e bioquímicas (grupo I a IV – classificação de Bush-Jacoby-Medeiros) (BUSH; JACOBY, 2010; JACOBY; MEDEIROS, 1991). Enzimas classificadas como classe A ou grupo II, hidrolisam penicilinas e cefalosporinas; classe B ou grupo III, carbapenêmicos; classe C ou grupo I, cefalosporinas; classe D, penicilinas e cloxacilina; e grupo IV são as penicilinases que hidrolisam as penicilinas naturais (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). De acordo com as diferenças em seus mecanismos catalíticos, estas classes ainda podem ser classificadas dentro de dois grupos: serina-beta-lactamases (classes A, C e D) e metalo-beta-lactamases (classe B) (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; ROSSOLINI, 2005).

Durante a década de 80, com a introdução das cefalosporinas de 3ª geração, emergiram cepas com um espectro de resistência estendido frente aos beta-lactâmicos em virtude da expressão de enzimas do tipo ESBL (*Extended-Spectrum Beta-Lactamase*) e/ou AmpC (PITOUT et al., 2005; LIVERMORE; WOODFORD, 2006). Cepas de enterobactérias produtoras de ESBL geralmente apresentam resistência simultânea a outras classes de antimicrobianos como fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, inibidores da síntese de folatos, tetraciclinas e cloranfenicol (PITOUT; LAUPLAND, 2008). Em consequência deste amplo perfil de resistência, aumentou-se o uso dos carbapenêmicos, que são beta-lactâmicos resistentes à ação de ESBL, promovendo uma nova pressão seletiva e a consequente emergência de cepas resistentes aos carbapenêmicos (DESHPANDE et al., 2006).

AmpC é uma serina-beta-lactamase pertencente ao grupo 1 de Bush e à classe C de Ambler e é produzida de forma constitutiva ou induzida, através da expressão de genes cromossomais ou plasmidiais. A produção natural desta enzima tem função biológica na

manutenção da parede bacteriana (PHILIPPON; ARLET; JACOBY, 2002), porém quando o gene cromossomal é induzido por exposição prévia a agentes como ampicilina, cefepime, ceftoxitina, imipenem ou ácido clavulânico, o gene é expresso e consequentemente o isolado apresenta características de produtor de AmpC como hidrólise da maioria dos antimicrobianos beta-lactâmicos, incluindo cefalosporinas, cefamicinas, penicilinas e as combinações com inibidores de beta-lactamases, porém mantém suscetibilidade às cefalosporinas de quarta geração (JACOBY, 2009). Para agravar este cenário, já está descrito um novo tipo de AmpC, o ESAC (*Extended-Spectrum AmpC*) que é capaz de hidrolisar cefalosporinas de quarta geração e carbapenêmicos (PIRES et al. 2015).

Em enterobactérias, as primeiras carbapenemases foram descritas em 1982, do tipo SME-1 (*Serratia marcescens enzyme*), detectada em cepas de *S. marcescens* isoladas de pacientes internados em um hospital de Londres, Inglaterra (YANG; WU; LIVERMORE, 1990); e em 1984, do tipo IMI-1 (*Imipenem-hydrolyzing beta-lactamase*) em uma cepa de *Enterobacter cloacae* recuperada de infecção de ferida de um paciente internado na Califórnia, EUA (RASMUSSEN et al., 1996). Em 1993 foi descrita uma carbapenemase em *Enterobacter cloacae* na França (NAAS; NORDMANN, 1994). No mesmo ano, houve a primeira descrição de ARI-1, mais tarde denominada OXA-23 em *A. baumannii* na Escócia (PATON et al., 1993). Em 1995, no Japão, o gene *bla*_{IMP-1} foi descrito pela primeira vez em uma cepa de *S. marcescens* (ITO et al., 1995) e em 2001 nos EUA, o gene *bla*_{KPC-1} foi encontrado em um isolado de *K. pneumoniae* (YIGIT et al., 2001). Em 2013, no Hospital Universitário da UFGD, foram isoladas cepas de *S. marcescens* portadoras dos genes *bla*_{KPC-2} e *bla*_{IMP-10} (SILVA et al., 2015).

Carbapenemases são enzimas codificadas por genes cromossômicos ou plasmidiais. As carbapenemases adquiridas por plasmídeos possuem destaque na disseminação da resistência aos carbapenêmicos e são divididas em dois grupos: metalo-beta-lactamases (MBL) com potencial para degradar todos os beta-lactâmicos, exceto monobactâmico (aztreonam), elas são: imipenemase (IMP); verona imipenemase (VIM); New Delhi metalo-beta-lactamase (NDM); São Paulo metalo-beta-lactamase (SPM); german imipenemase (GIM); Seoul imipenemase (SIM); e serina-beta-lactamases que tem potencial para degradar todos os beta-lactâmicos, cujo principal exemplo é a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), detectada em diversos gêneros ou espécies de bacilos Gram-negativos, não sendo exclusiva, como pode sugerir o nome, de *K. pneumoniae* (PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010; JACOBY, 2006). Atualmente, as carbapenemases NDM e KPC são os principais problemas relacionados às infecções

hospitalares por bacilos Gram-negativos, pois quase sempre essas bactérias também expressam outros mecanismos de resistência (MELETIS, 2016).

2.1.1. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

KPC é uma betalactamase pertencente à classe A de Ambler e ao subgrupo 2f de Bush (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY, 2010). O primeiro membro da família KPC foi descrito nos EUA em 1991, posteriormente denominado KPC-1 (YIGIT et al., 2001) e em 1998, uma mutação pontual em um aminoácido caracterizou a primeira variante, denominada KPC-2 também descrita em uma cepa de *K. pneumoniae*. A partir de então, relatos de KPC-2 tornaram-se frequentes na Costa Leste dos Estados Unidos e rapidamente se disseminaram, sendo descritos em diversas partes do mundo (SMITH MOLAND et al., 2003).

No Brasil, o primeiro relato de KPC foi em 2005 na cidade de São Paulo, em 2007 foram detectados casos em Recife, em 2008 no Rio de Janeiro e novamente em São Paulo e em 2009 um caso foi registrado em Londrina (BEIRÃO et al., 2011; ABBOUD et al., 2011). Somente em 2011 essas bactérias começaram a causar surtos mais graves no Brasil (CHANG et al., 2013; PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009).

O gene codificador da enzima KPC possui alto potencial de disseminação devido à sua localização em plasmídeo, sendo bastante frequente em bactéria *K. pneumoniae* por que esta apresenta grande capacidade de acumular e transferir genes de resistência (ANVISA, 2010). Essa enzima pode ser produzida por diversos tipos de bactérias e subdividida em grupos numéricos. Existem pelo menos 19 tipos de *bla*_{KPC} conhecidos publicados na literatura ou depositados no GenBank (CENTONZE et al., 2017); KPC-1 a 3 são os mais comuns sendo que KPC-1 é geralmente isolada de cepas de *K. pneumoniae*; KPC-2 em *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella enterica* e *Enterobacter* spp.; KPC-3 em *K. pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* (MONTEIRO et al. 2009; CAI et al., 2008). Também é comumente isolado em *Serratia marcescens* (MATHERS et al., 2011).

O gene *bla*_{KPC} é codificado em um transposon altamente conservado, Tn4401, encontrado em vários replicons diferentes de plasmídeos transferíveis entre espécies, e entre gêneros bacterianos (SIDJABAT et al., 2009). O mesmo já foi encontrado em espécies variadas da família Enterobacteriaceae e até em alguns não fermentadores como *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. (KAZI et al., 2015). No Tn4401, o *bla*_{KPC} é flanqueado pelas sequências de inserção ISKpn7 (*upstream*) e ISKpn6 (*downstream*). Entre ISKpn7 e *bla*_{KPC} pode existir uma deleção de 100 a 200 pares de bases o que determina as variantes do Tn4401. Tn4401a foi o primeiro transposon caracterizado, a partir cepas de *K. pneumoniae* isoladas na França, Grécia

e Estados Unidos, a variante *b* foi caracterizada a partir de *K. pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas na Colômbia e é a variante mais frequente nos Estados Unidos. Tn4401a difere de Tn4401b por uma deleção de 100 pares de bases. Tn4401c foi identificada em *Escherichia coli* isolada na França e difere de Tn4401b por uma deleção de 200 pares de bases (NAAS et al., 2008; NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

2.1.2. Métodos para detecção de carbapenemases:

As metodologias usadas para rastreamento de KPC são diversificadas: focalização isoelétrica, disco-difusão, E-test, teste de Hodge modificado e mCIM (*modified Carbapenem Inactivation Method*) (ANDERSON et al., 2007; CLSI, 2018). O Teste de Hodge Modificado é uma técnica bastante utilizada por ser barata e de fácil execução (PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009) contudo, cepas com resultados de Hodge negativos podem expressar beta-lactamases cromossômicas do tipo AmpC e/ou ESBL associadas também a alterações de permeabilidade nos canais de porinas que modificam a ação e a entrada dos antibióticos nas células (CARVALHAES et al., 2010; DORTET; POIREL; NORDMANN, 2014a). O teste de Hodge não é específico para detecção da carbapenemase do tipo KPC (MEYER; PICOLI, 2011) nem NDM (ROZALES et al., 2014; CLSI, 2018), o teste é apenas preditivo para a ausência ou presença de carbapenemase no geral. Além do que, bactérias produtoras de outras enzimas beta-lactamases, como CTX-M-15 com perda de porinas podem dar resultados falso positivo (GIRLICH; POIREL; NORDMANN, 2011).

O teste mCIM é simples de executar e há várias vantagens sobre os outros testes fenotípicos disponíveis para produção de carbapenemase como boa sensibilidade para a detecção de enzimas das classes A, B e D de Ambler. O mCIM possui sensibilidade e especificidade maiores que 99% para detecção de Enterobacteriaceae produtora de carbapenemase, além de ser confiável na detecção de carbapenemase em *P. aeruginosa* (CLSI, 2018).

A espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo (MALDI-ToF ToF) é outra técnica que permite a detecção de carbapenemases e é altamente específica e sensível e de processamento rápido, porém o custo do equipamento é alto (DORTET; POIREL; NORDMANN, 2014a). O teste Carba NP, que detecta rapidamente a produção de carbapenemases a partir da cultura microbiana, por alteração de cor no indicador de pH após hidrólise de imipenem, se mostra 100% específico e o tempo para leitura pode variar de 15 min a 2 horas, porém este teste exige grande quantidade de massa bacteriana e pode apresentar dificuldade de leitura dos resultados devido a diferentes percepções de cores

(POIREL; NORDMANN, 2015). Adicionalmente, o teste Carba NP não é eficiente para detectar amostras carreadoras de *bla*_{OXA-48-like} (CUNNINGHAM et al. 2017) nem *Proteus mirabilis*, *P. stuartii* e *P. rettgeri* produtores de NDM, apresentando resultados falso-negativos (MAURER et al. 2014).

Nenhum dos métodos citados até o momento indica a classe da enzima carbapenemase, para este fim, existem técnicas que se baseiam na utilização de inibidores de beta-lactamases, como o teste de disco-difusão em ágar no qual é utilizado um disco contendo o carbapenêmico e outro contendo carbapenêmico mais um inibidor da classe B, como o EDTA. Apesar de ser simples, a técnica de disco-difusão é demorada e não consegue detectar bactérias com baixa expressão de metalo-beta-lactamases (DORTET; POIREL; NORDMANN, 2014a; NORDMANN et al. 2011b). A fita de E-test para metalo-beta-lactamases é um teste frequentemente empregado para determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) para carbapenêmicos e possui o mesmo princípio do método anterior, com um gradiente de imipenem em uma ponta e, na outra, um gradiente de imipenem com EDTA, sendo um teste com 94% de sensibilidade e 95% de especificidade (WALSH et al. 2002). No entanto, também possui a desvantagem de não ser capaz de identificar cepas com baixo valor de CIM para carbapenêmicos (DORTET; POIREL; NORDMANN, 2014a).

A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e a qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa por tempo real) são técnicas moleculares capazes de identificar a presença dos genes codificadores das enzimas carbapenemases e classificá-los (ONG et al. 2011). Ambas as técnicas são reconhecidas pela sua alta sensibilidade e pelo alto poder discriminatório, todavia as desvantagens incluem a não detecção de carbapenemases ainda não descritas, equipamentos onerosos e exigência de pessoas treinadas para operação (DORTET; POIREL; NORDMANN, 2014a), além do que a presença do gene não indica que necessariamente o mesmo esteja sendo expresso pela bactéria.

Técnicas moleculares são mais sensíveis para a detecção da KPC e a PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) é considerada padrão ouro para genotipagem devido à sua alta capacidade de diferenciação, baseada na análise do perfil de restrição do DNA genômico por meio de eletroforese. Como desvantagem, para a sua execução são necessários vários dias,

impedindo a tipagem de algumas cepas bacterianas devido à degradação do DNA, além do alto custo para sua execução (LIU et. al., 2018).

2.1.3. Bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemases:

As bactérias multirresistentes pertencem a várias espécies ou grupos de microorganismos, muitas delas residem na microbiota, principalmente na pele e nos intestinos. Entre as espécies Gram-negativas com maior resistência a antimicrobianos estão as enterobactérias: *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens* e os não-fermentadores da glicose: *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (CAI et al., 2008; LIVERMORE; WOODFORD, 2006). As cepas bacterianas pertencentes à família Enterobacteriaceae têm ganhado destaque por estarem relacionadas a surtos de infecções hospitalares em todo mundo, inclusive no Brasil, e muitas delas são produtoras de enzimas carbapenemases (PAULA et al., 2016).

As bactérias da família Enterobacteriaceae ou enterobactérias são anaeróbicas facultativas, compostas por bacilos Gram-negativos, não esporulados, fermentadores da glicose e redutores de nitrato. São amplamente encontradas na natureza, porém a maioria habita os intestinos do homem e dos animais, seja como membros da microbiota normal ou como agentes de infecção (KONEMAN et al., 2001). As enterobactérias são prevalentes nas infecções hospitalares quando comparadas aos não-fermentadores e Gram-positivos e estão associadas a altos índices de resistência aos antimicrobianos. Estudos multicêntricos têm destacado as espécies *E. coli* e *K. pneumoniae*, seguidas pelo gênero *Enterobacter*, como as enterobactérias mais prevalentes causadoras de infecções em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) na América do Sul (FEDLER; BIEDENBACH; JONES, 2006, RHOMBERG; JONES, 2009, BANERJEE; HUMPHRIES, 2017).

K. pneumoniae é um dos principais responsáveis por infecções hospitalares, tanto exógenas quanto decorrentes da colonização dos pacientes, atrás apenas de *E. coli*, e tem como principais quadros de infecção: pneumonia, septicemia, infecção do trato urinário e abscessos, especialmente em pessoas imunocomprometidas (JIAO et al., 2015). No Brasil, 16,9% das infecções em UTI são causadas por *K. pneumoniae* (DE MAIO CARRILHO et al., 2016) e no ano de 2017 no Hospital Universitário da UFGD, 113 isolados de culturas de infecções bacterianas de pacientes internados foram positivas para *K. pneumoniae* de um total de 1143 culturas positivas para bactérias (10%), incluindo todos os setores de internação, sendo dessas, 49 produtoras de carbapenemase (43%). Nas UTIs – UTIs adulto A e B, UTI pediátrica e UTI

neonatal, ocorreram 36 (10%) culturas com isolamento de *K. pneumoniae* de um total de 361 culturas positivas para bactérias, sendo 21 delas produtoras de carbapenemase (58%) (tabela 1).

Tabela 1. Frequência de isolados bacterianos por espécie e por perfil de resistência no Hospital Universitário da UFGD no ano de 2017.

	Bactérias										Total
	<i>K. pneumoniae</i>		<i>S. marcescens</i>		<i>Enterobacter spp.</i>		<i>A. baumannii</i>		<i>P. aeruginosa</i>		
	Total	R	Total	R	Total	R	Total	R	Total	R	
Hospital	113	49	6	0	30	11	44	43	68	46	2244
UTIs	36	21	2	0	10	7	33	33	30	18	361

Legenda: UTIs: UTIs adulto A e B, UTI pediátrica e UTI neonatal; R: resistência a carbapenêmicos. Tabela elaborada pelo autor.

Fatores de virulência de cepas de *K. pneumoniae* incluem formação de biofilme, cápsula, lipopolissacarídeo, adesinas fimbriais e não fimbriais e sistema de coleta de ferro por sideróforos que auxiliam no processo de patogênese desse micro-organismo. A abundante cápsula polissacarídica que normalmente circunda *K. pneumoniae* protege contra a ação bactericida e prejudica a fagocitose, e pode ser considerado como o mais importante determinante de virulência de *K. pneumoniae* (RAMIREZ et al., 2014). A superprodução da cápsula em *K. pneumoniae* deu origem à variante chamada *K. pneumoniae* hipervirulenta e hiper mucoviscosa (hvKP) que é capaz de causar infecções graves e com disseminação metastática pela corrente sanguínea, disseminação essa facilitada devido ao fenótipo hiper mucoso que confere resistência à fagocitose (BRISSE et al., 2009; LIN et al., 2004). Um estudo de vigilância nos Estados Unidos analisou 758 isolados Gram-negativos, e *K. pneumoniae* foi colocada em primeiro lugar como portadora do gene *bla_{KPC}*, ficando o *Enterobacter spp.* em segundo lugar (LANDMAN et al., 2011). A perspectiva de um patógeno hipervirulento que é capaz de causar infecção grave em indivíduos saudáveis e ambulatoriais é preocupante. Se adicionarmos a probabilidade de que as cepas irão adquirir resistência pan-antimicrobiana no futuro, o cenário se torna devastador.

No Brasil, o gênero *Enterobacter* é responsável por 7,9% das infecções hospitalares em pacientes das UTIs (SADER et al., 2005). As duas espécies mais conhecidas, *E. aerogenes* e *E. cloacae* são frequentes patógenos associados a infecções relacionadas à assistência à saúde de pacientes de terapia intensiva em ventilação mecânica (MEZZATESTA; GONA; STEFANI, 2012). Essas espécies possuem um fenótipo particular que confere versatilidade e virulência atribuídas à aquisição horizontal de genes adicionais provindos de outras espécies de

Enterobacteriaceae - elementos móveis que rapidamente se integram e são traduzidos tão facilmente quanto sua herança ancestral (DIENE et al., 2013). Os genes flagelares e seu sistema de montagem foram adquiridos em bloco do gênero *Serratia*. *E. aerogenes* contém oito operons RNAr e 87 RNAt associados com a capacidade de traduzir genes importados que usam diferentes códons, melhorando sua capacidade de usar seus genes estranhos integrados (MEZZATESTA; GONA; STEFANI, 2012). Devido à facilidade de troca de material genético, incluindo genes codificadores de enzimas como ESBL e carbapenemases nesta espécie, *E. cloacae* tornou-se a terceira espécie envolvida em infecções hospitalares após *E. coli* e *K. pneumoniae* (KIFFER et al., 2005; POTRON et al., 2013).

Tanto *K. pneumoniae* quanto *Enterobacter* spp. fazem parte de um grupo de patógenos que foi chamado ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter*). Esses patógenos são os agentes causadores da maioria das infecções hospitalares e “escapam” do tratamento antimicrobiano através da multirresistência (BOUCHER et al., 2009).

Serratia spp. são micro-organismos onipresentes no meio ambiente e são encontrados na água e no solo, bem como associados a plantas, insetos, humanos e outros animais. Têm sido isolados como agentes etiológicos em todos os tipos de infecção, incluindo trato respiratório, trato urinário, septicemia, meningite e infecções de ferida (HEJAZI; FALKINER, 1997). Fatores de patogenicidade marcantes em *Serratia* spp. são formação de fímbrias, produção de potentes sideróforos, presença de antígenos da parede celular, capacidade de resistir à ação bactericida do soro animal e produção de proteases, lipases, DNases e quitinases (PETERSEN; TISA, 2014; GRIMONT; GRIMONT, 2006). Outra característica importante de *Serratia* spp. é a sua resistência intrínseca e adquirida aos antimicrobianos, necessitando uso de antibióticos geralmente mantidos em reserva, como a polimixina B (LIU et al., 2016).

Em 2013 foi caracterizado um surto por *S. marcescens* produtora da carbapenemase KPC-2 e da metalo-beta-lactamase IMP-10 no Hospital Universitário da UFGD no qual a mortalidade dos pacientes foi de 100%. Porém a alta taxa de mortalidade entre esse grupo de pacientes não pôde ser atribuído unicamente à presença de *S. marcescens* co-produtoras de KPC-2 e IMP-10, podendo estar relacionada conjuntamente com condições clínicas desfavoráveis desses pacientes (SILVA et al., 2015). Muitos dos isolados clínicos deste organismo carregam determinantes genéticos cromossômicos e codificados por plasmídeos conferindo resistência a uma ampla gama de antibióticos (MAHLEN, 2011). A espécie mais clinicamente relevante do gênero é *S. marcescens* que possui a capacidade de sobreviver e

crescer sob condições extremas, inclusive em desinfetantes, anti-sépticos e água bidestilada (ŠIŠIRAK; HUKIĆ, 2013).

Os bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose constituem um grupo extremamente diverso, são estritamente aeróbios, não esporulados e se caracterizam pelo fato de serem incapazes de utilizar carboidratos como fonte de energia por meio de fermentação, degradando-os pela via oxidativa (KONEMAN et al., 2001). As infecções por essas bactérias se tornaram mais preocupantes em instituições hospitalares a partir da década de 1970, são agentes oportunistas, porém de difícil tratamento devido a apresentarem resistência a um grande número de antimicrobianos (SANTOS, 2004). Os principais representantes são *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Burkholderia cepacia* (FALAGAS; KOPTERIDES, 2006), sendo os dois primeiros mais comuns de portarem genes de resistência (KAZI et al., 2015).

P. aeruginosa causa uma ampla gama de infecções agudas e crônicas e morte prematura em pacientes com queimaduras graves, transplantes de órgãos, fibrose cística, AIDS e câncer (QUINN, 1998). Possui uma grande capacidade de adaptação, múltiplos fatores de virulência, processos fisiopatológicos complexos gerando uma grande diversidade de doenças associadas a este organismo e complicando as estratégias terapêuticas, com a ocorrência de cepas que exibem um alto nível de resistência a várias classes de antibióticos (LEE et al., 2006).

A. baumannii é comumente encontrada no solo, na água e no esgoto, mas emergiu como um importante patógeno nosocomial nos últimos anos (SMITH et al., 2007). É o agente causador de uma variedade de infecções humanas, incluindo infecções de pele, pneumonia, septicemia e infecções do trato urinário. Esta bactéria consegue entrar facilmente no corpo humano através de feridas abertas, cateteres intravasculares e ventiladores mecânicos. Infecções causadas por *A. baumannii* estão associadas particularmente com períodos prolongados de hospitalização (PELEG et al., 2008). Conhecido por ser suscetível à maioria dos antibióticos na década de 1970, esta bactéria desenvolveu resistência aos agentes antimicrobianos comumente usados hoje em dia. Em 2007, até 70% dos isolados (dependendo do país, hospital, departamento médico e amostra clínica) foram caracterizados como multirresistentes, incluindo resistência a carbapenêmicos (KEMPF; ROLAIN, 2012). A

disseminação de cepas multirresistentes entre pacientes hospitalizados e a ocorrência de surtos se tornaram uma causa crescente de preocupação (DIJKSOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007).

2.2. Tratamento farmacológico das infecções causadas por bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemases:

Como a resistência adquirida à maioria das classes de agentes antimicrobianos comercialmente disponíveis é freqüente, bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemases têm sido denominadas “superbactérias” (KAISER et al., 2018) e para o tratamento das infecções causadas por elas, polimixinas, antibióticos polipeptídicos catiônicos, classificados pelas letras A a E, desenvolvidos há mais de 50 anos foram reconsiderados como opção terapêutica valiosa (KADAR et al., 2013). Elas possuem um espectro antimicrobiano limitado, atuando contra Gram-negativos (BERGEN et al., 2012), porém inclui a maioria das Enterobacteriaceae clinicamente relevantes e espécies não fermentadoras: *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. (FALAGAS; KASIAKOU, 2005; ZAVASCKI et al., 2007). Bactérias Gram-positivas, anaeróbios e alguns Gram-negativos: *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii*, *Serratia* spp. e *Burkholderia cepacia*, são intrinsecamente resistente às polimixinas (KWA; TAM; FALAGAS, 2008).

As polimixinas são moléculas lipopeptídicas anfipáticas derivadas dos produtos de fermentação da bactéria *Paenibacillus polymyxa* (STANSLY; SHEPHERD; WHITE, 1947). Cinco diferentes polimixinas (A, B, C, D e E) foram originalmente isoladas e descritas de forma independente em 1947 por pesquisadores norte-americanos e ingleses, mas apenas polimixina B e polimixina E (colistina), esta sintetizada de forma não ribossômica por *Bacillus polymyxa* subespécie *colistinus* Koyama (KOYAMA et al., 1950) estão disponíveis para uso clínico em virtude da alta toxicidade das demais (FALAGAS; KASIAKOU, 2005). A colistina diferencia-se da polimixina B pela presença do aminoácido D-leucina no lugar de D-fenilalanina na posição 6. Polimixina B e colistina possuem o mesmo mecanismo de ação, padrão de efeitos adversos semelhantes (HOEPRICH, 1970; REED et al., 2001) e existe resistência cruzada entre ambas (GROISMAN; KAYSER; SONCINI, 1997). Quanto à atividade antibacteriana, a polimixina B apresenta melhores resultados que a colistina contra *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. (WRIGHT; WELCH, 1959).

A colistina foi inicialmente usada no Japão e Europa durante a década de 1950 e em 1959, nos Estados Unidos, começou a ser utilizada sob a forma de colistimetato de sódio (CMS) (REED et al., 2001). O CMS é um derivado da colistina obtido através da reação com

formaldeído e bissulfito de sódio e seu efeito bactericida depende da metabolização *in vivo* para formar colistina. Após a administração, o CMS, até então inativo, é convertido em colistina e ambas as formas circulam pelo organismo (BERGEN et al., 2006). Este derivado é menos potente em comparação com o composto original e parece causar menos efeitos adversos (FALAGAS; KASIAKOU, 2005).

A polimixina B é disponível em formulações parenterais e pode ser administrada por via intravenosa, intramuscular ou intratecal, além de ser amplamente utilizada em soluções oftálmicas e para colistina, duas formas são comercialmente disponíveis - o CMS, utilizado para administração parenteral, e o sulfato de colistina, administrado por via oral ou tópica (REED et al., 2001). No entanto, as formulações de polimixina B e colistina foram gradualmente abandonadas na maior parte do mundo no início dos anos 80 por causa da alta incidência relatada de nefrotoxicidade e neurotoxicidade (KOCH-WESER et al., 1970).

A toxicidade renal inclui principalmente necrose tubular aguda manifestada como diminuição do clearance de creatinina e aumento dos níveis séricos de ureia e creatinina e a toxicidade neurológica está associada com tontura, fraqueza, parestesia facial periférica, vertigem, distúrbios visuais, confusão, ataxia e bloqueio neuromuscular (KOCH-WESER et al., 1970). Nefro e neurotoxicidades são consideradas dose-dependente e geralmente são reversíveis após a descontinuação da terapia (KELESIDIS; FALAGAS, 2015).

O mecanismo de ação das polimixinas envolve interações eletrostáticas entre o polipeptídeo catiônico e as moléculas aniônicas do lipopolissacarídeo (LPS) e esta ligação desloca cálcio e magnésio da membrana celular externa das bactérias Gram-negativas levando à permeabilidade e alterações na membrana externa, onde ocorrem rupturas transitórias que permitem vazamento de conteúdo celular e, o mais importante, a entrada do próprio antibiótico, levando à morte celular (DAVIS; IANNETTA; WEDGWOOD, 1971; HERMSEN; SULLIVAN; ROTSCHAFFER, 2003; NEWTON, 1956).

As bactérias Gram-negativas estão demonstrando recentemente uma grande capacidade de adquirir resistência às polimixinas (SON et al., 2018). O mecanismo mais comum para essa resistência envolve a alteração do LPS (alvo de ligação primário das polimixinas) que pode ser dar por adição covalente de fosfoetanolamina (PEtN) ou 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-ara-4-N) ao lípido A do LPS, modificações essas que reduzem a carga negativa da membrana externa, mediadas principalmente pelos sistemas regulatórios de dois componentes *PmrA* / *PmrB* e *PhoP* / *PhoQ* (RAETZ et al., 2007). Como o primeiro passo da ação das polimixinas envolve uma interação eletrostática entre a carga positiva dos resíduos moleculares da polimixina e os grupos fosfato carregados negativamente do lípido A, ao reduzir essa carga

líquida da membrana externa, a célula bacteriana é capaz de evitar a atração eletrostática inicial da molécula de polimixina em sua superfície (VELKOV et al., 2013).

Outro mecanismo de resistência às polimixinas foi descrito em *K. pneumoniae*, no qual a mutação do gene *mgrB* resulta na desrepressão do *PhoP / PhoQ*, com subsequente aumento da modificação do lipídio A (CANNATELLI et al., 2013). Ainda, em *A. baumannii*, foi relatada resistência às polimixinas devido à perda completa de LPS por mutações em três genes, *lpxA*, *lpxC* e *lpxD* (MOFFATT et al., 2011). Outras estratégias menos comuns que mediam a resistência à polimixina incluem a utilização de bombas de efluxo e formação de cápsulas pelas bactérias (LLOBET; TOMAS; BENGOCHEA, 2008; PADILLA et al., 2010).

2.3. Plantas medicinais:

A resistência bacteriana ocorre em ritmo crescente nos diferentes patógenos Gram-positivos e Gram-negativos e representa um grande desafio terapêutico. Considerando o aumento de bactérias multirresistentes devido ao uso de antimicrobianos, a OMS reconhece o potencial terapêutico das plantas e seus derivados e seu uso associado com drogas antimicrobianas para inibir ou intensificar o efeito terapêutico dos medicamentos convencionais (WHO, 2002). Ao mesmo tempo em que há pressões para utilização de antibióticos cada vez mais eficazes, também existe a necessidade, por fatores como custo e principalmente resistência microbiana, da seleção e uso do antimicrobiano correto para a infecção a ser tratada (WANNMACHER, 2004). Com o aumento da resistência bacteriana a múltiplas drogas surge uma grande preocupação e a procura de novas alternativas terapêuticas. As plantas medicinais representam uma importante fonte para obtenção destes medicamentos. A atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais vem sendo comprovada em vários estudos realizados no Brasil (HOLETZ et al. 2002; NOVAIS et al. 2003; LIMA et al., 2006; PORFÍRIO et al. 2009; CANTON; ONOFRE, 2010).

A OMS define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” (WHO, 2002). Medicamentos obtidos a partir de plantas têm uma posição respeitável nos dias de hoje, principalmente nos países em desenvolvimento, onde a disponibilidade de serviços de saúde é limitada (AGRA; FREITAS;

BARBOSA-FILHO, 2007). Cerca de 85% desta população utiliza plantas ou preparações destas nos seus cuidados primários (MACIEL et al. 2002; WHO, 2011).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do planeta e possui uma rica diversidade étnica e cultural com um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, tendo assim o potencial necessário para o desenvolvimento de pesquisas com resultados promissores (FRANÇA et al., 2008). As espécies vegetais para estudo farmacológico podem ser selecionadas com base no uso tradicional, levando-se em consideração seu conteúdo químico e toxicidade (MORENO et al., 2013).

Em 1991, a OMS reforçou a importância da medicina tradicional para as populações com pouco acesso aos sistemas de saúde e solicitou que fosse intensificada a cooperação entre praticantes da medicina tradicional e da assistência sanitária moderna, principalmente com relação ao emprego de remédios tradicionais de eficácia científica demonstrada. Sugeriu também que os produtos naturais, em particular os derivados de plantas, poderiam conduzir ao descobrimento de novas substâncias terapêuticas. A política para o uso de plantas medicinais no serviço público no Brasil foi estabelecida através da Portaria nº. 971 de 03 de maio de 2006 que aprovou, na forma de Anexo, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde – SUS (BRASIL, 2006a) e também através do Decreto nº. 5813 de 22 junho de 2006 que aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) no país (BRASIL, 2006b).

As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e para o desenvolvimento de novos medicamentos, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 1998). Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, sendo 25% de plantas, 12% de micro-organismos e 3% de animais (CALIXTO, 2000). No caso de certas classes de produtos farmacêuticos, como medicamentos antitumorais e antimicrobianos, essa porcentagem pode ser maior que 60% (WHO, 2011).

No Brasil, um número significativo de extratos brutos e óleos essenciais de plantas é usado popularmente para tratar infecções comuns. Alguns dos constituintes isolados de folhas, raízes, flores e frutos (flavonóides, taninos, alcalóides, cumarinas e terpenos) são os principais responsáveis por medicamentos com ações analgésicas, antiinflamatórias, antivirais, hipoglicemiantes, antiespasmódicas, antialérgicas e antimicrobianas (HEINRICH et al., 2003). Embora nem todos possuam evidências científicas comprovando sua eficácia, muitos estudos

apresentam resultados *in vitro* ou em animais, mas não em humanos (LIMA et al. 2006). Atualmente há uma intensa busca para a caracterização antimicrobiana das plantas já que os antibióticos vegetais possuem estruturas químicas que podem regular o metabolismo intermediário de patógenos, ativando ou bloqueando reações e síntese de enzimas ou até mesmo alterando a estrutura das membranas (DIAZ et al., 2010; MICHELIN et al. 2005).

As potencialidades de uso das plantas medicinais encontram-se longe de estar esgotadas, surgem sempre novas necessidades, como a multirresistência microbiana, e soluções podem ser encontradas no reino vegetal por meio da descoberta e do desenvolvimento de novas moléculas com atividade terapêutica.

2.3.1. Óleos essenciais

Óleos essenciais são compostos aromáticos, voláteis que podem ser extraídos de raízes, caules, folhas, flores ou de todas as partes de plantas aromáticas. Essas extrações podem ocorrer por destilação de arraste a vapor, que é a técnica mais empregada, compressão de vegetais ou uso de solventes. A principal característica do óleo essencial é a volatilidade, diferindo-se, assim, dos óleos fixos, obtidos geralmente de sementes (OUSSALAH et al., 2007).

Como características, o óleo essencial possui um odor distinto segregado pelas glândulas das plantas aromáticas, aparência oleosa à temperatura ambiente, aroma agradável e intenso na maioria dos óleos e solubilidade em solventes orgânicos apolares. Em água apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são denominadas hidrolatos; de sabor geralmente acre e picante; quando recentemente extraídos são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados; em geral não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, calor, luz, umidade e metais; a maioria possui índice de refração e são opticamente ativos; estrutura química formada por carbono, hidrogênio e oxigênio, dando origem a complexa mistura de substâncias, que podem ser várias centenas, havendo predominância de uma a três substâncias que caracterizam a espécie vegetal em questão, seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, e até compostos com enxofre, cada qual com sua característica aromática e ação bioquímica (DHIFI et al., 2016).

Os constituintes químicos encontrados no reino vegetal são sintetizados e degradados por inúmeras reações anabólicas e catabólicas, que compõem o metabolismo das plantas, o qual está dividido em metabolismo primário e secundário. O primário é responsável pela síntese de substâncias químicas destinadas às funções vitais como crescimento e desenvolvimento do

organismo, estando entre elas: celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e seus polímeros derivados (VON POSER; MENTZ, 2003).

O metabolismo secundário caracteriza-se pela produção, transformação e acúmulo de inúmeras substâncias que ainda não possuem suas funções fisiológicas completamente determinadas e que aparentam não ter grande utilidade na sobrevivência das espécies, porém garantem vantagens e perpetuação da espécie em seu ecossistema como defesa da planta contra predadores, defesa contra os micro-organismos, atração de insetos e agentes fecundantes (PANDEY et al., 2017). São substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número limitado de organismos, sendo a bioquímica e o metabolismo correspondentes específicos e únicos, caracterizando-se como elementos de diferenciação e especialização (FERRO, 2006) e podem ser utilizados para a terapêutica humana (JIRSCHITZKA et al., 2012).

Os metabólitos secundários podem ser encontrados em diferentes tecidos e órgãos da planta, entretanto, alguns fatores podem interferir na concentração e na distribuição do composto no vegetal, tais como: parâmetros climáticos e fatores agrônômicos como fertilização, irrigação, colheita e sazonalidade, intensidade luminosa, temperatura, umidade, disponibilidade de nutrientes e tipo de solo, além do período do dia da coleta, localização geográfica e forma de uso *in natura* ou desidratada e especialmente a fase de desenvolvimento da planta na data da colheita (KERROLA; GALAMBOSI; KALLIO, 1994).

O uso dos óleos essenciais ainda é bastante limitado e engloba mais o domínio de cosméticos e perfumaria (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). É importante desenvolver uma melhor compreensão de suas propriedades biológicas e componentes individuais para novas aplicações como terapias alternativas ou complementos aos compostos sintéticos da indústria química, principalmente com relação ao crescente problema da multirresistência bacteriana aos antimicrobianos disponíveis comercialmente.

No âmbito da microbiologia, os óleos essenciais já demonstraram propriedades antissépticas, antibacterianas, antivirais e antifúngicas (BARBOSA et al., 2015). Portanto, eles são uma ferramenta poderosa para contornar a resistência microbiana (STEFANAKIS et al., 2013). Com relação à atividade que esses compostos desempenham nos micro-organismos, uma característica que se destaca nos óleos essenciais é sua hidrofobicidade, que permite interação com os lipídios da membrana celular das bactérias, perturbando a estrutura, tornando-a mais permeável e levando a vazamento de íons e outras moléculas celulares (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1994). Embora, o extravasamento de componentes celulares possa ser tolerado

sem perda de viabilidade, uma maior perda de conteúdo celular ou perda de moléculas críticas e íons pode levar à morte celular (NAZZARO et al., 2013).

Óleos essenciais e/ou seus constituintes podem ter um único alvo ou múltiplos alvos para exercer sua atividade antimicrobiana. Os mecanismos de ação dos óleos essenciais e/ou seus componentes dependem de sua composição química. Por exemplo, o timol e o carvacrol têm efeitos antimicrobianos semelhantes, mas possuem diferentes mecanismos de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (DORMAN; DEANS, 2000). A localização de um ou mais grupos funcionais nessas moléculas pode afetar sua atividade antimicrobiana. Desvendar o mecanismo de ação dos óleos essenciais requer estudo tanto da matéria-prima quanto dos componentes singulares e o modo de ação deve ser estudado em múltiplas linhagens e espécies de micro-organismos.

2.3.2. *Cinnamomum* sp.

A canela é uma especiaria tropical asiática nativa do Sri Lanka (JAYAPRAKASHA; RAO, 2011) obtida da casca interna de várias árvores do gênero *Cinnamomum* (SHREAZ et al., 2016). É uma laurácea de casca espessa e rugosa e aroma delicado, às vezes picante e açucarado. Muito utilizada na China e no norte da Índia, onde quase toda sua produção é absorvida, seja como condimento ou medicamento. É uma planta com folhas persistentes, atinge cerca de 3 metros de altura, seu tronco exterior é rugoso e castanho-acizentado e a casca interna é mais lisa e castanho-avermelhada. A colheita da casca é realizada na estação das chuvas e esta é colocada para secar em esteiras ou redes posteriormente, na época da seca, então essas cascas se curvam tomando a forma de pequenos canudos, classificados em função de seu comprimento, cheiro e cor. É amplamente utilizada na culinária como condimento e também como aditivo alimentar e agente aromatizante (BERALDO et al., 2013; MORITZ et al., 2015). O sabor e aroma intensos vêm do aldeído cinâmico ou cinamaldeído (3-fenil-2-propenal) (LIMA et al., 2005).

Existem várias espécies de canela que são usadas, não só na culinária, mas também em medicamentos tradicionais e modernos (RAO; GAN, 2014). As cascas e folhas são comumente usadas para tratar vários distúrbios e são conhecidas por exercerem propriedades antibacterianas (ALVES et al., 2016; MELO et al., 2015), antifúngicas (WANG; CHEN; CHANG, 2005), antioxidantes (MATHEW; ABRAHAM, 2006), antidiabéticas (LU et al., 2011), anti-inflamatórias (TUNG et al., 2008; TUNG et al., 2010), nematocidas (KONG et al., 2007), efeitos inseticidas (CHENG et al., 2009) e anticancerígenos (KOPPIKAR et al., 2010).

Aproximadamente 250 espécies foram identificadas no gênero *Cinnamomum*, com distribuição em todo o mundo (VANGALAPATI et al., 2012). Os óleos essenciais de canela mais importantes pertencem às espécies *C. burmannii*, *C. camphora*, *C. cassia*, *C. osmophloeum*, *C. verum* e *C. zeylanicum* (BARCELOUX, 2009). Os fabricantes de produtos farmacêuticos usam óleos de canela de Ceilão (óleo de canela) e canela chinesa (óleo de cássia) sem distinção entre eles (JAYAPRAKASHA; RAO, 2011).

A canela, como outras plantas, possui uma ampla variedade de metabólitos secundários e alguns exibem propriedades antibacterianas (NAZZARO et al., 2013; LANGEVELD; VELDHUIZEN; BURT, 2014). Estes compostos incluem cinamaldeído, cinamato, ácido cinâmico (VANGALAPATI et al., 2012; SENANAYAKE; LEE; WILLS, 1978) e uma ampla gama de óleos essenciais, tais como trans-cinamaldeído, acetato de cinamila, eugenol, L-borneol, cânfora, óxido de cariofileno, b-cariofileno, L-bornil acetato, E-nerolidol, α -cubebeno, α -terpineol, terpinoleno e α -thujeno (TUNG et al., 2008; TUNG et al., 2010). A quantidade e a presença de cada composto varia dependendo da parte da planta da qual foi extraído o óleo essencial (RAO; GAN, 2014).

O trans-cinamaldeído (TC), um aldeído insaturado, mostrou ser o principal responsável pela atividade antibacteriana da canela, sendo o grupo acroleína (parte carbonila alfa,beta-insaturada) essencial para a atividade dessas moléculas (BAE; JI; PARK, 1992). É aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*), tem sido amplamente utilizado em alimentos e cosméticos (LEE; BALICK, 2005) e foi considerado pouco tóxico para os seres humanos (SHEN et al., 2015). Porém, ainda é preciso estudar mais sobre qual a melhor maneira de usufruir farmacologicamente dessa atividade antimicrobiana, já que alguns estudos demonstraram a instabilidade do TC quando exposto ao ar, uma vez que ele é prontamente oxidado em ácido cinâmico, levando à perda volátil (SMITH et al., 2000). Além disso, *in vivo*, a decomposição também pode ocorrer antes que seja capaz de realizar atividade bactericida, pois o TC absorvido pode rápida e irreversivelmente se tornar ácido cinâmico através de catálise enzimática, se tornando instável no sangue (YUAN et al., 1992).

Com relação aos componentes menores, um efeito antibacteriano foi relatado para o metoxicinamaldeído, enquanto a cumarina, o acetato de cinamila e o benzaldeído mostraram ter baixo ou nenhum efeito antibacteriano (CHANG; CHEN; CHANG, 2001; YANG et al., 2012). Sabe-se que a mistura de diferentes constituintes pode resultar em efeitos sinérgicos ou aditivos; apesar de estar presente em níveis baixos ou não ter efeito antibacteriano quando usado isoladamente, é possível que esses componentes menores possam aumentar o efeito do TC ou ter outros alvos de ação nas células bacterianas (BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

2.4. Interação de plantas medicinais com drogas antimicrobianas:

Com a urgente necessidade de procurar novas classes de substâncias antibacterianas, especialmente a partir de fontes naturais, uma nova forma de terapia é a utilização da combinação sinérgica entre agentes antimicrobianos conhecidos e produtos naturais economicamente viáveis. Essa combinação pode expandir o espectro antimicrobiano, contornar o aparecimento de resistências, proporcionar uma maior atividade antibacteriana, diminuir os efeitos colaterais adversos, aumentar a biodisponibilidade e minimizar a toxicidade dos antibióticos devido à redução da dose necessária para o tratamento (CHANDRA; RAKHOLIYA, 2011). Assim sendo, o efeito potencializado dessas associações pode servir como nova estratégia para tratamento de infecções, possibilitando o uso de drogas antimicrobianas quando esta de forma isolada não se apresentar eficaz sobre determinadas linhagens bacterianas (KUMAR et al. 2009).

Novas drogas antimicrobianas combinadas que incluem produtos naturais surgiram, nos últimos anos, como uma prioridade de pesquisa (VAN VUUREN; VILJOEN, 2011) e existem vários estudos mostrando essa possibilidade com extratos e óleos essenciais de *Cinnamomum* spp.. O óleo essencial de *C. zeylanicum* possui sinergia com amicacina, gentamicina, imipenem e meropenem contra *Acinetobacter baumannii* (GUERRA et al., 2012) e se mostrou promissor em combinação com a colistina, uma droga atualmente usada para o tratamento de infecção por bactéria Gram-negativa produtora de carbapenemase (UTCHARIYAKIAT et al., 2016). O óleo essencial de *C. burmannii* apresentou sinergia com a gentamicina contra *Staphylococcus epidermidis* (NURYASTUTI et al., 2009) e o óleo essencial de *C. verum* demonstrou o potencial de reverter a resistência de *E. coli* portadora do gene da beta-lactamase TEM-1 à piperacilina. No estudo citado, as imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram alterações na superfície celular bacteriana tratada atribuídas à ruptura da membrana celular seguida por perda de material intracelular. As células tratadas somente com óleo essencial de *C. verum* mostraram uma superfície corrugada, enquanto o tratamento em combinação com piperacilina mostrou grande dano com mudanças no tamanho e na forma das células (YAP et al., 2015).

O TC diminuiu a CIM da clindamicina para o *Clostridium difficile* em 16 vezes (SHAHVERDI et al., 2007). O possível mecanismo foi a inibição de um sistema de bomba de efluxo de múltiplas drogas (CdeA) identificado nesta bactéria. O TC também age sinergicamente com ampicilina, bacitracina, clindamicina, eritromicina, novobiocina, penicilina, estreptomicina, sulfametoxazol e tetraciclina para várias espécies Gram-negativas e Gram-positivas (SHAHVERDI et al., 2007; KOLLANOOR JOHNY; HOAGLAND;

VENKITANARAYANAN, 2010; PALANIAPPAN; HOLLEY, 2010). Um efeito sinérgico de TC com estreptomicina foi descrito contra *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium*. As combinações sinérgicas tiveram atividades antibiofilme mais fortes do que os componentes individuais e causaram uma redução no número de bactérias viáveis. Imagens de microscopia de fluorescência demonstraram que a arquitetura dos biofilmes de ambas as linhagens exibia poucos agregados celulares e estavam dispersos. O TC pode inibir o sistema *quorum-sensing* e influenciar a expressão de genes relacionados ao biofilme. O tratamento combinado de antibióticos e óleo essencial de canela danifica os biofilmes e permite o fácil acesso dos antibióticos à célula bacteriana (LIU et al., 2015).

Pesquisas sobre combinações antimicrobianas podem fornecer novas maneiras de combater a incidência cada vez maior de infecções bacterianas resistentes a múltiplas drogas. Para melhorar a eficácia dos antibióticos, é necessário estudar os mecanismos de ação dos produtos naturais, os quais melhoram a difusão dos antibióticos e permeabilizam a membrana bacteriana, que é responsável pela resistência geral aos antibióticos nas bactérias (BOLLA et al., 2011). Embora haja um número considerável de estudos sobre a ação antimicrobiana de plantas medicinais e da canela ou de seus constituintes na literatura, poucos investigaram seus efeitos em bactérias multirresistentes como as Gram-negativas produtoras de carbapenemases (UTCHARIYAKIAT et al., 2016; YAP et al., 2015; GUERRA et al., 2012). A detecção precisa do genótipo de carbapenemases e outras enzimas de resistência, o entendimento dos mecanismos de resistência bacteriana e dos mecanismos de novos agentes antimicrobianos ajudarão a minimizar a disseminação e a evolução da resistência, reduzir as consequências do uso de antibióticos e possivelmente permitir o controle futuro de infecções causadas por esses patógenos extremamente resistentes.

3 OBJETIVOS

GERAL:

Avaliar a atividade antibacteriana e os mecanismos de ação do óleo essencial de *Cinammomum cassia* (L.) em bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemases.

ESPECÍFICOS:

- Caracterizar fenotípica e molecularmente os mecanismos de resistência das cepas bacterianas estudadas;
- Testar *in vitro* o óleo essencial de *Cinammomum cassia* (L.) contra bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemase;
- Testar se há sinergismo entre o óleo essencial de *Cinammomum cassia* (L.) e antibióticos disponíveis comercialmente;
- Investigar possíveis mecanismos de ação do óleo essencial de *Cinammomum cassia* (L.) nas cepas bacterianas estudadas.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOUD, C.S.; BERGAMASCO, M.D.; DOI, A.M.; ZANDONADI, E.C.; BARBOSA, V.; CORTEZ, D.; SARAIVA, C.R.; DOY, C.; GARCIA, D.O. First report of investigation into an outbreak due to carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary Brazilian hospital, with extension to a patient in the community. **Journal of Infection Prevention**, vol. 12, n. 4, p. 150-153, 2011.
- ABRAHAM, E.P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 677-678, 1988.
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.17, p.114-140, 2007.
- AMBLER, R.P. The structure of beta-lactamase. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 289, n. 36, p. 321-331, 1980.
- ANDERSON, K.F.; LONSWAY, D.R.; RASHEED, J.K.; BIDDLE, J.; JENSEN, B.; MCDUGAL, L.K.; CAREY, R.B.; THOMPSON, A.; STOCKER, S.; LIMBAGO, B.; PATEL, J.B. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2723-2725, 2007.
- ANDRADE, D.; LEOPOLDO, V.C.; HAAS, V.J. Ocorrência de Bactérias Multirresistentes em um Centro de Terapia Intensiva de Hospital Brasileiro de Emergências. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v. 18, n. 1, p. 27-33, 2006.
- ANVISA. UNIDADE DE INVESTIGAÇÃO E PREVENÇÃO DAS INFECÇÕES E DOS EVENTOS ADVERSOS GERÊNCIA GERAL DE TECNOLOGIA EM SERVIÇOS DE SAÚDE. **Nota Técnica No. 1/2010** - Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. Brasília, DF, 2010.
- ALVES, F.C.B.; BARBOSA, L.N.; ANDRADE, B.F.M.T.; ALBANO, M.; FURTADO, F.B.; PEREIRA, A.F.M.; RALL, V.L.M.; FERNANDES-JÚNIOR, A. Inhibitory activities of the lantibiotic nisin combined with phenolic compounds against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in cow milk. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 1831–1836, 2016.
- BAE, K.H.; JI, J.M.; PARK, K.L. The antibacterial component from Cinnamomi Cortex against a cariogenic bacterium *Streptococcus mutans* OMZ 176. **Archives of Pharmacal Research**, v. 15, n. 3, p. 239–241, 1992.
- BANERJEE R.; HUMPHRIES, R. Clinical and laboratory considerations for the rapid detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Virulence**, v. 8, n. 4, p. 427-439, 2017.
- BARBOSA, L.N.; PROBST I.S.; ANDRADE, B.F.; ALVES, F.C.; ALBANO, M.; DA CUNHA, M.L.R.S.; DOYAMA, J.T.; RALL, V.L.; FERNANDES JÚNIOR, A. *In vitro* antibacterial and chemical properties of essential oils including native plants from Brazil against pathogenic and resistant bacteria. **Journal of Oleo Science**, v. 64, n. 3, p. 289-298, 2015.
- BARCELOUX, D.G. *Cinnamon (Cinnamomum species)*. **Disease-a-month: DM**, v. 55, n. 6, p. 327-335, 2009.
- BARTON, M.D. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, n. 2, p. 279-299, 2000.

- BASSOLÉ, I.H.N.; JULIANI, H.R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 3989–4006, 2012.
- BEIRÃO, E.M.; FURTADO, J.J.D.; GIRARDELLO, R.; FILHO, E.F.; GALES, A.C. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.15, n. 1, p. 69-73, 2011.
- BERALDO, C.; DANELUZZI, N.S.; SCANAVACCA, J.; DOYAMA, J.T.; FERNANDES-JÚNIOR, A.; MORITZ, C.M.F. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 4, 436-440, 2013.
- BERGEN, P.J.; LANDERSDORFER, C.B.; ZHANG, J.; ZHAO, M.; LEE, H.J.; NATION, R.L.; LI, J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ‘old’ polymyxins: what is new? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 74, n. 3, p. 213–223, 2012.
- BERGEN, P.J.; LI, J.; RAYNER, C.R.; NATION, R.L. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 1953-1958, 2006.
- BICKERS, D.; CALOW, P.; GREIM, H.; HANIFIN, J.M.; ROGERS, A.E.; SAURAT, J.H.; SIPES, I.G.; SMITH, R.L.; TAGAMI, H. A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients. The RIFM expert panel. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 799–836, 2005.
- BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BLAIR, J.M.; WEBBER, M.A.; BAYLAY, A.J.; OGBOLU, D.O.; PIDDOCK, L.J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews Microbiology**. V. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.
- BOLLA, J.M.; ALIBERT-FRANCO, S.; HANDZLIK, J.; CHEVALIER, J.; MAHAMOUD, A.; BOYER, G.; KIEĆ-KONONOWICZ, K.; PAGÈS, J.M. Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. **FEBS Letters**, v. 585, n. 11, p. 1682-1690, 2011.
- BOUCHER, H.W.; TALBOT, G.H.; BRADLEY, J.S.; EDWARDS, J.E.; GILBERT, D.; RICE, L.B.; SCHELD, M.; SPELLBERG, B.; BARTLETT, J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 1–12, 2009.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 04 de maio de 2006a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto nº. 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 de junho de 2006b.
- BRISSE, S.; FEVRE, C.; PASSET, V.; ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; TOURNEBIZE, R.; DIANCOURT, L.; GRIMONT, P. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. **PLoS One**, v. 4 n. e4982, 2009.
- BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, n.6, p.1211-1233, 1995.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

CAI, J.C.; ZHOU, H.W.; ZHANG, R.; CHEN, G.X. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in intensive care units from a Chinese hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2014-2018, 2008.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CAMPOS, A.C.; ALBIERO, J.; ECKER, A.B.; KURODA, C.M.; MEIRELLES, L.E.F.; POLATO, A.; TOGNIM, M.C.B.; WINGETER, M.A.; TEIXEIRA, J.J.V. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K pneumoniae*: A systematic review. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 11, p. 1374-1380, 2016.

CANNATELLI, A.; D'ANDREA, M.M.; GIANI, T.; DI PILATO, V.; ARENA, F.; AMBRETTI, S.; GAIBANI, P.; ROSSOLINI, G.M. *In vivo* emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the *PhoQ/PhoP mgrB* regulator. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 11, 5521-5526, 2013.

CANTON, M.; ONOFRE, S.B. Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 348- 354, 2010.

CARVALHAES, C.G.; PICÃO, R.C.; NICOLETTI, A.G.; XAVIER, D.E.; GALES, A.C. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 2, p. 249-251, 2010.

CENTONZE, A.R.; AZZINI, A.M.; MAZZI, R.; MERIGHI, M.; CONCIA, E.; MAZZARIOL, A. *Klebsiella pneumoniae* (ST1519) producing KPC-19 carbapenemase in a patient undergoing selective digestive decontamination before liver transplantation. **Clinical Microbiology Infection**, v. 24, n. 2, p. 203-204, 2018.

CHANDA, S.; RAKHOLIYA, K. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. **Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**, v. 1, n. 13, p. 520-529, 2011.

CHANG, M.R.; BIBERG, C.A.; LOPES, F.A.; TETILA, A.F.; PIGNATARI, A.C. The first report of infection with *Klebsiella pneumoniae* carrying the *bla(kpc)* gene in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 1, p. 114-115, 2013.

CHANG, S.T.; CHEN, P.F.; CHANG, S.C. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 123-127, 2001.

CHENG, S.S.; LIU, J.Y.; HUANG, C.G.; HSUI, Y.R.; CHEN, W.J.; CHANG, S.T. Insecticidal activities of leaf essential oils from *Cinnamomum osmophloeum* against three mosquito species. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 457-464, 2009.

- CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 13th ed. CLSI standard M02. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI Document M100-ED28:2018.
- COSTA, A.L.P.; SILVA JUNIOR, A.C.S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.
- CUNNINGHAM, S.A.; LIMBAGO, B.; TRACZEWSKI, M.; ANDERSON, K.; HACKEL, M.; HINDLER, J.; SAHM, D.; ALYANAK, E.; LAWSIN, A.; GULVIK, C.A.; DE MAN, T.J.B.; MANDREKAR, J.N.; SCHUETZ, A.N.; JENKINS, S.; HUMPHRIES, R.; PALAVECINO, E.; VASOO, S.; PATEL, R. Multicenter Performance Assessment of the Carba NP Test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1954-1960, 2017.
- DAVIS, S.D.; IANNETTA, A.; WEDGWOOD, R.J. Activity of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*: inhibition by calcium. **Journal of Infectious Diseases**, v. 124, p. 610–612, 1971.
- DE MAIO CARRILHO, C.M.; GAUDERETO, J.J.; MARTINS, R.C.; DE CASTRO LIMA, V.A.; DE OLIVEIRA, L.M.; URBANO, M.R.; PEROZIN, J.S.; LEVIN, A.S.; COSTA, S.F. Colistin-resistant Enterobacteriaceae infections: Clinical and molecular characterization and analysis of *in vitro* synergy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, n. 3, p. 253-257, 2016.
- DESHPANDE, L.M.; JONES, R.N.; FRITSCH, T.R.; SADER, H.S. Occurrence and Characterization of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000 – 2004). **Microbial Drug Resistance**, v. 12, n. 4, 2006.
- DHIFI, W.; BELLILI, S.; JAZI, S.; BAHLOUL, N.; MNIF, W. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medicines (Basel)**. v. 3, n. 4, pii: E25, 2016.
- DIAZ, M.A.N.; ROSSI, C.C.; MENDONÇA, V.R.; SILVA, D.M.; RIBON, A.O.B.; AGUILAR, A.P.; MUÑOZ, G.D. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 724-728, 2010.
- DIENE, S.M.; MERHEJ, V.; HENRY, M.; EL FILALI, A.; ROUX, V.; ROBERT, C.; AZZA, S.; GAVORY, F.; BARBE, V.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D.; ROLAIN, J.M. The rhizome of the multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* genome reveals how new “killer bugs” are created because of a sympatric lifestyle. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 369–383, 2013.
- DIJKSOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 5, p. 939–951, 2007.
- DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308–316, 2000.
- DORTET, L.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Worldwide Dissemination of the NDM-Type Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria. **BioMed Research International**, 2014:249856, 2014a.
- FALAGAS, M.E.; KASIAKOU, S.K. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 1333–1341, 2005.

- FALAGAS, M.E.; KOPTERIDES, P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. **The Journal of Hospital Infection**, n. 64, p. 7-15, 2006.
- FEDLER, K.A.; BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N. Assessment of pathogen frequency and resistance patterns among pediatric patient isolates: report from the 2004 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program on 3 continents. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 56, n. 4, p. 427-436, 2006.
- FERRO, D. Fitorerapia: conceitos clínicos. São Paulo: Atheneu, 502 p., 2006.
- FRANÇA, I.S.X.; SOUZA, J.A.; BAPTISTA, R.S.; BRITTO, V.R.S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.
- GHAFOURIAN, S.; SADEGHIFARD, N.; SOHEILI, S.; SEKAWI, Z. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 17, p. 11-21, 2015.
- GIRLICH, D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 477-479, 2012.
- GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D. The Genus *Serratia*. **Prokaryotes**, v. 6, p. 219–244, 2006.
- GROISMAN, E.A.; KAYSER, J.; SONCINI, F.C. Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg²⁺ environments. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 7040–7045, 1997.
- GUERRA, F.Q.S.; MENDES, J.M.; DE SOUSA, J.P.; MORAIS-BRAGA, M.F.; SANTOS, B.H.; MELO COUTINHO, H.D.; LIMA, E. DE O. Increasing antibiotic activity against a multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. by essential oils of *Citrus limon* and *Cinnamomum zeylanicum*. **Natural Products Research**, v. 26, p. 2235–2238, 2012.
- GUPTA, N.; LIMBAGO, B.M.; PATEL, J.B.; KALLEN, A. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: Epidemiology and Prevention. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, p. 60-67, 2011.
- HAMMOUDI, D.; MOUBARECK, C.A.; SARKIS, D.K. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, p. 106–118, 2014.
- HAWKEY, P.M. The growing burden of antimicrobial resistance. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, Suppl 1:i1–9, 2008.
- HAWKEY, P.M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. **British Medical Journal**, v. 317, p. 657–660, 1998.
- HAWKEY, P.M.; JONES, A.M. The changing epidemiology of resistance. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, Suppl 1:i3–10, 2009.
- HE, S.; ZENG, K.W.; JIANG, Y.; TU, P.F. Nitric oxide inhibitory constituents from the barks of *Cinnamomum cassia*. **Fitoterapia**, v. 112, p. 153-160, 2016.
- HEINRICH, M. Ethnobotany and natural products: the search for new molecules, new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures? **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 141-154, 2003.
- HEJAZI, A.; FALKINER, F.R. *Serratia marcescens*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 46, n. 11, p. 903–912, 1997.

HERMSEN, E.D.; SULLIVAN, C.J.; ROTSCHAFFER, J.C. Polymyxins: pharmacology, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical applications. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 17, p. 545–562, 2003.

MAHLEN, S.D. *Serratia* infections: from military experiments to current practice. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 755–791, 2011.

HOEPRICH, P.D. The polymyxins. **The Medical Clinics of North America**, v. 54, p. 1257–1265, 1970.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, 2002.

ITO, H.; ARAKAWA, Y.; OHSUKA, S.; WACHAROTAYANKUN, R.; KATO, N.; OHTA, M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene *bla_{IMP}* among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 4, p. 824–829, 1995.

JACOBY, G.A. AmpC β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, p. 161–182, 2009.

JACOBY, G.A. Beta-lactamase nomenclature. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1123–1129, 2006.

JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. More extended-spectrum beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p. 1697–1704, 1991.

JAVAN, A.O.; SHOKOUHI, S.; SAHRAEI, Z. A review on colistin nephrotoxicity. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 71, p. 801–810, 2015.

JAYAPRAKASHA, G.K.; RAO, L.J.M. Chemistry, biogenesis, and biological activities of *Cinnamomum zeylanicum*. **Critical Reviews on Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 547–562, 2011.

JIAO, Y.; QIN, Y.; LIU, J.; LI, Q.; DONG, Y.; SHANG, Y.; HUANG, Y.; LIU, R. Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection/colonization and predictors of mortality: a retrospective study. **Pathogens and Global Health**, v. 109, n. 2, p. 68–74, 2015.

JIRSCHITZKA, J.; SCHMIDT, G.W.; REICHEL, M.; SCHNEIDER, B.; GERSHENZON, J.; D'AURIA, J.C. Plant tropane alkaloid biosynthesis evolved independently in the Solanaceae and Erythroxylaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 26, p. 103–104, 2012.

KADAR, B.; KOCSIS, B.; NAGY, K.; SZABO, D. The renaissance of polymyxins. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 30, p. 3759–3773, 2013.

KAISER, T.; FINSTERMEIER, K.; HÄNTZSCH, M.; FAUCHEUX, S.; KAASE, M.; ECKMANN, T.; BERCKER, S.; KAISERS, U.X.; LIPPMANN, N.; RODLOFF, A.C.; THIERY, J.; LÜBBERT, C. Stalking a lethal superbug by whole-genome sequencing and phylogenetics: Influence on unraveling a major hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **American Journal of Infection Control**, v. 46, n. 1, p. 54–59, 2018.

KAZI, M.; NIKAM, C.; SHETTY, A.; RODRIGUES, C.J. Dual-tubed multiplex-PCR for molecular characterization of carbapenemases isolated among *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. **Applied Microbiology**, v. 118, n. 5, p. 1096–1102, 2015.

KELESIDIS, T.; FALAGAS, M.E. The safety of polymyxin antibiotics. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 14, n. 11, p. 1687–1701, 2015.

- KEMPF, M.; ROLAIN, J.M. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, p. 105–114, 2012.
- KERROLA, K.; GALAMBOSI, B.; KALLIO, H. Volatile components and odor intensity of four phenotypes of hyssop (*Hyssopus officinales* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 776-781, 1994.
- KIFFER, C.; HSIUNG, A.; OPLUSTIL, C.; SAMPAIO, J.; SAKAGAMI, E.; TURNER, P.; MENDES, C.; MYSTIC BRAZIL GROUP. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, p. 216-224, 2005.
- KOCH-WESER, J.; SIDEL, V.W.; FEDERMAN, E.B.; KANAREK, P.; FINER, D.C.; EATON, A.E. Adverse effects of sodium colistimethate: manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. **Annals of Internatinal Medicine**, v. 72, p. 857–868, 1970.
- KOLLANOOR JOHNY, A.K.; HOAGLAND, T.; VENKITANARAYANAN, K. Effect of subinhibitory concentrations of plant-derived molecules in increasing the sensitivity of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 to antibiotics. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, p. 1165–1170, 2010.
- KOLLEF, M.H.; SHERMAN, G.; WARD, S.; FRASER, V.J. Inadequate antimicrobial treatment of infections: A risk factor for hospital mortality among critically ill patients. **Chest**, v. 115, p. 462–474, 1999.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. Diagnóstico Microbiológico. 5 Ed. Rio de Janeiro: Medisi; 2001.
- KONG, J.O.; LEE, S.M.; MOON, Y.S.; LEE, S.G.; AHN, Y.J. Nematicidal activity of cassia and cinnamon oil compounds and related compounds toward *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). **Journal of Nematology**, v. 39, n. 1, p. 31–36, 2007.
- KOPPIKAR, S.J.; CHOUDHARI, A.S.; SURYAVANSHI, S.A.; KUMARI, S.; CHATTOPADHYAY, S.; KAUL-GHANEKAR, R. Aqueous cinnamon extract (ACE-c) from the bark of *Cinnamomum cassia* causes apoptosis in human cervical cancer cell line (SiHa) through loss of mitochondrial membrane potential. **BMC Cancer**, v. 10, n. 1, p. 210, 2010.
- KOYAMA, Y.; KUROSASA, A.; TSUCHIYA, A.; TAKAKUTA, K. A new antibiotic “colistin” produced by spore-forming soil bacteria. **The Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 3, p. 457–458, 1950.
- KUETE, V. Potential of Cameroonian Plants and Derived Products against Microbial Infections: A Review. **Planta Medica**, v. 76, p. 1479–1491, 2010.
- KUMAR, A.S.; VENKATESHWARAN, K.; VANITH, J.; SARAVANAN, V. S.; GANESH, M.; VASUDEVAN, M.; SIVAKUMAR, T. Synergistic activity of methanolic extract of *Thespesia populnea* (Malvaceae) flowers with oxytetracycline. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 4, p. 13-16, 2009.
- KWA, A.L.; TAM, V.H.; FALAGAS, M.E. Polymyxins: a review of the current status including recent developments. **Annals of the Acadademy of Medicine, Singapore**, v. 37, n. 10, p. 870-883, 2008.
- LANDMAN, D.; SALAMERA, J.; SINGH, M.; QUALE, J. Accuracy of carbapenem nonsusceptibility for identification of KPC-possessing Enterobacteriaceae by use of the revised CLSI breakpoints. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 3931–3933, 2011.

- LANGEVELD, W.T.; VELDHUIZEN, E.J.A.; BURT, S.A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 76–94, 2014.
- LAXMINARAYAN, R.; DUSE, A.; WATTAL, C.; ZAIDI, A.K.; WERTHEIM, H.F.; SUMPRADIT, N.; Vlieghe, E.; HARA, G.L.; GOULD, I.M.; GOOSSENS, H.; GREKO, C.; SO, A.D.; BIGDELI, M.; TOMSON, G.; WOODHOUSE, W.; OMBAKA, E.; PERALTA, A.Q.; QAMAR, F.N.; MIR, F.; KARIUKI, S.; BHUTTA, Z.A.; COATES, A.; BERGSTROM, R.; WRIGHT, G.D.; BROWN, E.D.; CARS, O. Antibiotic resistance-the need for global solutions. **The Lancet. Infectious Diseases**, v.13, n. 12, p. 1057-1098, 2013.
- LEE, R.; BALICK, M.J. Sweet wood-cinnamon and its importance as a spice and medicine. **The Journal of Science and Healing**, v. 1, p. 61–64, 2005.
- LEE, D.G.; URBACH, J.M.; WU, G.; LIBERATI, N.T.; FEINBAUM, R.L.; MIYATA, S. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. **Genome Biology**, v. 7, n. 10, p. R90, 2006.
- LEVY, S.B. Antibiotic resistance – the problem intensifies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1446-1450, 2005.
- LIMA, M.P.; ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; SILVA, T.M.D.; FERNANDES, C.S. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **Acta amazônica**, v. 35, n. 3, p. 363 – 366, 2005.
- LIMA, M.R.F.; LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; ANDRADE, M.C.C.; SANT’ANA, A.E.G.; GENET, J.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, p. 137- 147, 2006.
- LIN, J.C.; CHANG, F.Y.; FUNG, C.P.; XU, J.Z.; CHENG, H.P.; WANG, J.J.; HUANG, L.Y.; SIU, L.K. High prevalence of phagocytically resistant capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae* in liver abscess. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 1191–1198, 2004.
- LIU, Q.; NIU, H.; ZHANG, W.; UM, H.; SUN, C.; DUAN, J. Synergy among thymol, eugenol, berberine, cinnamaldehyde and streptomycin against planktonic and biofilm-associated food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 421–430, 2015.
- LIU, J.; YU, J.; CHEN, F.; YU, J.; SIMNER, P.; TAMMA, P.; LIU, Y.; SHEN, L. Emergence and establishment of KPC-2-producing ST11 *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital in Shanghai, China. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, n. 2, p. 293-299, 2018.
- LIU, Y.Y.; WANG, Y.; WALSH, T.R.; YI, L.X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L.F.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, J.H.; SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.
- LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in microbiology**, v. 14, n. 9, p. 413–20, 2006.
- LLOBET, E.; TOMAS, J.M.; BENGOCHEA, J.A. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. **Microbiology**, v. 154, n. Pt 12, p. 3877-3886, 2008.
- LU, Z.; JIA, Q.; WANG, R.; WU, X.; WU, Y.; HUANG, C.; LI, Y. Hypoglycemic activities of A and B-type procyanidin oligomer-rich extracts from different Cinnamon barks. **Phytomedicine**, v. 18, n. 4, p. 298–302, 2011.

- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.
- MATHERS, A.J.; COX, H.L.; KITCHEL, B.; BONATTI, H.; BRASSINGA, A.K.; CARROLL, J.; SCHELD, W.M.; HAZEN, K.C.; SIFRI, C.D. Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae reveals intergenus KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. **mBio**, v. 2, n. 6, 2:e00204–11, 2011.
- MATHEW, S.; ABRAHAM, T.E. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various *in vitro* models. **Food Chemistry**, v. 94, n. 4, p. 520–528, 2006.
- MAU, J.; CHEN, C.; HSIEH, P. Antimicrobial effect of extracts from Chinese chive, cinnamon, and corni fructus. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 183-8, 2001.
- MELETIS, G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. Therapeutic advances in infectious disease. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 3, n. 1, p. 15-21, 2016.
- MAURER, F.P.; CASTELBERG, C.; QUIBLIER, C.; BLOEMBERG, G.V.; HOMBACH, M. Evaluation of carbapenemase screening and confirmation tests with Enterobacteriaceae and development of a practical diagnostic algorithm. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, p. 95–104, 2015.
- MELO, A. D.; AMARAL, A. F.; SCHAEFER, G.; LUCIANO, F. B.; DE ANDRADE, C.; COSTA, L. B.; ROSTAGNO, M. H. Antimicrobial effect against different bacterial strains and bacterial adaptation to essential oils used as feed additives. *Can J Vet Res*, v. 79, n. 4, p. 285-9, 2015.
- MEYER, G.; PICOLI, S.U. Phenotypes of beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* from emergency hospital of Porto Alegre. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n.1, 2011.
- MEZZATESTA, M.L.; GONA, F.; STEFANI, S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. **Future Microbiology**, v. 7, p. 887–902, 2012.
- MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 316-320, 2005.
- MOFFATT, J.H.; HARPER, M.; ADLER, B.; NATION, R.L.; LI, J.; BOYCE, J.D. Insertion sequence ISAb11 is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(6):3022-4.
- MONTEIRO, J.; SANTOS, A.F.; ASENSI, M.D.; PEIRANO, G.; GALES, A.C. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.1, p.333-334, 2009.
- MORENO, P.R.H.; DA COSTA-ISSA, F.I.; RAJCA-FERREIRA, A.K.; PEREIRA, M.A.; KANEKO, T.M. Native Brazilian plants against nosocomial infections: a critical review on their potential and the antimicrobial methodology. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 24, p. 3040-3078, 2013.
- MORITZ, C.M.F.; RALL, V.L.M.; SAEKI, M.J.; FERNANDES-JÚNIOR, A. Assessment of antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil combined with EDTA and polyethylene glycol in yogurt. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 37, n. 1, p. 99-104, 2015.

- NAAS, T.; NORDMANN, P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A betalactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 91, n. 16, p. 7693–7697, 1994.
- NAAS, T.; CUZON, G.; VILLEGAS, M.V.; LARTIGUE, M.F.; QUINN, J.P.; NORDMANN, P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase blaKPC gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1257–1263, 2008.
- NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, p. 1451-1474, 2013.
- NEWTON, B.A. The properties and mode of action of the polymyxins. **Bacteriological Reviews**, v. 20, p. 14–27, 1956.
- NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 228-236, 2009.
- NORDMANN, P.; POIREL, L. Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 3, p. 487–489, 2013.
- NORDMANN, P.; POIREL, L.; CARRÈR, A.; TOLEMAN, M.A.; WALSH, T.R. How to detect NDM-1 producers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 718-721, 2011b.
- NOVAIS, T.S.; COSTA J.F.O.; DAVID, J.P.L.; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P. FRANÇA F.; GIULIETTI, A.M.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, (Supl. 2), 2003.
- NURYASTUTI, T.; VAN DER MEI, H.C.; BUSSCHER, H.J.; IRAVATI, S.; AMAN, A.T.; KROM, B.P. Effect of cinnamon oil on *icaA* expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 6850–6855, 2009.
- OLIVEIRA, F.B.M.; LIMA, L.M.; MOURA, M.E.B.; NUNES, B.M.V.T.; OLIVEIRA, B.M. Indiscriminate use of antibiotics and antimicrobial resistance: a reflection on the treatment of hospital infections. **Revista Interdisciplinar**, v.4, n.4, p.72-77, 2011.
- ONG, D.C.T.; KOH, T.H.; SYAHIDAH, N.; KRISHNAN, P.; TAN, T.Y. Rapid detection of the blaNDM-1 gene by real-time PCR. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 1647-1649, 2011.
- OOI, L.S.; LI, Y.; KAM, S.L.; WANG, H.; WONG, E.Y.; OOI, V.E. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 34, n. 3, p. 511-522, 2006.
- ORÚS, P.; GOMEZ-PEREZ, L.; LERANOZ, S.; BERLANGA, M. Increasing antibiotic resistance in preservative-tolerant bacterial strains isolated from cosmetic products. **International Microbiology**, v.18, n. 1, p. 51-59, 2015.
- OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, v. 73, n. 2, p. 236-244, 2006.
- OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella*

- Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.
- PADILLA, E.; LLOBET, E.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; BENGOCHEA, J.A.; ALBERTÍ, S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 177-183, 2010.
- PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, R.A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v. 140, p. 164–168, 2010.
- PANDEY, A.K.; KUMAR, P.; SINGH, P.; TRIPATHI, N.N.; BAJPAI, V.K. Essential oils: sources of antimicrobials and food preservatives. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 2161, 2017.
- PATEL, J.B.; RASHEED, J.K.; KITCHEL, B. Carbapenemases in enterobacteriaceae: activity, epidemiology, and laboratory detection. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 31, p. 55-62, 2009.
- PATON, R.; MILES, R.S.; HOOD, J.; AMYES, S.G.B.; MILES, R.S.; AMYES, S.G. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 2, p. 81-87, 1993.
- PAULA, V.G.; QUINTANILHA, L.V.; SILVA, F.A.C.S; ROCHA, H.F.R.; SANTOS, F.L. Enterobacteria producing carbapenemase: prevention of superbugs dissemination in ICU's. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 175-185, 2016.
- PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E.M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2702, 2009.
- 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.; SEIFERT, H.; DIJKSHOORN, L. The success of *Acinetobacter* species; genetic, metabolic and virulence attributes. **PLoS ONE**, v. 7, e46984, 2012.
- PETERSEN, L.M.; TISA, L.S. Molecular characterization of protease activity in *Serratia* sp. strain SCBI and its importance in cytotoxicity and virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 22, p. 3923-3936, 2014.
- PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 6, p. 371-379, 2010.
- PHILIPPON, A.; ARLET, G.; JACOBY, G.A. Plasmid-Determined AmpC Type β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 1-11, 2002.
- PIRES, J.; TARACILA, M.; BETHEL, C.R.; DOI, Y.; KASRAIAN, S.; TINGUELY, R.; SENDI, P.; BONOMO, R.A.; ENDIMIANI, A. *In vivo* evolution of CMY-2 to CMY-33 β -lactamase in *Escherichia coli* ST131: characterization of an acquired Extended-Spectrum AmpC (ESAC) conferring resistance to cefepime. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, p. 7483-7488, 2015.
- PITOUT, J.D.D.; LAUPLAND, K.B. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 159-166, 2008.

- PITOUT, J.D.D.; NORDMANN, P.; LAUPLAND, K.B.; POIREL, L. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 52–59, 2005.
- POIREL, L.; NORDMANN, P. Rapidec Carba NP test for rapid detection of carbapenemase producers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, p. 3003–3008, 2015.
- PORFÍRIO, Z.; MELO FILHO, G.C.; ALVINO, V.; LIMA, M.R.F.; SANT'ANA, A.E.G. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Lafoensia pacari* A. St. Hil., Lythraceae, frente a bactérias multirresistentes de origem hospitalar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 785-89, 2009.
- POTRON, A.; POIREL, L.; RONDINAUD, E.; NORDMANN, P. Intercontinental spread of OXA-48 β -lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11- year period, 2001 to 2011. **Euro Surveillance**, v. 18, p. 20549, 2013.
- QUINN, J.P. Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting Gram negative pathogens. **Clinical of Infectious Diseases**, v. 24, Suppl 117–124, 1998.
- RAETZ, C.R.; REYNOLDS, C.M.; TRENT, M.S.; BISHOP, R.E. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, p. 295–329, 2007.
- RAMIREZ, M.S.; TRAGLIA, G.M.; LIN, D.L.; TRAN, T.; TOLMASKY, M.E. Plasmid-mediated antibiotic resistance and virulence in Gram-negatives: the *Klebsiella pneumoniae* paradigm. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 5, 2014.
- RAO, P.V.; GAN, S.H. Cinnamon: A multifaceted medicinal plant. **Evidence Based Complementary and Alternaternative Medicine**, 642942, 2014.
- RASMUSSEN, B.A.; BUSH, K.; KEENEY, D.; YANG, Y.; HARE, R.; O'GARA, C.; MEDEIROS, A.A. Characterization of IMI-1 betalactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 9, p. 2080–2086, 1996.
- REED, M.D.; STERN, R.C.; O'RIORDAN, M.A.; BLUMER, J.L. The pharmacokinetics of colistin in patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 41, p. 645–654, 2001.
- RHOMBERG, P.R.; JONES, R.N. Summary trends for the meropenem yearly susceptibility test information collection program: a 10-year experience in the United States (1999-2008). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 65, n. 4, p. 414-426, 2009.
- ROZALES, F.P.; RIBEIRO, V.B.; MAGAGNIN, C.M.; PAGANO, M.; LUTZ, L.; FALCI, D.R.; MACHADO, A.; BARTH, A.L.; ZAVASCKI, A.P. Emergence of NDM-1- producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p. 79–81, 2014.
- ROSSOLINI, G.M. Acquired metallo-beta-lactamases: an increasing clinical threat. **Clinical Infectious Diseases**, v.41, n. 11, p.1557-1558, 2005.
- SADER, H.S.; CASTANHEIRA, M.; MENDES, R.E.; TOLEMAN, M.; WALSH, T.R.; JONES, R.N. Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, n. 1, p. 57-61, 2005.
- SANTOS, N.Q. Bacterial resistance in the context of hospital infection. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 13, p. 64-70, 2004.

- SENANAYAKE, U.M.; LEE, T.H.; WILLS, R.B.H. Volatile constituents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 822–824, 1978.
- SHAHVERDI, A.R.L.; MONSEF-ESFAHANI, H.R.; TAVASOLI, F.; ZAHERI, A.; MIRJANI, R. Trans-cinnamaldehyde from *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil reduces the clindamycin resistance of *Clostridium difficile* in vitro. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 1, p. S055–S058, 2007.
- SHEN, S.; ZHANG, T.; YUAN, Y.; LIN, S.; XU, J.; YE, H. Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane. **Food Control**, v. 47, p. 196–202, 2015.
- SHREAZ, S.; WANI, W.A.; BEHBEHANI, J.M.; RAJA, V.; IRSHAD, M.; KARCHED, M.; ALI, I.; SIDDIQI, W.A.; HUN, L.T. Cinnamaldehyde and its constituents, a novel class of antifungal agents. **Fitoterapia**, v. 12, p. 116–131, 2016.
- SIDJABAT, H.E.; SILVEIRA, F.P.; POTOSKI, B.A.; ABU-ELMAGD, K.M.; ADAMS-HADUCH, J.M.; PATERSON, D.L.; DOI, Y. Interspecies spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene in a single patient. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 1736 – 1738, 2009.
- SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 8022–8028, 1994.
- SILVA, K.E.; CAYÔ, R.; CARVALHAES, C.G.; SACHI, F.P.C.; RODRIGUES-COSTA, F.; RAMOS DA SILVA, A.C.; CRODA, J.; GALES, A.C.; SIMIONATTO, S. Coproduction of KPC-2 and IMP-10 in Carbapenem-Resistant *Serratia marcescens* Isolates from an Outbreak in a Brazilian Teaching Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 2324–2328, 2015.
- SINGH, S.B. Confronting the challenges of discovery of novel antibacterial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 3683–3689, 2014.
- ŠIŠIRAK, M.; HUKIĆ, M. An outbreak of multidrug-resistant *Serratia marcescens*: the importance of continuous monitoring of nosocomial infections. **Acta Medica Academica**, v. 42, n. 1, p. 25–31, 2013.
- SMITH, C.K.; MOORE, C.A.; ELAHI, E.N.; SMART, A.T.; HOTCHKISS, S.A. Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde and cinnamic alcohol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 168, p. 189–199, 2000.
- SMITH, M.G.; GIANOULIS, T.A.; PUKATZKI, S.; MEKALANOS, J.J.; ORNSTON, L.N.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by highdensity pyrosequencing and transposon mutagenesis. **Genes & Development**, v. 21, p. 601–614, 2007.
- SMITH MOLAND, E.; HANSON, N.D.; HERRERA, V.L.; BLACK, J.A.; LOCKHART, T.J.; HOSSAIN, A.; JOHNSON, J.A.; GOERING, R.V.; THOMSON, K.S. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates., v. 51, n. 3, p. 711–714, 2003.
- SON, S.J.; HUANG, R.; SQUIRE, C.J.; LEUNG, I.K.H. MCR-1: a promising target for structure-based design of inhibitors to tackle polymyxin resistance. **Drug Discovery Today**, pii: S1359-6446(18)30025-4, 2018.
- STANSLY, P.G.; SHEPHERD, R.G.; WHITE, H.J. Polymyxin: a new chemotherapeutic agent. **Bulletin of Johns Hopkins Hospital**, v. 81, n. 1, p. 43–54, 1947.

STEFANAKIS, M.K.; TOULOUPAKIS, E.; ANASTASOPOULOS, E.; GHANOTAKIS, D.; KATERINOPOULOS, H.E.; MAKRIDIS, P. Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. **Food Control**, v. 34, p. 539–546, 2013.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, (Suppl. 1), p. S3-S10, 2006.

TRINH, N.T.; DUMAS, E.; THANH, M.L.; DEGRAEVE, P.; BEN AMARA, C.; GHARSALLAOUI, A.; OULAHAL, N. Effect of a Vietnamese *Cinnamomum cassia* essential oil and its major component trans-cinnamaldehyde on the cell viability, membrane integrity, membrane fluidity, and proton motive force of *Listeria innocua*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 263-271, 2015.

TUNG, Y.T.; CHUA, M.T.; WANG, S.Y.; CHANG, S.T. Antiinflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3908–3913, 2008.

TUNG, Y.T.; YEN, P.L.; LIN, C.Y.; CHANG, S.T. Antiinflammatory activities of essential oils and their constituents from different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 10, p. 1130–1136, 2010.

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

VAN HOEK, A.H.A.M.; MEVIUS, D.; GUERRA, B.; MULLANY, P.; ROBERTS, A.P.; AARTS, H.J.M. Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 203, 2011.

VAN VUUREN, S.; VILJOEN, A. Plant-Based Antimicrobial studies – Methods and approaches to study the interaction between natural products. **Planta Medica**, v. 77, p. 1168–1182, 2011.

VANGALAPATI, M.; SATYA, N.S.; PRAKASH, D.S.; AVANIGADDA, S. A review on pharmacological activities and clinical effects of cinnamon species. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 653–663, 2012.

VELKOV, T.; ROBERTS, K.D.; NATION, R.L.; THOMPSON, P.E.; LI, J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. **Future Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 711-724, 2013.

VON POSER, G.L.; MENTZ, L. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMOES, C.M.O.; OLIVEIRA, C.M. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, p. 75-89, 2003.

YANG, C.H.; YANG, C.S.; HWANG, M.L.; CHANG, C.C.; LI, R.X.; CHUANG, L.Y. Antimicrobial activity of various parts of *Cinnamomum cassia* extracted with different extraction methods. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 690–698, 2012.

YANG, Y.J.; WU, P.J.; LIVERMORE, D.M. Biochemical characterization of a betalactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 5, p. 755–758, 1990.

YAP, P.S.; KRISHNAN, T.; CHAN, K.G.; LIM, S.H. Antibacterial mode of action of *Cinnamomum verum* bark essential oil, alone and in combination with piperacillin, against a

multi-drug-resistant *Escherichia coli* strain. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 8, p. 1299–1306, 2015.

YIGIT, H.; QUEENAN, A.M.; ANDERSON, G.J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J.W.; STEWARD, C.D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F.C. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 2001.

YUAN, J.H.; DIETER, M.P.; BUCHER, J.R.; JAMESON, C.W. Toxicokinetics of cinnamaldehyde in F344 rats. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 30, p. 997–1004, 1992.

WALSH, T.R.; BOLMSTRÖM, A.; QWÄRNSTRÖM, A.; GALES, A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2755–2759, 2002.

WANG, S.Y.; CHEN, P.F.; CHANG, S.T. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 7, p. 813–818, 2005.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência antimicrobiana: uma guerra perdida? Uso Racional de medicamentos: temas selecionados. **Brasília: OPAS/OMS**, 2004.

WITH, K.; ALLERBERGER, F.; AMANN, S.; APFALTER, P.; BRODT, H.R.; ECKMANN, T.; FELLHAUER, M.; GEISS, H.K.; JANATA, O.; KRAUSE, R.; LEMMEN, S.; MEYER, E.; MITTERMAYER, H.; PORSCHE, U.; PRESTERL, E.; REUTER, S.; SINHA, B.; STRAUß, R.; WECHSLER-FÖRDÖS, A.; WENISCH, C.; KERN, W.V. Strategies to enhance rational use of antibiotics in hospital: a guideline by the German Society for Infectious Diseases **Infection**, v. 44, p. 395–439, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Medicina tradicional: necesidades crecientes y potencial. Policy perspectives on medicines, Ginebra, n. 2, p. 1-6, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: WHO, 12p., 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The world health report 1998 - Life in the 21st century: a vision for all. Geneva: WHO, 232p., 1998.

WRIGHT, W.W.; WELCH, H. Chemical, biological and clinical observations on colistin. **Antibiotics Annual**, v. 7, p. 61–74, 1959.

ZAVASCKI, A.P.; GOLDANI, L.Z.; LI, J.; NATION, R.L. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 1206–1215, 2007.

5 APÊNDICES

5.1 Artigo 1:

Artigo a ser submetido para a revista **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**

<https://aac.asm.org/sites/default/files/additional-assets/AAC-ITA.pdf>

Classificação Capes: A1 na área Medicina II

Fator de impacto: 4.302

Synergistic effects of *Cinnamomum cassia* L. essential oil in combination with polymyxin B against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*

Vasconcelos, N. G.^{a,b}; Queiroz, J. H. F. S.^a, Silva, K. E.^a; Vasconcelos, P. C. P.^b; Croda, J.^{a,c,d}
Simionatto, S.^a

^a Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil.

^b Hospital Universitário de Dourados, Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil.

^c Fundação Oswaldo Cruz, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

^d Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva, s/nº | Bairro Universitário - CEP 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

*Corresponding author:

Current Address: Rodovia Dourados - Itahum km 12, Cidade Universitária, CEP: 79804970, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. E-mail: simonesimionatto@ufgd.edu.br.

Abstract

Multidrug-resistance in bacteria is nowadays an increasing public health problem therefore the search for new sources of antibiotics with new targets at bacteria cell is imperative. The objective of the present study was to investigate the antibacterial activity of *Cinnamomum cassia* L. essential oil (CCeo) alone and in combination with commercially available antibiotics against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Antimicrobial susceptibility was determined by broth microdilution and carbapenemase production by ertapenem hydrolysis using MALDI-ToF ToF. The presence of beta-lactamase-encoding genes was assessed by PCR. Antibacterial activity of the CCeo and synergism with antibiotics was performed by agar disk diffusion, broth microdilution, time-kill and checkboard methods. Possible CCeo mechanism of action was assessed by PCR, RT-PCR, RT-qPCR, and protein leakage assay. The CCeo exhibited inhibitory effect against *K. pneumoniae* and *S. marcescens* with MICs = 281.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. PCR confirmed the presence of *bla*_{KPC-2} for *K. pneumoniae* and *bla*_{KPC-2}, *bla*_{IPM-10} and *arnB* for *S. marcescens*. RT-PCR showed difference in mRNA transcripts of *arnB* when comparing samples before and after treatment with CCeo + polymyxin B (POL) and RT-qPCR proved the reduction in *S. marcescens* cells after treatment with CCeo + POL. Association of CCeo with POL showed a decrease of survival curves in viable cell counts over time after a 4 hour-treatment with FIC Index values of 0.006 for both strains. Protein leakage was observed with increasing concentrations of CCeo and CCeo + POL. CCeo presents antibacterial activity against the studied strains and when associated with POL, a synergistic effect is able to inhibit bacterial growth rapidly and consistently, making it an interesting candidate for development of alternative treatment and drug delivery system for carbapenemase-producing strains. Mechanism of CCeo blocking *S. marcescens* strategies to be resistant to POL is possibly increasing the cell outer membrane permeability, allowing POL to enter the bacterial periplasmic space. More studies are necessary to elucidate the complex mechanism of action and synergism of CCeo + POL. *In vivo* studies are also valuable in order to better understand the mechanisms of interaction, bioavailability and confirm this oil efficacy.

Keywords: antibacterial activity, synergism, cinnamom, polymyxin B, carbapenemases, Gram-negative bacterium.

Introduction

Klebsiella pneumoniae and *Serratia marcescens*, Gram-negative bacilli of the Enterobacteriaceae family, acquire and share resistance genes very easily leading to a multidrug-resistance and causing severe infections. One of the most concerning public health issues is the wide spread of carbapenemase resistance among Gram-negative bacteria. These enzymes, located on self-conjugative plasmids, hydrolyze carbapenems conferring resistance to a broad variety of beta-lactams (1). Those plasmids are capable of disseminating among bacteria resulting in spread of resistance (2). Nowadays, the options for those hard to treat infections are tigecycline, polymyxins, aminoglycosides and fosfomycin (3). However, the use of these antibiotics is limited because of their toxicity and pharmacokinetic properties (4). The global spread of carbapenemase-producing bacteria and limitations of the current treatments for its infections, the search for new therapeutic alternatives is needed. Thus, novel sources of chemicals with antimicrobial activity against multiresistant strains are required.

Serratia is a genus naturally resistant to polymyxins, it has a modified lipopolysaccharide (LPS) with substitution of normally encountered Enterobacteriaceae cationic phosphate groups for 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) or phosphoethanolamine (PEtN) (5), being the most common modification, the cationic substitution of the phosphate groups by L-Ara4N (6), which increases the net negative charge of lipid A of LPS making polymyxins, cationic antimicrobial peptides, be repelled by the bacteria cell (7). The operon *arnBCADTEF-pmrE* (also called *pmrHFIJKLM-ugd*) mediates the synthesis and transfer of L-Ara4N to lipid A (8,9) and the inactivation of the *arnB* and *arnC* genes can result in polymyxin sensitivity in *S. marcescens* (8). The *arnBCADTEF-pmrE* operon appears to be constitutively expressed in intrinsically resistant bacteria in contrast to non-intrinsically resistant bacteria (9).

Essential oils are potential sources of antimicrobial compounds, several studies shows antibacterial, antifungal, antiviral and antiparasitic properties of plant oils (10,11). The essential oils and their components have a variety of targets, particularly the membrane and cytoplasm, and in certain situations, they completely alter the morphology of the cells (11), which makes them a focal area for research. A current focus of pharmacological research is development of new drug delivery systems and essential oils are promising novel functional excipients (12). Excipients, previously seen as mere substances capable of facilitating administration and protecting the drug, are nowadays considered as essential constituents, which guarantee the performance of the drug and optimize the attainment of the therapeutic effect (13). Essential

oils need to be studied to make best use of their antibacterial activity and to reduce antibiotic's concentrations required to achieve the antibacterial effect.

Cinnamomum cassia is a popular spice and its dried barks are used in traditional medicine to treat various disorders such as amenorrhea, rheumatoid arthritis, cardiac palpitation, diarrhea and gastrointestinal neurosis (14). Several antimicrobial activities of *C. cassia* parts and oil have been reported in both Gram-positive (15,16) and Gram-negative sensible bacteria (17,18,19). The main compound responsible for antimicrobial activity in cinnamon bark essential oil is cinnamaldehyde, which is also the dominant substance (20).

This study described the antibacterial efficacy of *C. cassia* L. essential oil (CCeo) against carbapenemase-producing *K. pneumoniae* and *S. marcescens*, its synergistic effects when associated to antibiotics of six different pharmacological classes and assessed the expression of the *16S* and *arnB* genes in order to possibly uncover the mechanisms of action of synergism when treating *S. marcescens*.

Material and methods

Essential oil

The essential oil used in this study was *C. cassia*, a clear liquid yellow to brown oil, extracted by leaf, bark and branches steam distillation, with density of 1.053, originated from China and acquired commercially by Ferquima Ind. Com. LTDA (São Paulo, Brazil), CAS number: 84961-46-6. Trans-cinnamaldehyde 99% was acquired commercially by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), CAS number: 14371-10-9. Cinnamaldehyde is the most prevalent compound (87.6%), followed by α -humulene (3.1%), γ -elemene (2.5%), borneol (1.5%), cinnamic acid (0.7%), benzaldehyde (0.5%), eugenol (0.4%) and other minor components (3.7%), according to the chromatographic technical report presented by the supplier.

Bacterial strain, culture media and chemicals for antibacterial assays

Carbapenemase-producing *K. pneumoniae* and *S. marcescens* isolated from human specimen were selected and maintained at -70°C and sub-cultured on MacConkey agar for 24 hours before any test. These isolates were identified and characterized according to their sensibility to antibiotics by Vitek[®] 2 (bioMérieux, Hazelwood, MO, USA). Preliminary screening for the presence of carbapenemase was performed by the modified Hodge test (MHT) for *K. pneumoniae* and *S. marcescens* (21) and the presence of KPC enzyme, a carbapenemase, was confirmed by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry

(MALDI-ToF ToF), using a Microflex LT spectrometer (Bruker Daltonics, MA, USA) (22, 23). CCEO was diluted with distilled water and 0.5% tween 80 was added to homogenize the mixture. Antibiotics amikacin (AMI), ciprofloxacin (CIP), imipenem (IPM), piperacillin/tazobactam (PPT), POL and tigecycline (TGC) were acquired by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and were diluted with distilled water. The effect of the addition of tween 80 (0.5%) as an oil solubilizer on the antibacterial activities of the antibacterial assays was investigated with minimal inhibitory concentration (MIC) and concentration used did not interfere with bacterial growth. The study was conducted with the approval of the Research Ethics Committee from the Universidade Federal da Grande Dourados (Process No. 877.292/2014).

PCR amplification

Polimerase Chain Reaction (PCR) was performed to confirm the presence of the genes *bla*_{CTX-M-1-like}, *bla*_{CTX-M-2-like}, *bla*_{CTX-M-8-like}, *bla*_{CTX-M-14-like}, *bla*_{GES-like}, *bla*_{GIM-like}, *bla*_{IMP-10}, *bla*_{IMP-like}, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{NDM-like}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{SIM-like}, *bla*_{SME-like}, *bla*_{SPM-like}, *bla*_{TEM-like} and *bla*_{VIM-like} in carbapenem-resistant *K. pneumoniae* and the mRNA was transformed into cDNA using iScript™ cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, USA) and assessed by RT-PCR (8) to assess the genes *16S* and *arnB* in *S. marcescens* strains before and after treatment with CCEO + POL and *arnB* after treatment with POL (24,25). PCR products were examined by 1 % agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining.

The primers *arnBF* and *arnBR* were designed based on the gene sequences of *S. marcescens* subsp. *marcescens* Db11 and *S. marcescens* 2880STDY5682918 (GenBank Accession No. HG326223.1, NZ_FCJC01000002.1). The DNA sequences of these two strains considered relevant for the target were retrieved from the NCBI public database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) and were aligned with the program CLustalX2. The primer pair was designed, preferentially within conserved regions with few self-complementarity. An *in silico* test of the primer pair was performed using the Vector NTI software and then synthesized by Sigma, USA (table 1).

Table 1. Primers used for amplification of *arnB* and *16S* genes.

Primer	Sequence 5'-3'	Nucleotide position	Product length
<i>arnBF</i>	CCAAAGCGATTGTTCCGGTG	365–384	169 bp
<i>arnBR</i>	AAAGAGAAAATCGCCGTGCC	609–590	
<i>16SF</i>	ATTCCAGGTGTAGCGGTGAA	646–665	238 bp
<i>16SR</i>	TGAGTTTTAACCTTGCGGCC	883–864	

16SF: *16S* gene forward primer; *16SR*: *16S* gene reverse primer; *arnBF*: *arnB* gene forward primer; *arnBR*: *arnB* gene reverse primer; bp: base pairs.

Real-time RT-qPCR analysis was performed to verify changes in the small subunit ribosomal RNA 16S expression levels during treatment with CCEO in association with POL. Total RNA was isolated from *S. marcescens* before and after treatment (at MIC values), transformed into cDNA using iScript™ cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, USA) and the cDNA was subjected to real-time RT-qPCR with the primers pairs *16S* forward (*16SF*) and *16S* reverse (*16SR*) using SYBR Green mix (SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™, St. Louis, MO, USA). Reactions were performed using the following reagents: SYBR Green mix, *16SF* primer and *16SR* primer (10 µM stock), template (20 ng) and double-distilled water to complete the reaction final volume. Real-time RT-qPCR cycling was implemented with the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad, USA) as follows: initial denaturation at 94 °C for 2 minutes and then 40 cycles of 94 °C (15 seconds) and 60 °C (1 minute). All PCR assay reactions were performed in triplicate. Negative controls were included with each PCR assay. Following amplification, the results were analyzed on the PCR computer using the CFX Manager ver. 3.1.15 software. Once amplification was completed, the level of amplification was reported by the software as the mean Cycle Threshold (CT) value of replicate samples. A sample was considered positive by real-time RT-qPCR and expressed the *16S* gene, if the CT crossed the threshold before the PCR cycle of 40 and after the negative control CT.

Bacterial susceptibility determinations

The antibacterial activity of the CCEO was performed by a standard method of agar disk diffusion. POL and TGC were used as positive standards. The test was performed in duplicate and the means of values obtained were used to classify the bacterium as sensible (≥ 10 mm) or resistant (< 10 mm) to the oil tested (26). The MIC of the CCEO and trans-cinnamaldehyde

(TC) were determined by broth microdilution as described by Cavalcanti et al. (27) and was determined by resazurin colorimetric assay.

Synergy tests

Disk-diffusion:

Disk-diffusion for screening synergy was performed with three filter paper disks for each analysis. CCeo was placed on a disk, the combination, CCeo + antibiotic, was placed on a separate disk and the third was the antibiotic alone. Six commonly used antibiotics including AMI, CIP, IPM, PPT, POL and TGC were used for potentiation assay (data not shown for AMI, CIP, PPT and TGC). The inhibition zone of the combination was comparatively examined with the independent test samples. Synergistic interactions were evaluated if the inhibition zone by the combination was larger by 2 mm or more in comparison to either antibiotic or CCeo alone (28).

Time-kill:

The time-kill method was performed by the broth macrodilution technique (29,30). CCeo alone and in combination with antibiotic (IPM or POL) were tested against the carbapenemase-producing *K. pneumoniae* and *S. marcescens*. POL and gentamicin (GEN) were used as positive controls for carbapenem-resistant *K. pneumoniae* and *S. marcescens* (intrinsic resistance to POL) respectively. The concentration of each antimicrobial agent tested were the MIC value. POL concentration used as MIC for *S. marcescens* was $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, same as POL MIC for *K. pneumoniae*. The time-kill studies were performed with a final inoculum of approximately $1.5 \times 10^6 \text{ CFU.mL}^{-1}$ in a final volume of 3.2 mL. The final inoculum was verified with a spectrophotometer by Vitek[®] 2 (bioMérieux, Hazelwood, MO). The tubes were shaken periodically and incubated at 37°C. Samples were obtained at 0, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 hours. At each sample time, 1 μl was withdrawn from each tube with a sterile loop and seeded in MacConkey agar plates. The plates were incubated for 24 h at 37°C and colony counts were determined. The resulting colony count of the samples treated with the combination was compared to the ones treated with the most effective single agent. A decrease in colony count by 100-fold or more was considered synergism, while an increase in colony count by 100-fold or more was considered antagonism. Changes that were limited to 10-fold were defined as additive or indifference (31). Negative control was BHI with the bacterial strain and sterility control was only saline.

Checkboard:

To evaluate the potentiating effect of CCeo, combinations of CCeo and POL were assessed against the carbapenemase-producing *K. pneumoniae* and *S. marcescens* (32). The concentration range of each antimicrobial agent ranged from 1/32 times the MIC (1/32 x MIC) to 2 x MIC. POL concentration used as MIC for *S. marcescens* (intrinsic resistance) was 1 µg.mL⁻¹. Two-fold serial dilutions of oils were prepared in horizontal rows of one microtiter plate and two-fold serial dilutions of antibiotics were prepared in vertical rows. The plates were subsequently added well by well resulting in a single plate with both antimicrobial agents cross-diluted. The inoculum used was 1.5 × 10⁶ CFU.mL⁻¹. Resazurin indicated viable bacteria. The Fractional inhibitory concentration (FIC) of each combination was then calculated as the ratio of MIC of antimicrobial agent in combination versus MIC of antimicrobial agent alone (33). The ΣFIC is then calculated for each test sample independently as specified in the following equations:

$$FIC^{(*i)} = \frac{\text{MIC (POL) in combination with (CCeo)}}{\text{MIC (POL) independently}}$$

$$FIC^{(*ii)} = \frac{\text{MIC (CCeo) in combination with (POL)}}{\text{MIC (CCeo) independently}}$$

The FIC index is thus calculated as: ΣFIC = FIC^(*i) + FIC^(*ii). The interpretation of either synergistic (ΣFIC ≤ 0.5), additive (0.5 < ΣFIC < 1.0), noninteractive (1.0 < ΣFIC ≤ 4.0), or antagonistic effect (ΣFIC > 4.0) were used (34). All experiments carried out in duplicate as two independent experiments and the calculated FIC indexes were averaged. Negative control was BHI with the bacterial strain, saline was the sterility control, and sterility of CCeo, POL and water were also assessed. Tween negative control that was bacterial inoculum with 0.5% of tween 80 was also tested.

Determination of cell membrane integrity

Protein leakage through the bacterial membrane:

The integrity of the bacterial cell membrane can be monitored by the release of proteins from the cell into the supernatant. As *S. marcescens* is resistant to POL, it was selected for this assay. The strain was incubated in MacConkey agar at 37 °C for 24 h. Three groups with bacterial inoculum in logarithmic growth phase (0.5 × 10⁸ CFU.mL⁻¹) were placed in a 96 wells microplate, treated with CCeo + POL, CCeo and POL at 0.5 × MIC, 1 × MIC, and 2 × MIC of each agent. CCeo and POL were diluted with distilled water. Saline with bacterium was used

as negative control. The microplate was then incubated at 37 °C for 0, 1, 2 and 4 h. A 1 µL aliquot of CCeO + POL 1 x MIC treatment of 0, 1, 2 and 4 h were seeded in Müller-Hinton agar to confirm the viability of the strain at the time-points. The content of each microplate well were then centrifuged at 2500 rpm for 5 min at 4 °C. The concentration of proteins released from the cytoplasm was then assessed in the supernatant using the Pierce™ BCA Protein Assay kit and read at OD 490 nm with iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad). The experiment was performed in triplicates.

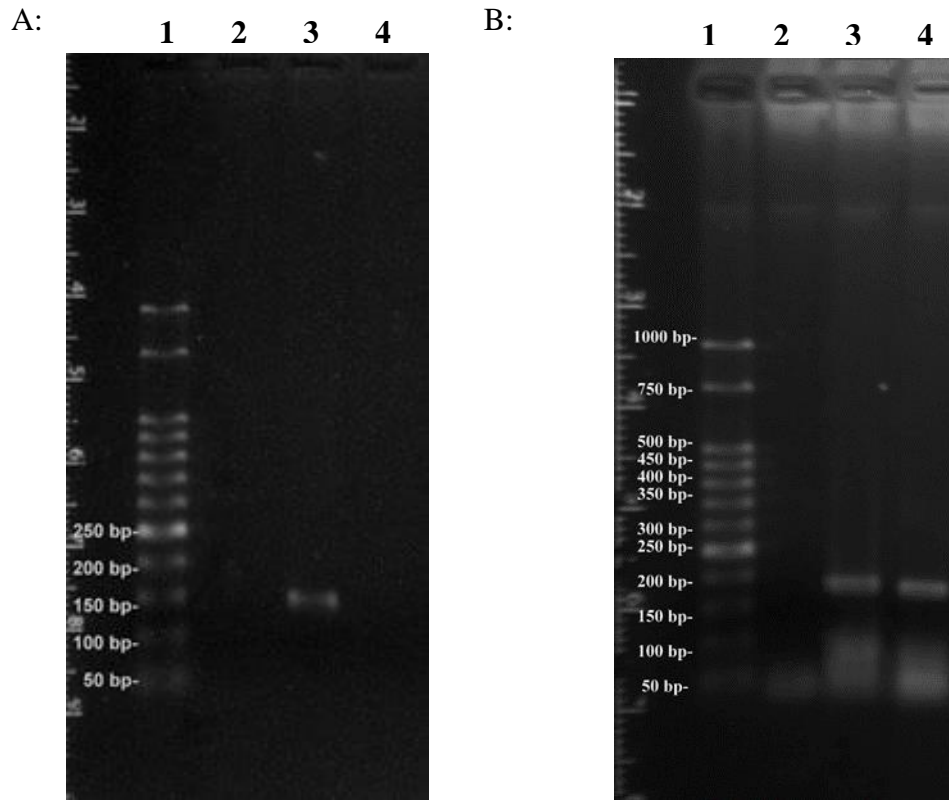
Results

The isolates were tested by broth microdilution and showed resistance to carbapenems. Sensitivity was observed only to colistin for *K. pneumoniae* and AMI and GEN for *S. marcescens* (Table S1). All strains were identified as carbapenemase-producers by MHT and using MALDI-ToF ToF for confirmation. PCR amplification showed that the *bla*_{KPC-2} gene was present in *K. pneumoniae* and *bla*_{KPC-2}, *bla*_{IMP-10} and *arnB* in *S. marcescens*. The presence of *bla*_{CTX-M-1-like}, *bla*_{CTX-M-2-like}, *bla*_{CTX-M-8-like}, *bla*_{CTX-M-14-like}, *bla*_{GES-like}, *bla*_{GIM-like}, *bla*_{IMP-like}, *bla*_{NDM-like}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{SIM-like}, *bla*_{SME-like}, *bla*_{SPM-like}, *bla*_{TEM-like} and *bla*_{VIM-like} genes were not detected. Presence of the *arnB* gene in *S. marcescens* was confirmed by PCR and RT-PCR. Using the same amount of *S. marcescens* cDNA (40 ng), RT-PCR presented amplification, confirming expression of the *arnB* gene, in both samples, before and after treatment with CCeO + POL, showing a reduction in the intensity of the product amplification in the electrophoresis gel post treatment. 16S rRNA transcripts declined when cells of *S. marcescens* were in contact with CCeO + POL as verified by RT-qPCR, proving that there was a decrease in bacterial cells number. When treated with POL alone, *arnB* RT-PCR transcripts are present before and after 1 h treatment (figure S1).

Supplementar material: Table S1. Sensitivity of bacterial strains to the action of different antibiotics (results expressed in $\mu\text{g.mL}^{-1}$) assessed by Vitek[®] 2.

Antibiotics	MIC (Interpretation)	
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. marcescens</i>
Amikacin	>32 (R)	16 (S)
Ampicillin	>16 (R)	>16 (R)
Aztreonam	>16 (R)	>16 (R)
Cefoxitin	>16 (R)	>16 (R)
Ceftazidime	16 (R)	8 (R)
Cefepime	>16 (R)	8 (R)
Ciprofloxacin	>2 (R)	>2 (R)
Ertapenem	>4 (R)	>4 (R)
Gentamicin	>8 (R)	≤ 2 (S)
Imipenem	>8 (R)	>8 (R)
Levofloxacin	>4 (R)	>4 (R)
Meropenem	>8 (R)	>8 (R)
Nitrofurantoin	>64 (R)	>64 (R)
Piperacillin/Tazobactam	>64/4 (R)	64/4 (R)
Polymyxin B	≤ 1 (S)	(IR)
Tigecycline	2 (I)	4 (R)
Sulfamethoxazole/Trimethoprim	>4/76 (R)	$\leq 1/19$ (S)

MIC: minimal inhibitory concentration; (S): susceptibility; (I): intermediate; (R): resistance; (IR): intrinsic resistance.



Supplementar material: Figure S1. Agarose gels electrophoresis for the detection of the expression of *arnB* mRNA (169 bp) in *S. marcescens* strain by RT-PCR stained with GelRed. A: CCeo + POL. Lane 1: molecular weight marker Ludwig 50x (50 bp); lane 2: negative control; lane 3: before treatment; lane 4: after 1 hour of treatment. B: POL. Lane 1: molecular weight marker Ludwig 50x (50 bp); lane 2: negative control; lane 3: before treatment; lane 4: after 1 hour of treatment.

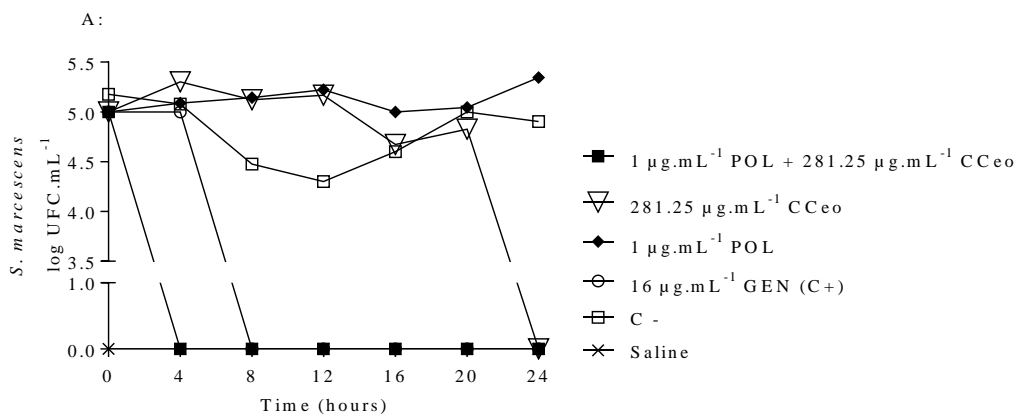
The CCeo exhibited inhibitory effect against *K. pneumoniae* and *S. marcescens* with MICs = 281.25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Trans-cinnamaldehyde's MIC was also evaluated and found to be the same as CCeo 281.25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for both strains. The initial synergism trial using the disk-diffusion method showed potentiation of IPM and POL when associated with CCeo. PCR results, disk diffusion, MIC of CCeo against carbapenemase-producing strains and synergism effect are shown in table 2.

Table 2. Antibacterial action of CCeo and TC using disk-diffusion and broth microdilution and synergism between CCeo and antibiotics using disk-diffusion as screening.

Method	Antimicrobial agent	Bacteria	
		<i>K. pneumoniae</i> <i>bla</i> _{KPC-2}	<i>S. marcescens</i> <i>bla</i> _{KPC-2} ; <i>bla</i> _{IMP-10} ; <i>arnB</i>
MIC	CCeo	25 mm (S)	16 mm (S)
	TC	281.25 µg.mL ⁻¹	281.25 µg.mL ⁻¹
	CCeo	281.25 µg.mL ⁻¹	281.25 µg.mL ⁻¹
Disk-diffusion	CCeo + IPM	25 mm *	20 mm *
	CCeo + POL	2 mm *	6 mm *

CCeo: *Cinnamomum cassia* essential oil; IPM: imipenem; IR: intrinsic resistance; MIC: minimum inhibitory concentration; POL: polymyxin B; S: susceptibility; TC: trans-cinnamaldehyde; *: diameter of inhibition zone in mm of CCeo + antibiotic minus diameter of inhibition zone of antibiotic.

Survival curves of the strains showed a decrease in viable cell counts over time when CCeo was in association with POL (Figure 2). CCeo + POL promoted decreases in cellular count in a range of 5 log₁₀ CFU.mL⁻¹. Considering time of cell death, CCeo inhibited carbapenem-resistant *K. pneumoniae* and carbapenem and POL-resistant *S. marcescens* strains within 24 hours and with CCeo + POL, bacterial load were reduced to undetectable levels within only four hours of treatment, which was faster than POL (20 hours) and GEN (8 hours) for *K. pneumoniae* and *S. marcescens* respectively. The combination CCeo and IPM was unable to reduce bacterial load. For all treatments, IPM had no activity within 24 hours. Control antibiotics (POL and GEN) have successfully inhibited strains before 24 hours. Saline was used as negative control where no growth was observed.



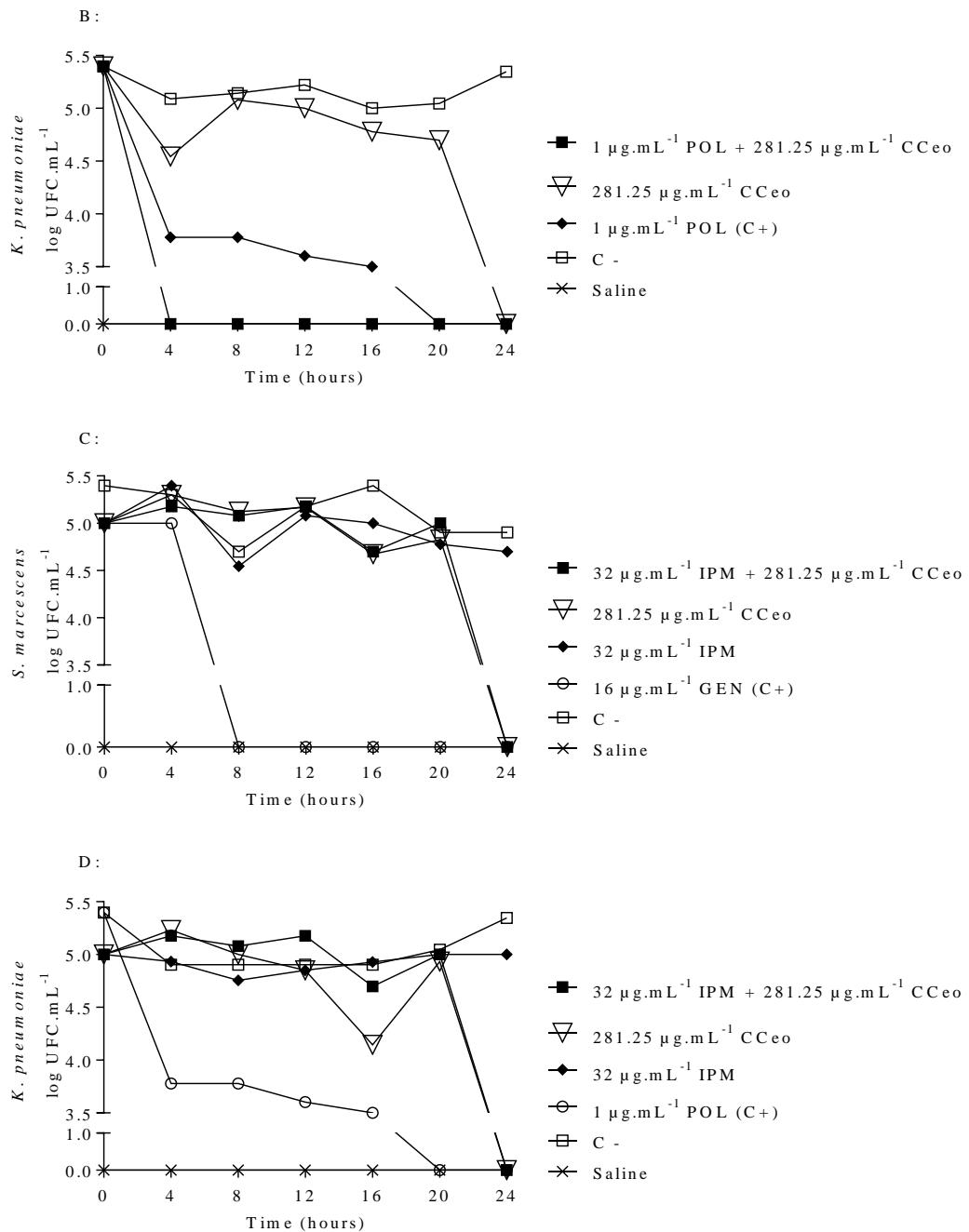
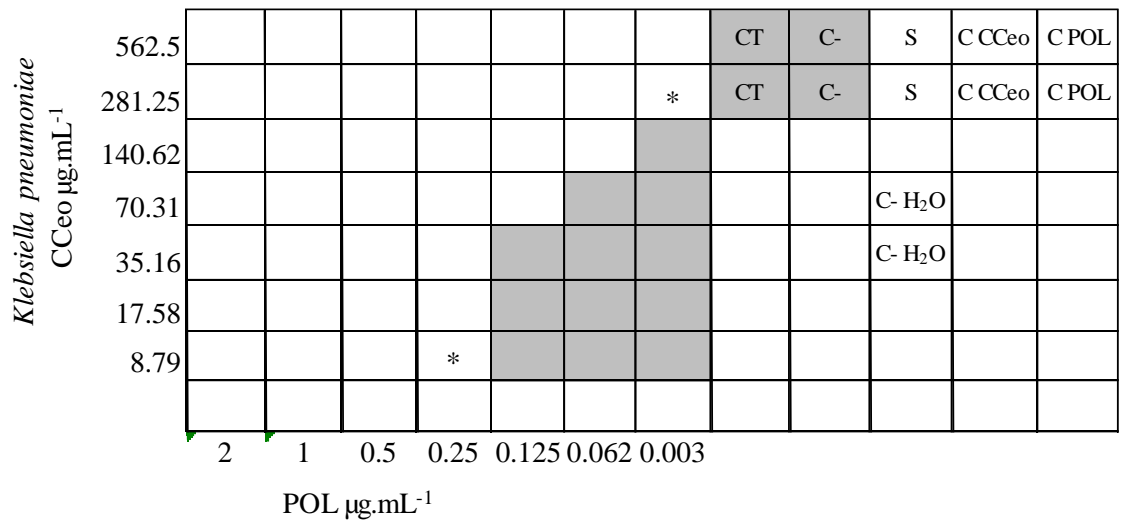


Figure 2. Time-kill curves against the studied carbapenemase-producing strains. A: CCeo x POL against *S. marcescens*. B: CCeo x POL against *K. pneumoniae*. C: CCeo x IPM against *S. marcescens*. D: CCeo x IPM against *K. pneumoniae*. C+: positive control; C-: negative control (*S. marcescens* or *K. pneumoniae* and BHI – Brain Heart Infusion broth); CCeo: *C. cassia* essential oil; GEN: gentamicin; IPM: imipenem; MIC: minimal inhibitory concentration; POL: polymyxin B.

In the checkboard assay, 49 different combinations of CCeo and POL were tested for each strain, ranging from twice the MIC to several dilutions below the MIC. A 320-fold reduction of the POL MIC was observed (Figure 3). Checkboard was not done with imipenem because time-kill curves did not prove synergism. FIC Index values were calculated by considering the lowest combinations of CCeo and POL in which there was no visible growth. FIC Index values were 0.006 for both *K. pneumoniae* and *S. marcescens*.

A:



B:

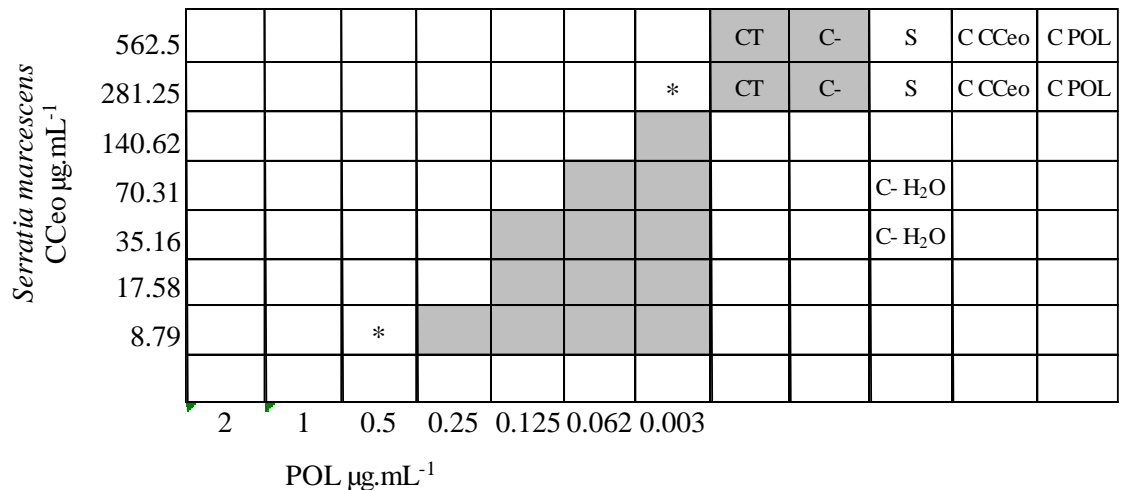
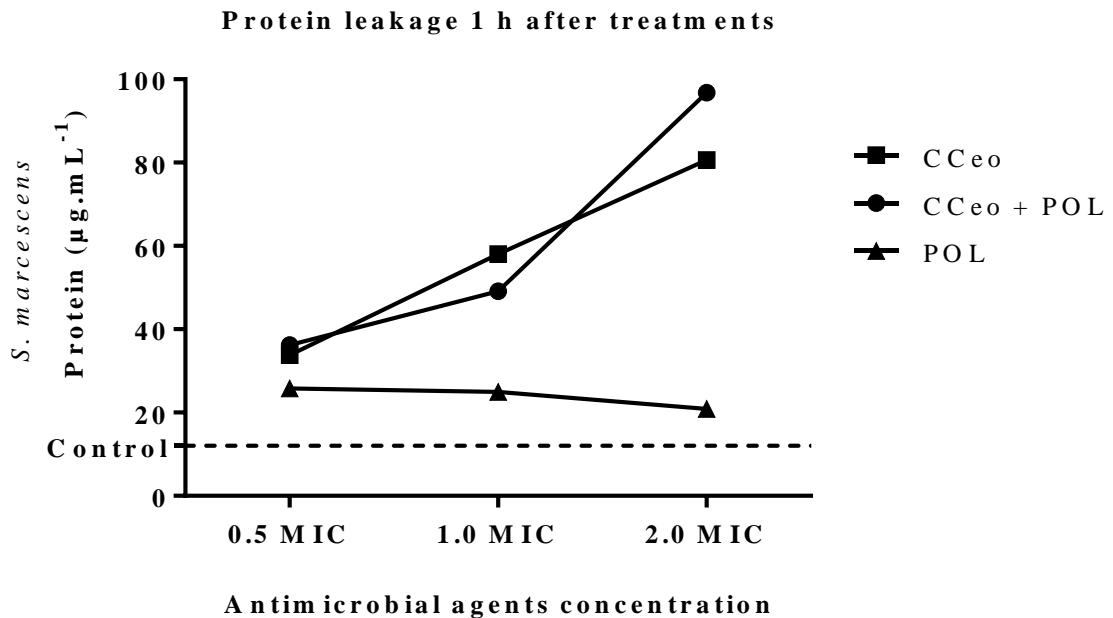


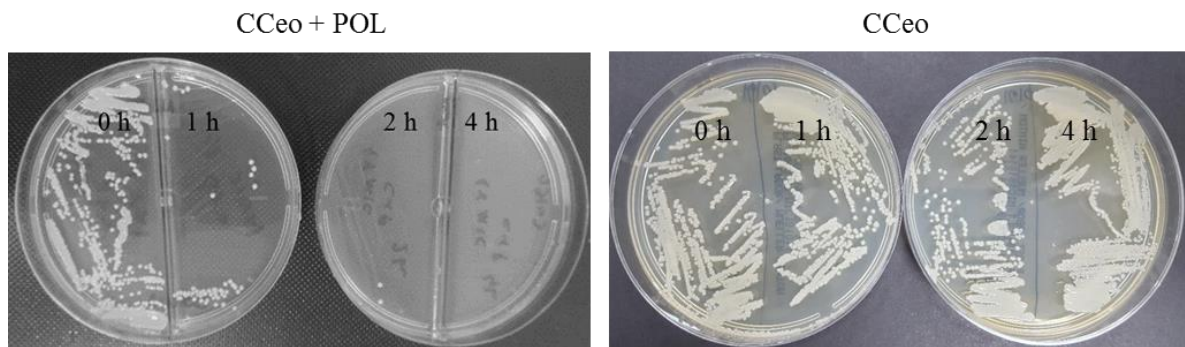
Figure 3. Checkboard against the studied carbapenemase-producing strains. A: *K. pneumoniae* and B: *S. marcescens* - checkboard assays with CCeo and POL against carbapenemase-producing bacteria. Shading: visible growth; *: optimal association concentrations; CT: tween 80 control; C-: negative control; S: sterility control of saline; C- H₂O: water control; C CCeo: sterility control of *C. cassia* essential oil; C POL: sterility control of polymyxin B.

Information on the release of cell constituents reveals the integrity of the cell membrane. Protein externalized the bacterium cell when *S. marcescens* was treated with increasing concentrations of CCEO and CCEO + POL. Initially, protein leakage from bacterium in the control at 1 h was $12.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. With sub-inhibitory concentration ($0.5 \times \text{MIC}$), $33.8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of protein was present at the supernatant of CCEO treatment and $36.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ at CCEO + POL treatment, both at 1 h. With twice the MIC, $80.6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of protein was present at the supernatant of CCEO treatment and $96.8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ at CCEO + POL treatment (1 h), showing an increase in the protein leakage levels. Treatment with POL alone did not show leakage of protein. Müller-Hinton agar plates showed abundant growth at 0 h, an expressive growth reduction at 1 h, only 2 CFU growth at 2 h and total inhibition at 4 h when cells were treated with CCEO + POL. No difference in bacterium growth at 0, 1, 2 and 4 h was observed when cells were treated with CCEO (figure 4), being consistent with time kill assay. No difference was observed in protein leakage among the time-points studied. Protein leakage 1 h after treatments was the time-point chosen to be represented graphically because bacterial cells are still viable to grow in culture media.

A:



B:



C:

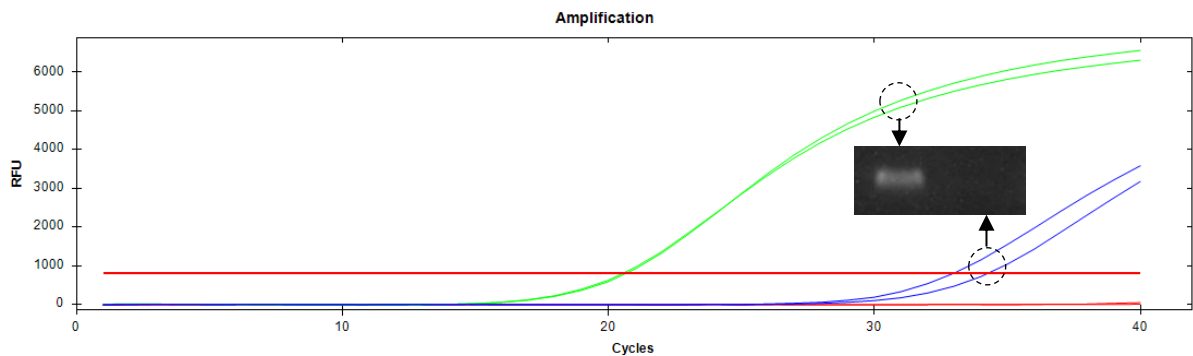


Figure 4. A: Protein leakage from *S. marcescens* after 1 hour of treatment with CCEo (MIC, $281.25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CCEo + POL (MIC CCEo, $281.25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ + MIC POL, $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and POL (MIC, $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Control: saline with *S. marcescens*. CCEo: *C. cassia* essential oil; MIC: minimal inhibitory concentration; POL: polymyxin B. B: Müller-Hinton agar plates seeded with 0 h, 1 h, 2 h, and 4 h aliquots of *S. marcescens* treated with CCEo + POL 1 x MIC and CCEo 1 x MIC. C: Relative expression of 16S rRNA *S. marcescens* gene by RT-qPCR. Green lines: *S. marcescens* without CCEo + POL treatment; blue lines: *S. marcescens* after 1 hour with CCEo + POL treatment; red lines: negative control. Electroforese gel: RT-qPCR products. RFU: Relative fluorescence units.

Discussion

As far as we know, there are no studies of the antibacterial action of *C. cassia* alone or in combination with antibiotics against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae bacteria. *C. cassia* was able to inhibit two strains of Gram-negative bacteria from human specimen resistant to almost all classes of clinical used antibiotics, either alone or in combination with

POL. Antibacterial assays evidences the potential of action of CCeo against carbapenem-resistant *K. pneumoniae* and *S. marcescens* (MIC of 281.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). TC was considered the main component with antibacterial action of CCeo as it showed the same MIC as CCeo, but following the new tendency of studying the whole plant and not single compounds (34), assays were conducted with CCeo as a whole. CCeo + POL was faster than POL and GEN in inhibiting *K. pneumoniae* and *S. marcescens*. Interestingly, this susceptibility was independent of acquired carbapenemase-resistant gene, since *K. pneumoniae* presented *bla*_{KPC-2} and *S. marcescens*, *bla*_{KPC-2} and *bla*_{IMP-10} indicating a mechanism of action not related to the genus, specie or resistance genes. The FIC index value of CCeo and POL in combination confirmed the synergistic effects between these two agents for *K. pneumoniae* and *S. marcescens* and showed the best dosages of each antimicrobial agent when associated.

This study also highlights that, disk-diffusion is not a suitable method for synergism evaluation because even great differences in the diameter of inhibition zone between drugs alone and in association with other agent, may be refuted as indicative of synergism when tested with more accurate methods like time-kill, the gold standard method for synergism (29) and checkboard (31,34).

IPM and POL were chosen for synergism confirmatory tests because they are the therapeutical choices when treating an important Gram-negative infection. For carbapenem-resistant bacterial infections, POL and colistin, used alone or in combination with other antibiotics are the treatment options used nowadays (35). The global increase in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae has resulted in increased use of those drugs with the inevitable risk of emerging resistance. However, the use of polymyxins is associated with high incidence of toxicity, such as nephrotoxicity and neurotoxicity, including dizziness, muscle weakness, facial and peripheral paresthesia, vertigo, confusion and ataxia, which can lead to respiratory failure or apnea, convulsions and coma (36) besides neuromuscular blockade with sometimes fatal consequences (37). In these circumstances, the possibility of reducing the necessary dose for treatment with POL, when associated with CCeo, is a very interesting result of the present article since POL dose is directly related with its toxicity when used therapeutically. Moreover, lower doses are expected to reduce the selective pressure upon carbapenemase-producing bacteria minimizing resistance induction (35, 38). Concerning CCeo toxicity, the major components of *C. cassia* are considered to be non-toxic and safe agents with no acute or chronic toxicity, no mutagenicity or genotoxicity and no carcinogenicity detected in mammalian studies (39).

In the present world scenario, the lack of new effective antimicrobial agents against carbapenemase-producing and POL-resistant pathogens is a serious global threat to human health and cannot be underestimated (40). Microemulsions and nanoemulsions synthesized using essential oils are drug delivery systems that have demonstrated potent antibacterial activity and due to their physicochemical properties, they can improve the treatment options for human diseases and provide better delivery vehicles for drugs with low bioavailability, thereby decreasing drug toxicity and prolong the usable life of the current antimicrobial drugs (41). CCEo may be used as an excipient for POL, reducing the dose required for treatment.

CCEo was capable to make *S. marcescens*, specie of a gender that have intrinsic resistance to POL, be inhibited by that antibiotic, even with very low FIC value index, what means low MICs of CCEo and antibacterial action with low MICs of POL when it is associated to CCEo. The mechanisms of action of that synergistic effect are possibly CCEo blocking *S. marcescens* strategies to be resistant to POL or increasing the outer membrane permeability, allowing POL to enter the bacterial periplasmic space. The resistance strategies of *S. marcescens* to polymyxins include modifications on their LPS, which normally have negative charges and are the initial targets of polymyxins (42). Evidences indicate that *S. marcescens* can regulate the expression of the *arn* operon, in which stands *arnB* gene, to modify LPS and lead to polymyxins resistance (8). This gene was a target for molecular analysis in order to evaluate where CCEo could possibly act at molecular level in this previously POL resistant bacterium.

Cinnamon essential oils cause irreversible damage to the bacterial membrane, affecting membrane integrity, thereby causing bacterial cell wall lysis, followed by loss of intracellular dense material (43). Several bacterial cell injury such as deformation of the cell membrane, complete loss of membrane integrity, morphological changes, including separation of the cytoplasmic membrane from the cell wall, cell wall and cell membrane lysis, cytoplasmic content leakage, cytoplasmic content polarization, cell distortion and condensation of cytoplasmic content due to abnormal protein precipitation has already been reported for bacteria treated with cinnamaldehyde (44). Reduction in agarose gel intensity of *arnB* expression bands after 1 hour with CCEo + POL treatment showed reduction in POL resistance and is consistent with the fact that *S. marcescens* cells were totally inhibited after 4 hours of the treatment. RT-qPCR confirmed *S. marcescens* reduction in cell number due to CCEo + POL treatment. In order to better understand the synergism mechanisms of action, *S. marcescens* was treated with POL alone and RT-PCR showed expression of *arnB* gene before and after treatment. It is known that contact with POL can upregulate the *arnB* expression in *S. marcescens* (8), indicating that

the bacterial cell is able to sense the presence of POL and have a positive feedback by enhancing *arnB* expression in order to promote better protection against the imminent drug threat. These results reaffirm the hypothesis that CCeO disturbs the bacterial outer membrane allowing POL to enter the cell since when associated with POL, CCeO was able to inhibit that *arnB* overexpression. Another study observed different expression patterns of PmrAB, pmrD, and PhoPQ in the presence or absence of colistin (45). LPS modifications for intrinsic polymyxins resistance are regulated by the two-component systems: PmrAB and PhoPQ. PmrD mediate a pathway that governs the regulation of *pmrAB* expression. All these genes are correlated and are part of a genetic cascade that when activated lead to alterations in bacterial outer membrane in order to confer resistance to polymyxins.

Moreover, it has already been shown that cinnamon reduces the negativity of the electric charge of the *E. coli* membrane cells, which experienced irreversible membrane damage because of the acidification and protein denaturation due to the accumulation of cinnamon bark essential oil components allowing the access of antibiotics to PBPs (penicillin-binding proteins) and the induction of cell death (46). In this study, protein leakage assay provided additional evidence to demonstrate the antibacterial mechanism of CCeO against *S. marcescens*, indicating that CCeO may have facilitated the entry of POL in bacterium cell. It is an interesting observation that the protein concentrations after sub-inhibitory (0.5 x MIC) treatments at all the time-points studied were 2.8 times (CCeO) and 3.0 times (CCeO + POL) higher than the negative control at 1 h. These sub-inhibitory treatment results enlighten the antibacterial mechanism of CCeO by showing that bacterial cells starts to leak proteins when in contact with CCeO when still viable to grow in culture media, allowing the entrance of POL to conclude the lysis of the bacterial cell membrane. At 1 x MIC and 2 x MIC CCeO and CCeO + POL treatments, protein leakage was higher, but there is also possibility of late intracellular contents extravasation due to other pathways of cell death. It is possible to assume that CCeO caused concentration-dependent damage to the cell membranes, destabilized the outer membrane of the *S. marcescens* strain, creating passage for the POL to enter the periplasm of the cell and have its action by disrupting outer membrane integrity, causing leakage of cellular contents, including the proteins, inhibition of cellular respiration and finally leading to cell death (47).

Multidrug-resistant *S. marcescens* has been responsible for outbreaks, particularly in critically ill neonates and patients in intensive care units and are reported to cause more-invasive infections and tend to spread rapidly in nosocomial environments (24,48), so the findings of the present study are of great significance given the current importance of POL in clinical practice and the increased bacterial resistance to that drug. However, the present research was limited

to *in vitro* studies and, since its findings are promising, it should be extended to *in vivo* stage in the future.

Conclusion

CCeo was able to inhibit carbapenemase-producing *K. pneumoniae* and *S. marcescens*, showed potential to act together with POL, being capable of reducing POL effective dose, which would also lower its toxicity and the emergence of POL resistance among carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. The mechanisms of *S. marcescens* sensitivity to POL when associated with CCeo are multifactorial and include the potential of CCeo to destabilize the outer membrane of the bacterium, enabling POL to enter the periplasmic space of bacterial cell and disrupt outer membrane integrity leading to cell death. The results at the present study, therefore, represent a basis for further *in vivo* and clinical studies that could lead to the development of a new treatment with the combination of CCeo and POL to fight multi-drug resistant strains.

Conflict of interest statement:

All authors have no conflict of interest to disclose.

Acknowledgements:

The authors thank the financial support and infrastructure provided by the Laboratório de Pesquisa em Ciência da Saúde (LPCS) and Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) which made this study possible, thank the Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados (HU-UFGD) for the strains of the study. K.E.S. and W.G.M. received a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). This study was conducted with the approval of the Research Ethics Committee from the Universidade Federal da Grande Dourados (no. 039439/2012).

Funding:

This work was partially supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq grants 480949/2013-1 and 407791/2013-2) and the Support Foundation for the Development of Education, Science and Technology in the State of Mato Grosso do Sul (FUNDECT grants 05/2011 and 04/2012).

References:

1. Nordmann P, Poirel L. 2013. Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 68(3):487–489.
2. Hammoudi D, Moubareck CA, Sarkis DK. 2014. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *J Microbiol Methods* 107:106–118.
3. Campos AC, Albiero J, Ecker AB, Kuroda CM, Meirelles LEF, Polato A, Tognim MCB, Wingeter MA, Teixeira JJV. 2016. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K pneumoniae*: A systematic review. *Am J Infect Control* 44(11):1374-1380.
4. Javan AO, Shokouhi S, Sahraei Z. 2015. A review on colistin nephrotoxicity. *Eur J Clin Pharmacol* 71:801–810.
5. Raetz CR, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE. 2007. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem* 76:295–329.
6. Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. 2003. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:593–656.
7. Boll M, Radziejewska-Lebrecht J, Warth C, Krajewska-Pietrasik D, Mayer H. 1994. 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose in LPS of enterobacterial R-mutants and its possible role for their polymyxin reactivity. *FEMS Immunol Med Microbiol* 8(4):329-341.
8. Lin QY, Tsai YL, Liu MC, Lin WC, Hsueh PR, Liaw SJ. 2014. *Serratia marcescens* arn, a PhoP-regulated locus necessary for polymyxin B resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 58:5181–5190.
9. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. 2014. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol* 5:643.
10. Barbosa LN, Probst IS, Andrade BF, Alves FC, Albano M, da Cunha Mde L, Doyama JT, Rall VL, Fernandes Júnior A. 2015. *In vitro* antibacterial and chemical properties of essential oils including native plants from Brazil against pathogenic and resistant bacteria. *J Oleo Sci* 64(3):289-298.
11. Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. 2013. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals* 6:1451-1474.
12. Marto J, Gouveia LF, Gonçalves LM, Ribeiro HM, Almeida AJ. 2018. Design of minocycline-containing starch nanocapsules for topical delivery. *J Microencapsul* 11:1-28.
13. Dave VS, Saoji SD, Raut NA, Haware RV. 2015. Excipient variability and its impact on dosage form functionality. *J Pharm Sci* 104(3):906-915.
14. He S, Zeng KW, Jiang Y, Tu PF. 2016. Nitric oxide inhibitory constituents from the barks of *Cinnamomum cassia*. *Fitoterapia* 112:153-160.
15. Melo AD, Amaral AF, Schaefer G, Luciano FB, de Andrade C, Costa LB, Rostagno MH. 2015. Antimicrobial effect against different bacterial strains and bacterial adaptation to essential oils used as feed additives. *Can J Vet Res* 79(4):285-289.
16. Trinh NT, Dumas E, Thanh ML, Degraeve P, Ben Amara C, Gharsallaoui A, Oulahal N. 2015. Effect of a Vietnamese *Cinnamomum cassia* essential oil and its major component trans-cinnamaldehyde on the cell viability, membrane integrity, membrane fluidity, and proton motive force of *Listeria innocua*. *Can J Microbiol* 61(4):263-271.

17. Andrade BFMT, Barbosa LN, Probst IS, Fernandes Júnior A. 2014. Antimicrobial activity of essential oils. *J Essent Oil Res* 26(1):34–40.
18. Ooi LS, Li Y, Kam SL, Wang H, Wong EY, Ooi VE. 2006. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. *Am J Chin Med* 34(3):511-522.
19. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. 2006. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Sci* 73(2):236-244.
20. Nabavi SF, Di Lorenzo A, Izadi M, Sobarzo-Sánchez E, Daglia M, Nabavi SM. 2015. Antibacterial Effects of Cinnamon: From Farm to Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries. *Nutrients* 7(9):7729-7748.
21. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Five Informational Supplement. CLSI Document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
22. Fehlberg LC, Andrade LH, Assis DM, Pereira RH, Gales AC. 2013. Performance of MALDI-TOF MS for species identification of *Burkholderia cepacia* complex clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 77:126–128.
23. Carvalhaes CG, Cayô R, Assis DM, Martins ER, Juliano L, Juliano MA, Gales AC. 2013. Detection of SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* and class D beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* isolates by use of liquid chromatography-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 51:287–290.
24. Silva KE, Cayô R, Carvalhaes CG, Sachi FPC, Rodrigues-Costa F, Ramos da Silva AC, Croda J, Gales AC, Simionatto S. 2015. Coproduction of KPC-2 and IMP-10 in Carbapenem-Resistant *Serratia marcescens* Isolates from an Outbreak in a Brazilian Teaching Hospital. *J Clin Microbiol* 53(7):2324-2328.
25. Silva KE, Maciel WG, Sacchi FP, Carvalhaes CG, Rodrigues-Costa F, da Silva AC, Croda MG, Negrão FJ, Croda J, Gales AC, Simionatto S. 2016. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: watch out for surgery. *J Med Microbiol* 65(6):547-553.
26. Wong-Leung YL. 1988. Antibacterial activities of some Hong Kong plants used in Chinese medicine. *Fitoterapia* 69(1):11-16.
27. Cavalcanti YW, Almeida LFD, Padilha WWN. 2011. Antifungal Activity of Three Essential Oils on Candida Strains. *Rev Odontol Bras Central* 20(52):68-73.
28. Pessoa OD, Carvalho CBM, Silvestre JOVL, Lima MCL, Neto RM, Matos FJA, Lemos TLG. 2005. Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia aff. gracillis*. *Fitoterapia* 76(7-8):712-714.
29. Beale AS, Sutherland R. Measurement of combined antibiotic action in antibiotics: Assessment of antimicrobial activity and resistance. London, UK: Academic Press (Inc.); 1983.
30. Morinaka A, Tsutsumi Y, Yamada K, Takayama Y, Sakakibara S, Takata T, Abe T, Furuuchi T, Inamura S, Sakamaki Y, Tsujii N, Ida T. 2016. *In Vitro* and *In Vivo* Activities of OP0595, a New Diazabicyclooctane, against CTX-M-15-Positive *Escherichia coli* and KPC-Positive *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 60(5):3001-3006.

31. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. 1996. Comparison of Three Different *In Vitro* Methods of Detecting Synergy: Time-Kill, Checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother* 40(8):1914–1918.
32. Touani FK, Seukep AJ, Djeussi DE, Fankam AG, Noumedem JA, Kuete V. 2014. Antibiotic-potential activities of four Cameroonian dietary plants against multidrug-resistant Gram-negative bacteria expressing efflux pumps. *BMC Complement Altern Med* 14:258.
33. van Vuuren SF, Viljoen AM. 2008. *In vitro* evidence of phyto-synergy for plant part combinations of *Croton gratissimus* (Euphorbiaceae) used in African traditional healing. *J Ethnopharmacol* 119(3):700-704.
34. van Vuuren S, Viljoen A. 2011. Plant-Based Antimicrobial Studies – Methods and Approaches to Study the Interaction between Natural Products. *Planta Med* 77:1168–1182.
35. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16(2):161-168.
36. Falagas ME, Kasiakou SK, Tsiodras S, Michalopoulos A. 2006. The use of intravenous and aerosolized polymyxins for the treatment of infections in critically ill patients: a review of the recent literature. *Clin Med Res* 4(2):138-146.
37. Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. 2015. Colistin, Mechanisms and Prevalence of Resistance. *Curr Med Res Opin* 31(4):707-721.
38. Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas MV, Ozdamar M, Türkoglu S, Nordmann P. 2015. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 70(1):75-80.
39. Bickers D, Calow P, Greim H, Hanifin JM, Rogers AE, Saurat JH, Sipes IG, Smith RL, Tagami H. 2005. A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients. The RIFM expert panel. *Food Chem Toxicol* 43:799–836.
40. Jasovský D, Littmann J, Zorzet A, Cars O. 2016. Antimicrobial resistance - a threat to the world's sustainable development. *Ups J Med Sci* 121(3): 159-164.
41. Franklyne JS, Mukherjee A, Chandrasekaran N. 2016. Essential oil micro- and nanoemulsions: promising roles in antimicrobial therapy targeting human pathogens. *Lett Appl Microbiol* 63(5):322-334.
42. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JD, Vinogradov E, Seemann T, Henry R, Crane B, St Michael F, Cox AD, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD. 2010. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother* 54:4971–4977.
43. Wang Y, Zhang Y, Shi YQ, Pan XH, Lu YH, Cao P. 2018. Antibacterial effects of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark essential oil on *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Pathog* 116:26-32.
44. Albano M, Alves, FCB, Andrade BFMT, Barbosa LN, Pereira AFM, daCunha MLRS, Rall VLM, Fernandes Júnior A. 2016. Antibacterial and anti-staphylococcal enterotoxin activities of phenolic compounds. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 38:83–90.

45. Kim SY, Choi HJ, Ko KS. 2014. Differential expression of two-component systems, *pmrAB* and *phoPQ*, with different growth phases of *Klebsiella pneumoniae* in the presence or absence of colistin. *Curr Microbiol* 69(1):37-41.
46. Yap PS, Krishnan T, Chan KG, Lim SH. 2015. Antibacterial mode of action of *Cinnamomum verum* bark essential oil, alone and in combination with piperacillin, against a multi-drug-resistant *Escherichia coli* strain. *J Microbiol Biotechnol* 25(8):1299–1306.
47. Vasconcelos NG, Croda J, Simionatto S. 2018. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microb Pathog* 120:198-203.
48. Merkier AK, Rodríguez MC, Togneri A, Brengi S, Osuna C, Pichel M, Cassini MH. 2013. *Serratia marcescens* Argentinean Collaborative Group, Centrón D. Outbreak of a cluster with epidemic behavior due to *Serratia marcescens* after colistin administration in a hospital setting. *J Clin Microbiol* 51(7):2295-2302.

5.2 Artigo 2:

Short communication

A ser submetido para a revista **Phytomedicine**

<https://www.elsevier.com/journals/phytomedicine/0944-7113/guide-for-authors#20001>

Classificação Capes: A2 na área Medicina II

Fator de impacto: 3.526

Antibacterial activity of *Cinnamomum cassia* L. essential oil in a carbapenem and polymyxin-resistant *Enterobacter cloacae* strain

Nathalie Gaebler Vasconcelos^{a,b}, Késia Esther Silva^a, Júlio Croda^{a,c,d}, and Simone Simionatto^a

^a Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil.

^b Hospital Universitário de Dourados, Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil.

^c Fundação Oswaldo Cruz, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

^d Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva, s/nº | Bairro Universitário - CEP 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

*Corresponding author:

Current Address: Rodovia Dourados - Itahum km 12, Cidade Universitária, CEP: 79804-970, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. E-mail: simonesimionatto@ufgd.edu.br.

Abstract

Background: The emergence of bacterial multidrug resistance is an important public health problem that has resulted in the need to explore novel sources of antibiotics with novel mechanisms of action. Natural plant products are sources for novel drug development, as they have several biological properties, including antimicrobial activity and cinnamon oil has been found to exhibit antimicrobial effects on multidrug-resistant Gram-negative.

Purpose: The objective of the present study was to evaluate the antibacterial activity of *Cinnamomum cassia* L. essential oil (CCeo) against carbapenem and polymyxin-resistant *Enterobacter cloacae* strain.

Study design: CCeo was tested against carbapenem and polymyxin-resistant *Enterobacter cloacae* strain.

Methods: The antibacterial activity of CCeo was evaluated using the broth microdilution and time-kill methods. PCR and genome sequencing were performed to confirm strain multiresistance profile.

Results: Molecular analysis proved the studied *E. cloacae* strain high resistance to antibiotics. CCeo exhibited an inhibitory effect against carbapenem and polymyxin-resistant *Enterobacter cloacae* strain (minimum inhibitory concentration [MIC], 17.57 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The survival curves of the strain showed a decrease in viable cell counts over time after a 24 h treatment with CCeo.

Conclusion: The antibacterial effect of CCeo was consistent, making it an interesting candidate for the development of alternative therapeutic options against carbapenem and polymyxin-resistant *Enterobacter cloacae* strains. Further studies with animal models are necessary to better understand the *in vivo* efficacy of CCeo.

Keywords: antibacterial activity; *Cinnamomum cassia* L. essential oil; carbapenemase; natural plant products; polymyxin.

Introduction:

The emergence of multidrug-resistant Gram-negative (MDR-GN) bacteria has been a public health issue, the cases of *Enterobacter* spp. infections with acquired resistance to most classes of commercially available antimicrobial agents including carbapenems and polymyxins are rising all over the world (Rosa et al., 2017). Carbapenems are frequently used to treat serious infections caused by MDR-GN, especially those with production of AmpC cephalosporinases or extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), such as infections caused by *Enterobacter* spp. (Bratu et al., 2005). This scenario led to the reconsideration of polymyxins, cationic polypeptide antibiotics, classified by letters A to E, developed over 50 years ago (Storm et al., 1977), as a valuable therapeutic option. Reports of common and serious nephrotoxicity and neurotoxicity (Koch-Weser et al., 1970) limited their use until the rise of MDR-GN.

However, Gram-negative bacteria are recently demonstrating great capability of acquiring resistance to polymyxins despite the fact of the high pressure on them with a variety of antimicrobial classes used in clinical treatment. Acquired resistance to polymyxins in MDR-GN started to be common only in the recent years, probably due to the little use of these agents over the last 50 years. Polymyxin-resistant *Enterobacter* spp. have been identified and have been increasingly reported (Baron et al., 2017; Denervaud-Tendon et al., 2017; Liu et al., 2016). This highlights the urgency of studying novel alternatives of treatment. Plant-derived essential oils contain potent natural agents that have been used for hundreds of years to combat pathogens, such as, bacteria, fungi, and viruses (Hammer et al., 1999). Cinnamon oil has been found to exhibit antimicrobial effects on MDR-GN (Guerra et al., 2012; Yap et al., 2015). In this study, the *Cinnamomum cassia* oil (CCeo) efficacy in inhibiting a carbapenem and polymyxin-resistant strain of *Enterobacter cloacae* was evidenced.

Material and Methods:**Essential oil**

The essential oil used in this study was *C. cassia*, a clear liquid yellow to brown oil, extracted by leaf, bark and branches steam distillation, with density of 1.053, originated from China and acquired commercially by Ferquima Ind. Com. LTDA (São Paulo, Brazil), CAS number: 84961-46-6. Cinnamaldehyde is the most prevalent compound (87.6%), followed by α -humulene (3.1%), γ -elemene (2.5%), borneol (1.5%), cinnamic acid (0.7%), benzaldehyde (0.5%) and eugenol (0.4%), according to the technical report presented by the supplier.

Bacterial strain

A clinical isolate of carbapenem and polymyxin-resistant *E. cloacae*, was identified in September 2015, in a vigilance culture (nasal swab) in a Brazilian's teaching hospital. The isolate were identified and characterized about its sensibility to antibiotics by BD Phoenix™100 (Becton Dickinson, Frankling Lakes, NJ). Preliminary screening for the presence of carbapenemase was performed by the modified Hodge test (CLSI, 2015). The study was conducted with the approval of the Research Ethics Committee from the Universidade Federal da Grande Dourados (Process No. 877.292/2014).

Molecular analysis

Polimerase Chain Reaction (PCR) and sequencing was performed to search for the presence of the carbapenems resistance genes *bla*_{CTX-M-1-like}, *bla*_{CTX-M-2-like}, *bla*_{CTX-M-8-like}, *bla*_{CTX-M-14-like}, *bla*_{GES-like}, *bla*_{GIM-like}, *bla*_{IMP-10}, *bla*_{IMP-like}, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{NDM-like}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{SIM-like}, *bla*_{SME-like}, *bla*_{SPM-like}, *bla*_{TEM-like} and *bla*_{VIM-like} (Silva et al., 2015; Silva et al., 2016) and polymyxin B resistance gene *mcr-1* (Liu et al., 2016).

Whole-genome sequencing

Genomic DNA was extracted from fresh culture. The concentration and purity of DNA were determined with a Qubit® 2.0 fluorometer using the dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA). Sequencing library were prepared using the Nextera library kit (Illumina). DNA sample was subjected to sequencing via Illumina MiSeq Platform (Illumina, San Diego, USA), as described previously (Dung et al., 2017). Reads were mapped to a reference sequence and specie identification was confirmed with Kraken (Wood and Salzberg, 2014). Read set was assembled using SPAdes version 3.6.1 and annotated using Prokka (Seemann et al., 2014). Read set was also screened for known alleles of genes using a read mapping approach with SRST2. For acquired resistance genes were used the ARG-ANNOT database (Gupta et al., 2014).

Antibacterial activity

The minimal inhibitory concentration (MIC) of the CCEO was determined by broth microdilution as described by Cavalcanti et al. (2011) and was determined by resazurin colorimetric assay. The time-kill method was performed by the broth macrodilution technique (Morinaka et al., 2016). Positive control was tigecycline with twice the MIC since the studied

strain has intermediate sensitivity to this antibiotic and there was no sensitivity to other pharmacological classes. Negative control was BHI with the bacterial strain and sterility control was only saline.

Results:

The *E. cloacae* strain has an extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and carbapenem and polymyxin-resistant profile and is highly resistant to antibiotics, with the exception of amikacin and tigecycline with intermediate resistance (table 1). The presence of a *bla*_{KPC-2} gene confirmed the carbapenem-resistant profile. Genes *bla*_{CTX-M-1-like}, *bla*_{CTX-M-2-like}, *bla*_{CTX-M-8-like}, *bla*_{CTX-M-14-like}, *bla*_{GES-like}, *bla*_{GIM-like}, *bla*_{IMP-10}, *bla*_{IMP-like}, *bla*_{NDM-like}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{SIM-like}, *bla*_{SME-like}, *bla*_{SPM-like}, *bla*_{TEM-like}, *bla*_{VIM-like} and *mcr-1* were not detected in the studied strain. The assembled genomic data with the ResFinder defined 17 resistance genes. Metallo-beta-lactamase resistance genes encountered were *ampC*, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{OXA-1} and *bla*_{TEM}, other resistance genes were *aac3*, *aac6*, *aphA6*, *catB4*, *dfrA8*, *dfrA14*, *qnrB1*, *strA*, *strB*, *sul2*, *tetA* and *tetR* conferring resistance to aminoglycosides, chloramphenicol, trimethoprim, fluoroquinolones, streptomycin, sulfamethoxazole and tetracycline.

The CCEo exhibited inhibitory effect for studied carbapenem and polymyxin-resistant *E. cloacae* strain, with low percentages of the essential oil 0.0019% and MIC of 17.57 µg.mL⁻¹. The survival curve of the strain showed a decrease in viable cell counts over time as seen in figure 1. Treatment with CCEo showed decrease in cell counts of approximately 5 log₁₀ CFU.mL⁻¹. Considering the time of cell death, the results showed total inhibition of carbapenem and polymyxin-resistant *E. cloacae* with cell counts reduced to zero after 24 h of treatment with CCEo. Furthermore, imipenem and polymyxin B showed no activity for up to 24 h. Tigecycline was used at twice the MIC value as positive control and successfully inhibited the strain within 24 h. Saline was used as the negative control.

Table 1. Antimicrobial susceptibility patterns (MICs in $\mu\text{g.mL}^{-1}$) assessed by Vitek[®] 2.

Amikacin	32 (I)	Gentamicin	≤ 2 (R)
Aztreonam	>16 (R)	Imipenem	8 (R)
Ceftazidime	>16 (R)	Meropenem	8 (R)
Cefepime	>16 (R)	Piperacillin/Tazobactam	>64 (R)
Ceftriaxone	>32 (R)	Polymyxin B	>4 (R)
Ciprofloxacin	>2 (R)	Tigecycline	2 (I)
Ertapenem	>4 (R)	Sulfamethoxazole/Trimethoprim	>4 (R)

(I): intermediate, (R): resistance.

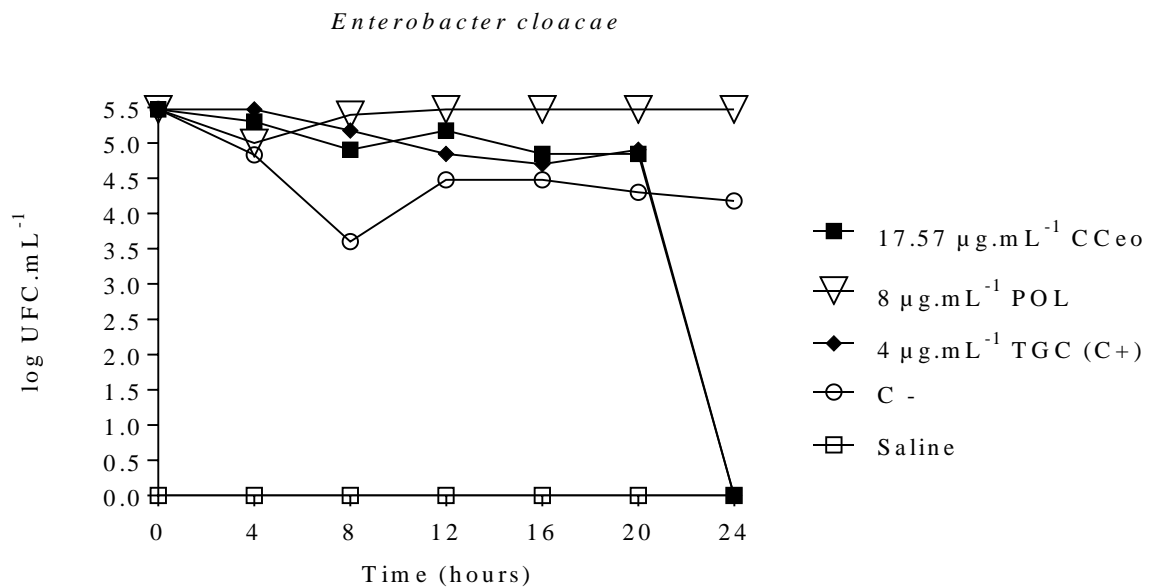


Figure 1. Time-kill curves with CCeo against the carbapenem and polymyxin-resistant *E. cloacae* strain. CCeo, *C. cassia* L. essential oil; MIC, Minimal Inhibitory Concentration, POL, polymyxin B; C+: positive control; C-: negative control (*E. cloacae* and BHI – Brain Heart Infusion broth).

Discussion:

With a great number of antibiotics having been found to be ineffective, the use of medicinal plants as a potential source of novell antibiotics to treat microbial infections has increased (Hammer et al., 1999). The CCeo possess promising antibacterial properties against the carpapenem and polymyxin-resistant *E. cloacae* strain, resistant to almost all classes of

clinical used antibiotics, with low MIC of $17.57 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and time kill curves showing counts of bacteria cell reducing to zero within 24 hours. As far as we know, it is the first report of antibacterial action of CCEO against multidrug-resistant *Enterobacter* sp. Only one study with CCEO against a sensible strain of *Enterobacter* sp. is found in literature, presenting a $600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MIC (Ooi et al., 2006). To analyze the mechanisms of antimicrobial resistance, phenotypic and molecular analyses of carbapenem and polymyxin-resistant *E. cloacae* were performed. Phenotypic antimicrobial resistance to carbapenems and polymyxin B was confirmed and molecular analysis by PCR allowed discovering of *bla*_{KPC-2} gene elucidating the mechanism of carbapenem resistance. Sequencing also confirmed presence of *bla*_{KPC-2} gene and allowed the acknowledgment of another metallo-beta-lactamase genes such as *ampC*, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1} and *bla*_{TEM}, proving a very difficult to treat *E. cloacae* strain, with a great range of resistance apparatus, possibly capable of transferring related resistance genes, leading to increasing resistance to clinical antibiotics. Resistance to polymyxin B was not due to the presence of *mcr-1* gene and sequencing did not show any known gene of polymyxins resistance. Mutation's molecular analysis of the strain will help to better understand these mechanisms.

The production of carbapenemases by pathogens that are also resistant to polymyxins is a matter of concern, as it drastically reduces the available therapeutic options (Nazzaro et al., 2013). Thus, is urgent the need of new antibiotics for the treatment of infections caused by carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. Carbapenem and polymyxin-resistant Enterobacteriaceae are considered critical in WHO list of priority for research and development of new antibiotics (Langeveld, et al., 2014).

In addition to determining the MICs, our study also used the more accurate time-kill method, which made it possible to verify the speed at which CCEO inhibited the studied bacterium to enhance the understanding of the underlying mechanisms of CCEO's action. However, the mechanism of the antibacterial action of CCEO seems complex. Several pathways could be involved in the inhibitory effects of this oil against bacterial cells, which makes it difficult to determine them. Multiple experiments would be necessary to evaluate all the possible mechanisms and provide a clearer insight into the actions of CCEO. The antimicrobial action of essential oils can involve single or multiple targets. Therefore, their mechanisms of action cannot be attributed to a unique site of action, but are instead a cascade of reactions involving the entire bacterial cell (Morinaka et al., 2016).

About CCEO toxicity, the major components of *C. cassia* are considered to be non-toxic and safe agents with no acute or chronic toxicity, no mutagenicity or genotoxicity and no

carcinogenicity detected in mammalian studies (Bickers et al., 2005), making CCeo even more interesting as raw material for drug development.

Conclusion:

The efficacy of CCeo in inhibiting the growth of carbapenem and polymyxin-resistant *E. cloacae* associated with nosocomial infection was demonstrated in this study. The antibacterial activity was effective with a low concentration of CCeo, making CCeo a favorable candidate for the development of an alternative treatment. This finding is important, considering the critical need for novel sources of antibiotics to address the increasing incidence of drug-resistant human pathogens, especially multidrug-resistant ones. Thus, future studies of CCeo activity and its resistance mechanisms in animal models are necessary to enhance our understanding of its actions and establish its efficacy.

Conflict of interest statement:

All authors have no conflict of interest to disclose.

Acknowledgements:

The authors thank the financial support and infrastructure provided by the Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) which made this study possible; Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados (HU-UFGD) for the strain of the study. K.E.S. and W.G.M. received a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). This study was conducted with the approval of the Research Ethics Committee from the Universidade Federal da Grande Dourados (no. 039439/2012).

Funding:

This work was partially supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq grants 480949/2013-1 and 407791/2013-2) and the Support Foundation for the Development of Education, Science and Technology in the State of Mato Grosso do Sul (FUNDECT grants 05/2011 and 04/2012).

References:

1. Baron, S., Bardet, L., Dubourg, G., Fichaux, M., Rolain, J.M., 2017. mcr-1 plasmid-mediated colistin resistance gene detection in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate in France. J. Glob. Antimicrob. Resist. 10, 35-36.

2. Bickers, D., Calow, P., Greim, H., Hanifin, J.M., Rogers, A.E., Saurat, J.H., Sipes, I.G., Smith, R.L., Tagami, H., 2005. A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients. The RIFM expert panel. *Food Chem. Toxicol.* 43, 799–836.
3. Bratu, S., Landman, D., Alam, M., Tolentino, E., Quale, J., 2005. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 776–778.
4. Cavalcanti, Y.W., Almeida, L.F.D., Padilha, W.W.N., 2011. Antifungal Activity of Three Essential Oils on Candida Strains. *Rev. Odontol. Bras. Central.* 20(52), 68-73.
5. Clinical Laboratory Standards Institute, 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Five Informational Supplement. CLSI Document M100-S25.
6. Denervaud-Tendon, V., Poirel, L., Connolly, L.E., Krause, K.M., Nordmann, P., 2017. Plazomicin activity against polymyxin-resistant Enterobacteriaceae, including MCR-1-producing isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 72(10), 2787-2791.
7. Dung, T.T.N., Duy, P.T., Sessions, O.M., Sangumathi, U.K., Phat, V.V., Tam, P.T.T., To, N.T.N., Phuc, T.M., Hong Chau, T.T., Chau, N.N.M., Minh, N.N., Thwaites, G.E., Rabaa, M.A., Baker, S., 2017. A universal genome sequencing method for rotavirus A from human fecal samples which identifies segment reassortment and multi-genotype mixed infection. *BMC Genomics* 18(1), 324.
8. Guerra, F.Q., Mendes, J.M., Sousa, J.P., Morais-Braga, M.F., Santos, B.H., Melo Coutinho, H.D., Lima, E.de O., 2012. Increasing antibiotic activity against a multidrug-resistant *Acinetobacter* spp by essential oils of *Citrus limon* and *Cinnamomum zeylanicum*. *Nat. Prod. Res.* 26(23), 2235-2238.
9. Gupta, S.K., Padmanabhan, B.R., Diene, S.M., Lopez-Rojas, R., Kempf, M., Landraud, L., Rolain, J.M., 2014. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58(1), 212-220.
10. Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86, 985–990.
11. Koch-Weser, J., Sidel, V.W., Federman, E.B., Kanarek, P., Finer, D.C., Eaton, A.E., 1970. Adverse effects of sodium colistimethate: manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. *Ann. Intern. Med.* 72, 857–868.
12. Langeveld, W.T., Veldhuizen, E.J.A., Burt, S.A., 2014. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Crit Rev Microbiol.* 40(1), 76-94.
13. Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.H., Shen, J., 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* 16(2), 161-168.
14. Morinaka, A., Tsutsumi, Y., Yamada, K., Takayama, Y., Sakakibara, S., Takata, T., Abe, T., Furuuchi, T., Inamura, S., Sakamaki, Y., Tsujii, N., Ida, T., 2016. *In Vitro* and *In Vivo* Activities of OP0595, a New Diazabicyclooctane, against CTX-M-15-Positive *Escherichia coli* and KPC-Positive *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60(5), 3001-3006.
15. Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V., 2013. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals.* 6, 1451-1474.

16. Ooi, L.S., Li, Y., Kam, S.L., Wang, H., Wong, E.Y., Ooi, V.E., 2006. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. *Am. J. Chin. Med.* 34(3), 511-522.
17. Rosa, J.F., Rizek, C., Marchi, A.P., Guimaraes, T., Miranda, L., Carrilho, C., Levin, A.S., Costa, S.F., 2017. Clonality, outer-membrane proteins profile and efflux pump in KPC-producing *Enterobacter* sp. in Brazil. *BMC Microbiol.* 17(1), 69.
18. Seemann T., 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30(14), 2068-2069.
19. Silva, K.E., Cayô, R., Carvalhaes, C.G., Sachi, F.P.C., Rodrigues-Costa, F., Ramos da Silva, A.C., Croda, J., Gales, A.C., Simionatto, S., 2015. Coproduction of KPC-2 and IMP-10 in Carbapenem-Resistant *Serratia marcescens* Isolates from an Outbreak in a Brazilian Teaching Hospital. *J. Clin. Microbiol.* 53(7), 2324-2328.
20. Silva, K.E., Maciel, W.G., Sacchi, F.P., Carvalhaes, C.G., Rodrigues-Costa, F., da Silva, A.C., Croda, M.G., Negrão, F.J., Croda, J., Gales, A.C., Simionatto, S., 2016. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: watch out for surgery. *J. Med. Microbiol.* 65(6), 547-553.
21. Storm, D.R., Rosenthal, K.S., Swanson, P.E., 1977. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 723-763.
22. Yap, P.S., Krishnan, T., Chan, K.G., Lim, S.H., 2015. Antibacterial Mode of Action of *Cinnamomum verum* Bark Essential Oil, Alone and in Combination with Piperacillin, Against a Multi-Drug-Resistant *Escherichia coli* Strain. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25(8), 1299-1306.
23. Wood, D.E., Salzberg, S.L., 2014. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.* 15(3), R46.

6 CONCLUSÕES

O CCeo foi capaz de inibir *K. pneumoniae* e *S. marcescens*, produtoras de carbapenemase e *E. cloacae* produtor de carbapenemase e resistente à POL. A atividade antibacteriana foi eficaz com uma baixa concentração de CCeo para *E. cloacae* e mostrou potencial para interagir com POL para o tratamento de *K. pneumoniae* e *S. marcescens*. CCeo pode possivelmente atuar reduzindo doses da POL, diminuindo toxicidade e surgimento da resistência à POL entre bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemases. CCeo desestabiliza a membrana externa da bactéria possibilitando a entrada da POL no espaço periplasmático, o que leva à morte celular; porém os mecanismos de sensibilidade de *S. marcescens* à POL, quando associados ao CCeo, são multifatoriais e necessitam ser elucidados. Considerando a necessidade crítica de novas fontes de antibióticos para abordar a crescente incidência de patógenos humanos resistentes a drogas, especialmente os resistentes a múltiplos fármacos, os resultados dessa pesquisa representam uma base para mais estudos, inclusive *in vivo* e clínicos, para estabelecer melhor a eficácia e mecanismos de ação da combinação de CCeo e POL para o desenvolvimento de novos tratamentos.

7 ANEXOS

Este estudo propôs fazer uma busca por produtos naturais com atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemase. Foram testados inicialmente 37 extratos de plantas e 13 óleos essenciais (tabela 2).

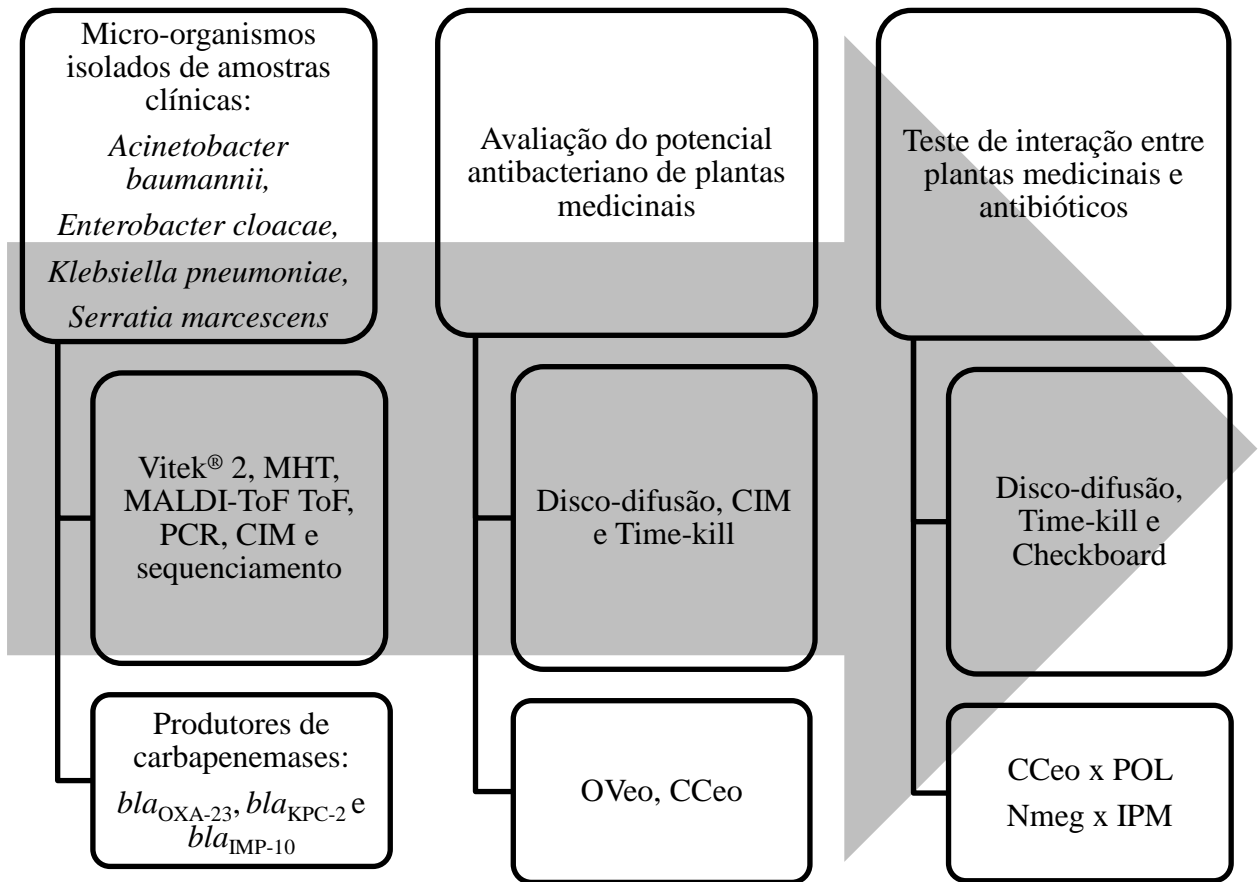
Tabela 2. Relação dos extratos de plantas e óleos essenciais triados para atividade antibacteriana e sinergismo com antibióticos contra bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemases.

	Siglas	Extratos	Atividade antibacteriana/sinergismo com antibióticos
1	Aa1	Extrato aquoso de <i>Alchornea glandulosa</i> folhas	-
2	Aa2	Guanidina alcalóide N-1, N-2, N-3-triisopentenilguanidina (Composto de <i>Alchornea glandulosa</i>)	-
3	AC	Extrato metanólico de <i>Annona crassiflora</i>	-
4	ACA	Extrato metanólico de <i>Annona cacans</i> folhas	-
5	ACO	Extrato metanólico de <i>Annona coriácea</i> folhas	-
6	ACRA	Extrato metanólico de <i>Annona crassiflora</i> folhas	-
7	AG	Extrato metanólico de <i>Alchornea glandulosa</i> folhas	-
8	ALT	<i>Alternanthera</i> sp.	-
9	AS	Extrato metanólico de <i>Annona sylvatica</i> folhas	-
10	BARC	Extrato metanólico de <i>Stryphnodendron adstringens</i> casca	-
11	BARF	Extrato metanólico de <i>Stryphnodendron adstringens</i> folhas	-
12	BLU	<i>Blutaparon</i> sp.	-
13	CAF	Extrato etanólico de <i>Copernicia australis</i> frutas	-
14	CAFL	Extrato etanólico de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> frutas	-
15	CAR	Extrato metanólico de <i>Psychotria carthagenensis</i> folhas	-
16	CG	Extrato metanólico de <i>Cephalantus glabratus</i> folhas	-
17	DF	Extrato metanólico de <i>Stryphnodendron adstringens</i> folhas	-
18	GC	Extrato etanólico de <i>Gomphrena celosioides</i> partes aéreas	-
19	HSC	Extrato metanólico de <i>Hibiscus sabdariffa</i> casca	-
20	HSF	Extrato metanólico de <i>Hibiscus sabdariffa</i> folhas	-
21	MG	<i>Myrcia guianensis</i>	-
22	MU	<i>Byrsonima crassifolia</i> raiz e caule	-
23	PA CHCl3	Fração clorofórmica de <i>Piper amalago</i> folhas	-
24	PA HEXA	Fração hexânica de <i>Piper amalago</i> folhas	-
25	PC	Extrato metanólico de <i>Palicourea crocea</i> folhas	-

26	PCA	Extrato metanólico de <i>Psychotria carthagenensis</i> folhas	-
27	PCP	Extrato metanólico de <i>Psychotria capilacea</i> folhas	-
28	PDE	Extrato metanólico de <i>Psychotria deflexa</i> folhas	-
29	PE	Extrato metanólico de <i>Paulinia elegans</i> folhas	-
30	PLE	Extrato metanólico de <i>Psychotria leiocarpa</i> folhas	-
31	PV	Extrato metanólico de <i>Piper vicosanum</i>	-
32	RH	Extrato hexânico de <i>Randia armata</i>	-
33	SH	Extrato etanólico de <i>Serjania hebecarpa</i>	-
34	STF	Extrato metanólico de <i>Schinus terebinthifolius</i> folhas	-
35	TSC	Extrato metanólico de <i>Trichilia sylvatica</i> casca	-
36	TSF	Extrato metanólico de <i>Trichilia sylvatica</i> folhas	-
37	UUL	Extrato metanólico de <i>Urvillea ulmaceae</i> folhas	-
	Siglas	Óleos essenciais	
38	OVeo	<i>Origanum vulgare</i> folhas	x
39	CCeo	<i>Cinnamomum cassia</i> folhas e casca	x
40	ROeo	<i>Rosmarinus officinalis</i>	-
41	ZOeo	<i>Zingiber officinale</i>	-
42	Oceo	<i>Ocotea</i> sp. casca	-
43	Cueo	<i>Cunila</i> sp.	-
44	Ocor	<i>Ocotea corymbosa</i> folhas	-
45	Odif	<i>Ocotea diopyrifolia</i> folhas	x
46	Odic	<i>Ocotea diopyrifolia</i> casca	x
47	Nmeg	<i>Nectandra megapotamica</i> flores	x
48	Nmemc	<i>Nectandra membranacea</i> casca	x
49	Nmemf	<i>Nectandra membranacea</i> folhas	x
50	STO	<i>Schinus terebinthifolius</i> frutas	-

Legenda: -: ausência de atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemases; x: presença de atividade antibacteriana ou sinergismo com antibióticos contra bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemase.

Organograma 1. Esquema organizacional e cronológico das avaliações realizadas no presente estudo.



Legenda: CCeo: óleo essencial de *Cinnamomum cassia* L.; CIM: Concentração inibitória mínima; IPM: imipenem; MHT: teste modificado de Hodge; OVeo: óleo essencial de *Origanum vulgare* L.; PCR: reação em cadeia da polimerase; POL: polimixina B.

7.1 Artigo 3:

Artigo submetido 29 de março de 2018 e aceito em 19 de abril de 2018 pela revista **Microbial Pathogenesis**

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401018305667?via%3Dihub>

Classificação Capes: B1 na área Medicina II

Fator de impacto: 2.009

Microbial Pathogenesis 120 (2018) 198–203



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micpath



Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review

N.G. Vasconcelos^{a,b}, J. Croda^{c,d}, S. Simionatto^{a,*}

^a Research Laboratory of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados - UFGD, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil

^b University Hospital of Dourados, Federal University of Grande Dourados - UFGD, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil

^c Oswaldo Cruz Foundation, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

^d Federal University of Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

Antimicrobial activity
Cinnamon
Mechanisms of action
Multi-drug resistance
Synergism
Trans-cinnamaldehyde

ABSTRACT

Background: In the current healthcare environment, an alarming rise in multi-drug resistant bacterial infections has led to a global health threat. The lack of new antibiotics has created a need for developing alternative strategies.

Objective: Understanding the antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents is crucial to enhance it as a potential new source of antibiotic. The objective of this review is to provide a compilation of all described mechanisms of antibacterial action of cinnamon and its constituents and synergism with commercial antibiotics in order to better understand how cinnamon and its constituents can collaborate as alternative treatment to multi-drug resistant bacterial infections.

Methods: The relevant references on antibacterial activities of cinnamon and its constituents were searched. Meanwhile, the references were classified according to the type of mechanism of action against bacteria. Relationships of cinnamon or its constituents and antibiotics were also analyzed and summarized.

Results: Cinnamon extracts, essential oils, and their compounds have been reported to inhibit bacteria by damaging cell membrane; altering the lipid profile; inhibiting ATPases, cell division, membrane porins, motility, and biofilm formation; and via anti-quorum sensing effects.

Conclusion: This review describes the antibacterial effects of cinnamon and its constituents, such as cinnamaldehyde and cinnamic acid, against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria. The review also

7.2 Artigo 4:

Artigo submetido em 27/10/2017 para a revista **The Journal of Infection in Developing Countries**

<https://jidc.org/index.php/journal/about/submissions>

Classificação Capes: B2 na área Medicina II

Fator de impacto: 1.353

***Origanum vulgare* L. essential oil inhibits the growth of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria**

7.3 Artigo 5:

Artigo a ser submetido para a revista **Biomedicine & Pharmacotherapy**

<https://www.elsevier.com/journals/biomedicine-and-pharmacotherapy/0753-3322/guide-for-authors>

Classificação Capes: B1 na área Medicina II

Fator de impacto: 2.759

Antibacterial activity and synergism of *Nectandra megapotamica* (L.) flowers essential oil against OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*

7.4 Artigo 6:

Artigo a ser submetido para a revista **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**

<https://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/submission-guidelines>

Classificação Capes: B1 na área Medicina II

Fator de impacto: 3.13

Genetic toxicological studies and antibacterial activity against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of *Byrsonima crassifolia* (L.) (Murici) extract

7.5 Artigo 7:

Artigo submetido 13 de fevereiro de 2017 e aceito em 29 de setembro de 2017 pela revista

Journal of Essential Oil Bearing Plants

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2017.1394223>

Classificação Capes: B4 na área Medicina II

Fator de impacto: 0.493

TEOP 20 (5) 2017 pp 1184 - 1195

1184



ISSN Print: 0972-060X
ISSN Online: 0976-5026

Chemical Composition, Antitumoral and Antibacterial Activities of Essential Oils from Leaves and Stem Bark of *Nectandra lanceolata* (Lauraceae)

Érica R. Costa ¹, Gabriela M. Louro ¹, Simone Simionatto ³, Nathalie G. Vasconcelos ³,
Claudia A.L. Cardoso ², Viviane Mallmann ¹, Rogério C.L. da Silva ¹, Maria de
F.C. Matos ⁴, Lucas Pizzuti ⁵, Etenaldo F. Santiago ², Ademir F. Morel ⁶,
Marco A. Mostardeiro ⁶ and Euclésio Simionatto ^{1*}

¹ Postgraduate Program in Natural Resources, State University of Mato Grosso do Sul, 79950-000, Naviraí-MS, Brazil

² Postgraduate Program in Natural Resources, State University of Mato Grosso do Sul, 79804-970, Dourados-MS, Brazil

³ Faculty of Biological and Environmental Sciences, Federal University of Grande Dourados, 79804970 - Dourados, MS, Brazil

⁴ Department of Pharmacy-Biochemistry, Federal University of Mato Grosso do Sul, 79070-900 Campo Grande-MS, Brazil

⁵ Faculty of Exact Sciences and Technology, Federal University of Grande Dourados, 79804970 - Dourados, MS, Brazil

⁶ Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria-RS, Brazil

Received 13 February 2017; accepted in revised form 29 September 2017

Abstract: The essential oil of leaves and barks of *Nectandra lanceolata*, obtained by hydrodistillation, was characterized in terms of its chemical composition by GC-FID, GC-MS and NMR. The analyses and identification pointed by mass fragmentation pattern and retention index revealed the presence of 30 compounds in the oil from leaves and 36 compounds in oil from barks, representing 91.8 % of the total leaf oil and 96.5 % of the bark oil. The major compounds of the leaf oil were *E*-caryophyllene (12.45 %), bicylogermacrene (18.2 %) and spathulenol (16.7 %). In the oil from barks, the major compounds were guaiol (13.2 %), cubenol (7.6 %), α -epi-cadinol (4.8 %), γ -cadinene (7.6 %), α -pinene (6.9 %). Moreover, were evaluated the potential of inhibition against the resistant bacteria *Acinetobacter baumannii* and antitumor properties of oils. It was possible to conclude that oil from bark of *Nectandra lanceolata* present more potent activity than oil from leaves. The essential oil from bark of *Nectandra lanceolata* showed more activity against K562 (14.6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) and U251 (37.3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). The content of these fractions was predominantly of the sesquiterpenes, such as guaiol, cubenol,

7.6 Artigo 8:

Artigo aceito em agosto de 2017 pela revista **American Journal of Infection Control**

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196655317308982?via%3Dihub>

Classificação Capes: B1 na área Medicina II

Fator de impacto: 1.929

American Journal of Infection Control 46 (2018) 108-10



Contents lists available at ScienceDirect

American Journal of Infection Control

journal homepage: www.ajicjournal.org



Brief Report

High mortality rate associated with KPC-producing *Enterobacter cloacae* in a Brazilian hospital



Kesia Esther da Silva MSc^a, Tháigor Rezek Varella MD^a,
Graciela Mendonça dos Santos Bet MSc^{a,b}, Cecília Godoy Carvalhaes PhD^c,
Maisa Estopa Correa MSc^a, Nathalie Gaebler Vasconcelos MSc^{a,b}, Julio Croda PhD^{a,b,d},
Ana Cristina Gales PhD^c, Simone Simionatto PhD^{a,*,1}

^a Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados—UFGD, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil

^b Hospital Universitário de Dourados, Universidade Federal da Grande Dourados—UFGD, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil

^c Laboratório ALERTA, Disciplina de Infectologia, Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo—UNIFESP, São Paulo, Brazil

^d Fundação Oswaldo Cruz, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

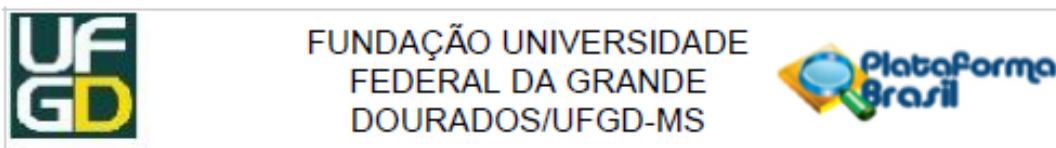
Key Words:

Antibiotic resistance
β-lactamases
Enterobacteriaceae

We describe a clonal dissemination of KPC-producing *Enterobacter cloacae* in a Brazilian hospital. Patients diagnosed with these isolates showed high mortality rate (41.8%) and were associated with previous use of antibiotics and urinary catheterization. Therefore, infection control measures and use of stricter antibiotic policies are required to control the spread of these organisms.

© 2018 Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

7.7 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP):



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Epidemiologia molecular de bactérias gram negativas produtoras de carbapenemases isoladas em Hospitais de Dourados-MS.

Pesquisador: Simone Simionatto

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 4

CAAE: 05666812.3.0000.5160

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

Patrocinador Principal: FUND. DE APOIO E DE DESENV. DO ENSINO, CIENCIA E TECN. DO ESTADO DO MS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 877.292

Data da Relatoria: 09/09/2014

Apresentação do Projeto:

O presente projeto propõe realizar um estudo de epidemiologia molecular de cepas de Enterobactérias produtoras de KPC isoladas de pacientes atendidos no Hospital Universitário HU) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Os resultados obtidos com as técnicas moleculares utilizadas para o diagnóstico e estudo de doenças infecciosas de origem hospitalar serão associados com a prevalência dos agentes envolvidos nestas enfermidades. Através da revisão de prontuários de pacientes internados no hospital será possível identificar os fatores de riscos associados à infecção ou colonização por microorganismos multirresistentes de interesse clínico. Também serão realizadas investigações sobre a relação entre a gravidade dos pacientes e a aquisição dos isolados resistentes, a influência do tempo de exposição ao ambiente hospitalar sobre a aquisição destes agentes infecciosos. Acredita-se que estes estudos possam contribuir para traçar medidas de contenção adequadas bem como para evitar futuros surtos de infecção dentro do ambiente hospitalar, contribuindo desta forma com ações de vigilância em saúde e consequentemente reduzindo os gastos do Sistema Único de Saúde com internações provenientes destes problemas. ao ambiente hospitalar sobre a aquisição destes agentes

Endereço: Rua Melvin Jones, 940

Bairro: Jardim América

UF: MS

Município: DOURADOS

CEP: 79.803-010

Telefone: (67)3410-2853

E-mail: cep@ufgd.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
FEDERAL DA GRANDE
DOURADOS/UFMS



Continuação do Parecer: 877.292

infecciosos. Acredita-se que estes estudos possam contribuir para traçar medidas de contenção adequadas bem como para evitar futuros surtos de infecção dentro do ambiente hospitalar, contribuindo desta forma com ações de vigilância em saúde e consequentemente reduzindo os gastos do Sistema Único de Saúde com internações provenientes destes

problemas.ao ambiente hospitalar sobre a aquisição destes agentes infecciosos. Acredita-se que estes estudos possam contribuir para traçar medidas de contenção adequadas bem como para evitar futuros surtos de infecção dentro do ambiente hospitalar, contribuindo desta forma com ações de vigilância em saúde e consequentemente reduzindo os gastos do Sistema Único de Saúde com internações provenientes destes problemas.

Objetivo da Pesquisa:

Estudar a ocorrência de Enterobactérias produtoras de carbapenemase (KPC) isoladas de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Dourados, visando identificar os fatores de riscos associados a aquisição de infecções causadas por estas bactérias.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Quanto aos benefícios parece ser uma proposta que possibilitará auxiliar ações de vigilância em saúde. A avaliação dos riscos inerentes à coleta das amostras dos pacientes é inexistente. No entanto, a pesquisa é retrospectiva, uma vez que o material já foi coletado em procedimento padrão da instituição em que será realizada a pesquisa, o que torna suficiente a avaliação ora apresentada no protocolo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O tema é relevante e os resultados da pesquisa podem contribuir com ações de vigilância em saúde no HU. A pesquisadora realizou adendo no protocolo (embora sem documento de encaminhamento) que corresponde ao aumento no número de participantes na pesquisa. O aumento seria de 300 participantes mudança no n de 200 para 500 participantes).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Descreve suficientemente o procedimento para obtenção do TCLE, além de versão reformulada do TLE (TCLE 12.11.2014).

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os pesquisadores descreveram detalhadamente o procedimento para obtenção dos TCLEs de forma a documentar, caso a caso, a impossibilidade da sua obtenção. No tocante a esse ponto, o

Endereço: Rua Melvin Jones, 940

Bairro: Jardim América

CEP: 79.803-010

UF: MS

Município: DOURADOS

Telefone: (67)3410-2853

E-mail: cep@ufgd.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
FEDERAL DA GRANDE
DOURADOS/UF GD-MS



Continuação do Parecer: 877.292

protocolo está conforme as exigências pregadas pela Res CNS 466/2012 para a dispensa do TCLE.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

DOURADOS, 19 de Novembro de 2014

Assinado por:

**Paulo Roberto dos Santos Ferreira
(Coordenador)**

Endereço: Rua Melvin Jones, 940

Bairro: Jardim América

UF: MS

Município: DOURADOS

CEP: 79.803-010

Telefone: (67)3410-2853

E-mail: cep@ufgd.edu.br