

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CAMILA AVELINO DE MACEDO

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DA *Lippia grata* FRENTE A
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa*

NATAL, RN
JUNHO DE 2019

CAMILA AVELINO DE MACEDO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DA *Lippia grata* FRENTE A
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Prof^a Dr^a Vânia Sousa Andrade

Co-orientador: Prof. Dr. José Veríssimo Fernandes

Natal, RN

JUNHO DE 2019

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências - CB

Macedo, Camila Avelino de.

Atividade antibacteriana e antibiofilme da *Lippia grata* frente a isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* / Camila Avelino de Macedo. - Natal, 2019.
90 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia de Sousa Andrade.

Coorientador: Prof. Dr. José Veríssimo Fernandes.

1. Óleo essencial - Dissertação. 2. Extrato hidroalcoólico - Dissertação. 3. Aderência bacteriana - Dissertação. 4. Timol - Dissertação. 5. Carvacrol - Dissertação. I. Andrade, Vânia de Sousa. II. Fernandes, José Veríssimo. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 665.52/.54

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DA *Lippia grata* FRENTE
A ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa***

elaborada por Camila Avelino de Macedo

e aprovada por todos os membros da banca examinadora como requisito
parcial à obtenção de título de Mestre em Ciências Biológicas

Natal, 17 de JUNHO de 2019

BANCA EXAMINADORA

Vânia Sousa Andrade (Orientadora)

José Veríssimo Fernandes (Co-orientador)

Maria Celeste Nunes De Melo (Membro interno do programa)

Mayron Alves de Vasconcelos (Membro externo à instituição)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (PPgCB) da UFRN;

À UFRN e a todos os professores do PPgCB pelo aprendizado e conhecimentos adquiridos ao longo deste trajeto;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado;

A minha orientadora, Vânia Sousa Andrade, pela oportunidade cedida e pela confiança em mim depositada;

Ao professor Paulo Roberto pela colaboração no tratamento estatístico do meu trabalho;

À professora Cynthia Cavalcanti de Albuquerque da Universidade Estadual do Rio Grande do Norte (UERN) pelo fornecimento do material vegetal analisado;

Aos professores Maria Celeste Nunes de Melo e José Veríssimo Fernandes pelas contribuições na produção do artigo científico;

À Gabriela Medeiros pela colaboração na coleta e processamento dos isolados clínicos;

Aos colegas do Laboratório de Ensaio Antimicrobianos e de Citotoxicidade (LEAC), Thales Rodrigo, Carlos Vital, Dayana Oliveira, Jéssica Campos e Sara Ester;

A minha mãe, Antônia Avelino, por todo amor, apoio e carinho inestimáveis;

As minhas tias Luzinete Avelino, Guiomar Avelino e a minha prima Jakeline Costa, por estarem sempre ao meu lado e me apoiarem incondicionalmente;

A Felipe Pedrosa pelo carinho, companheirismo e paciência.

Aos amigos, Jefferson Jalphy, Felipe Ribeiro e Felipe Melo pela amizade e por todo o incentivo;

À direção do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL) por permitir a realização deste trabalho;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Na busca por novas possibilidades de controle dos biofilmes bacterianos, estudos com métodos alternativos utilizando plantas têm crescido bastante nos últimos anos, tornando-se um campo de pesquisa relevante. Assim, os antimicrobianos de origem natural se apresentam como uma alternativa eficaz e econômica e sua atividade antimicrobiana já foi comprovada em vários estudos realizados em países que possuem uma flora diversificada, como o Brasil. Motivado pela busca de novas estratégias terapêuticas e considerando a crescente resistência bacteriana, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme do extrato hidroalcoólico e óleo essencial da *Lippia grata* frente a isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Para isso foram utilizados 44 isolados de *P. aeruginosa* provenientes de diversos tipos de amostras clínicas. O óleo essencial foi extraído por processo de hidrodestilação e caracterizado através de cromatografia gasosa associada a espectrofotometria de massas. O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi avaliado através da técnica de Kirby-Bauer e os pontos de corte foram estabelecidos de acordo com as diretrizes do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI). A atividade antibacteriana do extrato e do óleo essencial foi avaliada pela técnica da microdiluição em caldo, na qual as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas utilizando cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) como revelador de metabolismo bacteriano e as concentrações bactericidas mínimas (CBMs) por meio da análise do crescimento do conteúdo dos poços em ágar Mueller-Hinton. A quantificação da biomassa do biofilme foi realizada utilizando o cristal violeta e com base na densidade óptica produzida pelos biofilmes, as estirpes foram classificadas em não produtoras, fracas produtoras, moderadas produtoras e fortes produtoras. A atividade antibiofilme do extrato vegetal da *Lippia grata* foi avaliada nos 25 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* que apresentaram forte ou moderada produção de biofilme. A caracterização química do óleo essencial de *L. grata* identificou quatro componentes principais: carvacrol (51,4%) como constituinte majoritário, timol (15,6%), ρ -cimeno (12,2%) e γ -terpineno (7,4%). Entre os antimicrobianos testados, o aztreonam foi o que apresentou maior percentual de resistência (47,85), seguido por imipenem e levofloxacino, ambos com 41,0%, meropenem (36,4%), piperacilina/tazobactama (35,0%), ceftazidima (34,1%), ciprofloxacino (31,9%), cefepime (29,6%) e gentamicina (20,5%). O extrato vegetal da *L. grata* apresentou atividade antimicrobiana em 100% dos isolados testados na concentração de 50 mg/mL (CIM₉₀ e CBM₉₀). A concentração de 25 mg/mL (CIM₅₀) apresentou atividade inibitória em 56,8% dos isolados e atividade bactericida em 43,1% dos isolados. O óleo essencial da *L. grata* apresentou atividade antimicrobiana em 100% dos isolados testados a partir da concentração de 6,25 mg/mL (CIM₉₀). As concentrações de 3,12 mg/mL (CIM₅₀) e 1,56 mg/mL apresentaram atividade inibitória em 70,4% e 27,2% dos isolados, respectivamente. Nenhuma das concentrações testadas para o óleo essencial apresentou atividade bactericida sobre os isolados testados. Com relação a produção de biofilme, 18 isolados (40,9%) foram classificados como fracos produtores de biofilme, 18 (40,9%) como moderados produtores, 7 (15,9%) como fortes produtores e apenas 1 (2,2%) não produziu biofilme. Os 25 isolados com moderada ou forte produção de biofilme tratados com o extrato vegetal da *L. grata* apresentaram inibição na formação no biofilme em formação e consolidado. Conclui-se que os produtos vegetais da *L. grata* apresentaram atividade antimicrobiana e antibiofilme, configurando-se como uma alternativa promissora para combater microorganismos patogênicos, particularmente *Pseudomonas aeruginosa*.

Palavras-chave: óleo essencial; extrato hidroalcoólico; aderência Bacteriana; ti carvacrol

ABSTRACT

In the search for new possibilities of control against biofilms, studies involving the medical use of natural products have grown considerably in recent years, becoming a relevant field of research. Thus, natural antimicrobials present as an effective and economical alternative and their antimicrobial activity has already been proven in several studies carried out in countries that have a diversified flora, such as Brazil. Motivated by the search for new therapeutic strategies and considering the increasing bacterial resistance, this work had as objective to evaluate the antibacterial activity and antibiofilm of the extract and essential oil of *Lippia grata* against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. For this purpose, 44 *P. aeruginosa* isolates from different clinical samples were used. The essential oil was extracted by hydrodistillation process and characterized by gas chromatography associated with mass spectrometry. The antimicrobial susceptibility profile was evaluated using the Kirby-Bauer technique and the cut off points were established according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. The antibacterial activity of the extract and essential oil was evaluated by the microdilution technique in broth, in which the MIC's were determined using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (CTT) as a bacterial metabolism developer and the MBC's by means of growth analysis of the content of the few in Mueller-Hinton agar. The determination of biofilm formation was performed using violet crystal and based on the optical density produced by biofilms, the strains were classified as non-producing, weak producing, moderate producing and strong producing. The antibiofilm activity of the plant extract of *Lippia grata* was evaluated in the 25 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* that had a strong or moderate Biofilm production. In the chemical characterization of *L. grata* essential oil, four main components were identified: carvacrol (51.4%) as major constituent, thymol (15.6%), p-cymene (12.2%) and γ -terpinene (4%). Among the antimicrobials tested, aztreonam showed the highest percentage of resistance (47.85), followed by imipenem and levofloxacin, both with 41.0%, meropenem (36.4%), piperacillin/tazobactam (35.0%), ceftazidime (34.1%), ciprofloxacin (31.9%) cefepime (29.6%) and gentamicin (20.5%). The *L. grata* extract showed antimicrobial activity in 100% of the isolates tested at 50 mg / mL (MIC₉₀ and MBC₉₀). The concentration of 25 mg / mL (MIC₅₀) showed inhibitory activity in 56.8% of the isolates and bactericidal activity in 43.1% of the isolates. The essential oil of *L. grata* presented antimicrobial activity in 100% of the tested isolates in the concentrations between 50 mg/mL and 6,25 mg/mL (MIC₉₀). Concentrations of 3.12 mg/mL (MIC₅₀) and 1.56 mg/mL showed inhibitory activity in 70.4% and 27.2% of the isolates, respectively. None of the concentrations tested for essential oil presented bactericidal activity on the tested isolates. Regarding biofilm production, 18 (40.9%) isolates were classified as poor biofilm producers, 18 (40.9%) as moderate producers, 7 (15.9%) as strong producers and only 1 (2.2%) did not produce biofilm. The 25 isolates with moderate or strong biofilm production treated with the *L. grata* plant extract presented reduction in the formation and consolidated biofilm. It is concluded with these results that *L. grata* presented antimicrobial activity and antibiofilm, being configured as a promising alternative to combat pathogenic microorganisms, particularly *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: essential oil; hydroalcoholic extracts; bacterial adhesion; thymol; carvacrol.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE SIGLAS	12
1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
2.1.1 Biologia e identificação do micro-organismo	16
2.1.2 Patogenia e fatores de virulência	17
2.1.3 Biofilmes microbianos	21
2.1.3.1 Formação de biofilmes por <i>P. aeruginosa</i>	22
2.1.3.2 Métodos de caracterização de biofilmes	26
2.1.4 Prevalência das infecções causadas por <i>P. aeruginosa</i>	27
2.1.5 Resistência da <i>P. aeruginosa</i> aos antimicrobianos	29
2.2 Plantas medicinais no Brasil	33
2.3 Potencial antimicrobiano das plantas medicinais	35
2.3.1 Extratos vegetais e óleos essenciais	36
2.4 <i>Lippia grata</i> Schauer (Alecrim-da-chapada)	37
3. JUSTIFICATIVA	41
4. OBJETIVOS	42
4.1 Objetivo geral	42
4.2 Objetivos específicos	42
5. MATERIAIS E MÉTODOS	43
5.1 Aprovação no comitê de ética	43
5.2 Período e local de estudo	43
5.3 Material vegetal	43
5.4 Obtenção do extrato vegetal e óleo essencial	44
5.5 Caracterização química do óleo essencial por cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (CG/EM)	45
5.6 Estudo do perfil de resistência aos antimicrobianos.....	45
5.7 Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> do extrato vegetal e óleo essencial da <i>Lippia grata</i>	46

5.8	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	47
5.9	Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	48
5.10	Quantificação do biofilme	49
5.11	Ação do extrato sobre o biofilme em formação	50
5.12	Ação do extrato sobre o biofilme consolidado	50
5.13	Análise estatística	50
6.	RESULTADOS	51
6.1	Caracterização química do óleo essencial	51
6.2	Caracterização das amostras bacterianas	51
6.3	Estudo do perfil de resistência aos antimicrobianos	52
6.4	Teste da atividade antibacteriana <i>in vitro</i>	53
6.5	Quantificação do biofilme	56
6.6	Ação do extrato sobre o biofilme em formação	59
6.7	Ação do extrato sobre o biofilme consolidado	60
7.	DISCUSSÃO	61
8.	CONCLUSÃO	72
9.	REFERÊNCIAS	73
10.	ANEXOS	90

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fatores de virulência envolvidos na patogênese das infecções por *P. aeruginosa* (Fonte: GELLATLY; HANCOCK, 2013) 19
- Figura 2.** Esquema do modelo mais aceito dos estágios de desenvolvimento do biofilme bacteriano. (1) Adesão reversível; (2) Adesão irreversível; (C) Início do processo de maturação do biofilme; (D) Biofilme totalmente maduro com arquitetura complexa; (E) rompimento do biofilme e dispersão das células que darão início a novos biofilmes. (Fonte: MONROE , 2007)25
- Figura 3.** Parede celular de uma bactéria Gram negativa (Fonte: MADIGAN et al., 2010)31
- Figura 4.** Espécie vegetal *Lippia grata* (Fonte: <https://herbarioplantas.wordpress.com/alecrim-da-chapada/>)37
- Figura 5.** Representação da distribuição das concentrações em mg/mL na diluição seriada para o óleo essencial (colunas de 1-6) e extrato (Colunas de 7-8) de *Lippia grata*, realizadas na microdiluição em caldo em placa de 96 poços46
- Figura 6.** Redução do Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio ao formazan (Adaptado de OPWIS et al., 2012)47
- Figura 7.** Cálculo para quantificação do biofilme através da determinação da densidade óptica49
- Figura 8.** Avaliação do perfil de sensibilidade da amostra P37 aos antimicrobianos através da técnica de Kirby-Bauer (Fonte: Arquivo próprio)51
- Figura 9.** Percentual de resistência dos isolados aos antimicrobianos testados52
- Figura 10.** Determinação da Concentração inibitória mínima. Após a adição de CTT, o meio adquire coloração vermelha, caso haja atividade bacteriana. Na ausência de metabolismo bacteriano o meio permanece com sua coloração original (Fonte: Arquivo próprio)53

- Figura 11.** Determinação da concentração bactericida mínima das cepas P10 e P4 em ágar Mueller-Hinton (Fonte: Arquivo próprio)53
- Figura 12.** Resultados da determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) para o extrato vegetal da *L. grata*.54
- Figura 13.** Resultados da determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) para o óleo essencial da *L. grata*.55
- Figura 14.** Experimento de quantificação de biofilme em microplaca para alguns isolados de *P. aeruginosa* testados (Fonte: Arquivo próprio)56
- Figura 15.** Produção de biofilme pelos isolados após a interação com o extrato em diferentes concentrações.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais classes de compostos antimicrobianos de plantas e seus possíveis mecanismos de ação	35
Tabela 2. Composição química do óleo essencial da <i>L. grata</i>	50
Tabela 3. Distribuição da frequência dos isolados de acordo com o tipo de amostras	51
Tabela 4. Resumo geral das características fenotípicas de cada isolado clínico	56
Tabela 5. Análise estatística da interação do extrato com o biofilme consolidado através do teste dos sinais	59

LISTA DE SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração bactericida mínima
CG/EM	Cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CTT	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
C4-HSL	N -butiril- l -homo-serina lactona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
FoP	Forte produtor
FP	Fraco produtor
HC	Hospital das Clínicas
HSL	N-acil-homoserina-lactona
HUOL	Hospital Universitário Onofre Lopes Onofre Lopes
IL2	Interleucina 2
LEAC	Laboratório de Ensaios Antimicrobianos e de Citotoxicidade
LPS	Lipossacarídeos
MP	Moderado produtor
NP	Não produtor
OE	Óleos essenciais
OMS	Organização Mundial de Saúde
QS	<i>Quorum sensing</i>
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
T3SS	Sistema de secreção tipo 3
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TSA	Trypticase soy agar
TSB	Tryptic Soy Broth

TSI	Triple Sugar Iron Agar
UERN	Universidade Estadual do Rio Grande do Norte
UFC	Unidade formadora de colônia
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-árido
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte

1. INTRODUÇÃO

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma espécie bacteriana frequentemente implicada em vários tipos de infecções humanas, sendo a principal causa de infecções hospitalares dentre os bacilos Gram negativos não fermentadores de glicose e a maior causa de infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos (PANG et al., 2019). Muitas das infecções causadas por esse agente estão associadas a formação de biofilme, que confere a essa bactéria uma grande capacidade de sobreviver em ambientes com disponibilidade nutricionais mínimas e grande tolerância às variações ambientais (JENNY; KINGSBURY, 2018).

Biofilmes formados por *P. aeruginosa* têm sido extensivamente estudados devido à sua importância etiológica e o fato de se aderir às superfícies mais variadas, podendo agravar diversos tipos de infecção como otites, rinosinusites crônicas, uretrite, cistite, vaginite e infecções pulmonares (MOREIRA, 2011). As vantagens de sobrevivência que o biofilme proporciona aos micro-organismos configuram-se como uma das grandes preocupações em pacientes imunocomprometidos ou pacientes que necessitam utilizar cateter ou outros dispositivos médicos, pois dificultam o tratamento das infecções (SOUZA ELLER, 2015).

Este micro-organismo está sob contínua pressão seletiva em ambientes hospitalares e como consequência, tem apresentado resistência significativa aos antimicrobianos de primeira escolha e aos de amplo espectro. Portanto, tendo em vista as infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* no ambiente hospitalar, o aumento da resistência aos antimicrobianos e a formação de biofilmes, por essa bactéria, torna-se de grande importância a realização de estudos que visam avaliar a possível ação antimicrobiana de novos produtos, incluindo extratos vegetais e óleos essenciais, sobre esse patógeno (SOUZA ELLER, 2015).

A busca pela prevenção do desenvolvimento dos biofilmes é um dos mais desejáveis objetivos na área de pesquisa dos antimicrobianos (MANNER et al., 2017). Na busca por novas possibilidades de controle dos biofilmes, estudos com métodos alternativos utilizando plantas têm crescido bastante nos últimos anos, tornando-se um campo de pesquisa relevante (RAMOS et al., 2016). Assim, os

antimicrobianos de origem natural se apresentam como uma alternativa eficaz e econômica e a atividade de antimicrobianos naturais já foi comprovada em vários estudos realizados em países que possuem uma flora diversificada (CORDEIRO, 2014).

Estudos anteriores evidenciaram elevada atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos da *Lippia grata* frente a bactérias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiela pneumoniae*, Gram positivas como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e para os fungos *Saccharomyces* e *Trichophyton* (MATOS, 1998; PESSOA et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2006; BITU et al., 2014; CAFFARO, 2014).

O óleo essencial da *L. grata* contém proporções variáveis de fitoquímicos antimicrobianos de ação comprovada, como o timol e carvacrol, (FERNANES et al., 2015; MARCHESE et al., 2016). Considerando a constituição química dos extrato e óleo essencial da *L. grata*, torna-se apropriado avaliar seu possível efeito antimicrobiano com o objetivo de incentivar pesquisas futuras na descoberta de compostos bioativos presentes tanto no óleo quanto no extrato vegetal desta espécie, que sejam possíveis candidatos para o desenvolvimento de novos fitoterápicos eficazes com possível atividade antimicrobiana.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.1 Biologia e identificação do micro-organismo

O gênero *Pseudomonas* é composto por bacilos Gram negativos, não fermentadores de carboidratos e pertencentes à família Pseudomonadaceae. Os micro-organismos desse gênero são oportunistas e colonizam animais, plantas e seres humanos (LEE; YOON, 2017). Na microscopia óptica, podem se apresentar como bacilos retos ou levemente curvados, medindo entre 1,5 e 3 µm de comprimento e 0,5 e 0,8 µm de largura e apresentam mobilidade devido à presença de um ou mais flagelos polares (JENNY; KINGSBURY, 2018). Esse gênero é constituído por inúmeras espécies, as quais podem ser isoladas tanto de espécimes clínicos quanto do ambiente, sendo a *Pseudomonas aeruginosa* a espécie mais frequentemente isolada (KONEMAN et al., 2008).

A espécie *P. aeruginosa* é nutricionalmente versátil, possuindo necessidades nutricionais mínimas e grande tolerância às variações ambientais, podendo crescer numa ampla faixa de temperatura, entre 4 e 42°C (PITT; BART, 1997; GOMILA et al., 2013; JENNY; KINGSBURY, 2018). Essas características conferem à *P. aeruginosa* uma capacidade de sobreviver por longos períodos nas superfícies mais variadas. Esse micro-organismo possui um metabolismo estritamente aeróbio, contudo pode crescer em condições de anaerobiose utilizando o nitrato como aceptor alternativo de elétrons. Por ser incapaz de utilizar carboidrato como fonte de energia pela fermentação, obtém energia a partir destes compostos pela via oxidativa (KONEMAN et al., 2008). Ademais, é diferenciada dos bacilos Gram negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae pela presença da enzima citocromo oxidase (JENNY; KINGSBURY, 2018).

Essa espécie possui a capacidade de sintetizar diversos pigmentos hidrossolúveis que lhes conferem uma aparência diferencial na cultura. A piomelanina e a piorrubina são pigmentos raros que apresentam coloração vermelha e marrom, respectivamente. A piocianina é um pigmento azul produzido especificamente pela *P. aeruginosa* e quando combinado com a pioverdina, um composto fluorescente, geram uma coloração verde brilhante característica (KONEMAN et al., 2008).

A *P. aeruginosa* cresce em uma grande variedade de meios de cultura, o que facilita a sua identificação. No isolamento primário são observadas características como, ausência de fermentação da lactose em ágar MacConkey e formação de β -hemólise com produção de pigmento esverdeado (piocianina) em ágar sangue. As colônias apresentam normalmente tamanho médio, com bordas irregulares, achatadas, transparentes e brilhantes. O odor doce semelhante a uva, proveniente das colônias em meios de cultura é uma característica marcante nessa espécie (OPLUSTIL et al., 2000).

No processo de identificação realiza-se a coloração de Gram, prova da oxidase e observação de motilidade, ambas positivas para essa espécie. Por se tratar de uma bactéria não fermentadora, não se observa fermentação da glicose nos meios Triple Sugar Iron Agar (TSI) e Rugai. Possui capacidade de descarboxilar os aminoácidos arginina e ornitina, e não a lisina. É capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono, alterando a cor do meio ágar Citrato Simmons de verde para azul. Outras provas como oxidação de açúcares, prova do indol, prova da urease, crescimento a 42°C e coloração de flagelos também são utilizadas na identificação dessa espécie (OPLUSTIL et al., 2000; KONEMAN et al., 2008; LAILA; SANTOS, 2016).

2.1.2 Patogenia e fatores de virulência

A *P. aeruginosa* é considerada uma espécie ubíqua, normalmente é encontrada em água, vegetais e solos. Apesar de compor a microbiota normal da pele e garganta de pessoas saudáveis é considerada um patógeno oportunista, uma vez que está envolvido mais frequentemente com doenças em indivíduos imunocomprometidos (KATOULI; STREETER, 2016). Normalmente alguma quebra de barreira cutâneo-mucosa através de intervenções múltiplas (incisões, cateteres, traqueostomia e outros corpos estranhos), queimadura, ou fatores contribuintes para diminuição da imunidade do hospedeiro, como neutropenia, drogas imunossupressoras, AIDS, entre outras, estão presentes nas infecções por esta bactéria (SOUZA et al., 2016; SOUZA et al., 2017).

A patogênese das infecções por essa espécie bacteriana é multifatorial, como sugerido pelo número e grande variedade de determinantes de virulência descritos. O processo infeccioso por esse patógeno pode ser dividido basicamente em três estágios incluindo, adesão e colonização, invasão local e

disseminação e doença sistêmica. Determinantes bacterianos particulares da virulência medeiam cada uma dessas etapas, sendo uma importante estratégia dos patógenos para escapar da defesa imunológica do hospedeiro, resultando na progressão da patogênese, principalmente na fase inicial da colonização e infecção aguda. Muitos fatores de virulência, incluindo compostos secretados ou associados a célula, foram relatados como importantes na colonização e estabelecimento de infecções por *P. aeruginosa* (ALHAZMI, 2015; MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

Durante o processo de adesão e colonização, destacam-se as fimbrias ou *pili*, apêndices superficiais que possuem moléculas ligantes, como lectinas ligadoras de maltose e lectinas ligadoras de galactose, as quais promovem a aderência do micro-organismo a receptores de gangliosídeo GM-1 presentes na superfície das células epiteliais do hospedeiro, principalmente células cutâneo-mucosas (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; ALHAZMI, 2015). Esses receptores normalmente estão, em grande parte, ocupados pela fibronectina, impedindo assim a adesão da bactéria aos mesmos, sobretudo em bacilos Gram negativos. A colonização do trato respiratório por *Pseudomonas* requer adesão através de *pili* e pode ser auxiliada pela produção de uma enzima protease que degrada a fibronectina para expor os receptores de *pili* subjacentes na superfície de células epiteliais (GELLATLY; HANCOCK, 2013). A fimbria do tipo IV é composta por milhares de subunidades proteicas de 15kDa e é considerada a principal adesina de *P. aeruginosa*, sendo responsável pela aderência inicial tanto na superfície de células epiteliais como em materiais abióticos (HANH, 1997; ALHAZMI, 2015).

Um exopolissacarídeo mucoide, o alginato, produzido por algumas cepas de *P. aeruginosa*, também está relacionado com a adesão dessas bactérias em membranas mucosas. Além de se comportar como uma adesina, ancorando essas bactérias no epitélio respiratório colonizado, o alginato também protege essas cepas das defesas do hospedeiro, formada por linfócitos e fagócitos, complemento, e atividade mucociliar do trato respiratório, além de diminuir a ação dos antimicrobianos por dificultar sua penetração na bactéria (HENTZER, 2001; KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; ALHAZMI, 2015).

As cepas de *P. aeruginosa* mucoides são mais frequentemente isoladas de pacientes com fibrose cística e geralmente são encontradas em tecidos

pulmonares dos mesmos (O'MALLEY, et al., 2003^a; ZAVASCKI, 2003; LEE; YOON, 2017). O alginato é o responsável pelo aspecto mucoide das colônias observadas em culturas de amostras clínicas obtidas de pacientes com fibrose cística, sendo considerado o principal determinante de patogenicidade para o estabelecimento dessa bactéria no sistema respiratório desses indivíduos (KATOULI; STREETER, 2016). Entretanto, apesar de todas as cepas de *P. aeruginosa* apresentarem o sistema genético que codifica a produção de alginato, amostras isoladas de pacientes com outros quadros clínicos, bem como advindas do meio ambiente raramente apresentam esse polissacarídeo (MAI et al., 1993).

Com relação ao processo de invasão local contribuem enzimas e toxinas extracelulares como as elastases, protease alcalina, fosfolipase C, neuraminidase, exoenzima S, lectina e proteases como hemolisinas e exotoxinas. A elastase parece ser a principal enzima envolvida no processo de invasão local. Essa enzima desregula junções de células epiteliais, diminuindo a atividade mucociliar, provoca danos ao epitélio respiratório com hemorragia intra-alveolar, degradação da laminina e elastina dos pequenos vasos, promovem clivagem do colágeno e das imunoglobulinas IgG e IgA, e inativação de componentes do sistema complemento (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006). A elastase combinada com a protease alcalina, possui ação proteolítica sobre o interferon-gama (INF γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e citocinas, incluindo a interleucina 2 (IL2) (PARMELY et al., 1990).

A fosfolipase C caracteriza-se por possuir ação citotóxica direta, aumentando a síntese de ácido aracdônico e sua capacidade de degradação da fosfatidilcolina, um componente do surfactante, ocasionando lesões nos alvéolos pulmonares (KATOULI; STREETER, 2016). Possui também capacidade de inativar as opsoninas (HOLM et al., 1991). A exotoxina A é produzida pela maioria das cepas de *P. aeruginosa* isoladas de espécimes clínicos e apresenta potentes efeitos locais e sistêmicos, inibindo a síntese proteica em células eucarióticas, provocando necrose de tecidos moles, choque séptico e interrupção da atividade celular e a resposta macrofágica (POLLACK, 1983; ALHAZMI, 2015).

Vários outros fatores de virulência são secretados por *P. aeruginosa* e podem contribuir para sua patogenicidade. A pirocianina é encontrada nas secreções pulmonares de pacientes com fibrose cística, exercendo uma ação pró-inflamatória, causando danos ao epitélio brônquico e prejudicando a função ciliar. A pioverdina é um quelante de ferro que tem como função regular a secreção de outros fatores de virulência por *P. aeruginosa*. O Sistema de secreção tipo 3 (T3SS) possui quatro toxinas conhecidas (ExoY, ExoS, ExoT e ExoU) e é capaz injetá-las diretamente nas células do hospedeiro. O lipídeo A pode desencadear a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e eventualmente, choque endotóxico (O'MALLEY, et al., 2003a; 2003b; GELLATLY; KIPNIS, 2013; KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; HANCOCK, 2013; ALHAZMI, 2015; KATOULI; STREETER, 2016). Um resumo dos fatores de virulência da *P. aeruginosa* é mostrado na figura 1.

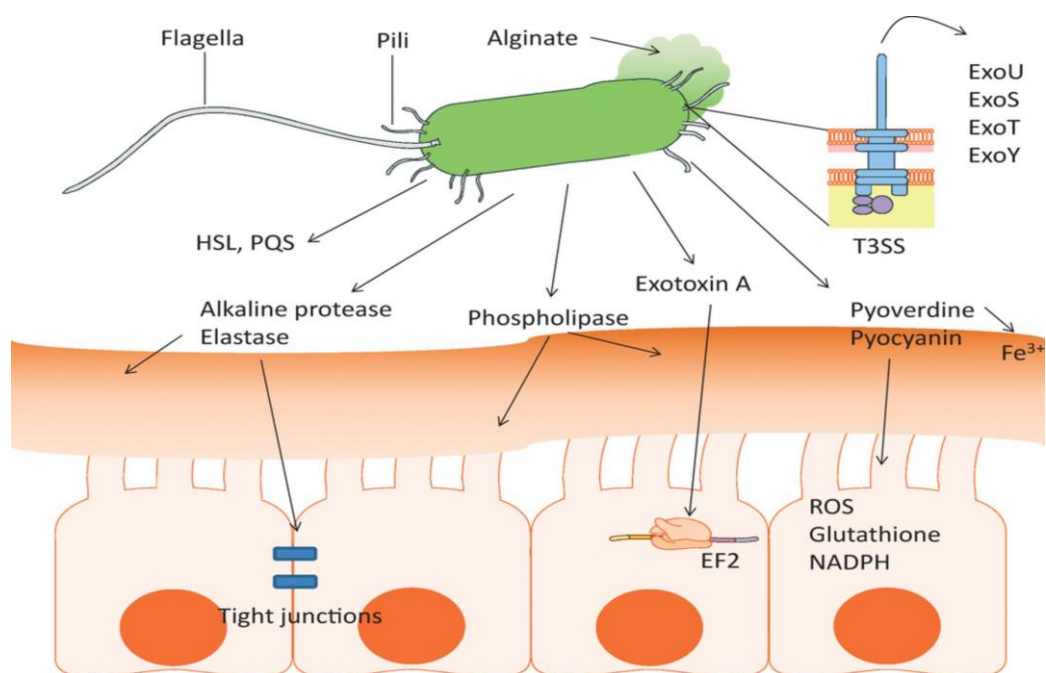


Figura 1. Fatores de virulência envolvidos na patogênese das infecções por *P. aeruginosa* (Fonte: GELLATLY; HANCOCK, 2013).

2.1.3 Biofilmes microbianos

Os biofilmes microbianos são complexos populacionais sesséis caracterizados por um conjunto de micro-organismos que de forma irreversível se unem a um substrato, superfícies bióticas e abióticas, ou ainda entre si, e são inclusas em uma complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas (OLIVEIRA et al., 2013).

Vários fatores estão envolvidos no desenvolvimento do biofilme, como temperatura, variação de pH, quantidade do inóculo bacteriano, características do substrato, forças hidrodinâmicas, presença de agentes antimicrobianos, disponibilidade de nutrientes e oxigênio e concentrações dos metabólitos microbianos (NAVES, et al., 2008). Esses fatores podem alterar as propriedades da superfície bacteriana e do substrato e, portanto, a capacidade das bactérias de aderir a superfícies (ABDALLAH et al., 2014).

A concentração de um antimicrobiano necessária para eliminar bactérias produtoras de biofilme pode ser até 1000 vezes maior que a necessária para eliminar bactérias em estado planctônico (FRANK, PATEL, 2007; HØIBY et al., 2010; PEREIRA, 2014; CHEN et al., 2018). Essa resistência elevada dos biofilmes bacterianos, pode ser explicada pela difusão limitada de agentes antimicrobianos por meio da matriz do biofilme, interações de agentes antimicrobianos com a matriz (células e polímeros), resistência mediada por enzimas, adaptação genética, e outros fatores inter-relacionados, como as barreiras de difusão, ultraestrutura da parede celular e atividade metabólica diferencial (CAIXETA, 2008; SHARMA et al., 2013). Além de uma maior resistência aos antimicrobianos, a vida em comunidade torna as bactérias menos suscetíveis a fatores externos como radiação UV, desidratação, variação de temperatura, variação e pH, variação osmótica, e fagocitose (CHEN et al., 2018).

Tal resistência gera um impacto negativo em várias atividades produtivas, podendo ocasionar perdas significativas, tanto na indústria quanto na clínica. Nas indústrias o acúmulo de biofilmes nos equipamentos causa impacto negativo à qualidade dos produtos finais por causarem corrosão aos equipamentos, interrupção do processo para limpeza, entre outros prejuízos (LEE; YOON, 2017). No setor alimentício, podem produzir enzimas termorresistentes podendo causar gelatinização do leite UAT, desenvolvimento de sabor e aromas

indesejáveis em leite pasteurizado, diminuição do rendimento de queijos e alterações sensoriais em iogurte (BATISTA, 2015). Na nefrologia clínica, os biofilmes influenciam no desenvolvimento de cálculos renais e afetam sistemas de diálise, inclusive cateteres peritoneais e venosos, além de ter um papel crítico na persistência de infecções renais e do trato urinário (MARCUS et al., 2008).

Atualmente, os dispositivos biomédicos estão sendo utilizados em praticamente todas as áreas da medicina, devido à necessidade de reparação ou substituição das atividades biológicas. Embora sejam sofisticados, estes dispositivos estão sujeitos à colonização por micro-organismos, que podem formar biofilmes com consequente infecção (TRENTIN et al., 2013). Os principais dispositivos biomédicos nos quais os biofilmes podem se desenvolver são catéteres venosos, endoproteses coronarianas, válvulas cardíacas, dispositivos de assistência ventricular, implantes de estimulação neurológicos, entre outros (CRESPO; FERNÁNDEZ, 2014). Estudos indicam que estes materiais constituem os principais fatores de risco no desenvolvimento de infecções por biofilmes, como consequência, a contaminação destes dispositivos é responsável por cerca de 80% das infecções microbianas no corpo (SILVA FILHO et al., 2013).

Os biofilmes podem ser constituídos por múltiplas espécies ou por apenas uma, podendo ser encontrados também em outros tipos de micro-organismos, como fungos e algas; principalmente em ambientes mais úmidos (PALMER, 1997). Com relação as patologias humanas, um biofilme formado por várias espécies pode apresentar um sinergismo que reflete tanto na distribuição bacteriana aderida ao biofilme quanto na quantidade de biomassa produzida. Essas interações entre diferentes bactérias no biofilme podem trazer vantagens para a comunidade como aumento da resistência e virulência bacteriana e mudança na degradação e geração de substratos; e desvantagens como aumento da competição por nutrientes e acúmulo de produtos tóxicos excretados por uma determinada espécie (RENDUELES; GHIGO, 2012).

2.1.3.1 Formação de biofilmes por *P. aeruginosa*

Diversos micro-organismos podem participar de processos de formação de biofilmes e gerar problemas de saúde pública e/ou de ordem econômica como: *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli*,

Listeria monocytogenes, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus* sp., *Enterococcus faecium*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, espécies de *Candida* sp. (CAPELLETTI, 2006; CAIXETA, 2008; HENRIQUES; VASCONCELOS; CERCA, 2013).

Biofilmes formados por *P. aeruginosa* têm sido extensivamente estudados devido à sua importância etiológica e o fato de se aderir às superfícies mais variadas. Pacientes com fibrose cística apresentam susceptibilidade à infecções por *P. aeruginosa* devido a capacidade desta espécie de colonizar superfícies e consequentemente se estabelecer formando biofilmes. Além de fibrose cística, os biofilmes podem causar outros tipos de infecção como otites e rinosinusites crônicas, uretrite, cistite, vaginite e infecções pulmonares (MOREIRA, 2011).

As bactérias que formam biofilme se comunicam por meio de um mecanismo denominado *quorum sensing* (QS) (LEE; YOON, 2017). Esse sistema está fortemente ligado à colonização bacteriana e consequentemente à formação do biofilme. Essa habilidade se dá através da produção, secreção e detecção de moléculas sinalizadoras chamadas de autoindutores (SHARMA et al., 2013). A concentração dessas moléculas torna-se então dependente da quantidade de células e quando atingem uma concentração limite, a população passa a responder coordenadamente, podendo modular vários comportamentos fenotípicos que dependem da população como um todo. Isso pode resultar na produção de exopolissacarídeos, biossurfactantes, esporulação, produção de antibióticos, expressão de genes de virulência entre outros (NADELL, 2008). Assim, o QS controla o comportamento social de bactérias por múltiplas vias de sinalização interconectadas, permitindo que as comunidades bacterianas regulem diversos processos biológicos importantes para a adaptação e sobrevivência bacteriana (MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

Em *P. aeruginosa*, a molécula sinalizadora autoindutora mais bem descrita é a N-acil-homoserina-lactona (HSL), que age regulando a produção de fatores de virulência, como enzimas extracelulares e lisinas celulares, que são importantes para a patogênese das infecções, onde funciona como um escudo protetor contra os fagócitos (HØIBY et al., 2010). A HSL medeia dois sistemas diferentes de QS encontrados nesta espécie, denominados de Las e Rhl, onde

o QS Las controla o QS Rhl (CHRISTENSEN et al., 2007; CHATTERJEE et al., 2016; LIMA et al., 2018).

Os dois sistemas são compostos por uma proteína reguladora transcricional (LasR e RhlR), que age controlando a transcrição de inúmeros genes; e por uma enzima sintetase auto-indutora (LasI e RhlI) que sintetiza, respectivamente, as moléculas auto-indutoras N- (3-oxododecanoyl)- L-homoserina lactona (3-oxo-C₁₂-HSL) e N-butiril- L-homoserina lactona (C₄-HSL) (MÜH et al., 2006). A molécula 3-oxo-C₁₂-HSL é também conhecida como o indutor III e seu aumento é diretamente proporcional ao aumento da população bacteriana. Ao atingir um limiar de concentração, a 3-oxo-C₁₂-HSL se liga a proteína LasR, desencadeando a expressão de inúmeros fatores de virulência como a exotoxina A, elastase B e protease alcalina. A ativação do sistema Las tem como consequência a ativação do sistema Rhl, levando à produção de C₄-HSL (LAVERTY et al., 2013; CHATTERJEE et al., 2016; LIMA et al., 2018).

O sistema Rhl é responsável pela produção de rhamnolipídeos, um biossurfactante que auxilia na manutenção das macrocolônias nos estágios finais do desenvolvimento do biofilme. Esse sistema também é responsável pela síntese de enzimas extracelulares como pioverdina, piocianina e cianeto de hidrogênio (LAVERTY et al., 2013). Las e Rhl também controlam a transcrição do gene LasB, responsável por codificar a enzima elastase LasB, que é capaz de induzir a destruição do tecido pulmonar através do aumento da permeabilidade nas junções entre as células, resultando na ruptura da barreira epitelial (NOMURA et al., 2014). Estudos vêm mostrando que um QS defeituoso compromete a produção de biofilmes por *P. aeruginosa*, implicando na utilização de substâncias denominadas inibidoras de *quorum Sensing* (IQS) e que poderiam ser administradas em combinação com antimicrobianos, reduzindo, desta maneira, a resistência observada em biofilmes (CADY et al., 2012; MAURICE; BEDI; SADIKOT, 2018).

Diversos processos estão envolvidos na formação do biofilme, o modelo mais aceito atualmente divide esse processo em cinco etapas diferentes. O primeiro estágio na formação de biofilme é chamado de adesão primária. Nesse processo ocorre a interação entre bactérias e superfícies, sendo uma fase reversível, onde as bactérias podem ser facilmente removidas através de simples processos de lavagem (ABDALLAH et al., 2014). As bactérias livres, também

conhecidas como planctônicas, estão dispersas no meio e começam a se aproximar de superfícies sólidas através de sua motilidade ou fluidos. Em superfícies bióticas esta etapa é caracterizada por interações moleculares mediadas por ligações específicas do tipo receptor-ligante, enquanto que a adesão em superfícies abióticas ocorre mediada por interações físico-químicas não específicas (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

Após a adesão inicial é estabelecida uma ancoragem mais firme entre a bactéria e a superfície, esta etapa é denominada adesão irreversível e é mediada principalmente por interações físico-químicas específicas ou através de pontes estabelecidas por estruturas extracelulares específicas dos micro-organismos (apêndices celulares filamentosos ou polímeros extracelulares) (MARTÍNEZ; VADYVALOO, 2014).

A terceira fase é caracterizada por um processo de maturação do biofilme, ocorrendo interações célula-célula e formação de componentes de superfícies importantes, contribuindo para a estrutura do biofilme (MARTÍNEZ; VADYVALOO, 2014). Nesta fase as células já estão firmemente aderidas e passam a multiplicar-se sobre as que estavam aderidas inicialmente, produzindo uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e formando microcolônias que se desenvolvem dando origem ao biofilme (BREX; THEILADE; ATTSTRÖM, 1983). Em *P. aeruginosa*, essa matriz é composta pelos polissacarídeos Pel, Psl e alginato, DNA extracelular e proteínas, incluindo CupA, CupB e CupC, fímbrias que medeiam a ligação bacteriana durante a formação inicial do biofilme e a lectina LecB (ALHAZMI, 2015).

Na quarta fase o biofilme está totalmente maduro, apresentando densidade celular alta e arquitetura complexa, que consiste em microcolônias em forma de torre denominadas “cogumelos” ou planas, dependendo da fonte de carbono utilizada, e que estão incorporadas na matriz (KLAUSEN et al., 2003, LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2013). Essa estrutura oferece ao biofilme canais maduros que funcionam como um sistema de circulação para a troca de nutrientes, enzimas, água, sinais químicos e eliminação de metabólitos potencialmente tóxicos (BOGINO et al., 2013).

Na quinta e última fase ocorre o rompimento do biofilme e a dispersão das células que podem rapidamente colonizar outras superfícies (THORMANN et al., 2006). A dispersão do biofilme é importante para a sobrevivência das espécies

(WOOD; HONG; MA, 2011), bem como para a transmissão de patógenos dos reservatórios ambientais para hospedeiros, transmissão entre hospedeiros e para a disseminação da infecção dentro de um hospedeiro (KAPLAN, 2010; ABDALLAH et al., 2014).

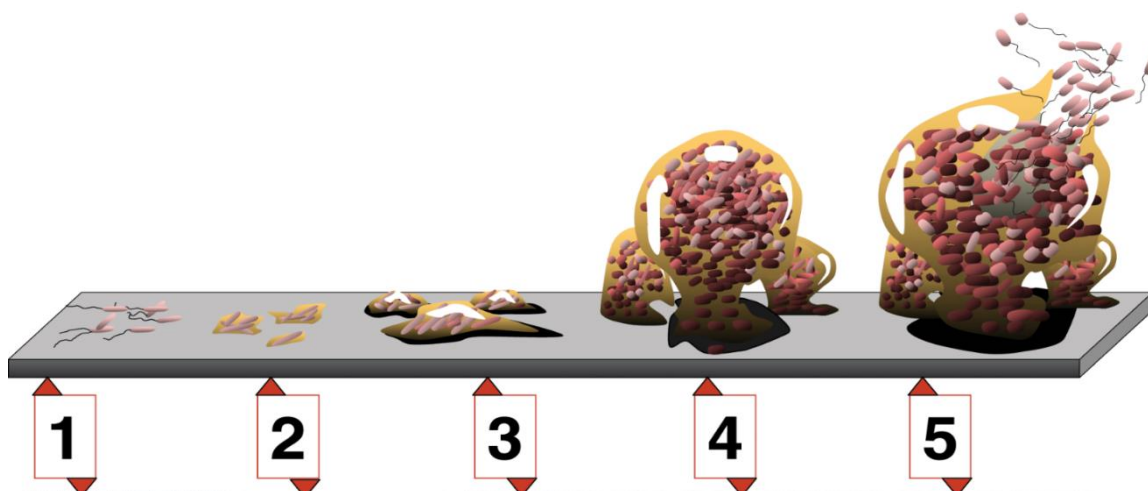


Figura 2. Esquema do modelo dos estágios de desenvolvimento do biofilme bacteriano. (1) Adesão reversível; (2) Adesão irreversível; (C) Início do processo de maturação do biofilme; (D) Biofilme totalmente maduro com arquitetura complexa; (E) rompimento do biofilme e dispersão das células que darão início a novos biofilmes. (Fonte: MONROE, 2007).

2.1.3.2 Métodos de caracterização de biofilmes

Vários métodos foram desenvolvidos para o cultivo e quantificação do biofilme. Os primeiros métodos eram baseados no cultivo de biofilme na parede de um tubo de ensaio, com posterior coloração para detecção do biofilme (CHRISTENSEN et al., 1985). Posteriormente, placas de microtitulação passaram a ser usadas e os resultados avaliados através de espectrofotometria. Essa metodologia permanece entre os ensaios mais utilizados para investigação de biofilme, e várias modificações têm sido desenvolvidas para o cultivo *in vitro* e quantificação de biofilmes bacterianos (STEPANOVIĆ et al., 2007).

Atualmente vários métodos diferentes são utilizados, como teste de tubo, teste em placa de microtitulação, radiomarcagem, microscopia, teste com ágar vermelho congo, entre outros. O método do ágar vermelho congo (AVC) é um

ensaio qualitativo descrito por Freeman e colaboradores (1989) que indica a presença de biofilme através da mudança de cor de colônias inoculadas em meio AVC. Colônias negras com consistência cristalina seca indicam produtores de biofilme, enquanto colônias mantidas em rosa não produzem biofilme.

Microrganismos específicos presentes em uma comunidade heterogênea de biofilme podem ser identificados pelas sondas do método de hibridização fluorescente in situ (FISH), sem a necessidade de fixação e coloração. As técnicas de PCR também são usadas não só para a identificação de patógenos através da amplificação de sequências de ácidos nucléicos específicos para espécies, mas também detecção de fatores de virulência, amplificando genes de virulência alvo como genes de biofilme com o uso de primers gene-específicos (KIRMUSAOĞLU, 2019).

2.1.4 Prevalência das infecções causadas por *P. aeruginosa*

Dentre as espécies de bactérias Gram negativas relacionados às infecções hospitalares, as mais comuns são: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Enterobacter spp.* (PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009; ROSSI, 2011, GALES et al., 2012; SOUZA et al., 2016).

A *P. aeruginosa* é muito frequente em infecções hospitalares, devido a sua capacidade de sobreviver por longos períodos em superfícies, necessidades nutricionais mínimas e grande tolerância às variações ambientais. Possui também grande capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos, além de mecanismos de escape da defesa do hospedeiro, o qual geralmente é submetido a técnicas invasivas com fins diagnósticos ou terapêuticos (BLOT et al., 2002).

Dentre as doenças relacionadas a esta espécie estão as bacteremias, infecções do trato urinário, endocardites, infecções respiratórias agudas em pacientes submetidos à ventilação mecânica, infecções respiratórias crônicas em pacientes com fibrose cística, infecções tegumentares e ósseas, infecções de ouvidos e oculares e infecções decorrentes de queimaduras ou traumas (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; HAUSER; OZER, 2011; MORADALI; GHODS; REHM, 2017; LEE; YOON, 2017). Infecções por este micro-organismo, adquiridas na comunidade, como as foliculites, oftalmite e

otites externas, tendem a ser localizadas e estão associadas ao contato com água ou soluções contaminadas (KISKA; GILLIAN, 2003).

Uma característica importante das infecções por *P. aeruginosa* adquiridas em unidades de terapia intensiva (UTIs) é a multirresistência (SADER et al., 1993). Os percentuais de resistência são mais elevados nas amostras isoladas nestas unidades de tratamento, refletindo maior intensidade de uso de antimicrobianos nesse ambiente, à complexidade dos cuidados nesses locais, intervenções múltiplas (incisões, cateteres inseridos, traqueostomia e outros corpos estranhos) e fatores relacionados ao próprio paciente (estado imunológico, idade, diagnóstico clínico) (OLIVEIRA et al., 2010).

P. aeruginosa pode causar meningite e abscessos cerebrais, pois o micro-organismo tem a capacidade de invadir o sistema nervoso central através de uma estrutura contígua, como o ouvido interno ou seios paranasais, podendo também ser inoculado diretamente por meio de cirurgias, traumatismo craniano, ou métodos invasivos de diagnóstico (TODAR, 2004).

A grande relevância clínica e epidemiológica da *P. aeruginosa* reside principalmente nas infecções hospitalares, onde o trato respiratório inferior é o sítio mais comum de infecção por este agente, sendo um importante patógeno respiratório em pacientes com fibrose cística, doenças genéticas que apresentam como manifestações clínicas principais à doença pulmonar obstrutiva crônica e a insuficiência pancreática exócrina. Dados do Programa de Vigilância de antimicrobianos SENTRY apontam a *P. aeruginosa* como a segunda causa de pneumonias nosocomiais na América do Norte, respondendo por 20,6% dos isolados neste tipo de infecção (SADER et al., 2019). Na América latina, este agente foi responsável por 27,4% dos casos de pneumonia, entre os anos de 1997 e 2016 (SADER et al., 2019) e 7,5% dos casos de infecção sanguínea em pacientes hospitalizados (GALES et al., 2012). No Brasil, é o principal causador de pneumonias, sendo responsável por quase 31,2% dos casos (GALES et al., 2012). A água utilizada em equipamentos de terapia respiratória, quando contaminada, pode atingir facilmente pacientes internados, principalmente os que estão submetidos a procedimentos invasivos e em uso de antimicrobianos (KNOWLES; GILLIGAN; BOUCHER, 1995).

Além do trato respiratório, a *P. aeruginosa*, também está envolvida em infecções hospitalares do trato urinário, corrente sanguínea, queimaduras e sítio

cirúrgico. Na América latina, a *P. aeruginosa* é o terceiro patógeno mais isolado em infecções urinárias nosocomiais e no Brasil é o segundo agente mais frequente neste tipo de infecção (SADER, 2001). As infecções de corrente sanguínea ocorrem principalmente em pacientes com doenças neoplásicas ou hematológicas, queimaduras, endocardite, pneumonia, problemas urológicos entre outras doenças (FLICK; CLUFF, 1976). Na América latina, a *P. aeruginosa* é o quinto patógeno mais envolvido em infecções de corrente sanguínea e o primeiro mais isolado em infecções de sítio cirúrgico (GALES et al., 2012). Uma pesquisa realizada nos Estados Unidos entre os anos de 2003 e 2006, envolvendo 104 unidades de pacientes com queimaduras, fez um levantamento qualitativo e quantitativo a partir de dados do sistema de vigilância nacional do país e constatou que 44% das instituições identificaram a *P. aeruginosa* como a bactéria Gram negativa mais prevalente em infecções por queimaduras (HODLE et al., 2006).

2.1.5 Resistência da *P. aeruginosa* aos antimicrobianos

O aumento de cepas multirresistentes no ambiente hospitalar representa um dos problemas mais críticos da saúde pública. Em países em desenvolvimento como o Brasil, um número elevado de cepas isoladas nos hospitais apresenta resistência a grande maioria dos antibióticos disponíveis para a terapêutica. Entre os fatores que contribuem para essa disseminação de micro-organismos resistentes estão a falta de recursos humanos e financeiros, precariedade nos laboratórios de microbiologia, falta de higiene e de controle de infecções, entre outros (GONTIJO FILHO, 2006).

Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista de agentes patogênicos prioritários para a busca de novos antibióticos. Essa lista foi elaborada com o objetivo de orientar e promover a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos, como parte dos esforços da OMS para enfrentar a crescente resistência global aos medicamentos antimicrobianos. A *P. aeruginosa* aparece em segundo lugar no grupo classificado como “crítico”, que inclui bactérias multirresistentes que podem causar infecções graves e frequentemente mortais, como infecções da corrente sanguínea e pneumonia (TACCONELLI et al., 2017).

A *P. aeruginosa* está frequentemente implicada em vários tipos de infecções humanas, sendo a principal causa de infecções hospitalares dentre os bacilos Gram negativos não fermentadores de glicose e a maior causa de infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos. Este micro-organismo está sob contínua pressão seletiva em ambientes hospitalares e como consequência, tem apresentado significativa resistência aos antimicrobianos de primeira escolha e aos de amplo espectro (SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015; PANG et al., 2019).

O desenvolvimento de antibióticos beta-lactâmicos contribuiu para o controle de infecções de forma generalizada. O surgimento das cefalosporinas de amplo espectro na década de 80 foi considerada uma grande adição ao arsenal terapêutico na luta contra os organismos produtores de beta-lactamases (MEDEIROS, 1997). Porém, a sua utilização ao longo dos anos, causou a emergência de patógenos resistentes, comprometendo gravemente a eficácia desses antibióticos e ocasionando uso de antimicrobianos beta-lactâmicos de maior potência, como os carbapenêmicos (MURRAY et al., 2010).

Os carbapenêmicos são uma importante opção terapêutica para as infecções graves que são causadas por cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes por possuírem amplo espectro de atividade e serem estáveis à maioria das beta-lactamases, sendo uma classe de uso reservado para tratar infecções severas causadas por micro-organismos conhecidamente resistentes às penicilinas e cefalosporinas de última geração (PICOLI, 2008; KATOULI; STREETER, 2016). A produção de carbapenemases, enzimas que inativam os carbapenêmicos, é um mecanismo de resistência emergente que vem sendo apontado como causa da redução da utilidade clínica do imipenem e meropenem no tratamento das infecções por *P. aeruginosa* (LIVERMORE, 2002).

A resistência aos antimicrobianos se desenvolve como uma consequência natural da habilidade da população bacteriana de se adaptar frente aos efeitos nocivos ou letais aos quais estão sendo expostas (LIVERMORE, 1995; SANTOS, 2004). O surgimento de bactérias multirresistentes a drogas é um fenômeno que une clínicos e indústria farmacêutica, visto que esse problema é uma das maiores causas de insucesso no tratamento de doenças infecciosas (DAVIES, 1994).

Os problemas relacionados à resistência bacteriana, principalmente em bacilos Gram negativos parecem ser mais importantes no Brasil e em outros países da América Latina quando comparados a outras regiões do mundo como Europa e Estado Unidos, fato relatado pelos estudos realizados pelo Programa de monitoramento de resistência mundial aos antimicrobianos SENTRY (SHORTRIDGE et al., 2019).

Muitas bactérias, como a *P. aeruginosa*, possuem resistência intrínseca a vários grupos de antimicrobianos, onde a capacidade de resistir à ação desses fármacos, devido a mutações cromossomais, entre outros, é propagada de geração em geração (ALHAZMI, 2015). Por outro lado, a resistência adquirida é caracterizada pela aquisição de genes de resistência aos antibióticos, através de plasmídios, transposons ou integrons que podem ser transmitidos tanto para a descendência como para outros organismos (BRANDÃO, 2013; PANG et al., 2019).

Por ser um bacilo Gram negativo, a parede celular da *P. aeruginosa* é composta por uma estrutura em multicamadas e bastante complexa, onde cerca de 10% de sua totalidade é constituída de peptidoglicano. A principal função do peptidoglicano é proporcionar rigidez estrutural à parede da célula bacteriana, constituindo uma barreira física contra o ambiente externo, além de servir de suporte para outros componentes (VOLLMER et al., 2008). A parede celular das bactérias Gram negativas, apesar de possuir uma camada de peptidoglicano mais fina que a de bactérias Gram positivas, são estruturalmente mais complexas e conseqüentemente mais resistentes à ação de antimicrobianos, que não são capazes de cruzar efetivamente esta barreira lipídica (KONEMAN et al., 2008). Para ter acesso à célula bacteriana, os antibióticos devem cruzar a parede celular através de proteínas de membrana, denominadas porinas, que apresentam o interior com características hidrofílicas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

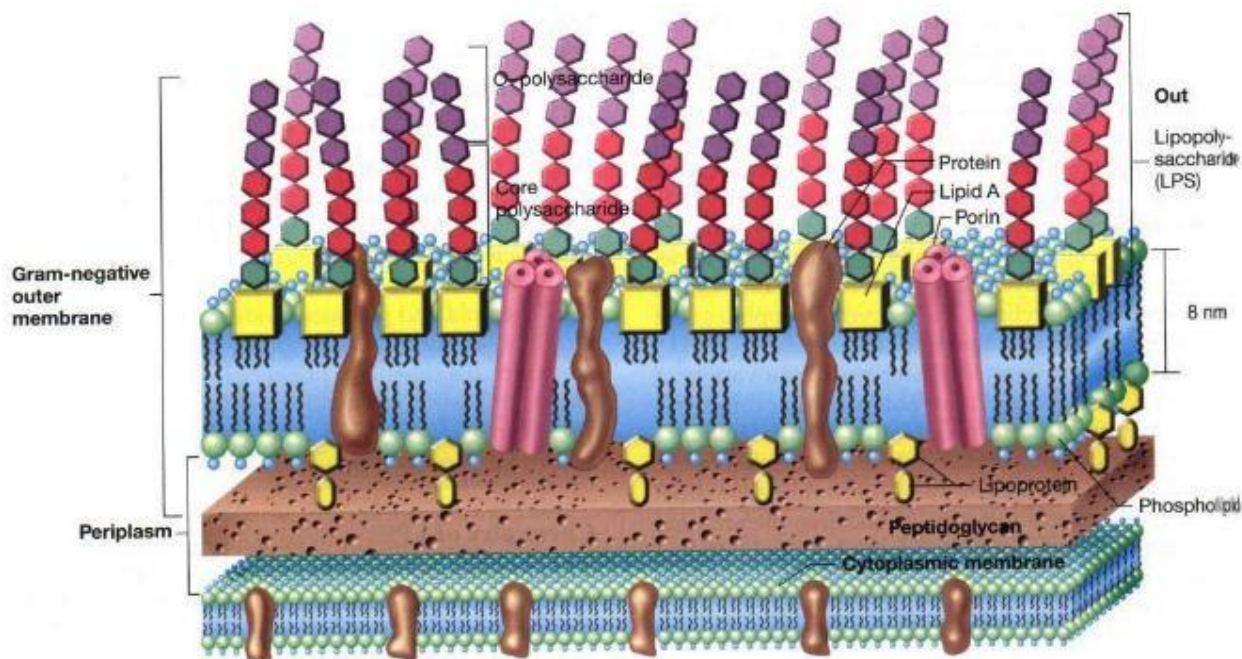


Figura 3. Parede celular de uma bactéria Gram negativa (Fonte: MADIGAN et al., 2010).

A produção de beta-lactamases cromossômicas tipo AmpC, a baixa permeabilidade da membrana externa a determinadas drogas, e a presença constitutiva de bombas de efluxo são alguns dos mecanismos de resistência intrínsecos que são responsáveis pela resistência natural desta espécie às penicilinas de espectro restrito, cefalosporinas de primeira e segunda geração, trimetoprim e sulfonamidas (SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015; PANG et al., 2019). O tratamento de infecções sistêmicas causadas por *P. aeruginosa* dispõe atualmente de penicilinas, cefalosporinas de 3^o e 4^o geração, fluoquinolonas, antimicrobianos associados a inibidores de beta-lactamases, aminoglicosídeos, monobactâmico, carbapenêmicos e as polimixinas (ROSSI; ANDREAZZI, 2005; SPIEGEL, 2005). Alguns dos mecanismos de resistência adquiridos são a produção de beta-lactamases de diferentes classes moleculares, produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, alteração do alvo das fluoroquinolonas, a perda de porinas devido à mutação e a hiperexpressão de bombas de efluxo (LIVERMORE, 2002; CHATTERJEE et al., 2015; SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015; PANG et al., 2019).

2.2. Plantas medicinais no Brasil

Planta medicinal é 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 (SILVA et al., 2017). De acordo com a OMS, 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependem de plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde, porém a maior parte dessas plantas não possui dados científicos que comprovem a sua eficiência (ROBINSON; ZHANG, 2011).

As plantas medicinais fazem parte da história da humanidade. A busca por alívio e cura das doenças, talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais, existindo registros históricos desde 4.000 a.C (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Essas interações entre seres humanos e plantas são moldadas pela história, pela cultura, pelos ambientes físico, biológico, social e pelas características inerentes às plantas (SANTOS et al., 2015).

No Brasil, a utilização de plantas medicinais teve influência das culturas indígena, africana e europeia. Entre os indígenas, as plantas eram utilizadas no tratamento de enfermidades, como veneno em guerras e caças e em rituais de magia. Esse conhecimento foi sendo transmitido oralmente de uma geração para outra (JORGE; MORAIS, 2003). Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, as plantas medicinais são vendidas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. As observações da população sobre o uso e a eficiência dessas plantas auxiliam de forma relevante para a divulgação das propriedades mesmo não tendo seus constituintes químicos elucidados (MACIEL; PINTO; VEIGA-JUNIOR, 2002).

Populações locais do Brasil utilizam, na medicina popular, várias plantas, oriundas do cerrado, floresta amazônica e mata atlântica, assim como plantas exóticas introduzidas como fonte de agentes medicinais naturais para o tratamento de diversas doenças, como esquistossomose, leishmaniose, infecções fúngicas e bacterianas (DUARTE, 2006; FERNANDES et al., 2015; SANTOS et al., 2016; TIAN et al., 2019). Sabendo-se que a população brasileira possui acesso limitado a medicamentos, a utilização dessa prática terapêutica traz diversas vantagens, como baixo custo, diminuição de efeitos colaterais, fácil

acesso, redução de efeitos adversos e diminuição dos riscos de intoxicação por uso inadequado (FURLAN, 1998).

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do planeta, onde se localizam 50% das espécies vegetais do mundo. Devido a sua complexidade, a biodiversidade do Brasil não é totalmente conhecida, porém, estima-se que existam 55.000 espécies catalogadas, num total estimado entre 350.000 e 550.000 (TOLEDO et al., 2003; SILVA; RYLANDS; FONSECA, 2005; DUTRA et al., 2016). Na Amazônia as plantas atingem uma biodiversidade extraordinária e estima-se que a região abrigue cerca de quarenta mil espécies de plantas vasculares, das quais trinta mil são endêmicas à região (MITTERMEIER et al., 2003).

A Caatinga é um bioma predominante do semiárido brasileiro, cobrindo aproximadamente 80% de sua área geográfica (IBAMA, 2009), incluindo partes dos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe. Sua diversidade é caracterizada por mais de duas mil espécies, destacando-se aproximadamente 130 espécies endêmicas; em vista disso, é considerado um bioma rico em recursos genéticos quando comparada a outras regiões semiáridas no mundo (MAIA et al., 2014). Estas espécies endêmicas apresentam um grande potencial medicinal, sendo amplamente conhecidas e utilizadas na medicina popular brasileira (MAGALHÃES et al., 2019).

Este grande patrimônio genético encontrado no Brasil, possui um valor econômico imensurável em várias atividades (BRASIL, 2006), mas é no campo de desenvolvimento de novos medicamentos onde ele é mais explorado, uma vez que inúmeros medicamentos foram obtidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais. Estimativas mostram que 40% dos medicamentos disponíveis atualmente na terapêutica foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, sendo que 25% foram originados a partir de plantas (CALIXTO, 2003).

A busca por terapias alternativas aumentou exponencialmente o interesse pelas plantas medicinais. Isto se deve principalmente devido a ineficácia de alguns medicamentos sintéticos, alto custo dos medicamentos convencionais e a busca por tratamentos que causem menos efeitos colaterais ao organismo principalmente no atendimento primário à saúde (RIBEIRO; LEITE; DANTAS-BARROS, 2005). As plantas que possuem compostos aromáticos são exemplos

de plantas que são utilizadas tradicionalmente não só na medicina popular, mas também para prolongar a vida útil os alimentos através da inibição de bactérias e fungos, na indústria farmacêutica, terapias naturais e medicina alternativa (SARTORATTO et al., 2004; TEMPONE et al., 2008). Como as plantas são importantes fontes de produtos biologicamente ativos, ou seja, substâncias que apresentam alguma atividade farmacológica sobre o metabolismo de um organismo vivo, elas são indispensáveis para a síntese de um grande número de novos fármacos (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

2.3. Potencial antimicrobiano das plantas medicinais

Devido ao aumento da resistência bacteriana aos múltiplos fármacos já existentes, surgiu a necessidade de se buscar novas alternativas terapêuticas, como fonte importante para obtenção destes medicamentos. Nesse contexto, os antimicrobianos de origem natural se apresentam como uma alternativa eficaz e econômica e sua atividade antimicrobiana já foi comprovada em vários estudos realizados em países que possuem uma flora diversificada (CORDEIRO, 2014).

Os produtos naturais, como compostos puros ou extratos padronizados de plantas, oferecem oportunidades como novas drogas devido à sua diversidade química. A estrutura química dos antibióticos vegetais difere daqueles derivados de micro-organismos, podendo regular o metabolismo intermediário de patógenos, ativando ou bloqueando reações e síntese enzimática ou mesmo alterando a estrutura de membranas (CORDEIRO, 2014; TOFIÑO-RIVERA et al., 2016).

Os compostos produzidos pelas plantas têm sido divididos em primário (macromoléculas - proteínas, lipídios e carboidratos) que são amplamente distribuídos nos organismos vivos; e secundários (micromoléculas- alcalóides, terpeóides, flavonóides) de ocorrência restrita em sua distribuição, embora estes sejam essenciais para os organismos que os produzem (RENSHENG e WEININ, 2011). São esses compostos que além de serem responsáveis pela ação medicinal, ou tóxica, das plantas, agem também na preservação da sua integridade, podendo atuar na atração de polinizadores, ou representar uma defesa química contra estresse ambiental. Em contrapartida, quando incorporados ao organismo animal, esses compostos produzem efeitos variados, caracterizando os princípios ativos das plantas que os possuem. Nem sempre esses princípios são conhecidos, porém, mesmo assim, a planta pode

apresentar atividade medicinal satisfatória e ser usada desde que não apresente efeito tóxico (LORENZI; MATOS, 2002).

As plantas possuem uma capacidade quase ilimitada de sintetizar substâncias aromáticas, a maioria das quais são fenóis ou seus derivados. Os compostos orgânicos mais associados à ação antibacteriana e seus possíveis mecanismos de ação são abordados de forma resumida na tabela abaixo:

Tabela 1. Principais classes de compostos antimicrobianos de plantas e seus possíveis mecanismos de ação

Compostos orgânicos	Mecanismos de ação
Fenóis simples	Inibição enzimática
Ácidos fenólicos	Ruptura de membrana
Quinonas	Inativação enzimática, ligação à adesinas de superfície
Flavonas, flavonoides e flavonóis	Inativação enzimática, ligação com proteínas extracelulares ou com a parede celular bacteriana
Cumarinas	Interação com o DNA eucariótico
Terpenóides e óleos essenciais	Ruptura de membrana
Alcalóides	Se intercalar na parede celular e / ou DNA
Lectinas e polipeptídeos	Formação de canais iônicos na membrana microbiana

Fonte: Adaptada de Cowan (1999)

2.3.1 Extratos vegetais e óleos essenciais

Os óleos essenciais (OE) são misturas heterogêneas que podem conter muitos compostos em diferentes concentrações. Cada OE é caracterizado por alguns compostos principais, que podem atingir níveis elevados em comparação com outros compostos presentes em quantidades vestigiais (ZAMORA; TORRES; NUÑEZ, 2018). As propriedades antimicrobianas de substâncias e óleos essenciais originários de plantas, através do seu metabolismo secundário, vem sendo reconhecidas empiricamente durante séculos, mas apenas recentemente é que foram confirmadas cientificamente (DUARTE, 2006).

Os extratos podem apresentar-se como produtos líquidos ou secos e são obtidos através de esgotamento a frio ou a quente. Podendo ser produzidos a partir de produtos de origem animal, vegetal ou microbiana, devendo possuir os princípios sápicos aromáticos voláteis e fixos correspondentes ao respectivo produto natural (BRASIL, 1961). Os extratos e óleos essenciais de inúmeras espécies de plantas podem limitar o crescimento dos micro-organismos relacionados à pele, cárie dental e deterioração de alimentos, incluindo as bactérias Gram negativas e Gram positivas (SARTORATTO et al., 2004).

Os mecanismos de ação desses compostos associados a sua atividade antimicrobiana são: desintegração da membrana plasmática, desestabilização da força próton motriz, fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula (ARAÚJO, 2014; FERNANES et al., 2015). Esses mecanismos de ação nem sempre agem em alvos específicos, podendo alguns sítios serem afetados em decorrência de outros mecanismos (BURT, 2004). Uma característica relevante, responsável pelo efeito antimicrobiano que os óleos essenciais possuem, são os componentes hidrofóbicos que permitem o rompimento de lipídeos da membrana celular bacteriana, desintegrando seus componentes e tornando-as mais permeável (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1994).

A atividade antimicrobiana das plantas medicinais tem sido associada a pequenos terpenóides e compostos fenólicos como carvona, timol, carvacrol, mentol e muroleno, que exibem atividade antibacteriana ou antifúngica também na sua forma pura. Apesar desses mecanismos de ação não estarem totalmente caracterizados, estes parecem estar associados ao caráter lipofílico dos compostos, havendo um acúmulo em membranas e perda de energia pelas células (FERNANES et al., 2015). Existe uma grande variação nas composições químicas de preparações vegetais, resultando em dados de difícil comparação entre as pesquisas, além disso, não há um consenso sobre os níveis de inibição aceitáveis para compostos de plantas, quando comparados com antibióticos padrões (DUARTE, 2006; GOMES; NOGUEIRA, MORAES, 2011).

2.4 *Lippia grata* Schauer (Alecrim-da-chapada)

A família Verbanaceae é composta por cerca de 100 gêneros e 2000 espécies distribuídas mundialmente, predominando em regiões tropicais e subtropicais (PRADO et al., 2012). O Brasil abriga aproximadamente 17 gêneros e 250 espécies desta família (SANTOS et al., 2009). O gênero *Lippia*, é o segundo maior da família Verbenaceae e é constituído por muitas espécies medicinais. Os maiores centros de dispersão desse gênero encontram-se na América Central, regiões tropicais da África, América do Norte, América do Sul e Austrália (VICCINI et al., 2006; GOMES et al., 2011), sendo os principais centros de diversidade específica do gênero *Lippia* localizados no México e no Brasil, sobretudo nos biomas do Cerrado e Caatinga (OLIVEIRA et al.; 2008; SOARES; TAVARES-DIAS, 2013).

A *Lippia grata* (antiga *Lippia gracilis*) é uma planta nativa do nordeste brasileiro é encontrada principalmente nos estados da Bahia, Piauí e Sergipe, sendo conhecida popularmente por Cidreira da serra, Alecrim-da-chapada ou Alecrim-de-tabuleiro (PRADO et al., 2012). A *L. grata* se apresenta como um arbusto caducifólio que varia de 2,5 cm até 2 metros de altura, com caule quebradiço, folhas pequenas e flores brancas, sendo bastante aromáticas. Os frutos são do tipo aquênio (seco), extremamente pequenos, cujas sementes raramente germinam (MATOS, 1998; GOMES et a., 2011).



Figura 4. Espécie vegetal *Lippia grata* (Fonte: <https://herbarioplantas.wordpress.com/alecrim-da-chapada/>).

Inúmeras espécies de *Lippia* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas doenças e muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de elucidar as propriedades dessas espécies, suas infusões de folhas e maceração alcoólica são utilizadas para algumas doenças inflamatórias, dor de cabeça, gripe, bronquite e tosse (GOMES; NOGUEIRA, MORAES, 2011). Vários estudos demonstram as atividades encontradas nos óleos essenciais e nos extratos hidroalcoólicos, da *L. grata*, como atividades antibacterianas (ALBUQUERQUE et al., 2006; BITU et al., 2014; CAFFARO, 2014), antifúngicas (CAROLINE et al., 2014; FERNANDES et al., 2015), antiparasitárias (DA SILVA et al., 2018; MELO et al., 2013; SOARES et al., 2017), inseticidas (ZOUBIRI; BAALIOUAMER, 2014; GALVÃO et al., 2019), gastroprotetoras (MARTINS, 2017), analgésicas (MENDES et al., 2010), anticolinesterásicas (VANZOLINI et al., 2018), citotóxicas (FERRAZ et al., 2013), acaricidas (MENEZES, 2016).

A composição química do óleo de *Lippia grata* mostra flutuações quantitativas dos componentes majoritários, provavelmente devido a condições genéticas, do local e das condições em que a planta é cultivada, justificando a diferença de constituintes entre óleos da mesma espécie (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; GOMES; NOGUEIRA, MORAES, 2011). Os constituintes dos óleos essenciais também são muito instáveis a presença de luz, calor e umidade, conseqüentemente o horário de colheita do material vegetal pode influenciar direta ou indiretamente nos processos do metabolismo secundário. A composição química do óleo essencial de muitas espécies de *Lippia* tem sido investigada através de Cromatografia Gasosa, sendo limoneno, b-cariofileno, p-cimeno, cânfora, linalool, α -pineno, timol e carvacrol os componentes que aparecem com maior frequência (GOMES; NOGUEIRA, MORAES, 2011; FRANCO et al., 2014).

O óleo essencial da *L. grata* contém proporções variáveis de fitoquímicos antimicrobianos de ação comprovada, sendo o timol e carvacrol, possuindo ação antimicrobiana por envolver a ruptura da membrana bacteriana (OLIVEIRA et al., 2008; ALBUQUERQUE et al., 2006; VIANA, 2009; NETO et al., 2010; GOMES; NOGUEIRA, MORAES, 2011; FERNANDES et al., 2015; MARCHESE et al., 2016). Outros constituintes, mais presentes nos extratos hidroalcoólicos, como as flavonas, flavanoides e flavonóis, possuem como possível mecanismo de ação antimicrobiano a formação de complexos com proteínas extracelulares ou

com a parede celular bacteriana, resultando na ruptura da membrana (ARAÚJO, 2014). Ensaio antimicrobianos com produtos vegetais desta espécie demonstraram elevada atividade frente as bactérias Gram negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiela pneumoniae*; e Gram positivas *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., fungos *Saccharomyces* e *Trichophyton* (MATOS, 1998; PESSOA et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2006; BITU et al., 2014; CAFFARO, 2014).

Considerando a constituição química do extrato e óleo essencial da *L. grata*, as atividades biológicas já elucidadas e o incentivo de políticas públicas para a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos à base de plantas medicinais, torna-se apropriado avaliar seu possível efeito antimicrobiano.

3. JUSTIFICATIVA

Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista de agentes patogênicos prioritários para a busca de novos antibióticos, na qual a espécie *P. aeruginosa* aparece em segundo lugar no grupo classificado como “crítico” (TACCONELLI et al., 2017). A formação de biofilmes por esta espécie dificulta a ação dos antimicrobianos, que tem por consequência uma falha na terapia das infecções. Assim, a busca pela prevenção do desenvolvimento dos biofilmes é um dos mais desejáveis objetivos na área de pesquisa dos antimicrobianos (MANNER et al., 2017).

Na busca por novas possibilidades de controle dos biofilmes, estudos com métodos alternativos utilizando plantas têm crescido bastante nos últimos anos, tornando-se um campo de pesquisa relevante. Neste contexto, as propriedades antimicrobianas de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais produzidos por plantas são, de fato, reconhecidas empiricamente há séculos e recentemente vêm sendo exploradas de forma ampla no âmbito científico, almejando o uso de plantas como uma alternativa aos medicamentos convencionais nos tratamentos tradicionais.

Na perspectiva de elucidar o possível papel de compostos orgânicos biologicamente ativos no tratamento de infecções bacterianas, o presente estudo visa aliar o conhecimento tradicional do uso de plantas medicinais com a prospecção de compostos orgânicos presente em extratos e óleos essenciais obtidos a partir de *L. grata*. A análise da atividade farmacológica de extratos e óleos essenciais obtidos a partir da *Lippia grata*, realizada em estudos anteriores, revelou que esses produtos naturais apresentaram um promissor potencial antimicrobiano frente a patógenos resistentes de importância médica.

Considerando que o estado do Rio Grande do Norte inclui uma flora ainda pouco estudada, estimula a realização de pesquisas que avaliem as espécies vegetais (extratos, frações, sub-frações e óleos essenciais) com relação ao seu potencial antimicrobiano assim como, a busca de novos compostos ativos frente a formação de biofilmes bacterianos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme do extrato e óleo essencial da *Lippia grata* frente a isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de sensibilidade dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos (CLSI, 2018).
- Determinar quantitativamente pela técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2018) a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato vegetal e óleo essencial da *L. grata* frente a isolados clínicos de *P. aeruginosa*;
- Determinar a concentração bactericida mínima (CBM), posteriormente à determinação da CIM;
- Quantificar, através da coloração com cristal de violeta, a formação dos biofilmes e analisar estatisticamente os resultados observados.
- Avaliar *in vitro* (microtitulação) o efeito do extrato hidroalcoólico da *L. grata* frente aos biofilmes em formação e consolidados de *P. aeruginosa*;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Aprovação no comitê de ética

O presente estudo utilizou amostras clínicas isoladas de pacientes do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL), sendo assim submetido à avaliação pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e aprovado com os números de registro CAAE: 85605318.9.0000.5537 e CEP: 2577278, conforme documento em anexo (ver ANEXO 1).

5.2 Isolados bacterianos e local do estudo

A pesquisa foi realizada com 44 isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes do Laboratório de Análises clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL), obtidos no período de Abril a Junho de 2018. Estes isolados foram encaminhados ao Laboratório de Ensaio Antimicrobianos e de Citotoxicidade (LEAC) do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), onde ocorreu todas as etapas da pesquisa. Todos os isolados foram identificados fenotipicamente através do sistema automatizado BD Phoenix e mantidos estocados em freezer a -20°C até a realização dos ensaios. A ativação das cepas foi realizada através de semeio por esgotamento em ágar triptona soja (TSA - HIMEDIA, Índia) 24 horas antes da execução dos ensaios, visando obter a cultura em fase logarítmica de crescimento. Em todos os experimentos utilizou-se como controle a cepa padrão *P. aeruginosa* (ATCC 27853).

5.3 Material vegetal

As etapas de obtenção do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial da *L. grata* foram realizadas em colaboração com a Pesquisadora Prof^a Dr^a Cynthia Cavalcanti de Albuquerque do Laboratório de fisiologia e bioquímica de plantas da Universidade Estadual do Rio Grande do Norte (UERN). As amostras encontram-se cadastradas (registro nº A624800) no Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN).

5.4 Obtenção do extrato vegetal e óleo essencial da *L. grata*

A amostra de um espécime da *L. grata* está depositada no herbário Dárdaro de Andrade Lima MOSS, da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), localizada sob Latitude 05° 11' 15" S e Longitude 37° 20' 39" W, sob nº de tombo 9317. O extrato hidroalcolico da *L. grata* foi produzido a partir de folhas frescas coletadas às 6 horas da manhã na proporção de 1:5 p/v, utilizando-se 1000 gramas de folhas para cinco litros de etanol a 70%. As folhas foram colhidas, lavadas, trituradas e colocadas em recipiente de vidro âmbar sob agitação ocasional e mantendo-se a proporção citada. O líquido extraído passou por uma filtração inicial em papel de filtro sob pressão reduzida, e uma posterior filtração por gravidade com funil fechado com algodão. O filtrado foi concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida numa temperatura de ± 80 °C, para separação do etanol. A solução obtida foi colocada em banho-maria a uma temperatura constante de 65 °C para evaporação da água e obtenção do material sólido (FERNANDES et al., 2015).

Para obtenção do óleo essencial, foram coletadas cerca de 1000 gramas de folhas frescas da *L. grata* no período de 6 horas da manhã. A extração do óleo essencial foi realizada por processo de hidrodestilação, utilizando o sistema Clevenger. As folhas foram transferidas para um balão de fundo redondo com 2 litros de água e a vidraria foi aquecida por 2 horas em manta aquecedora. O vapor gerado através do aquecimento foi condensado, gerando um precipitado de água e óleo em funil de separação. Em seguida, o óleo foi desidratado com sulfato de sódio anidro e éter. O material obtido foi estocado em frasco hermético, protegido da luz (FERNANDES et al., 2015).

O extrato hidroalcolico e óleo essencial foram colocados em frascos herméticos protegidos da luz, acondicionados adequadamente em gelo e transportados para o Laboratório de Ensaios Antimicrobianos e de Citotoxicidade (LEAC) do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), onde permaneceu sob refrigeração a -10°C até o momento de sua utilização, sob supervisão e orientação da Prof^a Vânia Sousa Andrade.

5.5 Caracterização química do óleo essencial da *L. grata* por Cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (CG/EM)

A identificação dos constituintes voláteis foi realizada no Instituto de Química da UFRN sob supervisão da Prof^a. Dr^a Renata Mendonça Araújo. A análise foi realizada em triplicata com três amostras do óleo essencial da *L. grata* (produzido em 2013). O equipamento utilizado foi o cromatográfico gasoso associado a espectrometria de massa modelo QP2020 da Shimadzu®, usando uma coluna capilar de 5MS com o método do Terpeno. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) foi realizada através de injeção do tipo split, configurada na proporção de 1:7 e temperatura do injetor de 290°C. O fluxo constante foi de 1,5 mL/min, com linha de transferência ajustada a 300°C e temperatura da fonte iônica de 240°C. Foi utilizada uma rampa a 80°C (0 min), 80°C até 260°C (5°C/min por 0 min), e 260°C até 280°C (10°C/min por 5 min). A abrangência de massa utilizada foi de 35 – 500 u.m.a. com tempo de scan 0.2 segundos e injeção 1 µL. A amostra do óleo essencial foi realizada em triplicata, sendo esta amostra dissolvida em dicloro metano P.A. (UV/HPLC). Os componentes do óleo foram identificados por comparação com os dados da literatura (ADAMS, 2007).

5.6 Estudo do Perfil de resistência aos antimicrobianos

O perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados de *P. aeruginosa* foi determinado através da técnica de disco-difusão (Kirby-Bauer) segundo as recomendações do CLSI (2018). Colônias de aspectos similares foram inoculadas em um tubo contendo 5mL de solução salina ajustando a turvação para 0,5 da escala MacFarland (PROBAC, Brasil), que corresponde a uma quantidade de 10⁸UFC/mL. Um *swab* de algodão estéril foi então submergido a esta suspensão bacteriana e posteriormente inoculado à superfície seca do meio de cultura ágar Mueller-Hinton (HIMEDIA, Índia) à temperatura ambiente. Com o objetivo de distribuir uniformemente o inóculo, o ágar foi estriado com o *swab* em pelo menos três direções, girando a placa em ângulos de aproximadamente 60 graus após cada estria.

Os agentes antimicrobianos testados e as respectivas concentrações (µg/mL) foram: ceftazidima (30µg), cefepime (30µg), aztreonam (30µg), imipenem (10µg), meropenem (10µg), gentamicina (10µg), ciprofloxacino (5µg),

levofloxacino (5µg), piperacilina + tazobactam (PIT) (100/10µg). Os discos de antibióticos foram colocados manualmente sobre a superfície do meio, com o auxílio de pinça estéril, respeitando a ordem e as distâncias específicas para cada teste. Após esta etapa as placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por aproximadamente 24 horas. Após este período, foi realizada a medição do diâmetro da zona de inibição do crescimento ao redor de cada disco de antibiótico, com o auxílio de uma régua. As amostras foram classificadas como sensíveis (S), intermediárias (I) ou resistentes (R) aos antimicrobianos testados, de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo CLSI (2018).

5.7 Atividade antibacteriana *in vitro* do extrato e óleo essencial da *Lippia grata*

A atividade antibacteriana do extrato vegetal e óleo essencial da *Lippia grata* foi avaliada de forma quantitativa através da técnica da microdiluição em caldo (CLSI, 2018) com modificações. Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços de fundo plano através de diluição seriada. Todas as amostras foram testadas em triplicata, como controle positivo foi utilizado gentamicina (10 µg/mL) e como controle negativo, dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% que foi utilizado como diluente das amostras. O controle de crescimento foi realizado para mostrar a viabilidade da cepa, sendo constituído apenas por meio de cultura e suspensão bacteriana.

Foram pipetados em cada poço da placa de microtitulação, 100 µL de caldo Mueller-Hinton (HIMEDIA, Índia). Em seguida foram adicionados 100 µL da solução estoque do extrato ou óleo no primeiro poço, com posterior homogeneização, seguido de diluições seriadas, com o objetivo de se obter as 8 concentrações finais para o extrato hidroalcolico: 100 mg/mL; 50 mg/mL; 25 mg/mL; 12,5 mg/mL; 6,25 mg/mL; 3,12 mg/mL; 1,56 mg/mL; 0,78 mg/mL; e as 16 concentrações finais para o óleo essencial: 100 mg/mL; 50 mg/mL; 25 mg/mL; 12,5 mg/mL; 6,25 mg/mL; 3,12 mg/mL; 1,56 mg/mL; 0,78 mg/mL; 0,39 mg/mL; 0,19 mg/mL; 0,09 mg/mL; 0,04 mg/mL; 0,02 mg/mL; 0,01 mg/mL; 0,006 mg/mL; 0,003 mg/mL, conforme mostrado na figura abaixo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100	0,39	100	0,39	100	0,39	100	100	100	CP	CN	CC
B	50	0,19	50	0,19	50	0,19	50	50	50	CP	CN	CC
C	25	0,09	25	0,09	25	0,09	25	25	25	CP	CN	CC
D	12,5	0,04	12,5	0,04	12,5	0,04	12,5	12,5	12,5			
E	6,25	0,02	6,25	0,02	6,25	0,02	6,25	6,25	6,25			
F	3,12	0,01	3,12	0,01	3,12	0,01	3,12	3,12	3,12			
G	1,56	0,006	1,56	0,006	1,56	0,006	1,56	1,56	1,56			
g	0,78	0,003	0,78	0,003	0,78	0,003	0,78	0,78	0,78			

Óleo essencial
 Extrato
 Controle positivo
 Controle negativo
 Controle de crescimento

Figura 5. Representação da distribuição das concentrações em mg/mL na diluição seriada para o óleo essencial (colunas de 1-6) e extrato (Colunas de 7-9) de *Lippia grata*, realizadas na microdiluição em caldo em placa de 96 poços.

Para a preparação dos inóculos, as amostras foram semeadas em TSA. Colônias de aspectos similares foram inoculadas em um tubo contendo 2mL de solução salina ajustando a turvação para 0,5 da escala MacFarland, que corresponde a 10^8 UFC/mL. Desta suspensão, 20 μ L foram inoculados nos poços da microplaca contendo meio de cultura e a diluição do extrato ou óleo essencial. Após esta etapa as placas foram incubadas a 35°C em estufa bacteriológica por aproximadamente 24 horas.

5.8 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Após a incubação foi realizada a leitura da placa, onde foi utilizado o revelador de crescimento bacteriano Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) a 0,5%. Esse composto é incolor na forma oxidada e solúvel em água; na presença de metabolismo bacteriano, ocorre a conversão do tetrazólio em cristais insolúveis de cor vermelha, chamados de compostos de formazan. Dessa forma, se houver atividade bacteriana, o meio de cultura ganha uma coloração vermelha e na ausência de metabolismo bacteriano, o meio permanece com sua coloração original (GUNZ, 1949).

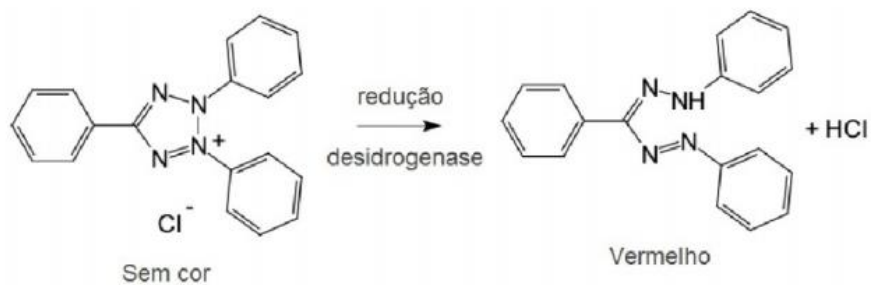


Figura 6. Redução do Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio ao formazan (Adaptado de OPWIS et al., 2012).

Em cada poço da placa foi adicionado 20 μ L da solução de CTT, seguido de incubação a 37°C durante 2 horas. Após a incubação, as placas foram analisadas com o objetivo de se determinar as CIMs, as quais foram definidas como as menores concentrações do extrato ou óleo essencial, que visualmente inibiram completamente o crescimento bacteriano. A CIM50 foi definida como a concentração mínima necessária para inibir o crescimento de 50% dos isolados bacterianos testados e a CIM90 como a concentração mínima necessária para inibir o crescimento de 90% dos isolados bacterianos testados (CORTINHAS et al., 2013).

5.9 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Para avaliar a ação bactericida do extrato e óleo essencial da *L. grata*, foram selecionados, em cada placa, os poços que abrangeram as regiões teste e os controles (CN, CP e CC). De cada poço, foi retirada uma alíquota de 10 μ L, semeando-a na superfície de ágar MH e incubando por 24 horas a 37 °C. Após a incubação foi realizada a leitura das CBMs para avaliar a possível ação bactericida dos produtos naturais testados. A CBM foi definida como a menor concentração do extrato ou óleo essencial capaz de causar danos irreversíveis à célula bacteriana, impedindo o crescimento do micro-organismo (MAHBOUBI et al., 2012). A CBM₅₀ e CBM₉₀ foram definidas como as menores concentrações do extrato ou óleo essencial capazes de causar danos irreversíveis em 50% e 90% das cepas, respectivamente (RÚA et al., 2019).

5.10 Quantificação do biofilme

Cada isolado de *Pseudomonas aeruginosa* foi cultivado em TSA e incubado a 37°C por 24 horas. Após a incubação, as colônias isoladas foram transferidas para solução salina estéril a 0,9%, ajustando a turbidez dos inóculos para a concentração de 0,5 na escala de MacFarland (10^8 UFC/mL). A suspensão obtida foi homogeneizada por agitação em vórtex por pelo menos 1 minuto. Para o cultivo do biofilme foi utilizada uma microplaca de poliestireno (KASVI, Brasil), 96 poços e base plana. Os poços das microplacas foram preenchidos com 180 μ L de caldo triptona de soja (TSB - HIMEDIA, Índia) suplementado com 1% de glicose. Em seguida, foram adicionados em cada poço 20 μ L do inóculo padronizado para cada amostra. Como controle negativo foram utilizados poços contendo apenas 200 μ L de TSB e como controle positivo, a cepa padrão *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. A placa inoculada foi incubada em condições de aerobiose a 37° C por 24 horas. Após a incubação, as microplacas foram lavadas três vezes em salina estéril a 0,85% e fixadas pelo calor, através da exposição ao ar quente durante 1 hora a 60° C. Em seguida, os poços foram corados com 200 μ L de cristal violeta durante 15 minutos em temperatura ambiente. As placas foram lavadas em água corrente para retirar o excesso de corante e após a secagem, foram adicionados 150 μ L de etanol a 95% nos poços. A placa foi então coberta com a tampa e deixada em temperatura ambiente por 30 minutos sem agitação.

A quantificação do biofilme em cada poço foi medida com base na densidade óptica (D.O.) de 570 nm através de um leitor de microplacas modelo Epoch (BIOTEK, EUA). Os valores médios da DO foram calculados para todas as cepas testadas e controles negativos, uma vez que todos os testes foram realizados em triplicata. O valor de corte (ODc) foi definido como três desvios padrão (DP) acima da DO média do controle negativo: $ODc = OD \text{ média do controle negativo} + (3 \times DP \text{ do controle negativo})$. O valor final de DO de uma amostra testada foi expresso como valor médio de DO da amostra reduzida pelo valor ODc ($OD = OD \text{ média de uma estirpe} - ODc$) (STEPANOVIĆ et al., 2007). Com base nos valores DO previamente calculados as cepas foram classificadas da seguinte forma:

DO das amostras em relação a DO dos poços controle	Produção de biofilme
$DO \leq DO_c$	Não produtor (NP)
$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	Fraco produtor (FP)
$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$	Moderado produtor (MP)
$4 \times OD_c < OD$	Forte produtor (FoP)

Figura 7. Cálculo para quantificação do biofilme através a determinação da Densidade óptica.

5.11 Ação do extrato sobre o biofilme em formação

Após a determinação da CBM, foi utilizada a concentração da CBM_{50} para os testes com o biofilme em formação. Este ensaio foi realizado apenas com os inóculos bacterianos classificados como MP (moderado produtor de biofilme) e FP (forte produtor de biofilme). O cultivo do biofilme foi realizado de acordo com o procedimento descrito no tópico 5.10. Após o preparo da placa, foram acrescidos em cada poço 100 μ l do extrato vegetal. Após 24 horas de incubação a 37°C, as placas foram submetidas à coloração com cristal violeta. A quantificação do biofilme em cada poço foi medida usando a densidade óptica (DO), como já descrito anteriormente.

5.12 Ação do extrato sobre o biofilme consolidado

Para a avaliação da ação do extrato frente aos biofilmes consolidados, estes foram testados também nas microplacas de 96 poços. O cultivo do biofilme foi realizado de acordo com o procedimento descrito no tópico 5.10. Após a incubação, os poços foram lavados três vezes com salina estéril, para a remoção de células plactônicas e em seguida foram adicionados 200 μ l da concentração do extrato que apresentou a melhor ação bactericida (CBM_{50}) no experimento (NOSTRO et al., 2007). A densidade óptica (DO) foi determinada imediatamente após a adição do extrato (0 h) e (24 h) depois.

5.13 Análise estatística

Para verificar a associação entre o tempo de tratamento com extrato (0h e 24h) e a densidade óptica do biofilme consolidado, através do cálculo da média e do desvio padrão, utilizou-se o Teste dos sinais (Statistica 7.0 Software).

6. Resultados

6.1. Caracterização química do óleo essencial da *L. grata*

Na caracterização química do óleo essencial de *L. grata* foram identificados quatro componentes principais: carvacrol (51,4%), como constituinte majoritário, timol (15,6%), p-cimeno (12,2%) e γ -terpineno (7,4%). A caracterização completa do óleo está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Composição química do óleo essencial da *L. grata*.

Componente volátil	KI-L	LGOE1			LGOE2			LGOE3		
		RT	Área (%)	KI-C	RT	Área (%)	KI-C	RT	Área (%)	KI-C
Mirceno	990	5,13	2,17	998,24	5,12	1,56	998,47	5,12	1,59	998,51
δ -2-Careno	1002	5,74	1,45	1019,22	5,73	1,13	1019,38	5,73	1,12	1019,42
p-Cimeno	1024	5,94	13,52	1026,02	5,91	12,16	1025,73	5,91	12,37	1025,71
γ -Terpineno	1059	6,72	7,75	1052,93	6,71	7,37	1052,89	6,71	7,34	1052,91
Ipsdienol	1145	8,98	1,64	1130,45	8,97	1,43	1130,55	8,97	1,36	1130,60
Terpinen-4-ol	1177	9,98	1,68	1164,91	9,97	1,32	1165,02	9,97	1,26	1165,18
Timol	1290	13,48	16,35	1284,90	13,47	15,61	1285,29	13,47	15,22	1285,15
Carvacrol	1299	13,91	46,56	1299,87	13,88	51,44	1299,06	13,86	51,91	1298,55
(E)-Cariofileno	1419	17,47	2,77	1422,15	17,46	2,28	1422,11	17,46	2,20	1422,22
Óxido de cariofileno	1583	22,34	2,84	1589,27	22,33	2,50	1589,49	22,33	2,48	1589,65
Equação da reta		$y = 34,33.x + 822,1$			$y = 34,334.x + 822,51$			$y = 34,345.x + 822,46$		
R ²		0,9976			0,9976			0,9976		

LGOE1: *Lippia grata* óleo essencial análise 1. LGOE2: *Lippia grata* óleo essencial análise 2. LGOE3: *Lippia grata* óleo essencial análise 3.

RT: tempo de retenção.

KI-L: Índice de Kovats padronizados da literatura (Adams 2007).

KI-C: Índice de Kovats corrigido.

6.2. Caracterização das amostras bacterianas

A maior parte dos isolados bacterianos foram provenientes de amostras de secreção traqueal (25%), seguido de urina (20,4%), sangue (15,9%), ponta de cateter (9,0%), escarro (6,85), secreção de orofaringe (6,8%), secreção de abscesso (4,5%) e de outras fontes com menores frequências são demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Frequência dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de acordo com o sítio de isolamento.

Sítio de isolamento	Número de isolados	Percentual (%)
Secreção traqueal	11	25,0
Urina	9	20,4
Sangue	7	15,9
Ponta de cateter	4	9,0
Escarro	3	6,8
Secreção de orofaringe	3	6,8
Secreção de abscesso	2	4,5
Secreção de ouvido	1	2,2
Raspado de córnea	1	2,2
Swab de olho	1	2,2
Fragmento de lesão venosa	1	2,2
Fragmento de perna esquerda	1	2,2
Total	44	100%

6.3. Estudo do perfil de resistência aos antimicrobianos

O perfil de resistência das amostras de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos testados foi avaliado através da técnica de Kirby-Bauer, como pode ser observado na figura 8.



Figura 8. Avaliação do perfil de sensibilidade da amostra P37 aos antimicrobianos através da técnica de Kirby-Bauer (Fonte: Arquivo próprio).

Entre os antimicrobianos testados, a classe dos monobactâmicos, representada pelo aztreonam foi a que apresentou maior percentual de resistência (47,85), seguido por imipenem e levofloxacino, ambos com 41,0%, meropenem (36,4%), PIT (35,0%), ceftazidima (34,1%), ciprofloxacino (31,9%) cefepime (29,6%) e gentamicina (20,5%). O perfil de sensibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos testados está apresentado na figura 9.

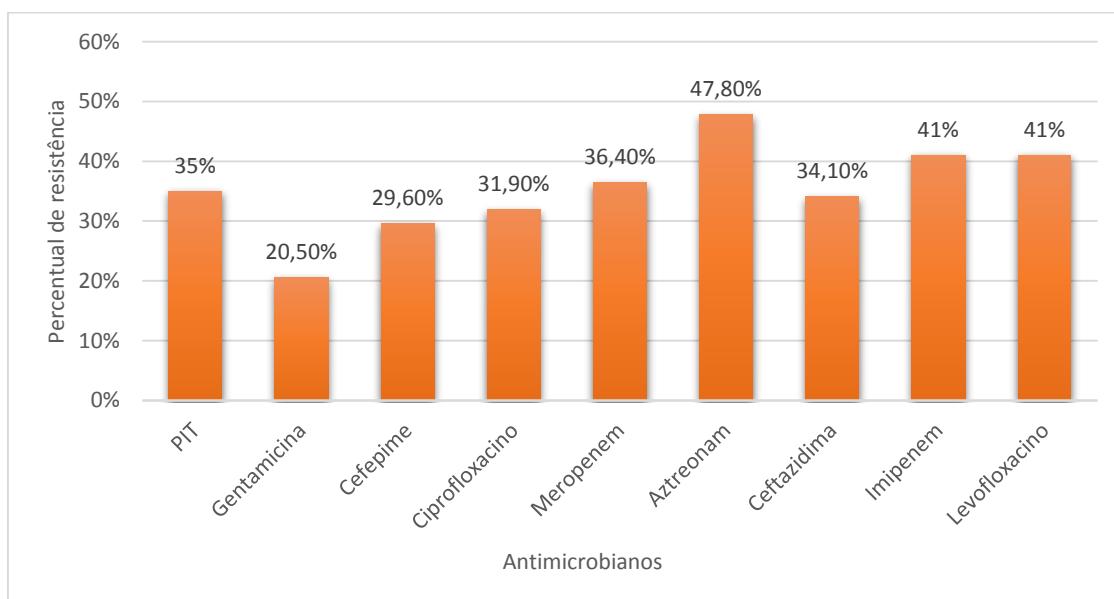


Figura 9. Percentual de resistência dos isolados aos antimicrobianos testados.

6.4. Teste da atividade antibacteriana *in vitro*

Os experimentos referentes à Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de algumas cepas podem ser observados nas Figuras 10 e 11, respectivamente.

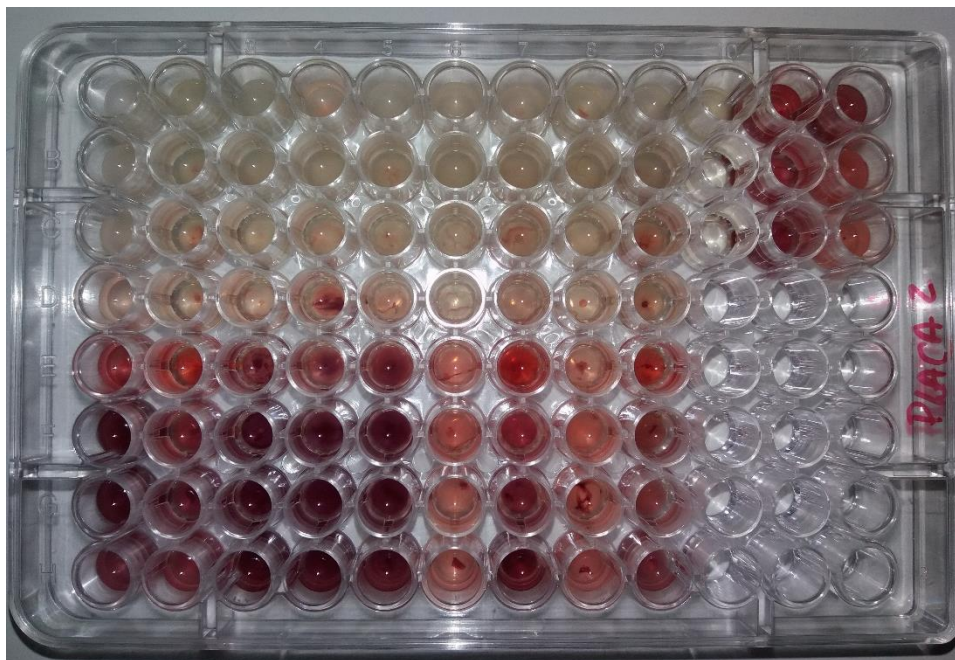


Figura 10. Determinação da Concentração inibitória mínima. Após a adição de CTT, o meio adquire coloração vermelha, caso haja atividade bacteriana. Na ausência de metabolismo bacteriano o meio permanece com sua coloração original (Fonte: Arquivo próprio).

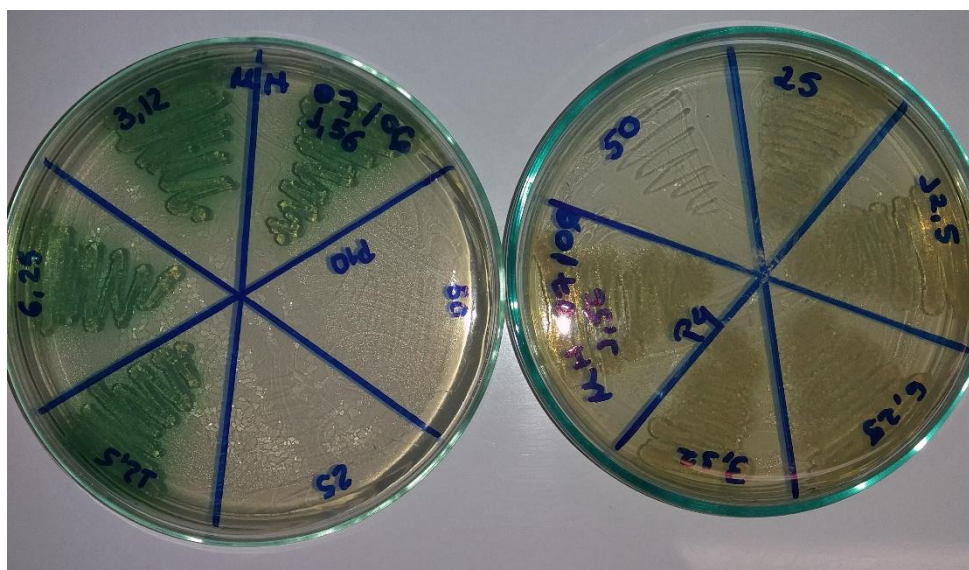


Figura 11. Determinação da concentração bactericida mínima das cepas P4 e P10 em ágar Mueller-Hinton (Fonte: Arquivo próprio).

O extrato vegetal da *L. grata* apresentou atividade antimicrobiana para 100% dos isolados testados na concentração de 50 mg/mL (CIM₉₀ e CBM₉₀). A concentração de 25 mg/mL (CIM₅₀) apresentou atividade inibitória para 56,8%

dos isolados e atividade bactericida para 43,1% dos isolados. As demais concentrações não apresentaram atividade antimicrobiana. Os resultados das CIMs e CBMs para o extrato vegetal da *L. grata* foram apresentados na figura 12.

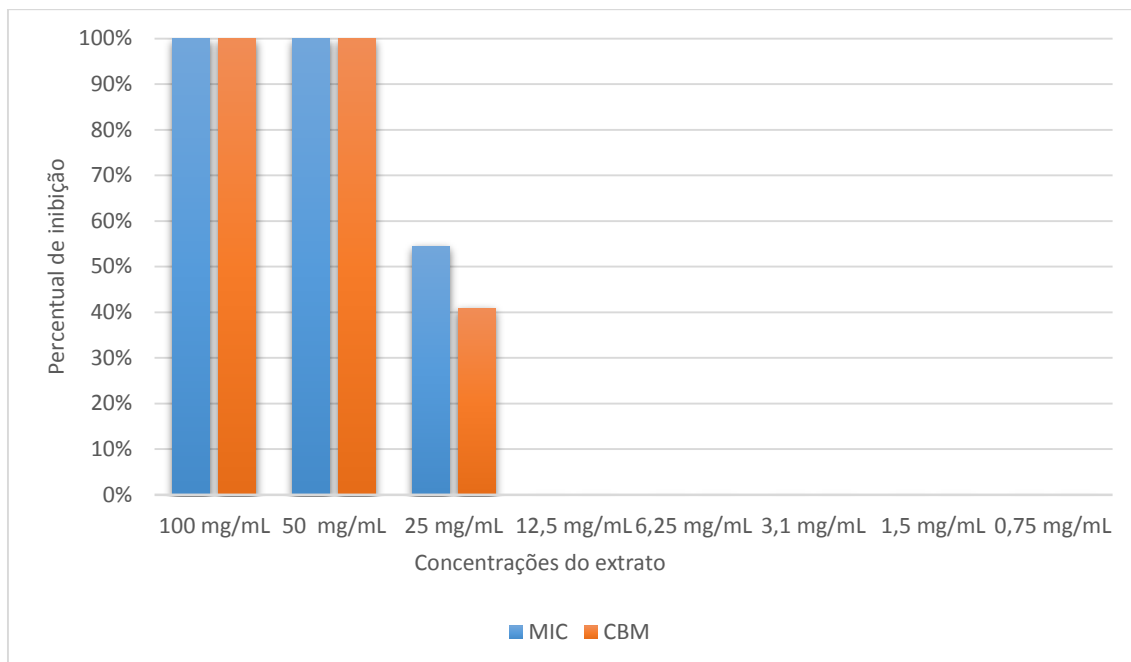


Figura 12. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) para o extrato vegetal da *L. grata*.

O óleo essencial da *L. grata* apresentou atividade inibitória em 100% dos isolados testados nas concentrações de 50 mg/mL a 6,25 mg/mL (CIM₉₀). As concentrações de 3,12 mg/mL (CIM₅₀) e 1,56 mg/mL apresentaram atividade inibitória para 70,4% e 27,2% dos isolados, respectivamente. As demais concentrações não apresentaram atividade antimicrobiana. Nenhuma das concentrações testadas do óleo essencial da *L. grata* apresentou atividade bactericida sobre os isolados testados. Os resultados das CIMs e CBMs para o óleo essencial da *L. grata* estão representados na figura 13.

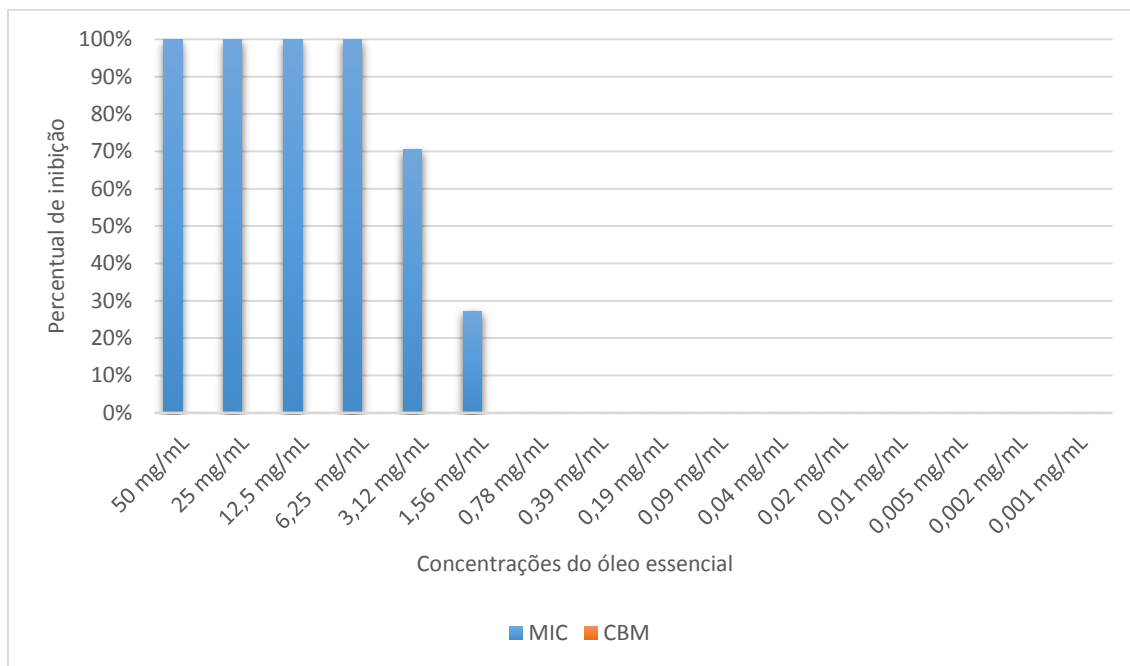


Figura 13. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) para o óleo essencial da *L. grata*.

Os controles validaram de forma eficiente os ensaios. Os poços utilizados como controle positivo não apresentaram crescimento bacteriano, corroborando a eficácia da gentamicina como controle positivo no teste. Com relação ao controle negativo e controle de crescimento, em todos os ensaios houve crescimento bacteriano, demonstrando que o efeito antibacteriano observado decorreu apenas dos constituintes do óleo essencial e extrato vegetal e não do diluente utilizado (DMSO).

6.5. Quantificação do biofilme

Os resultados da quantificação do biofilme produzido pela *P. aeruginosa* nas superfícies plásticas das microplacas revelaram que 97.7% dos isolados avaliados produziram biofilme no meio TSB diluído.

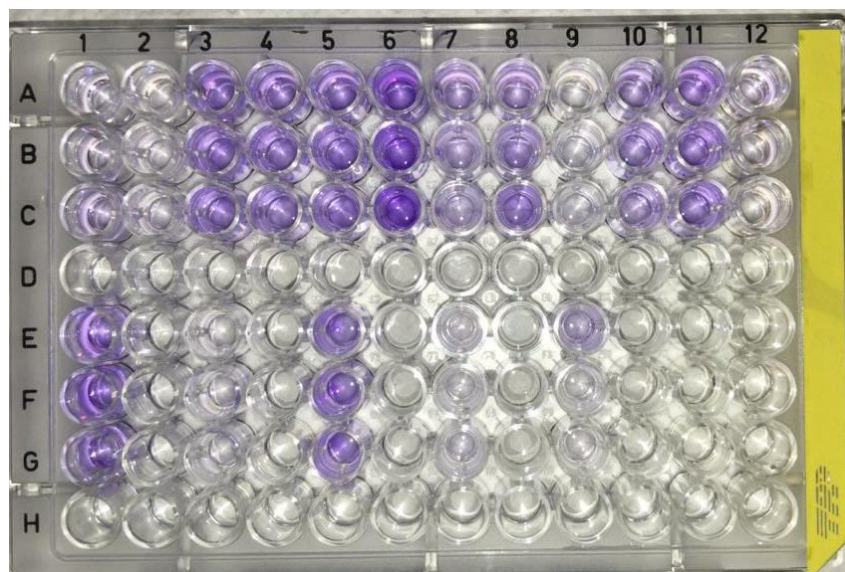


Figura 14. Quantificação de biofilme em microplaca para alguns isolados de *P. aeruginosa* testados (Fonte: Arquivo próprio).

Dos 44 isolados de *P. aeruginosa* analisados, 18 (40,9%) foram classificados como fracos produtores de biofilme, 18 (40,9%) como moderados produtores, 7 (15,9%) como fortes produtores e apenas 1 (2,2%) não produziu biofilme.

A Tabela 4 apresenta um breve resumo, correlacionando cada isolado clínico com o seu sítio de isolamento, perfil de resistência, classificação quanto a produção de biofilme, CIM e CBM para o extrato e óleo essencial.

Tabela 4. Resumo geral das características fenotípicas de cada isolado clínico.

Cepa	Sítio de isolamento	Perfil de resistência			Classificação	Extrato hidroalcoólico		Óleo essencial	
		Sensível	Intermediário	Resistente		CIM	CBM	CIM	CBM
P1	Sec. Traqueal	GEN, IMP, CAZ, PIT, MPM	-	LEV, CIP, ATM, CPM	Fraca produtora	25	25	1,5	-
P2	Sec. Traqueal	LEV, GEN, CIP		PIT, IMP, CAZ, COM, ATM, MPM	Fraca produtora	50	50	3,1	-
P3	Sec. Traqueal	IPM, CAZ, GEN, CPM, ATM, CIP, MPM	PIT, LEV	-	Forte produtora	50	50	1,5	-
P4	Abscesso subfrênico	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV	,		Moderada produtora	50	50	3,1	-
P5	Sec. de orofarige	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV	-	-	Moderada produtora	50	50	1,5	-
P6	Sec. Traqueal	IMP, GEN, MPM, PIT	CAZ	CPM, CIP, ATM, LEV	Forte produtora	25	25	3,1	-
P7	Escarro	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV	-	-	Moderada produtora	50	50	1,5	-
P8	Sec. de ouvido	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV	-	-	Moderada produtora	25	25	3,1	-

P9	Sec. Traqueal	GEN, PIT, CAZ, LEV, CPM, CIP	-	ATM, MPM, IMP	Não produtora	25	50	3,1	-
P10	Ponta de catéter	CIP, PIT, CPM, CAZ, GEN	ATM	LEV, MPM, IMP	Moderada produtora	25	25	1,5	-
P11	Raspado de córnea	IMP, CIP, MPM, PIT, LEV, CPM, GEN, CAZ	ATM	-	Moderada produtora	50	50	1,5	-
P12	Urina		-	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV	Fraca produtora	25	25	1,5	-
P13	Sec. de orofaringe	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, LEV	ATM	-	Forte produtora	25	25	1,5	-
P14	Sec. Nasotraqueal	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV		-	Moderada produtora	50	50	1,5	-
P15	Sec. Traqueal	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV	-	-	Moderada produtora	25	50	1,5	-
P16	Ponta de catéter	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV	-	-	Moderada produtora	50	50	3,1	-
P17	Sec. Traqueal	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV	-	-	Fraca produtora	25	25	3,1	-
P18	Urina	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV	-	-	Forte produtora	25	25	3,1	-
P19	Swab de orofaringe	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV		-	Fraca produtora	50	50	1,5	-
P20	Escarro	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV		-	Fraca produtora	25	25	1,5	-
P21	Escarro	MPM, IMP, ATM	CPM, PIT	CIP, LEV, GEN, CAZ	Moderada produtora	25	25	3,1	-
P22	Ponta de catéter	CIP, CPM, GEN, PIT, CAZ, LEV	ATM, IMP	MPM	Forte produtora	50	50	3,1	-
P23	Sec. Traqueal	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV	-		Moderada produtora	50	50	1,5	-
P25	Sangue	CAZ, GEN, CPM, MPM, CIP, PIT	LEV, ATM, IMP		Fraca produtora	50	50	3,1	-
P26	Sangue	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV	-	-	Fraca produtora	25	50	3,1	-
P27	Urina	GEN	-	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, CAZ, ATM, LEV	Moderada produtora	50	50	3,1	-
P28	Sangue	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV	-	-	Moderada produtora	50	50	3,1	-
P29	Ponta de catéter	MPM, CPM, ATM, CIP, LEV, IMP	GEN, PIT	CAZ	Moderada produtora	25	25	3,1	-
P31	Fragmento de lesão venosa em MIP	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV			Fraca produtora	25	25	3,1	-
P32	Sec. Traqueal	GEN		MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, CAZ, ATM, LEV	Fraca produtora	25	50	3,1	-
P33	Fragmento de perna esquerda	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV	-		Moderada produtora	25	50	3,1	-
P34	Swab de olho	CPM, IMP, MPM, ATM	CAZ	GEN, LEV, CIP, PIT	Fraca produtora	25	25	3,1	-
P36	Sangue	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV			Fraca produtora	25	25	3,1	-
P37	Sangue			MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV	Fraca produtora	25	25	3,1	-
P38	Sangue	GEN	CAZ	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, ATM, LEV	Moderada produtora	50	50	3,1	-

P39	Urina	CPM	-	MPM, CIP, PIT, IMP, GEN, CAZ, ATM, LEV	Fraca produtora	50	50	3,1	-
P40	Urina	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV	-	-	Fraca produtora	50	50	3,1	-
P41	Urina		GEN	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, CAZ, ATM, LEV	Fraca produtora	25	25	3,1	-
P42	Urina	GEN	CAZ, PIT	IMP, ATM, CIP, LEV, MPM, CPM	Moderada produtora	25	25	3,1	-
P44	Urina	-	-	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV	Fraca produtora	50	50	3,1	-
P45	Urina	-	-	MPM, CIP, PIT, IMP, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV	Forte produtora	25	25	3,1	-
P46	Sangue	MPM, CIP, PIT, CPM, GEN, CAZ, ATM, LEV	-	IMP	Moderada produtora	25	50	3,1	-
P47	Sec. de abscesso	CPM, CIP, LEV, GEN, PIT, CAZ	ATM	CAZ, IMP, MPM	Forte produtora	25	25	3,1	-
P48	Sec. Traqueal	CPM, CIP, GEN, PIT, CAZ	ATM	MPM, IMP, LEV	Fraca produtora	50	50	3,1	-

6.6. Ação do extrato sobre o biofilme em formação

A atividade antibiofilme do extrato vegetal da *Lippia grata* foi avaliada nos 25 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* que apresentaram forte ou moderada produção de Biofilme. Foi constatado que o extrato de *Lippia grata* nas concentrações de 50 mg/mL e 40 mg/mL, apresentou ação efetiva sobre o biofilme em formação, produzido pela *P. aeruginosa*, reduzindo de maneira significativa a capacidade de produção de biofilme por essa espécie bacteriana, conforme demonstrado pela diminuição da medida da densidade óptica após o tratamento, sendo estes isolados classificados novamente em fraco e não produtores de biofilme. A concentração de 50 mg/mL apresentou o melhor desempenho, onde 23 isolados (92%) foram classificados como não produtores de biofilme e 2 (8%) como fracos produtores de biofilme. A figura 16 mostra a reclassificação dos isolados após a tratamento da cultura com diferentes concentrações do extrato e óleo essencial da *L. grata*.

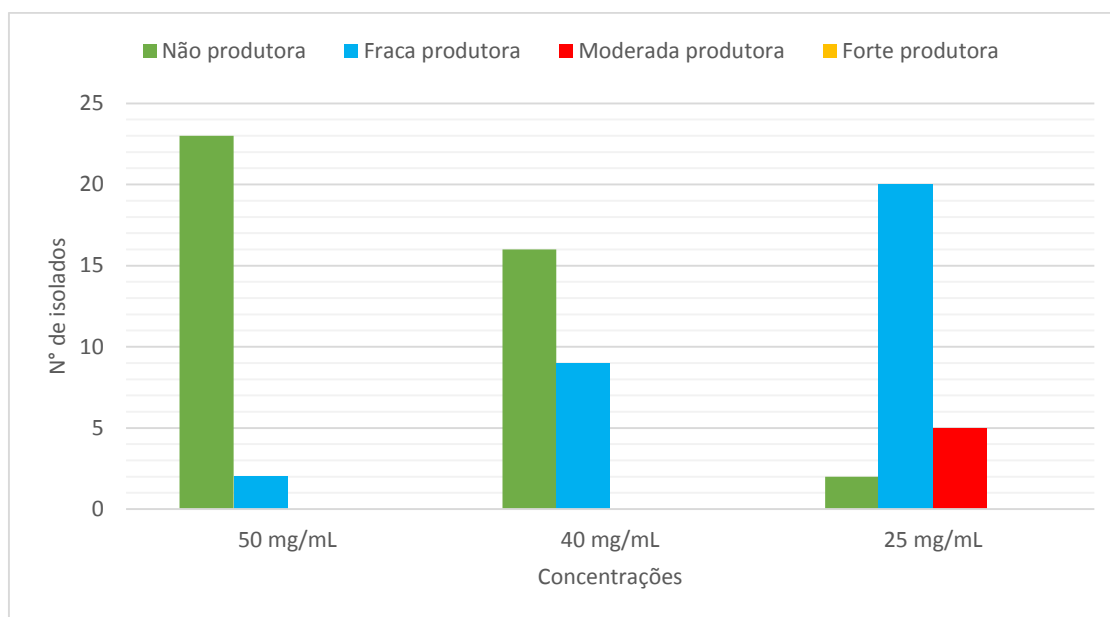


Figura 15. Produção de biofilme pelos isolados após a interação com o extrato em diferentes concentrações.

6.7. Ação do extrato sobre o biofilme consolidado

O extrato de *Lippia grata* também apresentou ação sobre o biofilme consolidado nas três concentrações testadas ao se aplicar o teste dos sinais, havendo diferença significativa entre as densidades ópticas no tempo 0 e após 24 horas. Os resultados podem ser verificados na Tabela 4.

Tabela 5. Análise estatística da interação do extrato com o biofilme consolidado através do teste dos sinais.

Concentração	Media (0h)	Media (24h)	Desvio padrão (0h)	Desvio padrão (24h)	p-valor
25 mg/mL	0,4859	0,5731	0,0502	0,0292	< 0,01
40 mg/mL	0,6588	0,7806	0,0300	0,0415	< 0,01
50 mg/mL	0,8036	0,9875	0,0240	0,0602	< 0,01

7. DISCUSSÃO

A análise por CG/EM do óleo essencial da *L. grata* permitiu a identificação de 10 compostos diferentes, conforme mostrado na Tabela 2. Os principais componentes do óleo essencial foram o carvacrol (51,4%), seguido por timol (15,6%), p-cimeno (12,2%) e γ -terpineno (7,4%). Outros constituintes como mirceno, δ -2-Careno, Ipsdienol, Terpinen-4-ol, (E)-Cariofileno e Óxido de cariofileno foram encontrados em menores proporções.

O óleo essencial de *L. grata* também tem sido investigado em outros estados do Brasil, como Sergipe, Ceará e Pará. Em Sergipe, o óleo essencial foi caracterizado por carvacrol (44,43%), o-cimeno (9,42%), γ -terpineno (9,16%) e β -cariofileno (8,83%) (GUILHON et al., 2011), no Ceará foi encontrado timol (21,30%), carvacrol (20,85%), α -pineno (19,42%) e p-cimeno (8,58%) (BITU et al., 2012), no Pará os constituintes principais foram timol (73,5%), p-cimeno (9,2%) e timol metil éter (FRANCO et al., 2014). É importante ressaltar que esses constituintes majoritários podem sofrer alterações dependendo da parte utilizada para a extração, do processo de extração e coleta, do ambiente e solo diferenciados, além de outros fatores envolvidos (JANNUZZI et al. 2011; BITU et al. 2012).

O timol e o carvacrol são os monoterpenos mais predominantes em óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia*, possuindo atividade antioxidantes, anti-inflamatória, anestésica, cicatrizante, antisséptica e principalmente antimicrobiana (ZAMORA; TORRES; NUÑEZ, 2018). Para investigar o mecanismo antibacteriano do carvacrol e do timol, Xu e colaboradores (2008) empregaram corantes fluorescentes e citometria de fluxo com o objetivo de explorar o efeito desses componentes na permeabilidade da membrana de cepas de *Escherichia coli*. Os efeitos antibacterianos desses constituintes foram atribuídos à sua capacidade de permeabilizar e despolarizar a membrana citoplasmática. Estes efeitos representam de certa forma uma extensão do próprio papel que desempenham nas plantas, defendendo-as de microorganismos fitopatogênicos (ALBUQUERQUE et al., 2006).

A atividade antibacteriana apresentada pelos óleos essenciais pode ter relação com apenas um dos seus constituintes majoritários ou com a interação entre eles. Michiels e colaboradores (2007) utilizaram a combinação de carvacrol e timol em simulações de fermentação *in vitro* no tubo digestivo de suínos. Os

resultados demonstraram que a combinação carvacrol mais timol possui um efeito antibacteriano maior que a soma dos efeitos de cada agente separado contra *E. coli* e *Lactobacillus* spp. Embora seja relatado na maioria dos estudos que a associação entre timol e carvacrol apresenta efeito sinérgico sobre diferentes organismos, cabe ressaltar que nem sempre esse efeito é verificado, como foi apontado por Koul e colaboradores (2013), que em seus estudos constataram que o carvacrol apresentou efeito antagônico quando combinado a outras substâncias testadas (linalol, 1,8-cineol, trans-anetol e timol).

No presente estudo, a maior parte das cepas foi isolada de secreção traqueal, urina, sangue e ponta de cateter, como pode ser verificado na Tabelas 3 e 4. De um modo geral, essas são as fontes de isolamento mais frequente e diversos estudos apresentam resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Pires e colaboradores (2009), analisaram 182 isolados de *P. aeruginosa*, a partir de dados microbiológicos obtidos do livro de registros de Secreções Diversas do Laboratório de Bacteriologia do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco. Dos 182 isolados, 34% foram provenientes de secreções traqueais. Similarmente, um outro estudo realizado em unidades de terapia intensiva entre os anos de 2007 a 2010, mostrou que a maior parte dos isolados de *P. aeruginosa* foi proveniente de amostras de corrente sanguínea, seguida por secreções do trato respiratório e trato urinário, corroborando com os dados encontrados no presente estudo (NÓBREGA; FILHO; PEREIRA, 2013). Esse mesmo padrão de amostras bacterianas também foi observado em estudos realizados na China (XU et al., 2013), Sérvia (DJORDJEVIC; FOLIC; JANKOVIC, 2017) e EUA (SADER et al., 2018).

O trato respiratório e a corrente sanguínea foram os principais sítios de isolamento para *P. aeruginosa* no presente trabalho. As infecções nestes sítios possuem uma grande importância clínica, devido à alta taxa de morbidade e mortalidade. A afinidade desta espécie por estes sítios, provavelmente está relacionando ao uso de procedimentos invasivos, como cateteres, sondas, intubação traqueal (SILVA et al., 2013; CRESPO; FERNÁNDEZ, 2014). A superfície do trato respiratório é revestida por uma malha de muco rica em fibronectina, para colonizá-la a *P. aeruginosa* libera proteases que clivam essa estrutura expondo os receptores onde as fímbrias podem se ligar. O uso constante de ventilação mecânica, com frequente aspiração, diminui os

movimentos ciliares da árvore brônquica, o que facilita o processo de colonização por micro-organismos oportunistas (PIRES, et al., 2009; NÓBREGA; FILHO; PEREIRA, 2013).

A maior parte dos casos de infecção do trato urinário no ambiente hospitalar é resultante da utilização de cateterismo vesical, representando cerca de 80% dos casos. Um fato agravante com relação ao uso de sonda vesical é o tempo de permanência da mesma no paciente, já que 10% dos pacientes permanecem com a sonda por pelo menos 4 dias (COSTA et al., 2014). A Sondagem urinária por período superior a sete dias é associada ao desenvolvimento de infecções do trato urinário em até 25% dos doentes, com risco diário de 5% (RORIZ-FILHO et al., 2010). No ambiente hospitalar, as fontes de maior contaminação de *P. aeruginosa* são os aparelhos de respiração, sistemas de hemodiálise, cateteres, pias e artefatos de limpeza (ROCHA et al., 2015), assim, diminuir o tempo de utilização de cateteres vesicais e ventilação mecânica pode provavelmente diminuir o risco de infecção urinária e de pneumonia, respectivamente (GUIMARÃES et al., 2011).

A frequência elevada da *P. aeruginosa* em infecções hospitalares ocorre devido a sua capacidade de sobreviver por longos períodos em superfícies, necessidades nutricionais mínimas, grande tolerância às variações ambientais e capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos utilizados na terapêutica (BLOT et al., 2002). Além de um amplo arsenal de resistência, intrínseca e adquirida, esta espécie ainda apresenta diversos mecanismos de virulência, onde uma vez estabelecida a sua entrada no hospedeiro, sua eliminação se torna muito mais difícil (HONG et al., 2015).

Vários estudos vêm demonstrando um aumento no padrão de resistência da *P. aeruginosa* a várias classes de antibióticos (XU et al., 2013; YAYAN; GHEBREMEDHIN; RASCHE, 2015; ACAR et al., 2019). Estudos realizados pelo programa SENTRY entre os anos de 1997 a 2016, apontaram uma maior taxa de resistência aos antimicrobianos na América latina quando comparadas a outros países do mundo. No período entre 2013 e 2016, os percentuais de resistência em *P. aeruginosa* foi de 34,6% para Cefepime, 36% para ceftazidima, 40.3% para ciprofloxacino, 37.3% para meropenem e 41.3% para PIT (SHORTRIDGE et al., 2019). No Brasil, um estudo envolvendo amostras da corrente sanguínea de 16 hospitais, coletadas entre junho de 2007 e março de

2010, constatou taxas elevadas de resistência para gentamicina (45,7%), ciprofloxacina (45,6%), cefepime (42,9%), imipenem (36,8%), ceftazidima (36,6%), meropenem (35,8%) e PIT (33,9%) (MARRA et al., 2011). De um modo geral, estes trabalhos constataram um padrão de resistência mais elevado do que o observado no presente estudo, como pode ser observado na Figura 8 e Tabela 4. Essa diminuição do padrão de resistência pode estar relacionada com a origem dos isolados de *P. aeruginosa*, já que alguns destes isolados foram provenientes de amostras de pacientes ambulatoriais, onde a pressão seletiva dos antimicrobianos não é tão intensa quanto nas UTIs, por exemplo, levando a um aumento na susceptibilidade aos antimicrobianos (ZIMERMAN, 2012).

De acordo com Gales e colaboradores (2012), a maior frequência de infecções por *P. aeruginosa* na América Latina, pode estar relacionada a localização geográfica, já que a mesma se encontra em uma zona tropical com clima quente e úmido, o que favorece o desenvolvimento deste patógeno. Outra explicação seria a maior prevalência de espécie com resistência intrínseca a vários antibióticos, levando a utilização de antimicrobianos de amplo espectro, resultando em uma maior pressão seletiva e conseqüentemente ao surgimento de cepas mais resistentes.

No presente estudo, os carbapenêmicos imipenem e meropenem apresentaram um dos maiores percentuais de resistência (41% e 36,4% respectivamente). A resistência aos carbapenêmicos, que é frequentemente acompanhada de resistência a múltiplos outros agentes, aumentou em todas as partes do mundo (XU et al., 2013). O aumento crescente da resistência da *P. aeruginosa* aos carbapenêmicos é um dado preocupante, já que se trata de um patógeno oportunista, envolvido em um amplo espectro de infecções, como pneumonias, septicemias, infecções urinárias e meningites, principalmente em pacientes imunocomprometidos. A consequência dessa elevada taxa de resistência juntamente com a escassez de novas opções terapêuticas é a limitação do tratamento ao uso de antimicrobianos mais potentes, como as polimixinas, que estavam em desuso desde a década de 70, devido à neurotoxicidade e nefrotoxicidade relacionadas ao seu uso (LI et al., 2006^a; VARDAKAS; FALAGAS, 2017).

Produtos naturais, como compostos puros ou extratos padronizados de plantas, fornecem oportunidades como novos fármacos devido à sua diversidade

química (TOFIÑO-RIVERA et al, 2016). No presente estudo o extrato vegetal e o óleo essencial da *L. grata* apresentaram atividade antibacteriana frente a todos os isolados testados.

Existem muitos relatos na literatura sobre os efeitos antimicrobianos de óleos essenciais de espécies do gênero *Lippia*. Um estudo realizado por Queiroz e colaboradores (2014) evidenciou a atividade antimicrobiana de *Lippia origanoides* sobre cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de alimentos. Outros estudos também demonstram atividade antimicrobiana da *L. origanoides* frente a cepas de *Aspergillus fumigatus* (BETANCUR-GALVIS et al., 2011), *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., (BETANCOURT et al., 2012) e enterobactérias isoladas de aves (SOUZA et al., 2015).

Um estudo realizado por Majolo e colaboradores (2016) avaliou a composição química de óleos essenciais extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* e *Lippia sidoides* e sua atividade contra *Aeromonas hydrophila*. As três espécies de *Lippia* apresentaram ação bacteriostática e bactericida contra *A. hydrophila*, com CIMs e CBMs variando de 1,25 a 5 mg/mL. Das espécies testadas, o melhor desempenho foi obtido com o óleo essencial de *L. sidoides*. O timol e o carvacrol são compostos encontrados nos óleos essenciais de plantas bioativas, como *L. origanoides* e *L. sidoides*. Estes terpenos fenólicos exibem forte atividade antimicrobiana capaz de romper a membrana externa de bactérias Gram negativas, liberando lipossacarídeos (LPS) e aumentando sua permeabilidade ao ATP (HELANDER et al, 1998).

Santos e colaboradores (2016) também estudaram a atividade antimicrobiana da *Lippia alba* em cepas de *Candida* sp., *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*. Os resultados mostraram que as cepas de leveduras foram consideravelmente mais sensíveis ao óleo essencial da *L. alba* que as cepas bacterianas. Na concentração de 4 mg/mL apenas *E. coli* apresentou uma inibição do crescimento acima de 80%; todas as outras cepas apresentaram uma CIM de 4,0 mg / mL com inibições de crescimento abaixo de 70%. Por outro lado, todas as linhagens de levedura testadas foram sensíveis ao óleo essencial de *L. alba*. e os CIMs calculados para eles eram duas a quatro vezes menores que os encontrados para as cepas bacterianas.

Diversos estudos relatam as atividades antimicrobiana e antifúngica do óleo essencial da *L. alba* extraído de dois quimiotipos. O quimiotipo carvona tem sido relatado como ativo contra vários micro-organismos, principalmente contra cepas Gram positivas de isolados clínicos humanos. Por outro lado, o quimiotipo linalol foi comprovado com sucesso contra *Candida albicans* (JARAMILLO-COLORADO et al., 2012).

A atividade antimicrobiana da *L. grata*, avaliada nesse estudo, vem sendo apontada por diversos trabalhos. Fernandes e colaboradores (2015) avaliaram o potencial antifúngico dos extratos vegetais e óleo essencial da *Lippia grata* sobre o fungo *Monosporascus cannonballus*. Tanto o óleo essencial como o extrato vegetal inibiram 100% do crescimento micelial do fungo. Porém, o óleo essencial foi mais eficiente quando comparado aos extratos, já que doses consideravelmente mais baixas do óleo inibiram 100% do crescimento fúngico.

Caffaro e colaboradores (2014) avaliaram a atividade biológica do extrato etanólico da *Lippia grata* frente a cepas bacterianas padronizadas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e cepa fúngica de *Candida albicans*. No ensaio da microdiluição em caldo com as cepas Gram positivas, todos os valores de concentração inibitória mínima dos extratos ficaram abaixo de 0,5 mg/mL. Já com as cepas Gram negativas os valores da CIM foram iguais ou acima de 1,0 mg/mL. No método de difusão em meio sólido, a *P. aeruginosa* apresentou resistência ao extrato da *L. grata*.

No presente estudo, o óleo essencial da *L. grata* desenvolveu uma ação antibacteriana mais acentuada que o extrato vegetal, uma vez que para todas as cepas os valores da CIM do óleo foram inferiores aos apresentados pelo extrato, como pode ser observado nas Figuras 12 e 13 e Tabela 4. Uma possível explicação para essas diferenças observadas entre o óleo e o extrato seria o caráter hidrofóbico das moléculas presentes na estrutura das paredes celulares bacterianas. Os terpenóides, presentes nos óleos essenciais dessa espécie, como o timol e o carvacrol apresentam natureza lipídica, característica semelhante as do lipopolissacarídeos presentes na superfície desses patógenos, havendo assim forte interação destes com a membrana plasmática da célula, resultando na formação de canais, através dos quais há extravasamento de conteúdo e conseqüente desorganização celular (BERTINI

et al., 2005; FERNANDES et al., 2015), A ação antimicrobiana dos óleos essenciais também pode estar relacionada à inativação de algumas enzimas, incluindo aquelas envolvidas na produção de energia e síntese de componentes estruturais (LAMBERT et al. 2001; ZAMORA; TORRES; NUÑEZ, 2018).

Apesar do óleo essencial da *L. grata* ter apresentado uma ação bacteriostática melhor que a do extrato, o mesmo não apresentou ação bactericida em nenhuma das concentrações testadas. A presença da ação bactericida apenas no extrato pode estar relacionada à diferença dos constituintes dos óleos e extratos. Estas diferenças nos constituintes podem ser atribuídas à origem da planta, época de colheita, fatores como calor, luminosidade, constituição do solo e umidade e métodos de extração (Lapa et al., 1999). Pouco se sabe sobre a ação dos extratos hidroalcoólicos da *L. grata*, visto que a maior parte dos estudos encontrados na literatura foram realizados com o óleo essencial da planta. De acordo com Matos (2009), deve-se procurar na composição fitoquímica do extrato hidroalcoólico a presença de alcaloides, cumarinas, flavonoides, metilxantinas, quinonas, saponinas e taninos. A presença destes componentes no extrato da *L. grata* pode estar relacionada com a elevada atividade bactericida do extrato encontrada no presente estudo.

Vários estudos demonstram o potencial antimicrobiano de outras espécies vegetais frente a cepas de *P. aeruginosa*. Tian e colaboradores (2019) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Zingiber striolatum* sobre algumas espécies bacterianas, entre elas a *P. aeruginosa*. O óleo essencial dessa espécie apresentou significativa inibição bacteriana contra a *P. aeruginosa* com valor de CIM igual a 3,12 mg/mL, resultado semelhante ao encontrado no presente estudo. Aelenei e colaboradores (2019) encontraram CIM de 5,44 µg/mL para o óleo essencial do coentro (*Coriandrum sativum*) em uma cepa padrão de *P. aeruginosa*. Outro estudo avaliou a atividade antibacteriana dos óleos essenciais do cominho (*Cuminum cyminum*), orégano (*Origanum compactum*) e pau-rosa (*Aniba rosaeodora*) frente a um isolado clínico de *P. aeruginosa*, os resultados das CIMs foram 18,60 mg/mL, 9,20 mg/mL e 35,20 mg/mL, respectivamente (OWEN; WHITE; LAIRD, 2018). Yang e colaboradores (2018) encontrou valores de CIM de 10 mg/mL para *P. aeruginosa* utilizando óleo essencial de *Camellia nitidissima*.

As discrepâncias entre os valores encontrados no presente estudo e outros relatos sobre os valores da CIM podem ser atribuídas aos diferentes perfis químicos dos óleos essenciais, diferentes protocolos experimentais e diferentes cepas utilizadas em estudo. No presente estudo foi observado que a *P. aeruginosa* apresentou valores de CIM mais elevados quando comparada a outras espécies bacterianas avaliadas para a mesma espécie vegetal. Deans e colaboradores (1995) observaram que alguns óleos essenciais parecem ser mais específicos em sua atividade antimicrobiana, exercendo maior atividade inibitória contra bactérias Gram positivas, provavelmente devido à menor complexidade da parede celular destes micro-organismos quando comparados aos Gram negativos. Além disso envoltório extracelular composto por alginato contido no biofilme formado por *P. aeruginosa* provavelmente também dificulta a ação direta dos componentes antibacterianos dos extratos e óleos essenciais na bactéria (CHIANG; BURROWS, 2003; ZAMORA; TORRES; NUÑEZ, 2018).

Este biofilme fornece proteção às células bacterianas, aumentando suas chances de sobrevivência em condições desfavoráveis. As bactérias protegidas pelo biofilme podem se multiplicar rapidamente e dispersar. Após adesão e crescimento dos micro-organismos infecciosos em tecidos, órgãos ou dispositivos invasivos, a camada de biofilme protege a colônia bacteriana contra o sistema de defesa do hospedeiro e contra antibióticos (ANWAR et al., 1992). O gênero *Pseudomonas* possui grande capacidade de formação de biofilmes, aumentando a sua permanência em superfície e tecidos vivos e dificultando a ação de antimicrobianos no tratamento de infecções causadas por este agente. Atualmente, poucas terapias com alvo em biofilmes microbianos encontram-se disponível no mercado. Assim, a melhor estratégia contra os biofilmes microbianos é evitar a sua formação ao invés de tentar eliminá-los após a sua formação (SCHILLACI et al., 2013).

No presente estudo, 97,7% dos isolados de *P. aeruginosa* avaliados foram produtores de biofilme. Conforme mostrado nos resultados (Tabela 4), dos 44 isolados de *P. aeruginosa*, 40,9% foram classificados como fracos produtores de biofilme, 40,9% como moderados produtores, 15,9% como fortes produtores e 2,2% não produziu biofilme. Esses resultados corroboram com os de Robinson e colaboradores (2019), que ao avaliar a produção de biofilme em 100 isolados de *P. aeruginosa* oriundas de otite canina constataram que 68% dos isolados

foram classificados como fortes produtores de biofilme, 20% como moderados produtores, 8% como fraco produtores e 4% como não produtores, demonstrando uma maior produção de biofilme quando comparado ao presente estudo. Em contrapartida, um estudo realizado com isolados de *P. aeruginosa* provenientes de amostras de escarro de pacientes internados, constatou que dos 74 isolados analisados, 64,8% foram classificados como fraco produtores de biofilme, 2,7% como moderados produtores e 32,4% como não produtores (PEREZ et al., 2011). Nenhum isolado foi classificado como forte produtor de biofilme, contrastando com os resultados do presente estudo.

A formação do biofilme e a adesão bacteriana dependem não só da fisiologia do micro-organismo, expressão de fatores de virulência e estado fisiológico das células bacterianas no momento da análise, mas também das características físico-químicas, a área e o material da superfície (MACEDO, 2006). De acordo com STEPANOVIĆ e colaboradores (2007), a composição do meio de cultura é provavelmente o fator mais importante que influencia a capacidade das bactérias em produzir biofilme em condições *in vitro*. Os ensaios de avaliação da produção de biofilme foram realizados em meio de cultura caldo TSB suplementado com glicose 1% (p/v), pois a glicose favorece a formação de biofilme. Este meio de cultura possui poucos nutrientes, podendo gerar um ambiente hostil para a sobrevivência destas bactérias, estimulando a produção de biofilme (BOLES; HORSWILL, 2011)

Para o estudo da ação da *L. grata* sobre os biofilmes em formação e consolidados foi utilizado apenas o extrato vegetal, já que óleo essencial não apresentou atividade bactericida frente aos isolados de *P. aeruginosa* em nenhuma concentração testada. O extrato de *L. grata* apresentou ação sobre o biofilme em formação nos 25 isolados de *P. aeruginosa*, sendo a concentração de 50 mg/mL a que demonstrou o melhor desempenho (Figura 15). O extrato da *L. grata* também apresentou ação sobre o biofilme consolidado nas três concentrações avaliadas (Tabela 4).

Outros estudos também evidenciam a propriedade antibiofilme de espécies do gênero *Lippia*. Tofiño-Rivera e colaboradores (2016) procuraram avaliar a capacidade de erradicação de biofilmes do óleo essencial da *L. alba* frente a *Streptococcus mutans*. Os óleos essenciais de *L. alba* apresentaram atividade de erradicação de biofilmes de *S. mutans* de 95,8% na concentração

de 0,01 mg / dL. Souza e colaboradores (2017) também avaliaram o potencial antibiofilme da *L. alba*, porém contra cepas de *Aeromonas* spp. O óleo essencial da *L. alba* interferiu na formação do biofilme, entretanto não foi eficiente para o biofilme consolidado. Similarmente, Albuquerque e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antiaderente da folha da *Lippia sidoides* Cham. que demonstrou efeito antiederente, sobre os principais micro-organismos responsáveis pela consolidação do biofilme dental.

Vários trabalhos evidenciam também o potencial de diversos vegetais frente a biofilmes em formação de *P. aeruginosa*. Kazemian e colaboradores (2015) avaliaram o efeito da camomila (*Chamaemelum nobile*) contra a formação de biofilme em amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com diferentes tipos de infecção. As concentrações efetivas contra a formação de biofilme variaram de 6,25 a 25 mg/mL. Al-Dhabi e colaboradores (2012) estudando o extrato clorofórmico de *Couroupita guianensis* encontraram atividade antibiofilme efetiva contra *P. aeruginosa* a partir de 2 mg/mL, com 52% de inibição da formação de biofilme. Kauffmann e colaboradores (2017) avaliaram o potencial antimicrobiano de espécies do gênero *Eugenia*, contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo observado que a grande maioria dos extratos não afetou a formação do biofilme nos ensaios com *P. aeruginosa*, contrastando com os resultados obtidos nos ensaios com *S. aureus*.

No presente estudo foram necessárias concentrações elevadas do extrato da *L. grata* para inibir a formação do biofilme de *P. aeruginosa*, enquanto outras espécies bacterianas necessitam de concentrações muito menores do mesmo extrato para inibir a formação do biofilme. Acredita-se que o alginato seja o componente responsável pela resistência aos antimicrobianos observada em biofilmes, principalmente de *P. aeruginosa*. Isso ocorre porque, ao ser carregado negativamente, o alginato acaba sequestrando ou neutralizando o efeito de antimicrobianos carregados positivamente. Por outro lado, antimicrobianos destituídos de carga elétrica, como o ciprofloxacino, não sofrem os efeitos neutralizantes do alginato, apresentando menor resistência clínica quando comparado à gentamicina, por exemplo (AITKEN et al., 2011). Cotton e colaboradores (2009) demonstraram que administração da enzima alginato ligase (AlgL) em biofilmes de *P. aeruginosa* resultou na redução da sobrevivência de células bacterianas quando expostas à gentamicina, estabelecendo, deste

modo, uma importante relação entre o alginato com o perfil de resistência ao antimicrobiano.

Os resultados dos experimentos tanto do biofilme consolidado quanto o do biofilme em formação confirmam a possibilidade de utilizar produtos naturais para combater patógenos de importância clínica em nível celular e em biofilme. Neste contexto, o presente trabalho pode direcionar o desenvolvimento de novas drogas, devido à atividade antibiofilme do extrato vegetal da *L. grata*.

8. CONCLUSÃO

O extrato e óleo essencial da *L. grata* apresentaram atividade antimicrobiana frente os isolados de *Pseudomonas aeruginosa*. O óleo essencial apresentou uma atividade bacteriostática mais eficiente que o extrato, porém não apresentou atividade bactericida em nenhuma concentração testada.

Com relação a ação bactericida do extrato, a CMB exibiu valor próximo a sua CIM, ocorrendo equivalência entre estas em alguns casos, confirmando a eficaz atividade bactericida da *L. grata*.

Com relação a interação entre o extrato e biofilme da *P. aeruginosa*, os resultados apresentados são bastante promissores, uma vez que o extrato demonstrou atividade frente ao biofilme em formação e ao consolidado;

O extrato da *L. grata* pode ter importantes aplicações para implementação de estratégias como agentes de suporte aos antimicrobianos e ação antibiofilme, sendo alternativas promissoras para combater micro-organismos patogênicos, particularmente *Pseudomonas aeruginosa*.

Os resultados obtidos neste trabalho apontam o potencial antimicrobiano da *L. grata*, porém são necessários outros estudos para a verificação da toxicidade de compostos ativos responsáveis pela atividade antimicrobiana da planta.

9. REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, Marwan et al. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Archives of microbiology**, v. 196, n. 7, p. 453-472, 2014.
- ACAR, Ali et al. Pooled prevalence and trends of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates over the past 10-years in Turkey: A meta-analysis. **Journal of global antimicrobial resistance**, 2019.
- AELENEI, P. et al. Coriander essential oil and linalool–interactions with antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Letters in applied microbiology**, v. 68, n. 2, p. 156-164, 2019.
- AITKEN, Emily et al. Different compositions of biofilm extracellular polymeric substance reveals contrasting antibiotic resistance profiles in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Exp. Microbiol. Immunol**, v. 15, p. 79-83, 2011.
- ALBUQUERQUE, C. C. DE et al. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 4, p. 527–535, jul. 2006.
- ALBUQUERQUE, A. C. L. et al. The anti-adherence effect of *Lippia sidoides* Cham: extract against microorganisms of dental biofilm. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 41-46, 2013.
- AL-DHABI, Naif Abdullah et al. Antimicrobial, antimycobacterial and antibiofilm properties of *Couroupita guianensis* Aubl. fruit extract. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, n. 1, p. 242, 2012.
- ALHAZMI, Alaa. *Pseudomonas aeruginosa*-Pathogenesis and Pathogenic mechanisms. **International Journal of Biology**, v. 7, n. 2, p. 44, 2015.
- ANWAR, H.; COSTERTON, J. W. Effective use of antibiotics in the treatment of biofilm-associated infections. **ASM American Society for Microbiology News**, v. 58, n. 12, p. 665-668, 1992.
- ARAÚJO, G. M. **Avaliação da atividade anti-*Helicobacter pylori* e citotóxica in vitro de extratos orgânicos obtidos das folhas de *Encholirium spectabile* e *Syzygium cumini***. Mestr em Ciências Biológicas—Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, mar. 2014.
- BATISTA, Nádia Nara et al. Formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* sobre aço inoxidável em contato com leite e seu controle por óleos essenciais. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 25, n. 1, p. 19-24, 2015.
- BERTINI, Luciana Medeiros et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v. 17, n. 3-4, p. 80-83, 2005.

BETANCOURT, Liliana et al. Efecto de diferentes niveles de aceites esenciales de *Lippia origanoides* kunth en pollos de engorde. **Revista MVZ Córdoba**, v. 17, n. 2, p. 3033-3040, 2012.

BETANCUR-GALVIS, Liliana et al. Antifungal, cytotoxic and chemical analyses of essential oils of *Lippia origanoides* HBK grown in Colombia. **Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud**, v. 43, n. 2, p. 141-148, 2011.

BITU, Vanessa et al. Phytochemical screening and antimicrobial activity phytochemical of essential oil from *Lippia gracillis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 69-75, 2012.

BITU, V. DE C. N. et al. Chemical composition of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer leaves and its potential as modulator of bacterial resistance. **Natural Product Research**, v. 28, n. 6, p. 399–402, 19 mar. 2014.

BLOT, S. et al. Nosocomial Bacteremia Caused by Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacteria in Critically Ill Patients: Clinical Outcome and Length of Hospitalization. *Clinical Infectious Diseases*, [s.l.], v. 34, n. 12, p.1600-1606, 15 jun. 2002. Oxford University Press (OUP).

BOGINO, P. C. The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 15838–5859, 2013.

BRANDÃO, C. S. C. **Aplicação de testes fenotípicos para detecção de AmpC**. 2013. 118 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Aveiro, Aveiro, 2013.

BRASIL. Decreto nº 50.040. Dispõe sobre as Normas Técnicas Especiais Reguladoras do emprego de aditivos químicos a alimentos. . 24 jan. 1961.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BREX, Michel; THEILADE, Jørgen; ATTSTRÖM, Rolf. An ultrastructural quantitative study of the significance of microbial multiplication during early dental plaque growth. **Journal of periodontal research**, v. 18, n. 2, p. 177-186, 1983.

BOLES, Blaise R.; HORSWILL, Alexander R. Staphylococcal biofilm disassembly. **Trends in microbiology**, v. 19, n. 9, p. 449-455, 2011.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CADY, Nathaniel C. et al. Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and infection in *Pseudomonas aeruginosa* by natural products-inspired organosulfur compounds. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38492, 2012.

CAFFARO, Kátia Mayumi Takarabe et al. Avaliação biológica in vitro de espécies vegetais da Caatinga: *Bauhinia cheilantha* e *Lippia gracilis*. 2014.

CAIXETA, Danila Soares. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**. 2008. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciênc. Cult**, v. 55, n. 3, São Paulo, 2003.

CAPELLETTI, Raquel Vannucci. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais**. 2006. 81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

CAROLINE, DA S. F. et al. Composition and antioxidant and antifungal activities of the essential oil from *Lippia gracilis* Schauer. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 30, p. 3107–3113, 23 jul. 2014.

CHATTERJEE, Maitrayee et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, n. 1, p. 48-58, 2016.

CHEN, Hongwei et al. Inhibition and eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by host defence peptides. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 10446, 2018.

CHIANG, Poney; BURROWS, Lori L. Biofilm formation by hyperpilated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 7, p. 2374-2378, 2003.

CHRISTENSEN, Louise D. et al. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing on biofilm persistence in an in vivo intraperitoneal foreign-body infection model. **Microbiology**, v. 153, n. 7, p. 2312-2320, 2007.

CORDEIRO, J. C. P. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e formação de biofilme pelos isolados de *Salmonella* spp. Provenientes de caprinos e ovinos do Vale do São Francisco. 2014. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2014.

CORTINHAS, Cristina S. et al. Minimum inhibitory concentrations of cephalosporin compounds and their active metabolites for selected mastitis pathogens. **American Journal Of Veterinary Research**, [s.l.], v. 74, n. 5, p.683-690, maio 2013. American Veterinary Medical Association (AVMA).

COSTA, F. M. et al. Infecção hospitalar: distribuição topográfica e microbiológica em um hospital público de ensino. **J Health Sci Inst**, v. 32, n. 3, p. 265-70, 2014.

COTTON, Laura A.; GRAHAM, Rebecca J.; LEE, Rose J. The role of alginate in *P. aeruginosa* PAO1 biofilm structural resistance to gentamicin and ciprofloxacin. **J. Exp. Microbiol. Immunol**, v. 13, p. 58-62, 2009.

COWAN, Marjorie Murphy. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CRESPO, Jorge Miguel Correia. Nueva formulación de antibióticos nanoencapsulados para la eliminación de biofilmes en clínica. **REDUCA**, v. 6, n. 1, 2014.

DA SILVA, Bruno José Martins et al. Medicinal plants from the Brazilian Amazonian region and their antileishmanial activity: a review. **Journal of integrative medicine**, v. 16, n. 4, p. 211-222, 2018.

DAVIES, J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. **Science**, v. 264, p.375-382, abr. 1994.

DEANS, S. G. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry: impact upon bacteria, fungi and fatty acid levels in ageing mice. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 10, n. 5, p. 323-328, 1995.

DJORDJEVIC, Zorana M.; FOLIC, Marko M.; JANKOVIC, Slobodan M. Previous Antibiotic Exposure and Antimicrobial Resistance Patterns of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients with Nosocomial Infections. **Balkan medical journal**, v. 34, n. 6, p. 527, 2017.

DUARTE, Marta Cristina Teixeira. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, out. 2016.

FERNANDES, L. C. B. et al. Fungitoxicidade dos extratos vegetais e do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer sobre o fungo *Monosporascus cannonballus* Pollack e Uecker. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 2, p. 153-155, jun. 2015.

FERRAZ, R. P. C. et al. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine**, v. 20, n. 7, p. 615-621, maio 2013.

FLICK, M. R.; CLUFF, L. E. *Pseudomonas* bacteremia. *Am J Med*, v. 60, p. 501-508, 1976.

FRANCO, Caroline da S. et al. Composition and antioxidant and antifungal activities of the essential oil from *Lippia gracilis* Schauer. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 30, 2014.

FRANK, Kristi L.; PATEL, Robin. Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaADBC-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. **Infection and immunity**, v. 75, n. 10, p. 4728-4742, 2007.

FURLAN, Marcos Roberto. **Cultivo de plantas medicinais**. SEBRAE-MT, 1998.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, [s.l.], v. 73, n. 4, p.354-360, ago. 2012. Elsevier BV

GALVÃO, Juliana G. et al. Lippia gracilis essential oil in β -cyclodextrin inclusion complexes: an environmentally safe formulation to control Aedes aegypti larvae. **Pest management science**, v. 75, n. 2, p. 452-459, 2019.

GELLATLY, Shaan L.; HANCOCK, Robert E.w.. Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens And Disease**, [s.l.], v. 67, n. 3, p.159-173, 15 mar. 2013. Oxford University Press (OUP).

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, abr. 2007.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero Lippia enfatizando Lippia grata Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.

GOMILA, Margarita et al. Genetic diversity of clinical Pseudomonas aeruginosa isolates in a public hospital in Spain. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 138, 2013.

GONTIJO FILHO, P. P. Problemas da vigilância epidemiológica de infecções hospitalares sem o uso de critérios microbiológicos no Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Uberlândia, v. 27, n. 2, p.97-102, 21 dez. 2006.

GUILHON, Carolina C. et al. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of Lippia gracilis essential oil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 406-413, 2011.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, [s.l.], v. 33, n. 3, p.667-679, 2010. FapUNIFESP (SciELO).

GUIMARÃES, Aline Caixeta et al. Óbitos associados à infecção hospitalar, ocorridos em um hospital geral de Sumaré-SP, Brasil. **Revista Brasileira de Enfermagem**, 2011.

GUNZ, F. W. Reduction of tetrazolium salts by some biological agents. **Nature**, v. 163, n. 4133, p. 98, 1949.

HAHN, Heinz P. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of Pseudomonas aeruginosa – a review. **Gene**, [s.l.], v. 192, n. 1, p.99-108, jun. 1997. Elsevier BV.

HAUSER A, OZER EA. Pseudomonas aeruginosa. **Nature Reviews Microbiology**. 2011; 9 (3)

HELANDER, Ilkka M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, 1998.

HENRIQUES, Ana; VASCONCELOS, Carlos; CERCA, Nuno. A importância dos biofilmes nas infeções nosocomiais: O estado da arte. **Arquivos de Medicina**, v. 27, n. 1, p. 27-36, 2013.

HENTZER, Morten et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5395-5401, 2001.

HODLE, Amanda E.; RICHTER, Kimber P.; THOMPSON, Rosie M. Infection control practices in US burn units. **Journal of burn care & research**, v. 27, n. 2, p. 142-151, 2006.

HØIBY, Niels et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International journal of antimicrobial agents**, v. 35, n. 4, p. 322-332, 2010.

HOLM, BRUCE A. et al. Inhibition of pulmonary surfactant function by phospholipases. **Journal of Applied Physiology**, v. 71, n. 1, p. 317-321, 1991.

HONG, Duck Jin et al. Epidemiology and characteristics of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection & chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 81-97, 2015.

JANNUZZI, H. et al. Avaliação agronômica e química de dezessete acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown] - quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 258–264, 2011.

JARAMILLO-COLORADO, Beatriz et al. Anti-quorum sensing activity of essential oils from Colombian plants. **Natural product research**, v. 26, n. 12, p. 1075-1086, 2012.

JENNY M, KINGSBURY J (2018) Properties and Prevention: A Review of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Biol Med Res**. Vol.2 No.3:18

JORGE, S. S. A. & MORAI, R. G. **Etnobotânica de plantas mediciniais**. In: Coelho, M. F. B.; Costa Junior, P.; Dombroski, J. L. D. (Org.) Diversos olhares em Etnobotânica, Etnoecologia e Plantas Mediciniais. Anais do I Seminário Mato Grossense de Etnobiologia e Etnoecologia e II Seminário Centro-Oeste de Plantas Mediciniais. Cuiabá: UNICEN. p.89-98. 2003.

KAPLAN, J. B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. **Journal of Dental Research**, v. 89, p. 205–218, 2010.

KAUFFMANN, Carla et al. POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME IN VITRO DE ESPÉCIES DO GÊNERO EUGENIA, MYRTACEAE, NATIVAS DO SUL DO BRASIL. **Revista Caderno Pedagógico**, [s.l.], v. 14, n. 2, 5 set. 2018. Editora Univates.

KAZEMIAN, Hossein et al. Antibacterial, anti-swarming and anti-biofilm formation activities of *Chamaemelum nobile* against *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 4, p. 432-436, 2015.

KIPNIS, E.; SAWA, T.; WIENER-KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Medecine et maladies infectieuses**, v. 36, n. 2, p. 78-91, 2006.

KISKA, D. L.; GILLIAN, P. H. ***Pseudomonas***. In: Murray, P. R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 8th **American Society for Microbiology**: Washington O. C. 2003, p 1212.

KLAUSEN, Mikkel et al. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. **Molecular microbiology**, v. 48, n. 6, p. 1511-1524, 2003.

KNOWLES, M. R.; GILLIGAN, P. H.; BOUCHER, R. C. Cystic fibrosis. In: MANDELL, D.; BENETHS, J; DOLIN, R. (eds) **Principles and practice of infectious diseases**. Churchill, 1995.

KONEMAN, et al. **Diagnóstico microbiológico : texto e atlas colorido**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KOUL, Opendar et al. Comparative study on the behavioral response and acute toxicity of some essential oil compounds and their binary mixtures to larvae of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura* and *Chilo partellus*. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 428-436, 2013.

LAILA, Hanan Jumah Eid Ahmah; SANTOS, Roberto Christ Vianna. Aspectos gerais e mecanismos moleculares envolvidos na formação de biofilmes de *pseudomonas aeruginosa*. **Disciplinarum Scientia| Saúde**, v. 17, n. 1, p. 125-144, 2016.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of applied microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LAVERTY, G.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. **Future Microbiology**, v. 8, n. 4 p. 509-524, 2013.

LEE, Keehoon; YOON, Sang Sun. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a programmed bacterial life for fitness. 2017.

LI, J., et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **The Lancet Infectious Diseases**, [s.l.], v. 6, n. 9, p.589-601, set. 2006. Elsevier.

LIMA, Jailton Lobo da Costa et al. Biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and structural changes in LasR protein of isolates non biofilm-producing. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 2, p. 129-136, 2018.

LIVERMORE, D. M. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, n. 4, p. 557-84, Oct 1995. ISSN 0893-8512 (Print).

LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Diseases**, v.34, p. 634-640, 2002.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum. 2002.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA-JUNIOR, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quím. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAGALHÃES, Karla do Nascimento et al. Medicinal plants of the Caatinga, northeastern Brazil: Ethnopharmacopeia (1980–1990) of the late professor Francisco José de Abreu Matos. **Journal of ethnopharmacology**, v. 237, p. 314-353, 2019.

MAIA, Josemir Moura et al. Motivações socioeconômicas para a conservação e exploração sustentável do bioma Caatinga. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 41, 2017.

MAI, G. T. et al. Suppression of lymphocyte and neutrophil functions by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide (alginate): reversal by physicochemical, alginase, and specific monoclonal antibody treatments. **Infection and immunity**, v. 61, n. 2, p. 559-564, 1993.

MACEDO, Jorge Antônio Barros. MILKNET. Biofilmes Bacterianos: Uma Preocupação Para a Indústria de Alimentos. 18 de julho de 2006.

MADIGAN et al., Microbiologia de Brock, 2010 – 12^o ed.

MAHBOUBI, Arash. Evaluation of antibacterial activity of three Iranian medicinal plants. **African Journal Of Microbiology Research**, [s.l.], v. 6, n. 9, p.0-0, 9 mar. 2012. Academic Journals.

MAJOLO, Cláudia et al. Chemical composition of *Lippiaspp.* essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, [s.l.], v. 48, n. 5, p.2380-2387, 16 abr. 2016.

MANNER, Suvi et al. Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation by antibiotics in 96-microtiter well plates and drip flow reactors: critical factors influencing outcomes. **Scientific reports**, v. 7, p. 43854, 2017.

MARRA, Alexandre R. et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1866-1871, 2011.

MARCHESE, A. et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, v. 210, p. 402–414, nov. 2016.

MARCUS, Richard J. et al. Biofilms in nephrology. **Expert opinion on biological therapy**, v. 8, n. 8, p. 1159-1166, 2008.

MARTINS, J. D. L. **Efeito gastroprotetor do óleo essencial da *Lippia gracilis* SCHAUER (Verbanaceae)**. Dissertação de Mestrado (área de concentração Ciências Fisiológicas)—São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, 2017.

MATOS, F. J. Farmácias vivas—sistema de utilização de plantas medicinais para pequenas comunidades. 1998.

MATOS, F. J. DE A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3. ed. Fortaleza: Editora da Universidade Federal do Ceará - UFC, 2009.

MAURICE, Nicholas M.; BEDI, Brahmchetna; SADIKOT, Ruxana T. Pseudomonas aeruginosa biofilms: host response and clinical implications in lung infections. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 58, n. 4, p. 428-439, 2018.

MEDEIROS, Antone A. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. Supplement 1, p. S19-S45, 1997.

MELO, Juliana Oliveira de et al. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 128, n. 1, p.110-115, out. 2013. Elsevier BV.

MENDES, S. S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 391–397, jun. 2010.

MENEZES, M. S. **Caracterização química e efeito do óleo essencial de *Lippia gracilis* e seus constituintes majoritários sobre *Aceria guerreronis* (Acari: Eriophyidae)**. São Cristóvão: Dissertação (Dissertação em agricultura e biodiversidade) – UFS, 2016.

MICHIELS, Joris et al. In vitro dose–response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. **Livestock Science**, v. 109, n. 1-3, p. 157-160, 2007.

MITTERMEIER, Russell A. et al. Wilderness and biodiversity conservation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 18, p. 10309-10313, 2003.

MONROE, Don. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS biology**, v. 5, n. 11, p. e307, 2007.

MORADALI, M. Fata; GHODS, Shirin; REHM, Bernd HA. Pseudomonas aeruginosa lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 39, 2017.

MOREIRA, C. A. Atividade in vitro de agentes antimicrobianos contra biofilmes de *Staphylococcus* spp. de otite canina. 2011. 103f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

MÜH, E. et al. Novel *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing inhibitors identified in an ultra-high-throughput screen. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3674-3679, 2006.

MURRAY, P. R. et al. Manual of clinical microbiology. 7 ed. Washington: ASM Press, 2010.

NADELL, Carey D.; XAVIER, Joao B.; FOSTER, Kevin R. The sociobiology of biofilms. **FEMS microbiology reviews**, v. 33, n. 1, p. 206-224, 2008.

NAVES, P. et al. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. **Journal of applied microbiology**, v. 105, n. 2, p. 585-590, 2008.

NETO, Renato M. et al. The essential oil from *Lippia gracilis* Schauer, Verbenaceae, in diabetic rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 2, p. 261-266, 2010.

NÓBREGA, Marciano de Sousa; CARMO FILHO, José Rodrigues do; PEREIRA, Milca Severino. Evolução da resistência de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* em unidades de terapia intensiva. 2013.

NOMURA, Kazuaki et al. *Pseudomonas aeruginosa* elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. **Respiratory research**, v. 15, n. 1, p. 21, 2014.

NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of medical microbiology**, v.56, pt.4, p.519–523, apr.2007.

OLIVEIRA, Olienaide Ribeiro de et al. Efeito de óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* sobre fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 1, 2008.

OLIVEIRA, A. C. et al. Bacterial Resistance and Mortality in an Intensive Care Unit. *Revista Latino-americana de Enfermagem*, [s.l.], v. 18, n. 6, p.1152-1160, dez. 2010. FapUNIFESP (SciELO).

OLIVEIRA, Maíra MM; BRUGNERA, Danilo F.; PICCOLI, Roberta H. BIOFILMES EM INDÚSTRIAS DE LATICÍNIOS: ASPECTOS GERAIS E USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO NOVA ALTERNATIVA DE CONTROLE. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 390, p. 65-73, 2013.

O'MALLEY, Yunxia Q. et al. The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 285, n. 5, p. L1077-L1086, 2003.

O'MALLEY, Yunxia Q. et al. Subcellular localization of Pseudomonas pyocyanin cytotoxicity in human lung epithelial cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 284, n. 2, p. L420-L430, 2003.

OPLUSTIL, C.P. et al. Procedimentos básicos em Microbiologia clínica, ed. Sarvier, São Paulo. 2000.

OPWIS, Klaus et al. Semi-industrial production of methane from textile wastewaters. **Energy, Sustainability and Society**, v. 2, n. 1, p. 1, 2012.

OWEN, Lucy; WHITE, Alex W.; LAIRD, Katie. Characterisation and screening of antimicrobial essential oil components against clinically important antibiotic-resistant bacteria using thin layer chromatography-direct bioautography hyphenated with GC-MS, LC-MS and NMR. **Phytochemical Analysis**, [s.l.], v. 30, n. 2, p.121-131, 2 out. 2018.

PALLERONI, N. J. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus Pseudomonas: a personal view. *Microbiology* [S.I.]; 149:1-7, 2003.

PALMER, R.J.; WHITE, D. C. Developmental biology of biofilmes: implications for treatment and control. *Trends in Microbiology*, v. 5, n. 11, p. 435-440, 1997.

PANG, Zheng et al. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology advances**, 2018.

PARMELY, M.; GALE, A.; CLABAUGH, M.; HORVAT, R.; ZHON, W. Proteolytic inactivation of cytokines by Pseudomonas aeruginosa. *Infect Immun*, v. 58, p. 3009-3014, 1990.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N.. Early Dissemination of KPC-2-Producing Klebsiella pneumoniae Strains in Brazil. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 53, n. 6, p.2702-2702, 30 mar. 2009. American Society for Microbiology.

PEREZ, L. R. R. et al. Evaluation of biofilm production by Pseudomonas aeruginosa isolates recovered from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 476-479, 2011.

PESSOA, O. D. L. et al. Antibacterial activity of the essential oil from Lippia aff. gracillis. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7-8, p. 712-714, 2005.

PICOLI, S. U. Metallo- β -lactamase and *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol. 40, n. 4, p. 273-277, 2008.

PIRES, Eduardo José Valença Cordeiro et al. Análise epidemiológica de isolados clínicos de Pseudomonas aeruginosa provenientes de hospital universitário. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 21, n. 4, p. 384-390, 2010.

PITT, T. L.; BARTH, A. L. *Pseudomonas aeruginosa* and other medically important *Pseudomonas*. **Princ. and Pract. of Clin. Microbiol**, v. 8, p. 14-8, 1997.

POLLACK, M. The role of exotoxin A in *Pseudomonas* disease on immunity. *Rev Infect Dis*, v. 5, p. 979-984, 1983.

PRADO, Vilma Menezes de Jesus et al. Caracterização de chás de genótipos de *Lippia gracilis schauer* através de perfil cromatográfico por CLAE-DAD combinado com análises quimiométricas. **Química Nova**, [s.l.], v. 35, n. 9, p.1814-1818, 2012. FapUNIFESP (SciELO).

QUEIROZ, M. R. A. et al. Assessment of the antibacterial activity of the essential oil of *Lippia organoides* in relation to *Staphylococcus* sp. isolated from food of animal origin. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 16, n. 3, p. 737-743, 2014.

RENDUELES, O.; GHIGO, J. M. Multi-species biofilms: How to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 36, p. 972-989, 2012.

RENSHENG, X.; YE, Y.; WEIMIN, Z. (Eds). Introduction to natural products Chemistry. New York, EUA: CRC Press, 2011. p.169- 175.

RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J.P.V.; DANTAS-BARROS, A.M. Perfil da utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob influência da legislação nacional. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 1, p. 65-70, 2005.

ROBINSON, Molly Meri; ZHANG, Xiaorui. The world medicines situation 2011, traditional medicines: Global situation, issues and challenges. **World Health Organization, Geneva**, p. 1-12, 2011.

ROBINSON, Victoria H. et al. Biofilm production of *Pseudomonas* spp. isolates from canine otitis in three different enrichment broths. **Veterinary dermatology**, 2019.

ROCHA, Igor Vasconcelos et al. Resistência de bactérias isoladas em equipamentos em unidade de terapia intensiva. **Acta paul. enferm**, v. 28, n. 5, p. 433-439, 2015.

RORIZ-FILHO, Jarbas S. et al. Infecção do trato urinário. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 43, n. 2, p. 118-125, 2010.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D.B. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005

ROSSI, Flávia. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical infectious diseases**, v. 52, n. 9, p. 1138-1143, 2011.

RÚA, Javier et al. Combination of Carvacrol and Thymol: Antimicrobial Activity Against *Staphylococcus aureus* and Antioxidant Activity. **Foodborne Pathogens and Disease**, 2019.

SADER, H. S.; PIGNATARI, A. C.; LEME, I. L.; BURATINI, M. N.; TANCRESI, R.; ROLLIS, R. J.; JONES, R.N. Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an outbreak in an intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 17, p. 13-18, 1993

SADER, H. S. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.200-214, ago. 2001. FapUNIFESP (SciELO)

SADER, Helio S et al. Geographical and temporal variation in the frequency and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from patients hospitalized with bacterial pneumonia: results from 20 years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2016). **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], 6 mar. 2019. Oxford University Press (OUP).

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto - Enferm.**, [s.l.], v. 13, n. , p.64-70, 2004. FapUNIFESP (SciELO).

SANTOS, Juliana Silva dos et al. Verbenaceae sensu stricto in the region of Xingó: Alagoas and Sergipe, Brazil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 4, p. 985-998, 2009.

SANTOS, Ingrid de Arruda Lucena dos; NOGUEIRA, Joseli Maria da Rocha; MENDONÇA, Flávia Coelho Ribeiro. Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*. **RBAC: Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.47, n.1/2, p.5-12, 2015.

SANTOS, A. C. B. et al. Uso popular de espécies medicinais da família Verbenaceae no Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med., Campinas**, v. 17, n. 4 supl II, p. 980-991, 2015.

SANTOS, R. G. et al. Tipo de estaca e substrato na propagação vegetativa de *Lippia gracilis* Schauer. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, n. 0, 2016.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SCHILLACI, Domenico et al. *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* essential oil prevented biofilm formation and showed antibacterial activity against planktonic and sessile bacterial cells. **Journal of food protection**, v. 76, n. 10, p. 1747-1752, 2013

SHARMA, Garima et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. **Biologicals**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2014.

SHORTRIDGE, Dee et al. Geographic and Temporal Patterns of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Over 20 Years From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–2016. **Open Forum Infectious Diseases**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.63-68, mar. 2019. Oxford University Press (OUP)

SIKKEMA, Jan; BONT, Jan A.; POOLMAN, Bert. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8022-8028, 1994.

SILVA, JMC da; RYLANDS, A. B.; FONSECA, GAB da. O destino das áreas de endemismo da Amazônia. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 124-131, 2005.

SILVA FILHO, Luiz Vicente Ribeiro Ferreira et al. Infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose cística: evidências científicas sobre o impacto clínico, diagnóstico e tratamento. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 2013.

SILVA, Natália Cristina Sousa et al. A UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS EM PROL DA SAÚDE. **ÚNICA Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 1, 2017.

SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu Potencial Bioativo e Importância na Medicina Veterinária e Aquicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 109–123, 30 jun. 2013.

SOARES, B. V. et al. Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia organoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, v. 469, p. 72–78, fev. 2017.

SOUZA, D. S. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia organoides* e *Lippia rotundifolia* frente a enterobactérias isoladas de aves. **Arq. bras. med. vet. zootec**, v. 67, n. 3, p. 940-944, 2015.

SOUZA, Gustavo Henrique Bianco de et al. *Pseudomonas aeruginosa* em hospital da microrregião de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. 2016.

SOUZA, Renilde Cordeiro et al. Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* against *Aeromonas* spp. **Microbial pathogenesis**, v. 113, p. 29-33, 2017.

SOUZA, Luana Carneiro Diniz et al. Oral infection by *Pseudomonas aeruginosa* in patient with chronic kidney disease - a case report. **Brazilian Journal Of Nephrology**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.82-85, 19 abr. 2018. FapUNIFESP (SciELO).

SOUZA ELLER, Sarah Carobini Werner et al. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica in vitro. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 1, 2015.

SPIEGEL, C. A. **Organismos Gram negatives: no Enterobacteriaceae**. In: Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Seattle. Editora Coordinadora, p. 171-82, 2005.

STEPANOVIĆ, Srdjan et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.

STREETER, Klissa; KATOULI, Mohammad. *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. *Infection, Epidemiology and Microbiology*, v. 2, n. 1, p. 25-32, 2016.

TACCONELLI, E. et al. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **World Health Organization**, v. 27, 2017.

TEMPONE A.G. et al. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 443-449, 2008.

TIAN, Minyi et al. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of the essential oil from the rhizomes of *Zingiber striolatum* Diels. **Natural product research**, p. 1-5, 2019.

TODAR, K. *Pseudomonas aeruginosa*. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. University of Wisconsin-Madison. Department of Bacteriology, 2004.

THORMANN, K. M. et al. Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic di-GMP. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 7, p. 2681–2691, 2006.

TOFIÑO-RIVERA, A. et al. Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 194, p. 749-754, 2016.

TOLEDO, Ana Cristina Oltramari et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

TRABULSI, L. Rachid; ALTERTHUM, Flavio. *Microbiologia*. 2ª Edição. **Editora Atheneu**, 2008.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013

WOOD, T. K.; HONG, S. H.; MA, Q. Engineering biofilm formation and dispersal. **Trends in Biotechnology**, v. 29, p. 87-94, 2011.

VADYVALOO, Viveka; MARTÍNEZ, Luay. Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 4, p. 38, 2014.

VANZOLINI, K. L. et al. Acetylcholinesterase affinity-based screening assay on *Lippia gracilis* Schauer extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 153, p. 232–237, maio 2018.

VARDAKAS, Konstantinos Z.; FALAGAS, Matthew E.. Colistin versus polymyxin B for the treatment of patients with multidrug-resistant Gram-negative infections: a systematic review and meta-analysis. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 49, n. 2, p.233-238, fev. 2017.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIANA, M. G. **Avaliação de produtos naturais sobre biofilmes formados em sistema dinâmico**. 2009, 90 p. 2009. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Petróleo)-Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

VICCINI, L. F. et al. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, n. 1-4, p. 171-178, 2005.

VOLLMER, W.; BLANOT, D.; PEDRO, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. **Fems Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 32, n. 2, p.149-167, mar. 2008. Oxford University Press (OUP).

WEINSTEIN, Melvin P. et al. M100 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review**. Geneva: World Health Organization, 1998.

XU, J. et al. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in applied microbiology**, v. 47, n. 3, p. 174-179, 2008.

XU, Zhaobin et al. A systems-level approach for investigating *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e57050, 2013.

YANG, Rui et al. Phytochemicals from *Camellia nitidissima* Chi Flowers Reduce the Pyocyanin Production and Motility of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 8, p.0-0, 9 jan. 2018. Frontiers Media SA.

YAYAN, Josef; GHEBREMEDHIN, Beniam; RASCHE, Kurt. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in pneumonia at a single university hospital center in Germany over a 10-year period. **Plos one**, v. 10, n. 10, p. e0139836, 2015.

ZAMORA, Cristina Pérez; TORRES, Carola; NUÑEZ, María. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oils from Verbenaceae Species Growing in South America. **Molecules**, [s.l.], v. 23, n. 3, 1 mar. 2018. MDPI AG.

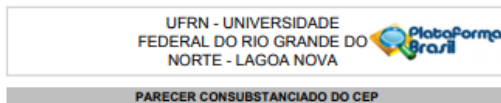
ZAVASCKI, A. P. **Fatores de risco para aquisição de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem em pacientes hospitalizados**. Porto Alegre, 2003. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

ZIMERMAN, Ricardo Ariel. Uso indiscriminado de antimicrobianos e resistência microbiana. **Uso racional de medicamentos: Temas selecionados. Ministério da saúde**, n. 3, 2010.

ZOUBIRI, S.; BAALIOUAMER, A. Potentiality of plants as source of insecticide principles. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 6, p. 925–938, dez. 2014.

10. ANEXOS

Anexo 1 - Aprovação no comitê de ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Atividade antibacteriana e efeito antibiofilme do extrato vegetal da *Lippia alba* em cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Pesquisador: Vânia Andrade

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 85605318.9.0000.5537

Instituição Proponente: Centro de Biociências

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.577.278

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um protocolo de pesquisa com nível de abrangência de Mestrado, está sendo proposto pelo Centro de Biociências-Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, tem como instituição co-participante o Hospital Universitário Onofre Lopes.

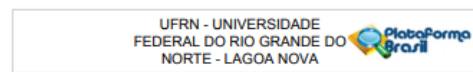
Para definir o número amostral usou-se como critério as informações do banco de dados do Laboratório de Análises clínicas do HUOL, considerando a prevalência mensal de infecções por *Pseudomonas aeruginosa*, após levantamento realizado em dezembro/2017.

De acordo com a proposta descrita no projeto, não serão recrutados participantes para a pesquisa. Entretanto, os isolados bacterianos, especificamente, *Pseudomonas aeruginosa*, provenientes de pacientes internados no HUOL e que foram estocados, previamente, no Laboratório de Análises clínicas (setor de microbiologia), no período entre maio a julho de 2018, serão utilizados nas etapas experimentais do presente projeto.

Os biofilmes microbianos são complexos populacionais sesséis caracterizados por um conjunto de micro-organismos, que de forma irreversível se unem a um substrato, superfícies bióticas e abióticas, ou ainda entre si, e são mergulhadas em uma matriz extracelular composta de substâncias poliméricas produzidas por eles mesmos. A concentração de um antimicrobiano necessária para eliminar bactérias produtoras de biofilme pode ser até 1000 vezes maior que a necessária para eliminar bactérias em estado plactônico. Diversos micro-organismos podem participar de processos de formação de biofilmes e gerar problemas de saúde pública e/ou de

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000
Bairro: Lagoa Nova CEP: 59.078-970
UF: RN Município: NATAL
Telefone: (84)3215-3135 E-mail: cep@h@reitoria.ufrn.br

Página 01 de 08



Continuação do Parecer: 2.577.278

ordem econômica. Os biofilmes formados por *Pseudomonas aeruginosa* têm sido extensivamente estudados devido à sua importância etiológica e o fato de se aderir às superfícies mais variadas. Além da produção de biofilme, essa espécie possui vários outros mecanismos de resistência, tornando o tratamento muito limitado e com poucas opções terapêuticas efetivas.

Devido ao aumento desta resistência aos fármacos já existentes, surgiu a necessidade de se buscar novas alternativas terapêuticas, como fonte importante para obtenção destes medicamentos. Nesse contexto, antimicrobianos de origem natural, como a *Lippia Alba* se apresentam como uma alternativa eficaz e econômica. Assim, esse trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antibacteriana e o efeito antibiofilme do extrato vegetal da *Lippia alba* frente a isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Ressaltando que, o estado do Rio Grande do Norte inclui uma flora ainda pouco estudada, o que estimula uma avaliação das espécies que possam ter ação antimicrobiana, motivando a busca de compostos ativos frente a formação de biofilmes.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL:

Avaliar a atividade antibacteriana e o efeito antibiofilme do extrato vegetal da *Lippia alba* frente a isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção dos materiais vegetais, incluindo os extratos e óleos essenciais;
- Determinar quantitativamente pela técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2016) a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das amostras vegetais frente a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853);
- Determinar a concentração bactericida mínima (CBM), posteriormente à determinação da CIM;
- Determinar quantitativamente pela técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2016) a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das amostras vegetais frente a isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*;
- Avaliar o perfil de sensibilidade dos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*;
- Avaliar in vitro (microtubulação) o efeito dos extratos vegetais e óleos essenciais frente os biofilmes em formação e consolidados pela *Pseudomonas aeruginosa*;
- Quantificar, através de espectrofotometria, a formação dos biofilmes e analisar estatisticamente os resultados observados.

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000
Bairro: Lagoa Nova CEP: 59.078-970
UF: RN Município: NATAL
Telefone: (84)3215-3135 E-mail: cep@h@reitoria.ufrn.br

Página 02 de 08



Continuação do Parecer: 2.577.278

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos dessa pesquisa podem ser classificados como mínimos, pois não haverá contato direto com o paciente. Os isolados clínicos serão provenientes do laboratório de Análises clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes a partir de amostras clínicas de pacientes. No caso, essas amostras serão coletadas a partir de solicitações da equipe médica, visando o diagnóstico clínico. Após a análise laboratorial, todas as bactérias isoladas e identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* serão estocadas e cedidas para esse estudo (após aprovação no CEP-UFRN). As informações necessárias a essa pesquisa serão apenas idade, sexo e sítio de coleta da amostra, não havendo, portanto, divulgação da identidade dos participantes.

Benefícios:

Colaborar, futuramente, com o desenvolvimento e elucidação de um fitofármaco que possa contribuir, na prática clínica, com a terapêutica de infecções causadas por patógenos resistentes, inclusive formadores de biofilmes, de importância médica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está bem fundamentada do ponto de vista ético e metodológico. Com a sua realização os pesquisadores esperam contribuir para a validação de um novo fitofármaco que possa contribuir, na prática clínica, com a terapêutica de infecções causadas por patógenos resistentes, inclusive formadores de biofilmes, de importância médica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Estão adequados para o tipo da pesquisa.

Recomendações:

Enviar os relatórios parcial e final da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise do protocolo de pesquisa, levando em consideração que não existem óbices éticos, o CEP Central/UFRN decidiu pela aprovação do referido protocolo.

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000
Bairro: Lagoa Nova CEP: 59.078-970
UF: RN Município: NATAL
Telefone: (84)3215-3135 E-mail: cep@h@reitoria.ufrn.br

Página 03 de 08