

INSTITUTO FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CURSO DE BACHARELADO EM BIOMEDICINA

SAMANTA DE LIMA AUGUSTO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NANOEMULSÃO DE
CAPIM-LIMÃO EM BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES**

VILA VELHA

2022

SAMANTA DE LIMA AUGUSTO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NANOEMULSÃO DE
CAPIM-LIMÃO EM BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES**

Monografia apresentada à Coordenadoria do Curso de Bacharelado em Biomedicina do Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Vila Velha, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof. Dra. Quézia Moura da Silva

VILA VELHA-ES
2022

(Biblioteca do Campus Vila Velha)

A923a Augusto , Samanta de Lima.

Avaliação da atividade antibacteriana de nanoemulsão de capim-limão em bactérias multirresistentes / Samanta de Lima Augusto . - 2022.
39 f. : il..

Orientador: Quêzia Moura da Silva.

TCC (Graduação) Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Vila Velha,
Curso de Biomedicina, 2022.

1. Bactérias. 2. Infecção. 3. Antibacterianos. 4. Óleos essenciais. I. Silva.,
Quêzia Moura da. II.Título III. Instituto Federal do Espírito Santo.

CDD: 616.92

Bibliotecário/a: Quezia Barbosa de Oliveira Amaral CRB6-ES nº 590



ATA DE DEFESA Nº 2/2023 - VVL - CCBB (11.02.34.01.08.02.10)

Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO

Vila Velha-ES, 03 de fevereiro de 2023.

ATA DE DEFESA DE TCC

Ao primeiro dia do mês de dezembro do ano de 2022, a banca presidida pela professora Quézia Moura da Silva e composta por Carine Coneglian de Farias, Hildegardo Seibert França, reuniu-se para a defesa do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NANOEMULSÃO DE CAPIM-LIMÃO EM BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES”, apresentado por Samanta de Lima Augusto do Curso Superior de Biomedicina. Após a apresentação do trabalho e arguição, a banca examinadora deliberou concluindo pela **APROVAÇÃO** do Trabalho de Conclusão de Curso, desde que a estudante entregue o Trabalho de Conclusão de Curso corrigido, conforme as considerações realizadas pela Banca Examinadora e sob supervisão do orientador, à Biblioteca Zilma Coelho Pinto do Ifes/Vila Velha, como requisito necessário para solicitação de colação de grau. A banca examinadora, ainda, atribuiu nota 9,2 ao trabalho.

(Assinado digitalmente em 03/02/2023 16:06)

CARINE CONEGLIAN DE FARIAS

COORDENADOR DE CURSO - TITULAR

VVL - CCBB (11.02.34.01.08.02.10)

Matrícula: 3092489

(Assinado digitalmente em 06/02/2023 12:22)

HILDEGARDO SEIBERT FRANCA

PROFESSOR DO ENSINO BASICO TECNICO E TECNOLOGICO

VVL - CCBB (11.02.34.01.08.02.10)

Matrícula: 1435888

(Assinado digitalmente em 03/02/2023 13:33)

QUEZIA MOURA DA SILVA

PROFESSOR DO ENSINO BASICO TECNICO E TECNOLOGICO

VVL - CCBB (11.02.34.01.08.02.10)

Matrícula: 1146184

(Assinado digitalmente em 03/02/2023 20:58)

SAMANTA DE LIMA AUGUSTO

DISCENTE

Matrícula: 9999304721

Processo Associado: 23187.000675/2023-18

Visualize o documento original em <https://sipac.ifes.edu.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 2, ano: 2023, tipo: ATA DE DEFESA, data de emissão: 03/02/2023 e o código de verificação: a18517f808

DECLARAÇÃO DA AUTORA

Declaro, para fins de pesquisa acadêmica, didática e técnico-científica, que este Trabalho de Conclusão de Curso pode ser parcialmente utilizado, desde que se faça a referência à fonte e à autora.

Vila Velha, 01 de dezembro de 2022.

Samanta de Lima Augusto

Samanta de Lima Augusto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus por ter guiado meu caminho e permitido que chegasse até onde cheguei. Tudo que tenho devo à Ele. Obrigada Senhor.

Agradeço a minha família, em especial a minha mãe, Lêda Maria e as minhas irmãs, Karen e Sayonara. Vocês são a minha fortaleza. Obrigada por todo o apoio, vocês me inspiram a ir atrás dos meus objetivos, não importa a dificuldade.

Agradeço a todos os meus amigos por todo companheirismo durante todos esses anos e, em especial, aqueles que estiveram presentes comigo durante estes últimos meses e me acompanharam durante horas em laboratório para conclusão do meu TCC. Muito obrigada!

Agradeço a minha professora, Quézia Moura, por ter me orientado e por todo o conhecimento que me passou, sei que irei levar para a vida.

Agradeço à professora Carine Coneglian de Farias e ao professor Hildegardo Seibert França por terem aceitado fazer parte da minha banca.

Agradeço de coração a todos que fizeram parte dessa jornada!

RESUMO

A Organização Mundial da Saúde alerta que a resistência a antibióticos tem se tornado um grande problema de saúde pública, uma vez que infecções por estes patógenos estão associados a um alto índice de mortalidade e morbidade, mostram dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças. Com o surgimento e disseminação desses microrganismos, destaca-se a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos. Com isso, os produtos de origem natural ganham destaque devido a sua ampla variedade de compostos com propriedades farmacológicas. A *Cymbopogon flexuosus*, conhecida como capim-limão, demonstrou em estudos anteriores possuir atividade antibacteriana significativa contra algumas cepas bacterianas. Neste contexto, os objetivos desse estudo foram avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* da nanoemulsão do óleo essencial de *C. flexuosus* e determinar a concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em caldo e pela determinação da concentração bactericida mínima pelo método de espalhamento em superfície contra cepas de bactérias Gram-negativas e Gram-positiva com diferentes mecanismos de resistência nas seguintes concentrações: 5.000µg/mL; 2.500µg/mL; 1.250µg/mL; 625µg/mL; 312,5µg/mL; 156,25µg/mL; 78,125µg/mL; 39,0625µg/mL; 19,53125µg/mL e 9,765µg/mL. A nanoemulsão de *C. flexuosus* apresentou potencial atividade contra as cepas de *S. aureus* ATCC, MRSA, *E. coli* produtora de ESBL e *E. coli* produtora de *mcr-3*. Foi observada maior ação antimicrobiana em bactérias Gram-positivas do que em Gram-negativas. Apesar de apresentar ação inibitória em concentrações maiores que as descritas anteriormente na literatura, a nanoemulsão de utilizada demonstrou potencial atividade antimicrobiano contra cepas resistentes. Dessa forma, a nanoemulsão de óleo essencial de *C. flexuosus* mostra-se uma alternativa promissora para o tratamento de infecções bacterianas resistentes a antibióticos.

Palavras-chave: Bactérias multirresistentes. Capim-limão. *S. aureus*. *E. coli*. *K. pneumoniae*. *P. aeruginosa*.

ABSTRACT

The World Health Organization warns that antibiotic resistance has become a major public health problem, since infections by these pathogens are associated with a high rate of mortality and morbidity, show data from the Centers for Disease Control and Prevention. With the emergence and dissemination of these microorganisms, the need for research and development of new antibiotics stands out. With this, products of natural origin gain prominence due to their wide variety of compounds with pharmacological properties. *Cymbopogon flexuosus*, known as lemongrass, has shown in previous studies to have significant antibacterial activity against some bacterial strains. In this context, the objectives of this study were to evaluate the in vitro antibacterial activity of *C. flexuosus* essential oil nanoemulsion and to determine the minimum inhibitory concentration by broth microdilution method and by determining the minimum bactericidal concentration by surface spreading method against Gram-negative and Gram-positive bacterial strains with different resistance mechanisms at the following concentrations: 5.000µg/mL; 2.500µg/mL; 1.250µg/mL; 625µg/mL; 312.5µg/mL; 156.25µg/mL; 78.125µg/mL; 39.0625µg/mL; 19.53125µg/mL and 9.765µg/mL. The nanoemulsion of *C. flexuosus* showed potential activity against *S. aureus* ATCC, MRSA, ESBL-producing *E. coli* and mcr-3-producing *E. coli* strains. A greater antimicrobial action was observed on Gram-positive bacteria than on Gram-negative ones. Despite showing inhibitory action at higher concentrations than those previously described in the literature, the nanoemulsion used showed potential antimicrobial activity against resistant strains. Thus, the essential oil nanoemulsion of *C. flexuosus* shows to be a promising alternative for the treatment of antibiotic resistant bacterial infections.

Keywords: Multidrug-resistant bacteria. Lemongrass. S. aureus. E. coli. K. pneumoniae. P. aeruginosa.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação da integração do gene cassete cromossômico estafilococo <i>mec</i> (SCC <i>mec</i>) em <i>S. aureus</i> sensível a meticilina (MSSA).....	19
Figura 2. Mecanismo de hidrólise de betalactâmicos pela enzima ESBL.....	20
Figura 3. Representação da estrutura da partícula de nanoemulsão de A/O ou O/A.....	23
Figura 4. Exemplo de placa de microtitulação e interpretação dos resultados da microdiluição.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de patógenos prioritários da OMS para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos divulgada em 2017.....	18
Tabela 2. Os compostos bioativos mais abundantes presentes no óleo essencial de capim-limão.....	24
Tabela 3. Concentrações obtidas após realização de diluição seriada de nanoemulsão de óleo essencial de <i>C. flexuosus</i> com concentração inicial de 10.000µg/mL.....	27
Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de nanoemulsão de capim-limão contra isolados bacterianos sensíveis e resistentes.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A/O – Água em óleo
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- BM – Bactérias multirresistentes
- CBM – Concentração Bactericida Mínima
- CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- EC-ESBL – *Escherichia coli* produtora de ESBL
- EC-ESBL e KPC-2 – *Escherichia coli* produtora de ESBL e KPC-2
- EC-IMP-1 – *Escherichia coli* produtora de IMP-1
- EC-KPC-2 – *Escherichia coli* produtora de KPC-2
- EC-mcr-1 – *Escherichia coli* produtora de mcr-1
- EC-mcr-2 – *Escherichia coli* produtora de mcr-2
- EC-mcr-3 – *Escherichia coli* produtora de mcr-3
- EC-mcr-4 – *Escherichia coli* produtora de mcr-4
- EC-mcr-5 – *Escherichia coli* produtora de mcr-5
- ESBL – *Extended-spectrum beta-lactamase*
- h – Horas
- IMP – Imipenemase
- KPC – *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase
- KP-KPC e NDM – *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC e NDM
- MCR – *Mobile colistin resistance*
- mec* – Gene de resistência à meticilina
- mL – Mililitro
- MRSA – *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente
- MβL – Metallo-beta-lactamase
- NDM – *New Delhi metalobetalactamase*
- nm – Nanômetros
- O/A – Óleo em água
- OECL – Óleo essencial de capim-limão
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- PA-SPM-1 – *Pseudomonas aeruginosa* produtora de SPM-1

PBP2a – Proteína de ligação à penicilina

SCCmec – *Staphylococcal cassette chromosome mec*

SPM – São Paulo metalo- β -lactamase

LISTA DE SÍMBOLOS

% – porcentagem

°C – Celsius

β – Beta

\pm – Mais ou menos

μ – micro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS.....	17
2.2	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.....	18
2.2.1	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina-Resistente (MRSA).....	18
2.2.2	Bactérias produtoras de β -Lactamase de Espectro Estendido (ESBL).....	19
2.2.3	KPC.....	21
2.2.4	IMP, NDM e SPM.....	21
2.2.5	MCR.....	22
2.3	NANOEMULSÕES E CAPIM-LIMÃO.....	22
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4	METODOLOGIA	27
4.1	PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.....	27
4.2	ISOLADOS BACTERIANOS.....	27
4.3	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	28
4.4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).....	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6	CONCLUSÃO	33
7	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

A resistência a antibióticos é um processo natural e adaptativo dos microrganismos, que ocorre quando bactérias, fungos e vírus adquirem mecanismos que os protegem contra a ação de antimicrobianos (CDC, 2022; MURRAY *et al.*, 2022). Essas alterações fazem com que os microrganismos não respondam mais ao tratamento medicamentoso, tornando as infecções mais difíceis de serem tratadas, aumentando o risco de se propagarem, causando infecções mais graves e podendo levar ao óbito do paciente (OMS, 2020). Diversos fatores contribuem para o avanço desse processo, sendo o uso exagerado e inadequado de antibióticos o principal deles (CDC, 2021; OMS, 2020).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2021), o surgimento e disseminação desses patógenos é uma das principais ameaças à saúde pública. Dados de 2021, do Centro de Prevenção e Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC), mostram que em 2019 foram registrados cerca 1,27 milhões de óbitos e, aproximadamente, 5 milhões de mortes associadas a bactérias multirresistentes. Isso evidencia que as opções para o tratamento de infecções bacterianas estão se tornando cada vez mais escassas e que os antibióticos já existentes estão ficando cada vez mais ineficientes. Com o surgimento e disseminação desses microrganismos, destaca-se a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos, frente a ineficácia dos antimicrobianos disponíveis comercialmente e a lista de patógenos prioritários divulgada em 2017 pela OMS, que inclui as *Enterobacteriaceae* produtora de ESBL, *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos (OMS, 2017).

Dentro do grupo de bactérias Gram-positivas, a *S. aureus* é uma das principais bactérias, associada a altas taxas de infecção nosocomial, sendo que a resistência a meticilina é o seu principal mecanismo de resistência (AKOVA, 2016). A disseminação desse patógeno representa grande preocupação para a saúde pública, uma vez que ele possui a capacidade de desenvolver resistência a quase todos os antibióticos disponíveis e está associado a altas taxas de mortalidade quando comparados com a cepa sensível à meticilina (LAKHUNDI, ZHANG, 2018).

As bactérias Gram-negativas incluem patógenos como a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Esses microrganismos possuem grande relevância clínica, uma vez que apresentam alto perfil de resistência contra diversos antimicrobianos, como a maioria dos betalactâmicos, e, também estão associados a altas taxas de infecções hospitalares e comunitárias (AKOVA, 2016; MOTA; OLIVEIRA; SOUTO; 2018). Dessa forma, há uma urgência para o desenvolvimento de novos compostos capazes de combater esses microrganismos.

Neste contexto, os produtos de origem natural ganham espaço e se mostram cada vez mais promissores, isso porque esses compostos possuem diversas vantagens em relação aos medicamentos tradicionais, como, por exemplo, a sua diversidade estrutural única (CALIXTO, 2019; HARVEY *et al*, 2015). Além disso, os produtos naturais chamam a atenção devido a sua disponibilidade, acessibilidade e por apresentarem poucos efeitos colaterais (UGBOGU *et al*, 2021).

A *Cymbopogon flexuosus*, conhecida popularmente como capim-limão (lemongrass, em inglês) é uma planta originária da Índia com diversas propriedades fitoquímicas (GÜNDEL *et al*, 2018). Em pesquisas anteriores, utilizando seu óleo essencial, a *C. flexuosus* apresentou propriedades antimicrobiana, antifúngica e anticancerígena (GAONKAR *et al.*, 2018). Além disso, quando realizado estudos com a nanoemulsão dessa planta, ela apresentou boa atividade antibacteriana contra cepas sensíveis ATCC de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, tendo seus compostos mais abundantes – geranial (também chamado de citral) e geraniol – associados com esse potencial antimicrobiano. (GÜNDEL *et al*, 2018). Logo, devido a suas propriedades farmacológicas, essa planta torna-se um composto promissor no desenvolvimento e pesquisa de novos antibióticos.

Entretanto, são escassos os estudos que avaliam a atividade antibacteriana da nanoemulsão do óleo essencial de capim-limão em cepas de bactérias multirresistentes. Neste contexto, a avaliação da atividade antibacteriana da nanoemulsão do óleo essencial de *C. flexuosus* em cepas de bactérias Gram-negativas e Gram-positiva com diferentes mecanismos de resistência é de grande importância frente à crescente ineficácia dos antibióticos disponíveis comercialmente.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

A descoberta dos antibióticos foi considerada uma das mais importantes revoluções na história da medicina moderna, resultando numa drástica queda da mortalidade e morbidade causada por infecções bacterianas (DURÃO *et al*, 2018). Além disso, contribuiu para uma melhor abordagem em diversos procedimentos médicos mais complexos, como cirurgias e transplante de órgãos (MUNITA; ARIAS, 2016). Entretanto, associado ao seu uso, um número crescente de bactérias e outros patógenos começaram a adquirir mecanismos que lhes conferiram resistência a diversos antibióticos, comprometendo a sua eficácia e contribuindo para o surgimento de bactérias multirresistentes (DURÃO *et al*, 2018; MUNITA; ARIAS, 2016).

O processo de resistência a antibióticos ocorre quando certos patógenos desenvolvem a habilidade de sobreviver a medicamentos destinados a matá-los, tornando as infecções mais difíceis de serem tratadas e, ainda, aumentando o risco de se disseminarem no ambiente, hospitais e na comunidade (CDC, 2022; OMS, 2020). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2020), a resistência a antibióticos tem se espalhado mundialmente de forma perigosa, o que tem levado doenças infecciosas como a pneumonia, tuberculose e gonorreia estarem cada vez mais difíceis – e às vezes, impossível – de serem tratadas devido a ineficácia dos antibióticos frente a estes patógenos. Além disso, infecções por bactérias multirresistentes (BM) estão associadas a uma alta taxa de mortalidade e morbidade, além de prolongarem o tempo de internação do paciente, gerando altos custos para os sistemas de saúde (CDC, 2019).

O uso inadequado e exagerado de antibióticos pela população, em hospitais e o uso agropecuário contribuem diretamente para o surgimento e disseminação de BM (CDC, 2019; SOARES *et al*, 2018). A resistência a antibióticos pode ocorrer de forma intrínseca, que acontece de forma natural, como parte do processo evolutivo bacteriano. Nesses casos, o microrganismo possui características estruturais ou enzimáticas que levam à resistência antimicrobiana (BAPTISTA, 2013; MOTA; OLIVEIRA; SOUTO, 2018). A resistência também pode ser adquirida, através da

aquisição de genes de resistência, podendo ser através de genes móveis, como plasmídeos, via bacteriófagos ou por transformação – quando uma recebe partes do DNA de outra bactéria dispersa no meio ambiente (ANDRADE; DARINI, s.d.; TEIXEIRA; FIGUEIREDO; FRANÇA, 2019). Em 2017, a OMS divulgou uma lista, dividida em 3 categorias (crítico, alto, médio), de bactérias multirresistentes que precisam de novos antibióticos (Tabela 1), dentre elas estão a *Staphylococcus aureus* metilina-resistente (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos e as *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL (OMS, 2017).

Tabela 1. Lista de patógenos prioritários da OMS para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos, divulgada em 2017.

Patógeno	Prioridade
<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenêmicos	Crítica
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenêmicos	Crítica
<i>Enterobacteriaceae</i> resistente a carbapenêmicos/produtora de ESBL	Crítica
<i>Enterococcus faecium</i> resistente à vancomicina	Alta
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina, intermediário e resistente à vancomicina	Alta
<i>Helicobacter pylori</i> resistente à claritromicina	Alta
<i>Campylobacter</i> spp. resistente a fluoroquinolonas	Alta
<i>Salmonella</i> resistente a fluoroquinolonas	Alta
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente a cefalosporinas e fluoroquinolonas	Alta
<i>Streptococcus pneumoniae</i> não suscetível à penicilina	Média
<i>Haemophilus influenzae</i> resistente à ampicilina	Média
<i>Shigella</i> spp. resistente a fluoroquinolonas	Média

Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2017.

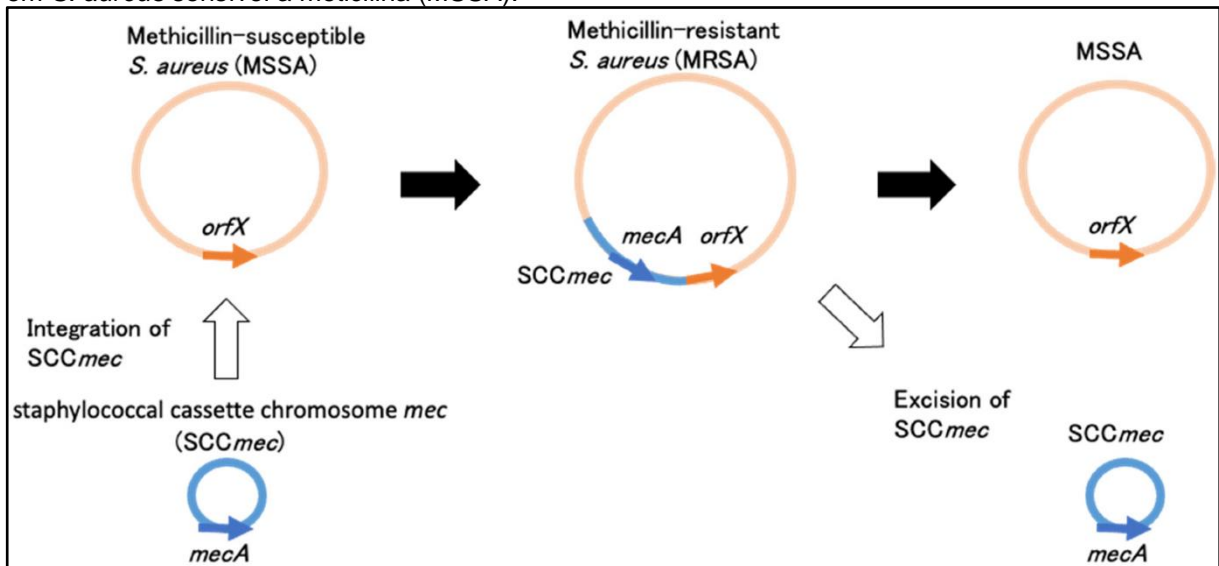
2.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

2.2.1 *Staphylococcus aureus* Metilina-Resistente (MRSA)

A *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva de grande relevância clínica (LEE *et al*, 2018). A cepa *S. aureus* metilina-resistente (MRSA) foi clinicamente identificada nos anos 1960, logo após a introdução da penicilina (LAKHUNDI *et al*, 2018; LEE *et al*, 2018). A MRSA é um dos principais patógenos causadores de infecções por bactérias multirresistentes, sendo associadas a uma alta taxa de mortalidade quando comparada à cepa sensível à metilina (DAVIS, *et al*, 2015). A resistência à metilina está relacionada à produção alterada de uma proteína de ligação a penicilina (PBP2a) pela *S. aureus*, que está associada à diminuição da

afinidade às penicilinas semissintéticas (LAKHUNDI *et al*, 2018). Essa proteína é adquirida via transferência horizontal de genes do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) (Figura 1), que codifica os genes *mecA* e *mecC* que conferem resistência à meticilina e à maioria dos antibióticos betalactâmicos (LEE *et al*, 2018). As penicilinas semissintéticas, como a meticilina e oxacilina, são muito empregadas no tratamento de infecções por *Staphylococcus* spp., dessa forma, a resistências a essa classe de medicamentos limita as opções de tratamento por essas bactérias (MARTINS, 2012).

Figura 1. Representação da integração do gene cassete cromossômico estafilococo *mec* (SCC*mec*) em *S. aureus* sensível a meticilina (MSSA).



O gene *mecA* é amplamente distribuído entre *S. aureus*. A resistência a meticilina é transferida por elementos móveis contendo chamados de cassete cromossômico estafilococo *mec* (SCC*mec*) que contém o gene *mecA* e o locus *ccrAB* que codifica a sua integração e excisão (DONNIO *et al.*, 2005; UEHARA, 2022).

Fonte: Uehara, 2022.

2.2.2 Bactérias produtoras de β -Lactamase de Espectro Estendido (ESBL)

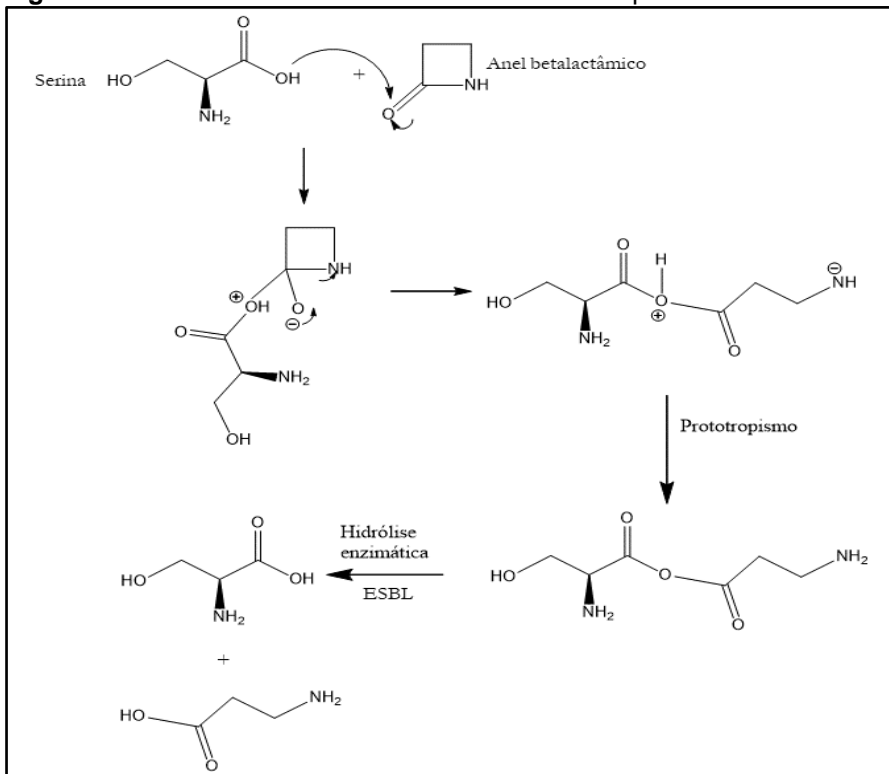
β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBL) são enzimas bacterianas que são capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico dos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos (Figura 2), conferindo às bactérias produtoras de ESBL resistência à maioria desses antibióticos, penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (GHAFOURIAN *et al*, 2015; PEIRANO *et al*, 2019). Geralmente, as ESBL são codificadas por genes presentes em plasmídeos e também estão associadas a outros

mecanismos de resistência, resultando em uma cepa com perfil de multirresistência (KARAIKOS *et al*, 2020; SILVA *et al*, 2012).

Segundo Peirano *et al* (2019), ESBLs são encontradas em bactérias Gram-negativas, principalmente nas *Enterobacteriaceae*, sendo a *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* as principais espécies de bactérias multirresistentes produtoras dessa enzima, estando comumente relacionadas a infecções do trato urinário e bacteremia. Ainda, infecções causadas por enterobactérias produtoras de ESBL estão relacionadas à uma alta taxa de mortalidade, longa estadia em hospitais e elevados custos aos sistemas de saúde (KARAIKOS *et al*, 2020).

A maioria das bactérias produtoras de ESBL pertencem à classe A de Ambler – em resumo, é uma classificação proposta por Richard Ambler (1933-2013) que divide as β -lactamases em quatro classes (A, B, C e D), de acordo com a sua sequência de aminoácidos (HALL e BARLOW, 2005) –, que incluem os tipos SHV, TEM e CTX-M (KARAIKOS *et al*, 2020; PEIRANO *et al*, 2019).

Figura 2. Mecanismo de hidrólise de betalactâmicos pela enzima ESBL.



A enzima associa-se de forma covalente ao anel betalactâmico pela ligação da hidroxila livre na cadeia lateral de um resíduo de serina, no sítio ativo da enzima, produzindo um grupo acil-éster. A hidrólise do éster finalmente libera a enzima ativa e o fármaco inativo hidrolisado (LIVERMORE, 1995).

Fonte: SILVA *et al*, 2012 (Adaptado).

2.2.3 KPC

Bactérias produtoras da enzima KPC – o nome deriva de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase, devido ao fato de ter sido identificado nessa bactéria (WOLTER *et al*, 2009) – representam uma grande ameaça à saúde pública devido à presença de genes móveis para carbapenemase – como genes localizados em plasmídeos – que conferem resistência aos betalactâmicos, incluindo os carbapenêmicos que são antimicrobianos de última escolha para tratamento de infecções graves (GAO *et al*, 2020). Segundo Porreca *et al* (2018), até hoje, foram identificadas pelo menos 19 variantes de KPC, sendo a KPC-2 e KPC-3 as mais relevantes.

As bactérias produtoras dessa enzima são suscetíveis a ação de poucos antibióticos, sendo sensíveis a, por exemplo, colistina e alguns aminoglicosídeos, limitando as opções de tratamento (MUNOZ-PRICE *et al*, 2013). A maioria das infecções por esses patógenos são nosocomiais, acometendo pacientes debilitados e imunocomprometidos, elevando a taxa de mortalidade (GAO, *et al*, 2020).

2.2.4 IMP, NDM e SPM

As enzimas IMP-1, NDM e SPM são beta-lactamases de classe B, de grande relevância clínica. Essas enzimas são chamadas de metalo-beta-lactamase (MβL) e podem ser codificadas intrinsecamente ou por genes móveis adquiridos (plasmídeos ou integrões) (BERTONCHELI; HÖRNER, 2008). As enzimas MβL são caracterizadas por utilizarem um íon, geralmente de zinco, como cofator de sua atividade catalítica (CHENG *et al*, 2021). Elas são capazes de hidrolisar quase todos os beta-lactâmicos disponíveis e por conta disso têm se tornado um grande problema para a saúde pública. Além disso, não existe inibidor de beta-lactamase capaz de inibir essas enzimas eficientemente (BERTONCHELI e HÖRNER, 2008).

A subclasse IMP-1 tem sido identificada em diversos microrganismos como *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (MENDES *et al*, 2006). A NDM foi identificada em *K. pneumoniae* e *E. coli*. De acordo com Mendes *et al* (2006), o gene que codifica a subclasse SPM-1 está relacionada apenas com a

espécie *P. aeruginosa*, uma vez que não foi identificado em outros gêneros e espécies.

2.2.5 MCR

A colistina pertence à família das polimixinas e possui alta eficácia contra bactérias Gram-negativas, principalmente algumas espécies de enterobactérias (LIU *et al*, 2016). Entretanto, a sua eficiência tem sido comprometida devido ao surgimento de resistência mediada pelo gene móvel de resistência à colistina *mcr* (do inglês, *mobile colistin resistance*), composta dos genes *mcr-1* ao *mcr-10*, que tem aumentado ao longo dos anos e preocupado a comunidade científica (HUSSEIN *et al*, 2021).

O gene *mcr* codifica a enzima fosfoetanolamina transferase que modifica o lipídio A presente na membrana externa das bactérias Gram-negativas, catalisando a adição de fosfoetanolamina, reduzindo a carga negativa, diminuindo a adesão da colistina, conferindo então resistência a este antibiótico (MOREIRA, 2020; LING *et al*, 2020).

2.3 NANOEMULSÕES E CAPIM-LIMÃO

Nanoemulsões podem ser definidas como dispersões coloidais de gotículas de dois líquidos imiscíveis, como água e óleo, estabilizadas por um surfactante, com gotículas de diâmetros que podem variar entre 100 a 500 nm (Figura 3). As gotículas podem estar como formas de água em óleo (A/O), ou ao contrário, óleo em água (O/A) (SINGH *et al*, 2017; ARIANTO; CINDY, 2019).

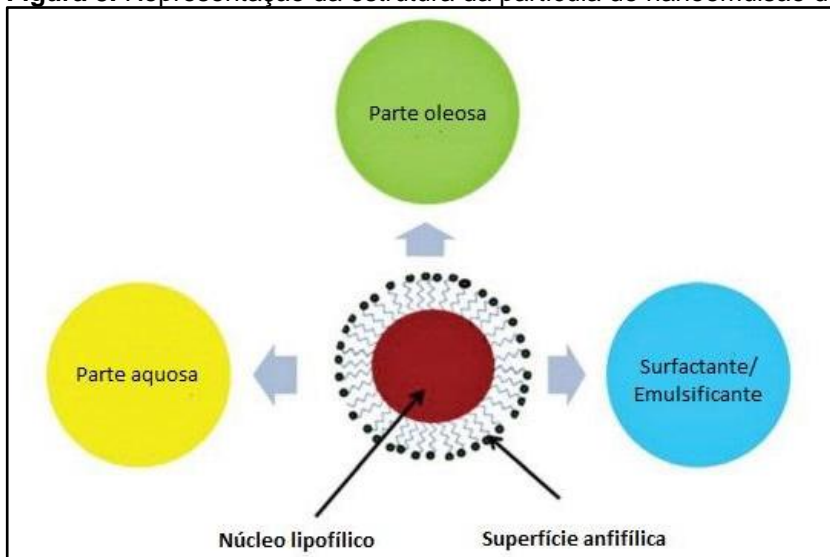
As nanoemulsões possuem propriedades únicas como o tamanho de suas gotículas, maior estabilidade e grande área de superfície, tornando-se uma tecnologia emergente na indústria farmacêutica e cosmética uma vez que este sistema é capaz de controlar a taxa de liberação de e melhorar a biodisponibilidade de compostos bioativos lipofílicos (HO; ABIK; MIKKONENA, 2021).

As nanoemulsões possuem uma fase oleosa, comumente contendo de 5-20% óleo, e uma fase aquosa. Normalmente, os surfactantes – moléculas anfifílicas capazes de reduzir a tensão interfacial e evitar a agregação de gotículas – utilizados para

estabilizar este sistema são a lecitina, Tween 20, 40, 60 e 80 e Span 20, 40, 60 e 80 (SINGH *et al*, 2017).

Devido as suas características, as nanoemulsões possuem diversas vantagens em relação às emulsões, como suas partículas pequenas, alta estabilidade, maior biodisponibilidade, maior capacidade de solubilidade, não são tóxicos e irritantes, podendo ser aplicados na pele e em mucosas e, por possuírem maior área de superfície e energia livre, tornam-se um sistema de transporte eficaz (HO; ABIK; MIKKONENA, 2021; DAS *et al*, 2020; BHOSALE *et al*, 2014).

Figura 3. Representação da estrutura da partícula de nanoemulsão de A/O ou O/A.



Fonte: LI *et al*, 2021 (adaptado).

Dessa forma, segundo Singh *et al* (2017), as nanoemulsões podem ser aplicadas de diferentes formas como em géis, cremes, sprays, dentre outras, além também poderem ser administradas maneiras diversas, como aplicação tópica, por via oral, intravenosa, via respiratória e ocular.

Historicamente, produtos de origem natural têm sido usados no tratamento de diversas doenças e por isso possuem um importante papel farmacológico. Tais produtos naturais possuem uma grande variedade de compostos com diversas atividades e propriedades farmacológicas, muitos apresentando atividade anticancerígena, antifúngica e antibacteriana (HARVEY *et al*, 2015; LI *et al*, 2009; COLONE *et al*, 2020). Ainda, óleos essenciais e seus compostos possuem atividade

contra uma variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (OUSSALAH *et al*, 2007).

Cymbopogon flexuosus é uma planta herbácea do gênero *Cymbopogon* spp., pertencente à família *Poaceae*, conhecida popularmente como capim-limão (do inglês, *lemongrass*). O gênero *Cymbopogon* spp. possui cerca de 180 espécies podendo destacar dentre elas, além da *C. flexuosus*, *C. citratus*, *C. nardus* e *C. martinii*. Diversas espécies desse gênero possuem grande relevância comercial, sendo amplamente usados na indústria cosmética, farmacêutica, perfumaria, dentre outros (GÜNDEL *et al*, 2018; MUKARRAM *et al*, 2021; SHARMA *et al*, 2008; SOUZA *et al*, 2020).

Os compostos mais abundantes do óleo essencial de capim-limão (OECL) já foram descritos anteriormente na literatura (Tabela 2) e em estudos prévios, quando utilizado OECL, obteve-se resultados positivos na avaliação da sua atividade antibacteriana *in vitro* contra cepas de *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* (MUKARRAM *et al*, 2021).

Tabela 2. Os compostos bioativos mais abundantes presentes no óleo essencial de capim-limão.

Composto	Concentração (%)
Geranial	39.05
Neral	28.20
Geraniol	6.33
Acetato de geranilo	2.46
Isogeranial	1.49
Citronelal	1.22
Citronelol	1.22
Isoneral	1.11
Linalool	0.96
Limonene	0.83

Fonte: MUKARRAM *et al*, 2021

O seu principal e mais abundante composto mais abundante, o geranial (citril), tem sido amplamente associado com potencial antimicrobiano contra diversas patógenos (BOEIRA *et al*, 2020). E, ainda de acordo com Boeira *et al* (2020), seu mecanismo de ação geralmente pode ser considerado como a perturbação da membrana plasmática, interrupção da força próton-motriz, fluxo de elétrons e transporte ativo e coagulação do conteúdo celular.

Deste modo, considerando a escassez de estudos que relacionam a atividade antimicrobiana de nanoemulsão de óleo essencial de *C. flexuosos* em cepas de bactérias multirresistentes, o presente estudo propôs analisar a sua atividade antibacteriana em cepas de bactérias com diferentes mecanismos de resistência.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de nanoemulsão de capim-limão contra isolados de bactérias multirresistentes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima de nanoemulsão de capim-limão contra isolados de bactéria Gram-positiva e Gram-negativas com diferentes mecanismos de resistência antimicrobiana;
- Determinar a concentração bactericida mínima de nanoemulsão contra isolados de bactéria Gram-positiva e Gram-negativas com diferentes mecanismos de resistência antimicrobiana;
- Comparar e discutir os resultados obtidos nessa pesquisa com os resultados de estudos prévios existentes na literatura realizados com diferentes formulações e cepas sensíveis aos antimicrobianos.

4 METODOLOGIA

4.1 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

A nanoemulsão utilizada foi produzida e obtida em parceria com o professor Hildegardo Seibert França (IFES, Campus Vila Velha). As nanoemulsões foram preparadas cerca de 1 a 3h antes da realização da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em uma concentração inicial de 1%, sendo assim, 0,01g/mL ou 10.000µg/mL. A partir dessa, foi realizada uma diluição seriada em caldo Müeller-Hinton em placas de microtitulação para a obtenção de dez concentrações diferentes, dispostas na Tabela 3:

Tabela 3. Concentrações obtidas após realização de diluição seriada de nanoemulsão de óleo essencial de *C. flexuosus* com concentração inicial de 10.000µg/mL.

Poço	Concentração (µg/mL)
1	5.000
2	2.500
3	1.250
4	625
5	312,5
6	156,25
7	78,125
8	39,0625
9	19,53125
10	9,765

Fonte: Autoria própria.

4.2 ISOLADOS BACTERIANOS

Neste estudo foram testados isolados de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente ATCC BA01; *Escherichia coli* produtora de ESBL; *Escherichia coli* produtora de KPC-2; *Escherichia coli* produtora de IMP-1; *Escherichia coli* produtora de ESBL e KPC; *Escherichia coli* produtora de *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5*; *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC e NDM; e *Pseudomonas aeruginosa* produtora de SPM-1. Como método de comparação da avaliação da atividade bacteriana da nanoemulsão, foram utilizadas cepas sensíveis de *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa*

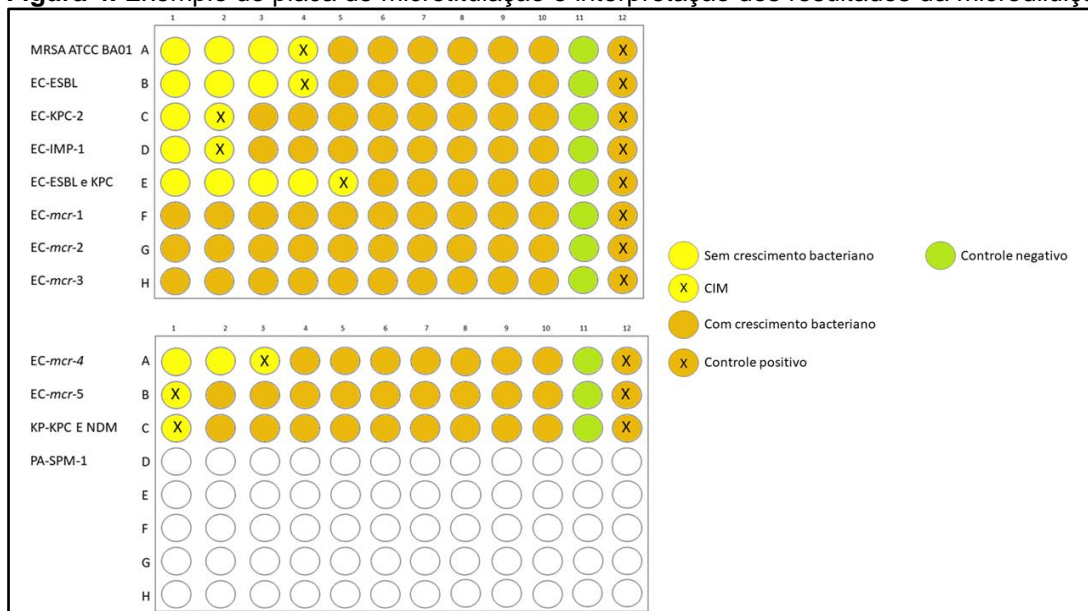
ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 e *Proteus mirabilis* ATCC 25933. Todas as bactérias foram obtidas a partir da coleção pessoal da professora orientadora. Todas as cepas foram inoculadas previamente em ágar apropriado e incubadas em estufa bacteriológica por 18-24h a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é um método utilizado para determinar a suscetibilidade de microrganismos a determinados antimicrobianos, sendo definida como a menor concentração que irá inibir o crescimento de determinado microrganismo após seu período de incubação (ANDREWS, 2001).

A CIM foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, com metodologia adaptada a partir das normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (NCCLS document M7-A7, 2006). Todo o experimento foi realizado em triplicata em microplacas estéreis de 96 poços.

Figura 4. Exemplo de placa de microtitulação e interpretação dos resultados da microdiluição.



Fonte: Autoria própria.

Em cada poço da microplaca, foram adicionados 100 µl de caldo Mueller Hinton cátion ajustado. No primeiro poço foram ainda adicionados 100 µl de nanoemulsão de capim-limão, com concentração inicial de 10.000 µg/mL, e foi realizada uma diluição seriada até o décimo poço, como representado na Figura 4. As concentrações obtidas estão

dispostas na Tabela 3. As suspensões bacterianas foram preparadas primeiramente em tubos contendo 3 mL de água destilada autoclavada e tiveram as absorvâncias ajustadas entre 0,08 e 0,12, em leitora de microplaca a 630 nm. Após isso, 100 µl da suspensão bacteriana foram adicionados em tubos contendo 900 µl de água destilada autoclavada, obtendo uma diluição na proporção de 1:10. Depois, 5 µl dessa suspensão foi adicionada nos poços de 1 a 10 da microplaca. Para controle positivo, foi adicionado 5 µl da suspensão no 12º poço contendo somente 100µl de caldo Mueller Hinton. Para controle negativo, 100 µl da nanoemulsão foi adicionada no 11º poço contendo o caldo. A microplaca foi, então, incubada em estufa bacteriológica por 18-24h a 36°C ± 1°C. A CIM foi determinada pela menor concentração em que não houve crescimento bacteriano visível a olho nu.

4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) é um método utilizado para determinar a menor concentração necessária para matar determinado patógeno (OWUAMA, 2017). Após o período de incubação das microplacas, dos poços em que não houve crescimento visível foram pipetados 100 µl e inoculados em placas de ágar Mueller Hinton, por espalhamento em superfície com alça de Drigalski. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por um período de 18-24h a 36°C ± 1°C. A CBM foi determinada como a menor concentração em que não houve crescimento de colônias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A nanoemulsão de capim-limão apresentou boa atividade antibacteriana contra as cepas utilizadas. Os resultados obtidos através da determinação da CIM e da CBM estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de nanoemulsão de capim-limão contra isolados bacterianos sensíveis e resistentes.

Isolados bacterianos	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
Sensíveis		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	5.000	>5.000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>5.000	NA
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	625	1.250
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	5.000	5.000
Resistentes		
<i>Escherichia coli</i> produtora de ESBL	1.250	1.250
<i>Escherichia coli</i> produtora de KPC-2	5.000	5.000
<i>Escherichia coli</i> produtora de IMP-1	2.500	2.500
<i>Escherichia coli</i> produtora de ESBL e KPC-2	>5.000	NA
<i>Escherichia coli</i> produtora de <i>mcr-1</i>	>5.000	NA
<i>Escherichia coli</i> produtora de <i>mcr-2</i>	>5.000	NA
<i>Escherichia coli</i> produtora <i>mcr-3</i>	1.250	1.250
<i>Escherichia coli</i> produtora <i>mcr-4</i>	5.000	5.000
<i>Escherichia coli</i> produtora <i>mcr-5</i>	>5.000	NA
<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de KPC e NDM	5.000	5.000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> produtora de SPM-1	>5.000	NA
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC BA01	625	1.250

NA: Não avaliada

Fonte: Autoria própria.

Das cepas sensíveis testadas a nanoemulsão de capim-limão apresentou melhor atividade inibitória contra *S. aureus*, com CIM de 625µg/mL e CBM de 1.250µg/mL, entretanto contra as cepas sensíveis de *E. coli* e *P. mirabilis* apenas apresentou atividade antibacteriana na maior concentração testada, de 5.000µg/mL. *P. aeruginosa* apresentou resistência em todas as concentrações testadas.

Dentre as cepas resistentes, a nanoemulsão apresentou melhor atividade antibacteriana contra o isolado bacteriano de *S. aureus* MRSA ATCC BA01, apresentando a mesma CIM e CBM que a cepa sensível de 625µg/mL e 1.250µg/mL., respectivamente. A nanoemulsão também apresentou atividade antibacteriana considerável contra as cepas resistentes de EC-ESBL e EC-*mcr-3*, ambas com CIM e CBM de 1.250µg/mL.

Por outro lado, contra as cepas resistentes de *E. coli*, EC-KPC-2, EC-IMP-1, EC-ESBL e KPC, EC-*mcr-1*, EC-*mcr-2*, EC-*mcr-4*, EC-*mcr-5* e KP-KPC e NDM, a nanoemulsão não apresentou atividade antibacteriana significativa, assim como na cepa sensível testada. Para as cepas de *P. aeruginosa* (sensível e resistente) não houve ação antimicrobiana. Os controles positivos apresentaram crescimento bacteriano como esperado e os controles negativos não apresentaram crescimento bacteriano visível.

Anteriormente na literatura foi descrito potencial atividade antibacteriana do OECL e de nanoemulsão de capim-limão, ambos a 5% (50.000 µg/mL), contra cepas ATCC de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, onde apresentaram, respectivamente, ação inibitória em concentrações de 0.58 mg/mL (580 µg/mL) para o OECL e para a nanoemulsão; e sem ação inibitória para o óleo e 11.33 mg/mL (11.330 µg/mL) para a nanoemulsão (GÜNDEL *et al*, 2018). Com relação a CIM obtida neste estudo para *S. aureus* ATCC é possível dizer que a nanoemulsão apresentou atividade antibacteriana inferior do que descrito anteriormente, uma vez que a concentração atingida foi consideravelmente maior. A *P. aeruginosa*, em ambos os casos, apresentou resistência nas concentrações testadas.

Chافتar *et al* (2016), realizou ensaios para determinação da CIM pelo método de microdiluição em caldo com diferentes óleos essenciais, incluindo as espécies *C. citratus* e *C. martinii var. motia*, contra diferentes cepas sensíveis Gram-positivas e

Gram-negativas. Para a espécie *C. citratus*, foi possível observar que Gram-positivas – *B. megaterium*, *S. epidermidis* e *S. xylosus* – apresentaram maior sensibilidade quando comparadas as cepas Gram-negativas testadas – *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* e *L. pneumophila*. Para a espécie *C. martinii var motia* as CIMs obtidas para ambos os grupos foram semelhantes.

Considerando todos os isolados testados, pode-se observar que a nanoemulsão de capim-limão apresentou melhor ação antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (cepas sensível e resistente de *S. aureus*) do que em bactérias Gram-negativas (cepas sensíveis e resistentes de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*). Uma hipótese para essa diferença de sensibilidade levantada por Balakrishnan *et al* (2010), estaria associada a diferenças estruturais e de composição da membrana desses dois grupos. As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa que serve como uma barreira impermeável para pequenas moléculas, podendo impedir a ação das partículas da nanoemulsão (BALAKRISHNAN *et al*, 2010).

Seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado. De acordo com GÜNDEL *et al* (2018), a ação antibacteriana pode estar relacionada com a grande área de superfície, que interage com a membrana celular do patógeno, destruindo a parede do microrganismo. Também, sua atividade antibacteriana tem sido associada a grande quantidade geranial – também chamado de citral – e seu mecanismo de ação geralmente pode ser considerado como a perturbação da membrana plasmática, interrupção da força próton-motriz, fluxo de elétrons e transporte ativo e coagulação do conteúdo celular (ADUKWU *et al*, 2016; ALAGAWANY *et al*, 2021; BOEIRA *et al*, 2020).

6 CONCLUSÃO

A nanoemulsão de capim-limão apresentou potencial atividade antibacteriana contra os isolados resistente de *S. aureus* MRSA, *E. coli* produtora de ESBL e *E. coli* produtora de *mcr-3*. Para as demais cepas resistentes testadas não houve ação antimicrobiana significativa. Com relação aos resultados presentes na literatura, utilizando o óleo essencial e nanoemulsão, é possível concluir que a nanoemulsão mostrou resultados inferiores neste estudo, uma vez que a CIM obtida foi maior que a descrita anteriormente. Entretanto, considerando os resultados obtidos e os descritos na literatura com outras espécies do mesmo gênero, foi possível observar que a nanoemulsão apresentou melhor atividade antimicrobiana contra as cepas Gram-positivas do que Gram-negativas.

Para melhor elucidar a ação antibacteriana da nanoemulsão seria ideal realizar novos testes com um número maior de cepas com diferentes mecanismos de resistência, principalmente com outros isolados de *S. aureus* e outras bactérias Gram-positivas, uma vez que estas apresentaram maior sensibilidade que as Gram-negativas. Além disso, seria importante realizar testes para determinar a CIM da cepa sensível de *K. pneumoniae*, para comparar com a CIM obtida contra a cepa resistente. Também são necessários estudos mais aprofundados que busquem compreender o mecanismo de ação dos componentes da nanoemulsão.

Por fim, considerando os resultados apresentados neste estudo e os já descritos na literatura, a nanoemulsão de capim-limão mostra ser uma alternativa promissora no tratamento de infecções por bactérias multirresistentes.

REFERÊNCIAS

- AKOVA, M. Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. **Virulence**, 7:3, 252-266, 2016;
- ANDRADE, L. N. de; DARINI, A. L. da C. Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos. Curso Básico de Antimicrobianos. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, s.d.;
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. suppl_1, p. 5–16, 2001;
- ANVISA. **Módulo 2: Gram-negativas Fermentadoras**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/MODULO2/resistencia.htm. Acesso em 13 nov. 2022;
- ARIANTO, A.; CINDY, C. Preparation and Evaluation of Sunflower Oil Nanoemulsion As a Sunscreen. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 7, n. 22, p. 3757–3761, 2019;
- ARNOLD, R. S.; THOM, K. A.; SHARMA, S.; PHILLIPS, M.; KRISTIE JOHNSON, J.; MORGAN, D. J. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **Southern medical journal**, 104(1), 40–45, 2011;
- BALAKRISHNAN, B.; PARAMASIVAM, S.; ARULKUMAR, A. Evaluation of the lemongrass plant (*Cymbopogon citratus*) extracted in different solvents for antioxidant and antibacterial activity against human pathogens. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. S134–S139, 2014;
- BAPTISTA, M. G. de F. M.; Mecanismos de resistência aos antibióticos. 2013. 51 f. Tese (mestrado) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Lisboa, 2013;
- BERTONCHELI, C. DE M.; HÖRNER, R. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 577–599, 2008;
- BHOSALE, R. R. *et al.* Nanoemulsion: A Review on Novel Profusion in Advanced Drug Delivery. **Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research**, v. 2, n. 01, p. 122–127, 2014;
- BOEIRA, C. P. *et al.* Phytochemical characterization and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* extract for application as natural antioxidant in fresh sausage. **Food Chemistry**, v. 319, p. 126553, jul. 2020.
- CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** [online]. 2019, v. 91, n. Suppl 3;

CDC. **Antibiotic / Antimicrobial Resistance**. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/index.html>. Acesso em: 13 nov. 2022;

CDC. **Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>. Acesso em: 13 nov. 2022;

CDC. **How Antibiotic Resistance Happens**. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about/how-resistance-happens.html>. Acesso em: 13 nov. 2022;

CELPROGEN. **Cell-based ELISA to Characterize Human Breast Cancer Stem Cell in culture**. Catalog Number K36102-29B. Disponível em: <https://celprogen.com/human-breast-csc-characterization-kit-nestin/>. Acesso em 20 nov 2022;

CHAFTAR, N. et al. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of 19 essential oils. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 1–15, 2015.

CHENG, Z. *et al.* Carbapenem Use Is Driving the Evolution of Imipenemase 1 Variants. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, vol. 65,4 e01714-20, 2021;

CHOPRA, B.; DHINGRA, A. K. Natural products: A lead for drug discovery and development. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 9, p. 4660–4702, 2021;

COLONE, M.; CALCABRINI, A.; STRINGARO, A. Drug Delivery Systems of Natural Products in Oncology. **Molecules**, v. 25, n. 19, p. 4560, 6 out. 2020;

CONCHA, N. O. *et al.* Crystal Structure of the IMP-1 Metallo β -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and Its Complex with a Mercaptocarboxylate Inhibitor: Binding Determinants of a Potent, Broad-Spectrum Inhibitor. **Biochemistry**, v. 39, n. 15, p. 4288–4298, 2000;

DAS, A. K. *et al.* Application of nanoemulsion-based approaches for improving the quality and safety of muscle foods: A comprehensive review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 5, p. 2677–2700, 2020;

DAVIS, J.; HAL, S.; TONG, S. Combination Antibiotic Treatment of Serious Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 36, n. 01, p. 003-016, 2015;

DONNIO, P.-Y. *et al.* Partial Excision of the Chromosomal Cassette Containing the Methicillin Resistance Determinant Results in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4191–4193, ago. 2005;

DURÃO, P.; BALBONTÍN, R.; GORDO, I. Evolutionary Mechanisms Shaping the Maintenance of Antibiotic Resistance. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 677–691, 2018;

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n. 4, p. 369–378, 2017;

GANJEWALA, D. *et al.* Antibacterial Properties of Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Steud) Wats Essential Oils in Single form and Combination of Honey Against Drug Resistant Pathogenic Bacteria. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, 4:4, 278-285., 2014;

GAO, H. *et al.* The transferability and evolution of NDM-1 and KPC-2 co-producing *Klebsiella pneumoniae* from clinical settings. **EBioMedicine**, v. 51, p. 102599, jan. 2020;

GAO, S. *et al.* Antimicrobial Activity of Lemongrass Essential Oil (*Cymbopogon flexuosus*) and Its Active Component Citral Against Dual-Species Biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida* Species. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 22 dez. 2020;

GAONKAR, R. *et al.* Essential oil from *Cymbopogon flexuosus* as the potential inhibitor for HSP90. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 489–496, 2018;

GHAFOURIAN S. *et al.* Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. **Current Issues in Molecular Biology**; vol. 17(1):11-22, 2015;

GÜNDEL, S. S. *et al.* Nanoemulsions containing *Cymbopogon flexuosus* essential oil: Development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. **Microbial Pathogenesis**, v. 118, p. 268–276, 2018;

HALL, B. G.; BARLOW M. Revised Ambler classification of β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Volume 55, Issue 6, June 2005, Pages 1050–1051;

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015;

HO, T. M.; ABIK, F.; MIKKONEN, K. S. An overview of nanoemulsion characterization via atomic force microscopy. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 62:18, 4908-4928, 2022;

HUSSEIN, N. H. *et al.* Mobilized colistin resistance (mcr) genes from 1 to 10: a comprehensive review. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 3, p. 2897–2907, mar. 2021;

JASKIEWICZ, M. *et al.* Methods Used for the Eradication of Staphylococcal Biofilms. **Antibiotics**, v. 8, n. 174, 2019;

KARAIKOS, I.; GIAMARELLOU, H. Carbapenem-Sparing Strategies for ESBL Producers: When and How. **Antibiotics**, v. 9, n. 2, p. 61, 2020;

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, 2018;

LEE, A. S. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, 2018;

LI, G. *et al.* Nanoemulsion-based delivery approaches for nutraceuticals: fabrication, application, characterization, biological fate, potential toxicity and future trends. **Food & Function**, v. 12, n. 5, p. 1933–1953, 2021;

LI, J. W.-H. .; VEDERAS, J. C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161–165, 2009;

LING, Z. *et al.* Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 11, p. 3087–3095, 2020;

LIU, Y.-Y. *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161–168, 2016;

LIVERMORE, D. M. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, n. 4, p. 557-84, 1995;

MACGOWAN, A.; MACNAUGHTON, E. Antibiotic resistance. **Medicine**, v. 45, n. 10, p. 622–628, 2017;

MARTINS, A. **Caracterização do cassete cromossômico mec (SCCmec) e análise fenotípica e molecular de resistência a oxacilina em estafilococos coagulase-negativa e *Staphylococcus aureus***. 2012. 136 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2012;

MENDES, R. E. *et al.* Metallo-beta-lactamases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 2, p. 103–113, abr. 2006;

MOREIRA, J. Resistência a colistina: papel do suíno como reservatório de genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* em sistemas de produção intensiva no Brasil. **Bvsalud.org**, p. 58–58, 2020;

MOTA, F. S. DA; OLIVEIRA, H. A. DE; SOUTO, R. C. F. Profile and prevalence of antimicrobial resistance of negative-Gram bacteria isolated from intensive care patients. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, 2018;

MUKARRAM, M. *et al.* Lemongrass Essential Oil Components with Antimicrobial and Anticancer Activities. **Antioxidants**, v. 11, n. 1, p. 20, 2021;

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, 2016;

MUNOZ-PRICE, L. S. *et al.* Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 9, p. 785–796, 2013;

- MURRAY, C. J. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022;
- OLIVEIRA, V. R. M.; PAIVA, M. C.; LIMA, W. G. Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: A systematic review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 31, p. 101459, 2019;
- OUSSALAH, M. *et al.* Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 414–420, 2007;
- OWUAMA, C. I. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a novel dilution tube method. **African Journal of Microbiology Research**, 11(23), 977-980, 2017;
- PALZKILL, T. Metallo- β -lactamase structure and function. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1277, n. 1, p. 91–104, 2012;
- PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. D. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. **Drugs**, v. 79, n. 14, p. 1529–1541, 2019;
- PORRECA, A. M.; SULLIVAN, K. V.; GALLAGHER, J. C. The Epidemiology, Evolution, and Treatment of KPC-Producing Organisms. **Current Infectious Disease Reports**, v. 20, n. 6, 2018;
- SABJAN, K. B. *et al.* Nanoemulsion as Oral Drug Delivery - A Review. **Current Drug Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 4–15, 2022;
- SHARMA, P. R. *et al.* Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 179, n. 2-3, p. 160–168, 2009;
- SILVA, K. C. DA; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91–99, 2012;
- SINGH, Y. *et al.* Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, 2017;
- SOUZA, E. M. D. *et al.* *Cymbopogon flexuosus* essential oil as an additive improves growth, biochemical and physiological responses and survival against *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. suppl 1, 2020;
- TEIXEIRA, A. R.; FIGUEIREDO, A. F.; FRANÇA, R. F. Resistência bacteriana relacionada ao uso indiscriminado de antibióticos. **Revista Saúde em Foco**, 11 ed., São Paulo, 2019;
- TIMMERMANS, M. *et al.* Colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-5*, including a case of triple occurrence (*mcr-1*, -3 and -5), in *Escherichia coli* isolates from faeces of healthy

pigs, cattle and poultry in Belgium, 2012–2016. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 57, n. 6, p. 106350, 2021;

UEHARA, Y. Current Status of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec). **Antibiotics**, v. 11, n. 1, p. 86, 2022;

UGBOGU, O. C. *et al.* A review on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities of clove basil (*Ocimum gratissimum L.*). **Heliyon**, v. 7, n. 11, p. e08404, 2021;

WHO. **Antimicrobial resistance**. World Health Organization. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>;

WHO. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**. World Health Organization. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>;

WOLTER, D. J. *et al.* Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, vol. 53,2: 557-62, 2009.