

Brazilian Journal of —
**HEALTH AND
PHARMACY**

Conselho Regional de Farmácia de Minas Gerais
Volume 04, Número 01, 2022



Prezados leitores e autores,

Temos o prazer de apresentar mais um número do periódico do Conselho Regional de Farmácia de Minas Gerais. As ações para indexação e valorização da Brazilian Journal of Health and Pharmacy continuam, sempre com o apoio da diretoria do CRF/MG. Grande é a gratidão aos autores que confiaram no trabalho e no crescimento deste projeto. A preciosidade deste projeto reside na sua importância como meio de divulgação da ciência desenvolvida em nosso país para levar informação atual, inovadora e relevante ao mundo acadêmico da saúde, mas principalmente ao profissional da saúde, em especial aos farmacêuticos. Em tempos de conflitos políticos e sociais, de alta demanda de assistência à saúde em todos os seus aspectos, o conhecimento permanece como poderosa ferramenta de alento e esperança por dias melhores. Assim, convido a todos para uma ótima leitura e que cada vez mais tenhamos artigos a serem publicados de forma gratuita e de qualidade.

Andrea Grabe Guimarães

Editor Chefe da BJHP

EDITORA CHEFE

Andrea Grabe Guimarães

Universidade Federal de Ouro Preto

EQUIPE EDITORIAL

Andrea Grabe Guimarães

Universidade Federal de Ouro Preto

Farah Maria D. Chequer Baldoni

Universidade Federal de São João del-Rei

Leonardo Meneghin Mendonça

Universidade Federal de Juiz de Fora

Micheline Rosa Silveira

Universidade Federal de Minas Gerais

Renata Aline Andrade

Universidade Federal dos Vales do

Jequitinhonha e Mucuri

Renata Cristina R. Macedo do Nascimento

Universidade Federal de Ouro Preto

Tiago Marques dos Reis

Universidade Federal de Alfenas

REVISORES

Angélica Rosa Faria

Universidade Federal de Alfenas

Bárbara Nobre Lafetá

Universidade Estadual de Montes Claros

Cristiane de Paula Rezende

Centro Universitário Newton Paiva

Cristiani Lopes Capistrano Gonçalves de Oliveira

Universidade Federal do Ceará

Emília Vitória da Silva

Universidade de Brasília

Fábio Antônio Colombo

Universidade Federal de Alfenas

Flávia Dias Marques Marinho

Universidade Federal de Ouro Preto

Gracielle Ferreira Andrade

Universidade Federal do Espírito Santo -UFES

Joaquim Maurício Duarte Almeida

Universidade Federal de São João Del Rei

Mariana Linhares Pereira

Universidade Federal de São João Del Rei

Ricardo Radighieri Rascado

Universidade Federal de Alfenas

Rondinelle Gomes Pereira

Faculdade Pitágoras de Governador Valadares

Sinézio Inácio da Silva Junior

Universidade Federal de Alfenas

Tássia Venga Mendes

Universidade Federal de Alfenas

Thales de Andrade Martins

Fundação Educacional da Região dos Lagos

Thays dos Santos Mendonça

Centro universitário UNA de Bom Despacho

Valéria Barbosa de Souza

Unicamp

Verônica Cristina Gomes Soares

Universidade Paulista

**CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA
DE MINAS GERAIS**

DIRETORIA CRF/MG – GESTÃO 2022/2023

Júnia Célia de Medeiros

Presidente

Márcia Cristina de Oliveira Alfenas

Vice-presidente

Christian Francisco De Matos

Secretário-geral

Sebastião José Ferreira

Diretor Tesoureiro

SECRETARIA ADMINISTRATIVA

Maria Cláudia Moreira de Faria

Waltovânio Cordeiro de Vasconcelos

COMUNICAÇÃO

Margarida Oliveira

DESIGN

Héllen Cota Torres

01

Percepção dos médicos da atenção primária em saúde de Ouro Preto e Mariana em prescrever benzodiazepínicos

Perception of primary health care physicians from Ouro Preto and Mariana on prescribing benzodiazepines

PAULO C. C. SANTOS; CRISTIANE P. REZENDE; CLÁUDIA S. B. RIBEIRO; LUANA A. PEDROSO; ELZA C. O. SEBASTIÃO.

13

Investigação da resistência aos betalactâmicos e da produção de betalactamase de espectro estendido (ESBL) em isolados de *Escherichia coli* uropatogênicas ciprofloxacina-resistente

Ciprofloxacin-resistant uropathogenic *Escherichia coli*: study of beta-lactam susceptibility profile and ESBL-mediated resistance

DEBORA VARGAS FARIAS, ADRIELLE PIEVE DE CASTRO, WILLIAM GUSTAVO LIMA, MAGNA CRISTINA DE PAIVA; ANGELA F. LOPES; MARÍLIA B. VISACRI

27

Avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico de folhas e cascas de *Eucalyptus globulus* Labill. frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Evaluation of the antibacterial activity of the ethanol extract of *Eucalyptus globulus* Labill. leaves and bark against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

DÉBORA MARRONI DE MIRANDA; MARINA PEREIRA ROCHA

39

Brine shrimp (*Artemia salina* Leach) as an alternative model for assessing the *in vivo* antioxidant activity of rutin

Artemia salina Leach como modelo alternativo para avaliação da atividade antioxidante *in vivo* da rutina

WILLIAM GUSTAVO LIMA; LETÍCIA BARBOSA SANTOS; WALESKA STEPHANIE DA CRUZ NIZE; RAQUEL OLIVEIRA CASTILHO; JÚLIO CÉSAR MOREIRA BRITO

Percepção dos médicos da atenção primária em saúde de Ouro Preto e Mariana em prescrever benzodiazepínicos

Perception of primary health care physicians from Ouro Preto and Mariana on prescribing benzodiazepines

Paulo C. C. Santos¹; Cristiane P. Rezende²; Cláudia S. B. Ribeiro³; Luana A. Pedroso⁴; Elza C. O. Sebastião^{*5}

1. Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte

2. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais

3. Farmácia Santa Luzia, Guiricema, MG.

4. Farmácia Escola, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Universitário, Morro do Cruzeiro. Ouro Preto, MG.

5. Departamento de Farmácia, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Universitário, Morro do Cruzeiro. Ouro Preto, MG.

***Autor correspondente:** Elza Conceição de Oliveira Sebastião. ORCID: 0000-0002-1324-8596. Departamento de Farmácia, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Universitário, Morro do Cruzeiro. Ouro Preto, MG. CEP 35400-000. E-mail: elza.sebastiao@ufop.edu.br

Data de Submissão: 19/05/2021; Data do Aceite: 20/01/2022.

Citar: Santos, P C C; Rezende, C P; Ribeiro, C S B; Pedroso, L A; Sebastião, E C O. Fatores determinantes da prescrição de benzodiazepínicos por médicos da atenção primária no Sistema Único de Saúde de Ouro Preto e Mariana. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v.4, n.1, p. 1-12, 2022. DOI: <https://doi.org/10.29327/226760.4.1-1>

RESUMO

A elevada utilização de benzodiazepínicos (BZD) para o tratamento de insônia e ansiedade desperta a necessidade de investigar os fatores que propiciam sua prescrição. Mediante isso, o presente trabalho tem como objetivo elencar os fatores determinantes da prescrição de BZD no tratamento de transtornos de saúde mental (TSM). Foi realizado um estudo descritivo, em outubro e novembro de 2019, utilizando-se questionário eletrônico via Google Forms com questões relacionadas à percepção de médicos sobre o uso de BZD. Os participantes da pesquisa foram médicos que atuavam na atenção primária em saúde do Sistema Único de Saúde (SUS) de Ouro Preto e Mariana. Dentre os dezoito médicos que participaram da pesquisa, a maioria assumiu a responsabilidade (61,1%) e a capacidade (55,6%) de tratar e diagnosticar TSM. Grande parte deles admitiu conhecer (88,2%) e saber (58,8%) manejar somente as principais reações adversas aos medicamentos (RAM) que prescreve. Alguns fatores relacionados aos pacientes considerados limitantes para o tratamento adequado de TSM foram: preocupação com RAM; relutância em consultar e tomar os medicamentos; e, estigmatização do diagnóstico. Outros fatores que podem favorecer a prescrição de BZD foram: limitações decorrentes da formação profissional; baixo conhecimento sobre tratamento e diagnóstico dessas condições/enfermidades; falta de domínio sobre medidas não farmacológicas. Ainda, os participantes apontaram que a falta de recursos terapêuticos alternativos disponibilizados no SUS dos municípios contribui para aumentar a prescrição de BZD. Apesar de conhecerem sobre a farmacoterapia e manejo de RAM, incluindo dependência e tolerância, os participantes demonstraram vivenciar uma angústia profissional entre a necessidade dos pacientes e a relação risco/benefícios da prescrição de BZD.

Palavras-chaves: Benzodiazepinas; Ansiolíticos; Uso de Medicamentos; Medicalização; Prescrições de Medicamentos

ABSTRACT

The high use of benzodiazepines (BZD) for the treatment of insomnia and anxiety arouses the need to investigate the factors that provide their prescription. Therefore, the present study aims to list the determining factors for the prescription of BZD in the treatment of mental health disorders (MHD). A descriptive study was carried out in October and November 2019, using an electronic questionnaire via Google Forms with questions related to the perception of doctors about the use of BZD. The participants were doctors who worked in primary health care in the Unified Health System (UHS) in Ouro Preto and Mariana. Among the eighteen physicians who participated in the research, the majority assumed responsibility (61.1%) and ability (55.6%) to treat and diagnose MHD. Most of them admitted having knowledge of adverse drug reactions (ADR). (88.2%) and knowing how to manage (58.8%) only the main ones of the drugs they are used to prescribe. Some factors related to patients considered limiting for the appropriate treatment of MHD were concern with ADR; reluctance to consult and take medications; and stigmatization of the diagnosis. Other factors that can favor the prescription of BZD were limitations resulting from professional training; low knowledge about treatment and diagnosis of these conditions / illnesses; lack of control over non-pharmacological measures. Still, the participants pointed out that the lack of alternative therapeutic resources available in the UHS of the municipalities contributes to increasing the prescription of BZD. Despite knowing about pharmacotherapy and management of ADR, including dependence and tolerance, the participants demonstrated to experience a professional anguish between the patients' need and the risk / benefit ratio of the BZD prescription.

Keywords: Benzodiazepines; Anti-anxiety agents; Drug utilization; Medicalization; Drug prescriptions.

INTRODUÇÃO

A patologização e medicalização de sentimentos e emoções têm sido percebidas por estudos farmacoepidemiológicos como uma verdadeira pandemia. Segundo dados coletados em 2015 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 3,6% da população mundial sofrem de transtornos de ansiedade, sendo cerca de três vezes maior essa incidência no Brasil (9,3%) (WHO, 2017). Na conjuntura atual do contexto da pandemia da COVID-19, estudos demonstram que transtornos de ansiedade, que já representavam um grande problema de saúde pública, se tornaram uma preocupação ainda maior, pois a incidência de ansiedade na população brasileira aumentou cerca de quatro vezes quando comparada com os dados de 2017, atingindo mais de 44%. Apesar de alarmantes, esses percentuais podem ser menores que a realidade, visto que os dados foram coletados *online*, excluindo, principalmente, a população de

baixa renda sem acesso à internet e a população geriátrica (CAMPOS *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2021).

Apesar de Freud (1996) ter afirmado que o mal-estar psíquico era inerente à condição humana, o sofrimento emocional cotidiano – manifestado por tristeza, timidez ou até mesmo situações de ansiedade fisiológica – tem sido interpretado como algo patológico, condições médicas nas quais preponderantemente devem ser manejadas pelo uso de psicofármacos (FERRAZZA *et al.*, 2010; ZANELLA *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2019).

Dentre os psicofármacos, os benzodiazepínicos (BZD) apresentam destaque no consumo, tornando-se uma preocupação para a comunidade acadêmica e para órgãos governamentais, tanto em termos de qualidade e (in) efetividade terapêutica, quanto pelo aspecto farmacoeconômico, uma vez que seu uso

crônico pode provocar iatrogênias e estas oneram os serviços de saúde público e privado, conformando uma cadeia do medicamento de *loop* infinito (FIRMINO *et al.*, 2012; AZEVEDO *et al.*, 2016; SILVEIRA *et al.*, 2016).

Em quase totalidade, a prescrição adequada de benzodiazepínicos perpassa pelo uso desses medicamentos para o manejo de sintomas agudos e por curto prazo, pois a relação benefício/risco favorável só se aplica quando o tempo de uso é de no máximo quatro semanas (POTTIE *et al.*, 2018). A partir desse período, é drasticamente aumentada a possibilidade de desenvolver reações adversas de tolerância e dependência psíquica e química. Dessa forma, são imprescindíveis o controle e o monitoramento do uso desses medicamentos (ZORZANELLI *et al.*, 2019).

Entretanto, segundo pesquisas, o uso de BZD tem sido majoritariamente feito de forma inadequada por períodos prolongados, inclusive por muitos anos, contradizendo as indicações clínicas (FIORELLI, ASSINI, 2017; FORSAN, 2010). Forsan (2010) justifica que tal fato decorre da (des) informação de prescritores, tanto na sua formação acadêmica, quanto na sua educação continuada. Contudo, para conter ou reverter os elevados índices de consumo de benzodiazepínicos no Brasil é imperativo não só promover capacitação dos prescritores, mas também adotar outras iniciativas que contribuem na resolução deste preocupante problema de saúde pública. Para isso, se faz necessário conhecer os fatores que propiciam a prescrição médica dos BZD. Mediante o exposto, o presente estudo teve como objetivo elencar os fatores determinantes da prescrição de BZD no tratamento de transtornos de saúde mental (TSM) entre médicos da atenção primária do SUS de Ouro Preto e Mariana, Minas Gerais.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo farmacoepidemiológico descritivo, aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) por meio do Parecer de número 3.628.079 (CAAE: 18965219.8.0000.5150).

Os participantes da pesquisa foram médicos do Sistema Único de Saúde (SUS) que atuavam na atenção primária em saúde (APS) da sede ou distritos de Ouro Preto e de Mariana, incluindo residentes em Saúde da Família e Comunidade. As Secretarias de Saúde, por meio das chefias da APS, forneceram os *e-mails* que constam no cadastro de cada potencial participante.

Nos meses de outubro e novembro de 2019, foi enviado um correio eletrônico para cada potencial participante contendo em seu corpo, uma apresentação e convite para participar deste projeto. O reenvio do email ocorreu em triplicata para os não respondentes, da seguinte forma: 1º reenvio: três dias após o 1º envio; 2º reenvio: sete dias após o 1º envio; 3º reenvio: 10 dias após o 1º envio. O formulário eletrônico ficou disponível para seu preenchimento por 35 dias.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi apresentado aos mesmos, e aqueles que após a leitura e compreensão do TCLE consentiram sua participação, preencheram o formulário eletrônico elaborado em *Google Forms*.

O instrumento utilizado no presente trabalho foi adaptado para o formato eletrônico daquele elaborado por Sebastião (2005). Tal instrumento continha questões objetivas e discursivas, de aspectos socioeconômicos, de formação acadêmica, de conhecimento sobre manejo de medicamentos para transtornos de saúde mental, além da

percepção individual sobre o consumo de BZD e uso de Práticas Integrativas e Complementares em Saúde (PICS). As questões objetivas apresentavam opções para indicação da melhor resposta, sendo que algumas perguntas não traziam respostas excludentes, ou seja, o participante poderia responder mais de uma opção.

Para identificar o perfil dos prescritores, foram elencadas questões pessoais (sexo, idade, formação acadêmica) e profissionais (tempo de trabalho, área de atuação, atendimentos). Enquanto para determinar os possíveis fatores que induzem e facilitam a prescrição de benzodiazepínicos, foram consideradas questões relacionadas ao conhecimento, habilidades e competências específicas, tais como diagnóstico e manejo de transtornos mentais, reações adversas dos benzodiazepínicos, fontes de informação e opiniões PICS em saúde mental.

Os dados coletados foram agrupados e analisados em um banco de dados do software Microsoft Office Excel®. A análise descritiva foi utilizada para detalhar tais dados, sendo determinadas medidas de frequência absoluta e relativa para variáveis qualitativas. Em adição, foram analisadas e apresentadas as respostas das questões discursivas, a fim de sumarizar as impressões, percepções e opiniões dos médicos em relação ao questionamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos os contatos eletrônicos de 57 médicos, sendo 26 de Mariana, 21 de Ouro Preto e 10 médicos do programa de residência em Medicina da Família e Comunidade (MFC) da UFOP. Dezoito profissionais responderam ao questionário, apresentando uma taxa de resposta de 31,6%. O instrumento não foi completamente preenchido por um participante, o que gerou um número total de respondentes diferente em alguns resultados.

Acredita-se que a taxa de resposta dos formulários foi influenciada pelo baixo acesso à internet das unidades básicas de saúde, à desatualização dos e-mails, aos e-mails direcionados para caixas de spam ou mesmo ao desinteresse em participar da pesquisa. Contudo, pode-se considerar que houve boa adesão dos profissionais ao estudo, uma vez que Vieira e colaboradores (2010) demonstram que a taxa de resposta para pesquisas enviadas por e-mail alcança em média 25%.

O perfil dos médicos participantes desse estudo está detalhado na Tabela 1. Vale salientar que este perfil é condizente com a pesquisa recente de Scheffer e colaboradores (2018), que discute o fenômeno de feminização dos médicos mais jovens, enquanto percebem-se maiores proporções de médicos homens em idades mais elevadas. Interessante também observar que segundo estes autores, parece haver preferência pelos médicos em cursar pós-graduação *lato sensu*, na modalidade de Residência Médica. Dos respondentes que referiram ter concluído alguma pós-graduação (n=12), a maioria (n=8; 66,67%) relatou Residência em Medicina e Saúde da Família, as demais foram: medicina do trabalho, medicina de urgência e gastroenterologia.

Na Tabela 2, estão apresentadas as frequências absolutas e relativas das respostas referentes às impressões, competências, habilidades e limitações no diagnóstico e/ou tratamento de TSM obtidas no questionário.

Ao observar os dados descritos na Tabela 2, percebe-se que a maioria reconhece que pode diagnosticar estes transtornos (88,9%) e tratá-los com medicamentos (83,3%), embora nem todos percebam que sejam de sua responsabilidade estes atos e nem que possam tratar tais condições com terapias não-medicamentosas. No estudo de Fernandes e colaboradores (2017), os participantes

Tabela 1 – Perfil dos participantes da pesquisa, médicos da atenção primária em saúde de Ouro Preto e Mariana, 2019.

Variáveis	n	%
Sexo		
Masculino	7	38,9
Feminino	11	61,1
Idade		
20-30 anos	8	44,4
31-40 anos	7	38,9
41- 50 anos	3	16,7
Universidade de formação		
Pública	13	72,2
Privada	4	22,2
Estrangeira	1	5,6
Possui pós-graduação?		
Não	6	33,3
Especialização	10	55,6
Mestrado	2	11,1
Tempo de atuação na mesma área		
Menos de 1 ano	4	22,2
1 a 3 anos	4	22,2
3 a 6 anos	3	16,7
6 a 8 anos	2	11,1
Mais de 8 anos	5	27,8
Tempo de atuação no Sistema Único de Saúde		
Menos de 1 ano	5	27,8
1 a 3 anos	3	16,7
3 a 6 anos	3	16,7
6 a 8 anos	2	11,1
Mais de 8 anos	5	27,8
Município de atuação		
Apenas em Mariana	5	27,8
Apenas em Ouro Preto	10	55,6
Em Mariana e Ouro Preto	2	11,1
Outros	1	5,6
Número de pacientes que atende por dia		
Até 10	1	5,6
11- 15	2	11,1
16-20	3	16,7
21 – 30	12	66,7
Total	18	100

afirmaram ser da responsabilidade específica dos médicos de MFC a identificação, diagnóstico, manuseio e referência dos pacientes acometidos por estes transtornos, já que realizam o primeiro contato com o usuário no sistema de saúde e possuem uma abordagem holística, integrada e centrada na pessoa.

Paralelamente, a maioria (n=11; 61,1%) dos participantes do presente estudo também reconhecem que as opções terapêuticas padronizadas na Relação Municipal de Medicamentos Essenciais (REMUME) em ambos os municípios são limitadas. Tais achados estão em consonância com o que Oliveira e colaboradores (2020) apontaram em seu estudo. A falta de opções terapêuticas mais seguras e efetivas para tratar transtornos de saúde mental não representa só a realidade de Ouro Preto e Mariana, mais ainda o contexto nacional, quando se observa a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais, sobretudo no que concerne ao manejo desses problemas de saúde na população geriátrica (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Desse modo, a falta de recursos farmacológicos e a necessidade de atender às demandas dos pacientes podem levar a indicação inadequada dos BDZ (FEGADOLLI *et al.*, 2019).

Pela análise dos questionários, percebeu-se que nenhum dos respondentes tinha pós-graduação em psiquiatria e/ou neurologia, contudo, 70% (n=7) dos respondentes com pós-graduação em MFC se consideram capazes e responsáveis por diagnosticar TSM e tratar com medicamentos e/ou terapias não medicamentosas. Em contraste, Pereira e Andrade (2018) evidenciam em seu estudo que os médicos em geral se sentiam despreparados ao atender pacientes de saúde mental, pontuando falhas na formação como um fator decisivo para essa condição. Achados desse estudo ainda apontaram que ansiedade e depressão foram os temas que mais necessitasse de aprendizado dentro da área de saúde mental, sendo

que mais de 80% desses profissionais relataram preocupações com diagnóstico e tratamento farmacológico para esses transtornos (PEREIRA, ANDRADE, 2018).

Tabela 2 – Impressões, competências, habilidades e limitações no diagnóstico e/ou tratamento de Transtorno de Saúde Mental (TSM) dos médicos da atenção primária em saúde de Ouro Preto e Mariana (n = 18), em 2019.

Variáveis	n	%
Impressão sobre atuação em TSM, especialmente ansiedade e depressão		
Eu posso diagnosticar TSM	16	88,9
Eu posso tratar TSM com medicamentos	15	83,3
Eu posso tratar TSM com terapias não medicamentosas	12	66,7
Tratar pacientes com TSM é minha responsabilidade	11	61,1
Diagnosticar TSM é minha responsabilidade	10	55,6
Limitações próprias para diagnóstico de TSM e monitoramento de reações adversas		
As opções terapêuticas padronizadas na REMUME são limitadas	11	61,1
Meu conhecimento sobre tratamento dessas condições/enfermidades é incompleto	8	44,4
O tempo da consulta é pouco para que eu aconselhe ou eduque o paciente	7	38,9
Há deficiência em tratamentos efetivos de efeitos adversos, tolerância ou dependência	6	33,3
O tempo da consulta é pouco para anamnese adequada	5	27,8
Meu conhecimento sobre critérios diagnósticos é incompleto	4	22,2
Não estou autorizado (a) pela SMS a prescrever os medicamentos padronizados na REMUME	0	0
Quanto aos pacientes, limitações do tratamento medicamentoso e seguimento terapêutico prescrito		
Paciente tem preocupações sobre reações adversas	7	38,9
Paciente ou sua família são relutantes em aceitar o diagnóstico	6	33,3
Paciente tem relutância em tomar os medicamentos	6	33,3
Paciente tem relutância em consultar um profissional	6	33,3
Outros problemas médicos do paciente são mais importantes pra ele que a reação adversa	1	5,6
Paciente tem medo de terapias não medicamentosas	1	5,6
Paciente não retorna para fazer seguimento	1	5,6
Custo dos medicamentos, poucas opções terapêuticas	1	5,6
Não sabe	1	5,6
Total	18	100

Legenda: REMUME: Relação Municipal de Medicamentos Essenciais; SMS: Secretaria Municipal de Saúde; TSM: Transtorno de Saúde Mental.

O medo do estigma ao ser diagnosticado como portador de TSM é uma grande barreira na busca de tratamento em saúde mental, tendo maior impacto que as barreiras estruturais (FUKUDA *et al.*, 2016), entretanto, a carência de uma rede de apoio em muitas unidades também contribui para a falha do tratamento. Um dos respondentes descreveu que:

“o paciente tem medo de terapias não medicamentosas não surtirem o efeito esperado dos medicamentos; as expectativas em relação ao curso de seus sintomas são de resolução de curto prazo, o que é trabalhado durante as consultas. Os pacientes também sentem falta da disponibilidade de outros profissionais, como psicólogos e terapeutas ocupacionais.”
(R05)

Essa declaração corrobora a afirmação de Santos e colaboradores (2019) sobre a necessidade de atenção multiprofissional e outras formas de terapia aliadas ao cuidado em saúde mental. Portanto, além dos personagens supracitados, o farmacêutico deve ser inserido na rede de apoio aos pacientes com TSM, visto que seriam os profissionais mais qualificados para avaliar se os medicamentos em uso são necessários, efetivos, seguros e convenientes para o paciente. Também, esses profissionais ao considerar a experiência subjetiva dos pacientes frente ao uso dos medicamentos psicotrópicos podem envolvê-los no seu próprio processo de cuidado, além de deixá-los mais engajados acerca do seu tratamento (SILVA *et al.*, 2018).

No presente estudo, a maioria dos respondentes relatou conhecer (88,2%; n=15), manejar (58,8%; n=10) e informar (76,5%; n=13) apenas as RAM e interações medicamentosas mais frequentes. Essas características no atendimento são preocupantes, pois, conforme Forsan (2010), a carência de informação sobre os efeitos adversos decorrentes

do uso de BZD é fator que favorece a cronificação do uso. Neste contexto, a assistência do profissional farmacêutico é fundamental, por ser profissional bem preparado para suprir a carência de informações sobre RAM. Um diálogo interprofissional entre médicos, psiquiatras e farmacêuticos pode nortear o uso e/ou a retirada do BDZ (ROSMAN *et al.*, 2011). Além disso, o farmacêutico promover a participação do paciente frente ao seu tratamento é fundamental para que este entenda os riscos e benefícios do uso dos BZD e participem da tomada de decisão a respeito de sua farmacoterapia (OLIVEIRA, NASCIMENTO, RAMALHO-DE-OLIVEIRA, 2020). Ademais, o farmacêutico também pode orientar o paciente sobre as reações adversas mais significativas e como manejá-las, além das formas de identificar e evitar a dependência e tolerância aos medicamentos psicofármacos, os quais ele utiliza (NEVES *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2019).

Outro achado importante observado foi que nem metade dos respondentes (n=7; 41,2%) declarou saber realizar completamente a desprescrição dos psicofármacos que prescrevem de maneira adequada, sendo que a maioria relatou ter dificuldades para executá-la. Frente a isso, a participação do farmacêutico no manejo da terapia dos pacientes, bem como no processo de desprescrição gradual, quando for o caso, se torna pertinente e importante para garantir que esta seja realizada de forma adequada. Ademais, para realizar a tomada de decisão acerca do uso de BZD, ou seja, se esse uso deve ou não continuar, é imprescindível que os profissionais de saúde consultem protocolos, aplicativos que auxiliem neste processo, bem como base de dados com informações sobre medicamentos – como *Up to date*, Micromedex®, drugs.com, whiteBook, entre outros. Tais atitudes minimizariam as chances do uso crônico desses medicamentos sem indicação terapêutica (NEVES *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2019).

Quando questionados sobre suas condutas no caso de o paciente solicitar uma receita de BZD ou outro psicofármaco e sobre sua 'sensação' ao prescrevê-los, foi interessante observar que os respondentes apontaram que o principal critério para prescrever estes fármacos seria a indicação somente mediante avaliação de real necessidade, mas que ainda assim não se sentiam muito seguros desta prescrição por conhecerem a frágil e nem sempre positiva relação benefício/risco do uso destes medicamentos. Houve um participante que relatou: *"Desconfortável, me sinto como um traficante de droga lícita. Sinto-me usado"* (R02).

Sentimentos similares foram relatados no estudo realizado na Noruega por Dybwad e colaboradores (1996) apud Forsan (2010) : *"a prática de prescrever benzodiazepínicos é uma das tarefas mais solicitadas e desconfortáveis, já que de alguma forma têm um sentimento de estarem praticando algo ilícito"*. E por Valle (2018) : *"Às vezes a gente até conversa entre si e parece que a gente está fazendo o trabalho de traficante de drogas. Que é só prescrever a medicação, só dar o remédio, sem de fato fazer uma consulta, sem abordar"*.

À luz destes achados pode-se notar que há mais de 20 anos o alto consumo de BDZ é preocupante e a sensação dos prescritores em nada difere. Isso muitas das vezes pode ser atribuído a relutância dos médicos aos *guidelines* de prescrição/desprescrição atuais, a falta de disponibilidade de psiquiatras para um melhor diagnóstico em saúde mental, a manutenção de uma boa relação com pacientes e a redução do limiar de sofrimento da população em geral (SIRDIFIELD *et al.*, 2013). Não obstante, o desconforto médico não impede a continuidade da prescrição de BZD por longo período devido sua aparente segurança (FEGADOLLI *et al.*, 2019).

Para tentar compreender as impressões dos participantes a respeito do consumo de BZD nos municípios

que estes trabalhavam, estão citados *ipsis litteris* alguns de seus relatos que indicam a necessidade de intensificar as ações no que concerne a divulgação de informações relacionadas ao uso de medicamentos:

"Falta de informação sobre o efeito dos medicamentos. E uso da medicação como uma "bengala" para problemas do seu cotidiano." (R02)

"Dependência química, ausência de abordagem sobre malefícios do uso crônico de benzodiazepínicos pela equipe de APS [...]" (R06)

"O consumo é muito alto e há muita relutância dos pacientes sobre o desmame e a parada. Muitos não acreditam que terão ou têm os efeitos colaterais do uso crônico dos benzodiazepínicos. É realmente uma "guerra" para a desprescrição e controle do uso dos benzodiazepínicos." (R18)

Percebe-se que os profissionais reconhecem o uso abusivo e indiscriminado de BDZ no cotidiano da sua prática médica, no entanto, alguns não percebem a sua própria parcela de contribuição, transferindo-a para outros prescritores. Como pode ser ilustrado com as seguintes falas: *"Percebo colegas que prescrevem com poucos critérios."* (R05); *"[...] prescrição indiscriminada por médicos da APS, urgência e psiquiatria"* (R06); *"Percebo uma prescrição disseminada e em grande número."* (R04); *"Prescrição desenfreada pelos próprios médicos, pouco conhecimento sobre os efeitos a curto e longo prazo, baixa adesão e baixa oferta de terapias não farmacológicas, pouca longitudinalidade na relação médico-paciente"* (R12).

Ao longo dos anos os prescritores têm mudado sua percepção quanto à prescrição de BDZ,

influenciados por alterações nos protocolos e diretrizes, introdução de novos medicamentos no mercado e maior controle por partes das agências reguladoras. Inicialmente acreditava-se que os BZD eram sinônimos de efetividade e ausência de efeitos adversos, porém, essa visão mudou, e hoje, são reconhecidos os problemas atrelados ao seu uso. Entretanto, ainda existe a utilização destes medicamentos como uma solução rápida do dia a dia, em consequência de alguns aspectos, tais como: tempo limitado de consultas; pressão por parte dos pacientes; e, até mesmo, falta de conhecimento sobre outras medidas de tratamento (SIRDIFIELD *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.* 2020).

Percebe-se que a prescrição contínua de BDZ para pacientes que não têm indicação terapêutica para tal, ainda é um problema de saúde pública e, portanto, intervenções educacionais são necessárias. Essas medidas não devem se limitar apenas a discussões sobre inadequações das prescrições e os danos decorrentes do uso de BDZ, mas deveriam englobar outras iniciativas, como: minimizar as barreiras que existem no processo de desprescrição, que configuram um processo traumático para ambos os lados (médicos e pacientes); e, promover o uso de medidas não farmacológicas como adoção de PICS (ROSMAN *et al.*, 2011; SIRDIFIELD *et al.*, 2013; MAGIN *et al.*, 2018)

Quanto a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, 88,2% dos respondentes (n=15) afirmou ter conhecimentos sobre, 82,4% (n=14) dos participantes demonstrou ter interesse pelas práticas e quando perguntados sobre a inclusão de fitoterapia 82,2% (n=15) dos respondentes se posicionou a favor. Acupuntura foi à única prática integrativa complementar que teve 100% de aceitação entre os respondentes, seguida por fitoterapia (76,5%), massagem terapêutica e práticas

corporais (ambas com 75%). Apesar de o presente estudo apontar sobre o conhecimento médico sobre as PICS, outros estudos sinalizam a necessidade de uma reformulação no ensino médico, com a incorporação das PICS ainda na graduação (THIAGO, TESSER, 2011; VARELA, AZEVEDO, 2014; PEREIRA, ANDRADE, 2018; COUTO *et al.*, 2018).

Embora a presente pesquisa não tivesse focado na oferta do acompanhamento farmacoterapêutico aos pacientes com TSM, é importante evidenciar que este serviço não era ofertado aos pacientes em ambos os municípios. A inserção do profissional farmacêutico na equipe de assistência a Saúde Mental é de fundamental importância para melhor esclarecimento sobre RAM, tolerância, dependência, adesão ao tratamento e apoio ao médico frente à pressão pela demanda de medicamentos psicofármacos pelos pacientes. Diversas formas de atuação profissional farmacêutica podem ser utilizadas para que esses pontos sejam alcançados, como realização de grupos de apoio, consultas farmacêuticas para acompanhamento farmacoterapêutico, elaboração de material informativo para profissionais de saúde, além de cartilhas e folders para os usuários.

Mediante o exposto, cabe ressaltar que as universidades têm um papel fundamental nessa mudança de cenário, visto que podem elaborar novos estudos que abordem esse assunto, visando identificar formas de contornar os problemas associados ao consumo abusivo de BZD e fornecer material para capacitação médica e dos demais profissionais da área da saúde, sendo capaz de atingir até a população leiga. Além disso, podem reestruturar os cursos de graduação em saúde – sobretudo os cursos de medicina e farmácia – para que estes contemplem essa temática.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo apontam que a maioria dos participantes assumiu a responsabilidade e a capacidade de tratar e diagnosticar TSM. Entretanto, grande parte deles admitiu conhecer e saber manejar somente as principais reações adversas aos medicamentos que prescreve. Também foi observado que fatores relacionados aos pacientes influenciaram na adequabilidade do tratamento de TSM, tais como: preocupação com RAM; relutância em consultar e tomar os medicamentos; e estigmatização do diagnóstico.

Paralelamente, foi encontrado que limitações decorrentes da formação profissional, o baixo conhecimento sobre tratamento e diagnóstico dessas condições/enfermidades e a falta de domínio sobre medidas não farmacológicas favoreceram a prescrição de BZD. Além disso, a falta de recursos terapêuticos alternativos disponibilizados no SUS dos municípios corrobora para o aumento da prescrição destes medicamentos. Acrescenta-se a esses achados que, apesar dos participantes conhecerem sobre a farmacoterapia e manejo de RAM, incluindo dependência e tolerância, eles demonstraram vivenciar uma angústia profissional entre a necessidade dos pacientes e a relação risco/benefícios da prescrição de BZD.

Portanto, para mudar a realidade do crescente uso de benzodiazepínicos de forma continuada é necessária uma ação conjunta que compreenda várias iniciativas, tais como: capacitação dos prescritores; envolvimento de outros profissionais de saúde no manejo dos sinais e sintomas de TSM – como psicólogos, assistentes sociais e farmacêuticos; engajamento dos pacientes e familiares acerca do tratamento do TSM, tanto no que se refere ao uso de medicamentos, quanto na introdução de abordagens não farmacológicas que contribuam no bem estar e melhora dos sinais e sintomas do TSM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, A.J.P.; ARAÚJO, A.A.; FERREIRA, M.A.F. Consumo de ansiolíticos benzodiazepínicos: uma correlação entre dados do SNGPC e indicadores sociodemográficos nas capitais brasileiras. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, n. 1, p. 83-90, 2016. DOI: 10.1590/1413-81232015211.15532014
- CAMPOS, J.A.D.B.; MARTINS, B.G.; CAMPOS, L.A.; MARÔCO, J.; SAADIQ, R.A.; RUANO, R. Early Psychological Impact of the COVID-19 Pandemic in Brazil: A National Survey. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 9, p. 2976, 2020. DOI: 10.3390/jcm9092976.
- COUTO, A.G.; BINZ, M.C.; MORAES, A.J.P.; CAETANO, B.L.S.; CUNHA, C.C. Conhecimento, uso e aceitação de acadêmicos de medicina sobre as práticas integrativas e complementares. **Vitalle – Revista de Ciência da Saúde**, v. 30, n. 1, p. 56-62, 2018. DOI: 10.14295/vitalle.v30i1.7448
- FEGADOLLI, C.; VARELA, N.M.D.; CARLINI, E.L.A. Uso e abuso de benzodiazepínicos na atenção primária à saúde: práticas profissionais no Brasil e em Cuba. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 35, n. 6, p. 1-11, 2019. DOI: 10.1590/0102-311X00097718
- FERNANDES, L.; BASÍLIO, N.; FIGUEIRA, S.; NUNES, J.M. Saúde Mental em Medicina Geral Familiar – obstáculos e expectativas percebidos pelos Médicos de Família. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 3, p. 797-805, 2017. DOI: 10.1590/1413-81232017223.33212016
- FERRAZZA, D.A.; LUZIO, C.A.; ROCHA, L.C.; SANCHES, R.R. A banalização da prescrição de psicofármacos em um ambulatório de saúde mental. **Paidéia**, v. 20, n. 47, p. 381-390, 2010. DOI: 10.1590/S0103-863X2010000300010
- FIORELLI, K.; ASSINI, F. L. The prescription of benzodiazepines in Brazil: a literature review. **ABCS Health Sciences**, v. 42, n. 1, p. 40-44, 2017. DOI: 10.7322/abcshs.v42i1.948
- FIRMINO, K.F.; ABREU, M.H.N.G.; PERINI, E.; MAGALHÃES, S.M.S. Utilização de benzodiazepínicos no Serviço Municipal de Saúde de Coronel Fabriciano, Minas Gerais. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 1, p. 157-166, 2012. DOI: 10.1590/S1413-81232012000100018
- FORSAN, M.A. **O uso indiscriminado de benzodiazepínicos: Uma análise crítica das práticas de prescrição, dispensação e uso prolongado**. 2010. Monografia do Curso apresentado do curso de Especialização em Atenção Básica em Saúde da Família – Universidade Federal de Minas Gerais – Campos Gerais.

FUKUDA, C.C.; PENSO, M.A.; AMPARO, D.M.; ALMEIDA, B.C.; MORAIS, C.A. Mental health of young Brazilians: Barriers to professional help-seeking. **Estudos de Psicologia**, v. 33, n. 2, p. 355-365, 2016. DOI: 10.1590/1982-02752016000200017

MAGIN, P.; TAPLEY, A.; DUNLOP, A.J.; DAVEY, A.; VAN DRIEL, M.; HOLLIDAY, E.; MORGAN, S.; HENDERSON, K.; BALL, J.; CATZIKIRIS, N.; MULQUINEY, K.; SPIKE, N.; KERR, R.; HOLLIDAY, S. Changes in Australian Early-Career General Practitioners' Benzodiazepine Prescribing: a Longitudinal Analysis. **Journal of General Internal Medicine**, v. 33, n. 10, p. 1676-1684, 2018. DOI: 10.1007/s11606-018-4577-5

OLIVEIRA, A.L.M.L.; NASCIMENTO, M.M.G.; CASTRO-COSTA, E.; FIRMO, J.O.A.; LIMA-COSTA, M.F.; LOYOLA FILHO, A.I. Aumento da utilização de benzodiazepínicos entre idosos mais velhos: Projeto Bambuí. **Revista Brasileira Epidemiologia**, v. 23, n. 1, 2020. DOI: 10.1590/1980-549720200029

PEREIRA, A.A.; ANDRADE, D.C.L. Estratégia Educacional em Saúde Mental para Médicos da Atenção Básica. **Revista Brasileira de Educação Médica**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 1, p. 4-12, 2018. DOI: 10.1590/1981-52712015v41n4RB20160021

NEVES, C.M.; NASCIMENTO, M.M.G.; SILVA, D.A.M.; RAMALHO-DE-OLIVEIRA, D. Clinical Results of Comprehensive Medication Management Services in Primary Care in Belo Horizonte. **Pharmacy**, v. 7, n. 58, p. 1-10, 2019. DOI: 10.3390/farmácia7020058

OLIVEIRA, I.V.; NASCIMENTO, Y.A.; RAMALHO-DE-OLIVEIRA, D. Decision-Making Process in Comprehensive Medication Management Services: From the Understanding to the Development of a Theoretical Model. **Pharmacy**, v. 8, n. 4, p. 180-198, 2020. DOI: 10.3390/farmácia8040180

POTTIE, K.; THOMPSON, W.; DAVIES, S.; GRENIER, J.; SADOWSKI, A.A.; WELCH, V.; HOLBROOK, A.; BOYD, C.; SWENSON, R.; MA, A.; FARREL, B. Deprescribing benzodiazepine receptor agonists. **Canadian Family Physician**, v. 64, n. 5, p. 339-351, 2018.

ROSMAN, S.; CAILLANT, M.L.; PELLETIER-FLEURY, N. Gaining insight into benzodiazepine prescribing in General Practice in France: a data-based study. **BMC Family Practice**, p.12-28, 2011. DOI: 10.1186/1471-2296-12-28.

SCHEFFER, M. *et al.* **Demografia Médica no Brasil 2018**. São Paulo, SP: FMUSP, CFM, Cremesp, 2018. 286 p. ISBN: 978-85-87077-55-4

SEBASTIÃO, E.C.O. **Intervenção farmacêutica na qualidade assistencial e nas reações adversas da amitriptilina prescrita para pacientes ambulatoriais do Sistema Único de Saúde de Ribeirão Preto (SP)**. 2005. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005. doi:10.11606/T.60.2005.tde-10052007-091141.

SANTOS, B.D.; NASCIMENTO, M.M.G.; OLIVEIRA, G.C.B.; NASCIMENTO, Y.A.; MABRINI, J.V.M.; STIEGERT, A.; PIOVESAN, T.G.C.; FERNANDES, L.B.; MARTINS, U.C.M.; NEVES, C.M.; SILVA, D.F.; OLIVEIRA, D.R. Clinical Impact of a Comprehensive Medication Management Service in Primary Health Care. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 34, n. 2, p. 265-271, 2019. DOI: 10.1177/0897190019866309.

SANTOS, P.C.C.; PEDROSO, L.A.; SEBASTIAO, E.C.O. O abuso de psicofármacos na atualidade e a medicalização da vida. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v. 1, n. 4, p. 6-10, 2019.

SILVA, D.A.M.; MENDONÇA, S.A.M.; OLIVEIRA, D.R.; CHAMELLO, C. A prática clínica do farmacêutico no núcleo de apoio à saúde a família. **Trabalho, Educação e Saúde**, v. 16, n. 2, p. 659-682, 2018. DOI: 10.1590/1981-7746-sol00108

SILVEIRA, S.T.D.; CARVALHO, A.R.V.; VECCHIA, M.D.; MELO, W. A Dispensação de Psicofármacos em um Município de Pequeno Porte: Considerações Acerca da Medicalização da Vida. **Psicologia em pesquisa**, v. 10, n. 1, p. 17-25, 2016. DOI: 10.24879/201600100010043

SIRDIFIELD, C.; ANTHIERENS, S.; CREUPELANDT, H.; CHIPCHASE, S.Y.; CHRISTIAENS, T.; SIRIWARDENA, AN. General practitioners' experiences and perceptions of benzodiazepine prescribing: systematic review and meta-synthesis. **BMC Family Practice**, v. 14, n. 191, p. 1-13, 2013. DOI: 10.1186/1471-2296-14-191.

SOUZA, A.S.R.; SOUZA, G.F.A.; SOUZA, G.A.; CORDEIRO, A.L.N.; PRACIANO, G.A.F.; ALVES, A.C.S.; SANTOS, A.C.; SILVA JUNIOR, J.R.; SOUZA, M.B.R. Factors associated with stress, anxiety, and depression during social distancing in Brazil. **Revista Saúde Pública**, v. 55, n. 5, p. 1-15, 2021. DOI: 10.11606/s1518-8787.2021055003152.

THIAGO, S.C.S.; TESSER, C.D. Percepção de médicos e enfermeiros da Estratégia de Saúde da Família sobre terapias complementares. **Revista Saúde Pública**, v. 45, n. 2, p. 249-257, 2011. DOI: 10.1590/S0034-89102011005000002

VALLE, M.A. **Análise da prescrição de benzodiazepínicos pelo médico de família em uma amostra no município do Rio de Janeiro**. 2018. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2018.

VARELA, D.S.S.; AZEVEDO, D.M. Saberes e práticas fitoterápicas de médicos na Estratégia Saúde da Família. **Trabalho, Educação e Saúde**, v. 12, n. 2, p. 273-290, 2014. DOI: 10.1590/S1981-77462014000200004

VICENS, C.; LEIVA, A.; BEJARANO, F.; SEMPERE, E.; RODRÍGUEZ-RINCÓN, R.M.; FIOL, F.; MENGUAL, M.; AJENJO, A.; DO PAZO, F.; MATEU, C.; FOLCH, S.; ALEGRET, S.; COLL, J.M.; MARTÍN-RABADÁN, M.; SOCIAS, I. Intervention to reduce benzodiazepine prescriptions in primary care, study protocol of a hybrid type 1 cluster randomised controlled trial: the BENZORED study. **BMJ Open**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2019. DOI: 10.1136/bmjopen-2018-022046

VIEIRA H.C.; CASTRO A.E.; SCHUCH JÚNIOR V.F. O uso de questionários via e-mail em pesquisas acadêmicas sob a ótica dos respondentes. **XIII SEMEAD Seminários em Adm.**, 2010. Disponível em: <http://www.ead.fea.usp.br/semead/13semead/resultado/trabalhosPDF/612.pdf>

WHO – World Health Organization. Depression and other common mental disorders: global health estimates. **Geneva: WHO**, 2017. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf>

ZANELLA, M.; LUZ, H.H.V.; BENETTI, I.C.; ROBERTI JUNIOR, J.P. Medicalização e saúde mental: Estratégias alternativas. **Revista Portuguesa de Enfermagem de Saúde Mental**, v. 15, p. 53-62, 2016.

ZORZANELLI, R.T.; GIORDANI, F.; GUARALDO, L.; MATOS, G.C.; BRITO JUNIOR, A.G.; OLIVEIRA, M.G.; SOUZA, R.M.; MOTA, R.Q.M.; ROZENFELD, S. Consumo do benzodiazepínico clonazepam (Rivotril®) no estado do Rio de Janeiro, Brasil, 2009-2013: estudo ecológico. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, n. 8, p. 3129-3140, 2019. DOI: 10.1590/1413-81232018248.23232017

Investigação da resistência aos betalactâmicos e da produção de betalactamase de espectro estendido (ESBL) em isolados de *Escherichia coli* uropatogênicas ciprofloxacina-resistente

Ciprofloxacin-resistant uropathogenic Escherichia coli: study of beta-lactam susceptibility profile and ESBL-mediated resistance

Debora Vargas Farias¹, Adrielle Pieve de Castro¹, William Gustavo Lima², Magna Cristina de Paiva^{1*}

1. Laboratório de Diagnóstico Laboratorial e Microbiologia Clínica. Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Centro-Oeste Dona Lindu, Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.

2. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

***Autor correspondente:** Magna Cristina de Paiva. <https://orcid.org/0000-0001-9375-7261>. Av. Sebastião Gonçalves Coelho, 400 – Chanadour, Divinópolis, MG – CEP 35.501-296. E-mail: magnacpaiva@ufsj.edu.br

Data de Submissão: 01/10/2021; Data do Aceite: 14/03/2022.

Citar: Farias, DV; Castro, AP; Lima W G; Paiva M C. Investigação da resistência aos betalactâmicos e da produção de betalactamase de espectro estendido (ESBL) em isolados de *Escherichia coli* uropatogênicas ciprofloxacina-resistente. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v.4, n.1, p. 13-26, 2022. DOI: <https://doi.org/10.29327/226760.4.1-2>

RESUMO

As infecções do trato urinário (ITU's) são frequentes na população e causadas, principalmente, por espécies da ordem Enterobacteriales, como *Escherichia coli*. As quinolonas são amplamente utilizadas no tratamento empírico, porém tem sido marcante o relato de falência terapêutica devido a resistência bacteriana à esta classe de antimicrobianos, sendo instituídas outras classes para o tratamento dessas ITUs, como os betalactâmicos. Consequentemente, a resistência à essa classe tem aumentado, sendo a inativação por enzimas betalactamases a principal causa, com grande destaque para as Enzimas Betalactamases de Espectro Estendido (ESBL) e as carbapenemases. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o perfil de suscetibilidade de *E. coli* uropatogênicas ciprofloxacina-resistentes aos principais betalactâmicos utilizados na clínica, bem como investigar a presença de enzimas ESBL entre esses isolados. O perfil de suscetibilidade aos betalactâmicos pela técnica de difusão em ágar e a investigação fenotípica pelo método de disco aproximação da produção de ESBL foram realizados de acordo com o *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2019) em um total de 52 isolados. 32,7% (17/52) dos isolados de *E. coli* foram sensíveis e 30,8% (16/52) intermediários aos betalactâmicos testados. Ainda, 11,5% (6/52) apresentaram resistência aos carbapenêmicos e foi detectada a produção de ESBL em 22 isolados (42,3%). Esses achados revelam a importância da investigação do contexto da suscetibilidade de *E. coli* resistentes a ciprofloxacina e alertam para a necessidade da revisão constante de protocolos de tratamento de ITUs e monitoramento da disseminação da resistência bacteriana a esses agentes de relevância clínica.

Palavras-chave: Infecção do trato urinário; *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC); Betalactamases de Espectro Estendido; β -lactâmicos; Resistência bacteriana.

ABSTRACT

Urinary tract infections (UTIs) are frequent in the population and are mainly caused by species of the Enterobacterial order, such as *Escherichia coli*. Quinolones are widely used in empirical treatment, but the report of therapeutic failure due to bacterial resistance to this class of antimicrobials has been striking, with other classes being instituted for the treatment of these UTIs, such as beta-lactams. Consequently, resistance to this class has increased, with inactivation by betalactamase enzymes being the main cause, with great emphasis on the Extended Spectrum Betalactamase Enzymes (ESBL) and carbapenemases. Thus, this study aimed to evaluate the susceptibility profile of ciprofloxacin-resistant uropathogenic *E.coli* to the main beta-lactams used in the clinic, as well as to investigate the presence of ESBL enzymes among these isolates. The β -lactam susceptibility profile by the agar diffusion technique and the phenotypic investigation by the disk approximation method of ESBL production were performed according to the *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2019) in 52 isolates of ciprofloxacin-resistant *E.coli*. 32.7% (17/52) of the isolates were sensitive and 30.8% (16/52) intermediate to the beta-lactams tested. Furthermore, 11.5% (6/52) were resistant to carbapenems and ESBL production was detected in 22 isolates (42.3%). These findings reveal the importance of investigating the context of the susceptibility of ciprofloxacin-resistant *E. coli* and highlight the need for constant review of UTI treatment protocols and monitoring of the spread of bacterial resistance to these clinically relevant compounds.

Keywords: Urinary tract infection; Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC); Extended Spectrum Betalactamase Enzymes (ESBL); Beta-lactams; Antimicrobial resistance.

INTRODUÇÃO

As infecções do trato urinário (ITU) são reconhecidas como as infecções bacterianas mais incidentes em todo o mundo. Estima-se que 150 milhões de pessoas são afetadas pelas ITUs anualmente, sendo que 40% das mulheres desenvolvem ao menos um episódio durante a vida e 11% delas tem pelo menos um caso ao ano (KAKIAN et al., 2019).

As ITUs são causadas mais frequentemente por bactérias Gram-negativas, sendo as principais espécies pertencentes à ordem Enterobacterales, como *Escherichia coli*, *Proteus spp.* e *Klebsiella pneumoniae* (LOPES, TAVARES, 2005). *E. coli* é responsável pela maior proporção de ITUs, seja em ambiente hospitalar ou na comunidade. O nicho de *E. coli* pode ser o meio ambiente, mas ela também faz parte da microbiota intestinal do homem e de outros animais. No entanto, existem patótipos desta espécie que adquiriram atributos específicos de

virulência, os quais conferem uma aumentada habilidade de adaptação a novos nichos, causando uma grande variedade de doenças, incluindo infecções do trato urinário, feridas, pneumonia em pacientes imunossuprimidos e meningite em neonatos (KAPER et al., 2004).

O patótipo de *E. coli* que causa ITU é denominado *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC), sendo distinto da *E. coli* comensal, com fenótipos epidemiologicamente associados envolvendo expressão de adesinas (fímbria tipo I, fímbria P, fímbria S), produção de toxinas (hemolisina, fator de necrose tumoral), sideróforos (aerobactina e enterobactina) e cápsula (KAPER et al., 2004).

Para o tratamento de ITU são utilizadas diversas classes de antimicrobianos, como por exemplo: aminoglicosídeos, betalactâmicos, sulfametoxazol-trimetropina, quinolonas, fosfomicina e nitrofurantoína (COSTA

et al., 2010). Dentre estas, as quinolonas constituem importantes fármacos contra estas infecções, possivelmente devido às altas concentrações renais alcançadas e amplo espectro de ação, justificando o emprego destas para tratamento de indivíduos com ITU, com grande destaque para a ciprofloxacina (PACHECO et al., 2009).

Por ser a mais recomendada para o tratamento de ITUs e, portanto, mais exposta às bactérias, tem sido relatado um aumento da resistência bacteriana a ciprofloxacina, que pode ser ocasionada por diversos mecanismos, entre eles, mutações de genes cromossômicos que codificam as DNA girase e topoisomerase IV; mutações em genes regulatórios da expressão de bombas de efluxo e da expressão de porinas da membrana externa (RUIZ, 2003).

Em infecções causadas por linhagens de UPECs resistentes as quinolonas, os antimicrobianos betalactâmicos figuram como uma opção terapêutica nesses casos. Desde a penicilina, vários outros betalactâmicos foram desenvolvidos e utilizados na clínica, incluindo cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. Estes antimicrobianos atuam como agentes bactericidas, interrompendo a formação da parede celular bacteriana e tem sido observado o uso crescente nas práticas médicas humanas, veterinárias e agrárias (BUSH; BRADFORD, 2016).

O uso indiscriminado dos betalactâmicos favoreceu o desenvolvimento da resistência bacteriana a esses fármacos e os mecanismos de resistência envolvem modificações estruturais das proteínas ligadoras de penicilina (PLP), alterações nos canais de porina específicos responsáveis pela difusão do fármaco e produção de enzimas betalactamases, codificadas pelo gene *bla*, capazes de hidrolisar o anel betalactâmico resultando na inativação do antimicrobiano e causando falha terapêutica (TSE et al., 2018).

Dentre as betalactamases, são destacadas as Enzimas Betalactamases de Espectro Estendido (ESBL; do inglês, *Extended-spectrum beta-lactamase*). O esquema de classificação das ESBLs baseia-se na preferência de substrato da enzima e na inativação na presença de inibidores específicos, sendo divididos em dois grupos: o grupo 2be, que incluem enzimas do tipo TEM, SHV e CTX-M, e grupo 2d, que agrupam enzimas ESBL do tipo OXA. Além disso, as betalactamases são classificadas em quatro grupos A, B, C e D segundo Ambler, considerando a similaridade entre as cadeias de aminoácidos das enzimas (BUSH; JACOBY, 2009).

Outro grupo de enzimas de grande relevância é o das carbapenemases, ativas contra os agentes betalactâmicos carbapenêmicos. As carbapenemases mais comuns pertencem as classes A (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, KPC; *Guiana extended spectrum*, GES); B (*New Delhi metallo-beta-lactamase*, NDM; *Verona imipenemase*, VIM; *Imipenemase*, IPM) e D (Oxacilinas, OXA 48, OXA 181) de Ambler e transferidas por elementos genéticos móveis (LOGAN, WEISNTEN, 2017). Essas classes são subdivididas em dois grandes grupos: as serino β -lactamases (classes A, C e D), onde as enzimas classe A, hidrolisam preferencialmente benzilpenicilina, com fraca hidrólise de cefalosporinas, carbapenêmicos ou monobactâmicos e o grupo das metalo- β -lactamases (classe B), que apresentam maior capacidade de hidrolisar carbapenêmicos e necessita de íons de zinco em seu sítio ativo para facilitar a hidrólise (BUSH; JACOBY, 2009).

Os genes que codificam para betalactamases são amplamente distribuídos e podem disseminar facilmente já que muitos deles se encontram em elementos genéticos móveis, como plasmídios, transposons e integrons. Além disso, tem sido relatado que estes elementos genéticos carregam genes de

resistência a outras classes de antimicrobianos, o que pode favorecer o surgimento de bactérias com fenótipo de multirresistência, comprometendo o sucesso terapêutico (SILVA; LINCOPAN, 2012).

Considerando a diversidade de mecanismos de resistência bacteriana e a grande disseminação dos genes codificadores de betalactamase, é de suma importância investigar o perfil de suscetibilidade aos betalactâmicos em espécies bacterianas clinicamente importantes como *E. coli*. Desta forma, o objetivo deste estudo é aumentar o conhecimento do contexto da resistência aos principais betalactâmicos bem como da circulação das enzimas ESBL entre isolados clínicos de *E. coli* uropatogênica resistentes a ciprofloxacina. Para o melhor do nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que busca caracterizar o perfil de resistência a agentes betalactâmicos e produção de ESBL na população de UPECs resistentes a ciprofloxacina no país. Os dados desta pesquisa poderão auxiliar na elaboração de protocolos de tratamento das ITUs e também das medidas de contenção da disseminação da resistência bacteriana a esses fármacos.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados bacterianos

Um total de 52 isolados de *E. coli* resistentes a ciprofloxacina recuperadas de urina de pacientes com ITU foram utilizadas neste estudo. Os isolados clínicos foram gentilmente cedidos pelos setores de Microbiologia dos Laboratórios LabVida (Hospital São João de Deus e São Judas), Prontolab (Hospital Santa Lucia) e BIOIMAGEM (Hospital Santa Mônica) – Divinópolis-MG. As amostras bacterianas foram cedidas sem qualquer informação sobre o paciente, tais como idade, sexo ou origem, apenas obedeceram aos critérios de seleção (*E. coli* resistente a ciprofloxacina), de acordo com as instruções dos respectivos comitês

de ética em pesquisa para isenção da aprovação do protocolo de pesquisa.

Para a identificação da espécie e determinação da resistência a ciprofloxacina foi utilizado o sistema automatizado VITEK 2®, versão 04.02 (bioMérieux, França), de acordo com as instruções do fabricante. Enterobacterales cuja concentração inibitória mínima (CIM) determinada pela técnica de microdiluição em caldo para ciprofloxacina é $\geq 1 \mu\text{g/mL}$ é classificado como resistente a este fármaco pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), Manual M100 S29, 2019.

As amostras foram armazenadas em caldo BHI (*Brain Heart infusion*, Difco) com glicerol 15% v/v e estocadas em freezer -80°C no Laboratório de Microscopia, Diagnóstico Laboratorial e Microbiologia Clínica do Campus Centro-Oeste Dona Lindu da Universidade Federal de São João del-Rei.

Para a realização dos experimentos, as amostras foram reativadas em 3,5 mL de caldo BHI duplo concentrado e incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, foram inoculadas em ágar Nutriente (Isofar, Brasil) para verificação da pureza e viabilidade, sendo assim conduzidas para a realização dos experimentos.

Determinação do perfil de suscetibilidade aos agentes betalactâmicos

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos imipenem (IPM), meropenem (MEM), ertapenem (ERT), ceftazidima (CAZ), ceftaxima (CTX) e amoxicilina/ácido clavulânico (AMC), foi determinado pela técnica de difusão de disco em ágar padronizada e interpretada segundo o Manual M100 S29, CLSI (2019), considerando os pontos de corte (*breakpoints*) estabelecidos

pelo mesmo. *Escherichia coli* American Type Culture Collection (ATCC) 25922 foi utilizada como controle dos experimentos.

Determinação fenotípica da produção de Enzima Betalactamase de Espectro Estendido (ESBL)

Os isolados de *E. coli* resistentes a ciprofloxacina foram submetidos ao teste fenotípico de dupla difusão de discos para determinação da produção de ESBL, utilizando os substratos antimicrobianos ceftazidima, aztreonam, ceftriaxona e cefotaxima e o inibidor de betalactamase ácido clavulânico, de acordo com o protocolo do CLSI (2019). Resumidamente, os substratos foram posicionados a uma distância de 20mm de um disco de amoxicilina/ácido clavulânico em uma placa de ágar Mueller Hinton previamente inoculada com a

suspensão bacteriana teste. A concentração celular do inóculo e os critérios de preparo seguiram as orientações do CLSI (2019). Após incubação a 37°C por 24 horas, a visualização de uma distorção de halo próximo a, pelo menos um, disco de substrato, configura resultado fenotípico de produtor de ESBL. *E. coli* AMP34 (ALVES-COELHO et al., 2021) foi utilizada como controle positivo dos experimentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, isolados de *E. coli* resistentes a ciprofloxacina (n=52) foram investigados quanto ao perfil de suscetibilidade aos fármacos betalactâmicos e a possível produção de mecanismo de resistência enzimática (ESBL) contra a ação destes agentes, cujos resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Perfil de suscetibilidade dos isolados de *Escherichia coli* ciprofloxacina-resistente aos agentes betalactâmicos.

Código	Antimicrobianos betalactâmicos									Produção de ESBL
	MEM	IMP	ERT	AMC	ATM	CRO	CAZ	CTX	CFO	
EC 01	S	R	I	R	R	R	R	R	R	+
EC 02	R	R	I	R	R	R	R	R	R	+
EC 03	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
EC 04	R	I	R	R	R	R	R	R	R	+
EC 05	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-
EC 06	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-
EC 07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
EC 08	S	S	S	S	S	S	S	S	I	-
EC 09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
EC 10	R	I	I	R	R	R	R	R	R	+
EC 11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
EC 12	S	S	S	S	S	S	I	S	S	-
EC 13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
EC 14	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
EC 15	S	S	S	S	S	R	S	S	S	-
EC 16	S	S	S	R	R	R	R	R	R	+
EC 17	S	S	I	R	R	R	R	R	R	+
EC 18	S	S	S	S	S	R	S	R	S	-

Código	Antimicrobianos betalactâmicos									Produção de ESBL
	MEM	IMP	ERT	AMC	ATM	CRO	CAZ	CTX	CFO	
EC 19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
EC 20	I*	S	S	S	S	S	S	S	S	-
EC 21	S	S	S	S	S	S	S	I	S	-
EC 22	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
EC 23	I	I	S	R	R	R	R	R	R	+
EC 24	S	S	S	S	S	S	I	S	S	-
EC 25	S	S	S	R	R	R	R	R	R	+
EC 26	I	I	I	R	R	R	R	R	R	+
EC 27	S	S	S	S	S	S	S	I	S	-
EC 28	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
EC 29	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
EC 30	S	S	S	R	R	R	R	R	R	+
EC 31	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
EC 32	S	S	S	R	R	R	R	R	R	+
EC 33	S	S	S	R	R	R	R	R	R	+
EC 34	S	S	S	S	S	S	I	S	S	-
EC 35	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
EC 36	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
EC 37	S	S	S	R	R	R	R	R	R	+
EC 38	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
EC 39	S	S	S	S	S	S	S	R	S	-
EC 40	S	S	S	R	R	R	R	R	R	+
EC 41	I	S	S	R	R	R	R	R	R	+
EC 42	S	S	S	R	R	R	R	R	R	+
EC 43	S	S	S	R	R	R	R	R	R	+
EC 44	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
EC 45	S	S	S	R	R	R	R	R	R	+
EC 46	I	I	I	R	R	R	R	R	R	+
EC 47	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
EC 48	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
EC 49	S	S	S	R	R	R	R	R	R	+
EC 50	S	S	S	R	R	R	R	R	R	+
EC 51	S	S	S	S	S	S	I	S	S	-
EC 52	S	S	S	R	R	R	R	R	R	+

Escherichia coli (EC); (Meropenem (MEM); Imipenem (IMP); Ertapenem (ERT); Amoxicilina/ácido clavulânico (AMC); Aztreonam (ATM); Ceftriaxona (CRO); Ceftazidima (CAZ); Cefotaxima (CTX); Cefoxitina (CFO); Sensível (S); Intermediário (I); Resistente (R) segundo o CLSI (2019); (+) Positivo, (-) Negativo.

Dentre os isolados de *E. coli* ciprofloxacina-resistentes estudados, 32,7% (17/52) foram sensíveis a todos os betalactâmicos testados. Possivelmente, a baixa suscetibilidade aqui observada pode estar relacionada ao amplo uso destes antimicrobianos no meio clínico para o tratamento de ITU (VERONIKA et al., 2010). SUÁREZ-TRUEBA et al. (2014) também relataram uma taxa de suscetibilidade menor que 50% entre cepas de *E. coli* isoladas de culturas de urina do Hospital Clínico Cirúrgico “Hermanos Ameijeiras” La Habana – Cuba. No Brasil, em um estudo conduzido em isolados de *E. coli* provenientes de uroculturas de pacientes gestantes atendidas em um hospital do Pará, também foi observada taxa de suscetibilidade aos betalactâmicos próxima da que foi aqui obtida (OLIVEIRA et al., 2016).

Em contraste aos nossos achados, TARLTON et al. (2019) mostraram uma taxa de sensibilidade de 69% dos isolados de UPEC aos betalactâmicos em um Serviço de Saúde da Universidade da Califórnia – Berkeley, enquanto em Santa Catarina – Brasil, VENTURIERI et al. (2019) encontraram suscetibilidade frente aos agentes betalactâmicos de 90% dos isolados de *E. coli*. Deve ser notado que as variações do perfil de suscetibilidade aos betalactâmicos em UPECs resistentes a ciprofloxacina podem ser atribuídas a diferenças de exposições dos pacientes a esses antimicrobianos, independentemente de serem da comunidade ou internado em uma unidade hospitalar (SILVA et al., 2017). Infecção do trato urinário é uma das patologias mais comuns, sendo contabilizados 150 milhões de casos anualmente, e apesar disso o acesso a exames microbiológicos para o diagnóstico e direcionamento da terapêutica ainda é muito limitado (PRICE et al., 2016). Assim, protocolos de tratamento regionalizados com base em estudos de suscetibilidade locais são empregados e dessa forma, antimicrobianos tais como aminoglicosídeos e sulfametoxazol-trimetoprima podem ser preferencialmente indicados (PRICE et al., 2016; SILVA et al., 2017).

Neste estudo, pôde ser observado que a resistência aos betalactâmicos estudados entre os isolados de *E. coli* ciprofloxacina-resistente ocorre em função da produção de ESBL em 42,3% dos isolados (22/52).

São descritos na literatura a produção de ESBL entre UPECs resistentes a fluoroquinolonas. A resistência a quinolonas envolve mutações cromossômicas nas regiões determinantes da resistência à quinolona (QRDR, do inglês, *quinolone resistance-determining regions*) que abrigam os genes que codificam a DNA-girase (*gyrA* e *gyrB*) e topoisomerase IV (*parC* e *parE*) ou transferência horizontal de genes da família *qnr*, *aac* (6') *Ib-cr*, *qepA* ou *oqxAB*, ou ainda, outros mecanismos como o aumento da atividade das bombas de efluxo, modificação do alvo ou inativação do antimicrobiano (HOOPER, JACOBY, 2016; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2016). Os genes que conferem resistência a quinolonas podem ser disseminados interespecie bacterianas via aquisição de plasmídios, que frequentemente carregam os genes que codificam ESBL, tais como *bla*_{CTX-M-15'}, *bla*_{CTX-M-14} e *bla*_{TEM-116}. Assim, tem sido relatado o aumento de bactérias, incluindo UPECs, resistentes simultaneamente a quinolonas e betalactâmicos, impondo desafios à terapêutica das ITUs (ARZAGUN et al., 2018).

Deve ser ressaltado que a produção de ESBL é um importante mecanismo de defesa das Enterobacterales, uma vez que ela é capaz de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de todas as gerações e monobactâmicos, diminuindo assim as opções terapêuticas. A prevalência de *E. coli* produtoras de ESBL tem aumentado nos últimos anos (32% em 2016 para 42% em 2017) e estudos relatam que as prevalências desses microrganismos variaram em diferentes regiões do mundo (BUSH; BRADFORD, 2016; FERNANDO et al., 2017; GONÇALVES et al., 2016).

No Brasil, as taxas de UPEC ESBL-positivas relatadas variam de 6,45% em infecções comunitárias no Rio Grande do Sul (MARTINS, PICOLI, 2011), a 65,38% no ambiente hospitalar no Amazonas (DINIZ, SANTOS, 2019). Assim, UPECs com este fenótipo estão distribuídas entre esses diferentes ambientes e a maior detecção em isolados hospitalares pode refletir a maior exposição bacteriana aos antimicrobianos destas classes bem como a maior triagem realizada nos casos mais graves (hospitalares) em detrimento dos mais leves (comunitários) (MALEKZADEGAN et al., 2018). Curiosamente, em um estudo realizado no Rio de Janeiro por DIAS et al. (2009), não foram observadas a produção de ESBL por isolados de *E. coli* uropatogênicas recuperadas de mulheres atendidas em uma clínica pública, o que pode estar relacionado com o desenho do estudo uma vez que os autores incluíram pacientes com ITU adquirida na comunidade e nosso estudo incluiu também pacientes com ITU hospitalar. No entanto, diante da alta taxa (32,7%) encontrada no presente estudo, mais pesquisas devem ser conduzidas a fim de monitorar esse perfil de resistência das UPECs no Brasil.

Em outros países, maiores taxas de UPEC ESBL-positivas já foram relatadas entre pacientes com ITU adquirido no ambiente hospitalar, tais como na China (55,5%) (QUAN et al., 2017), Nepal (62,13%) (YADAV, PRAKASH, 2017) e Índia (61,4%) (BASU, MUKHERJEE, 2018). Possivelmente as diferenças entre as taxas de *E. coli* ESBL-positivas se devem ao uso inadequado e excessivo de antimicrobianos nas diferentes áreas geográficas, para além do ambiente clínico (SEDIGHI ET AL., 2015; HASHEMIZADEH ET AL., 2019).

Interessantemente, neste estudo foram identificados isolados ESBL-negativos (58%, 30/52) resistentes a CRO (2, 3,8%), com suscetibilidade diminuída (intermediário) a CAZ (4, 7,7%), resistentes ou com

suscetibilidade diminuída (intermediário) a CFO (3, 5,7%) e CTX (4, 7,7%). Alguns estudos relatam a resistência à cefalosporinas entre isolados de *E. coli* ESBL-negativos. Na Inglaterra, a taxa de resistência a CTX observada em UPECs ESBL-negativas foi de 13,8% e de 21,3% para CAZ (ABERNETHY et al., 2017). BASU, MUKHERJEE (2018) apontam resistência de 9,03% para os antimicrobianos ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (CRO) e cefotaxima (CTX) em isolados ESBL-negativos recuperados de pacientes hospitalizados em Kolkata – Índia.

No Brasil as taxas de resistência foram de 9,23% concomitantemente para CAZ, CRO e CTX, em isolados de *E. coli* provenientes de pacientes adultos hospitalizados em UTIs no ano de 2015 (BRASIL, ANVISA, 2015). Além disso, FREITAS et al. (2016) encontraram uma taxa de resistência de 3,1%, 13,3% e 27,3%, respectivamente para os antimicrobianos CAZ, CRO e CTX, em isolados UPECs procedentes de ambulatórios e enfermarias em Bauru – SP. De uma maneira geral, parece que resistência as cefalosporinas mediada por mecanismos outros que ESBL ainda é baixa, o que é corroborado por Shahbazi et al. (2018) que não observaram resistência a CAZ, CRO e CTX em isolados ESBL-negativos de UPECs de origem hospitalar em Teerã – Irã.

O surgimento de isolados UPECs com fenótipo de resistência a múltiplos antimicrobianos, incluindo betalactâmicos, é considerado um sério problema, devido à limitação das alternativas para o tratamento de ITU. Neste estudo, um único isolado ESBL-negativo (EC 18) apresentou resistência a CRO e CTX simultaneamente. Possivelmente isso é atribuído à presença de outros mecanismos relacionados à resistência a cefalosporinas que incluem produção de outros tipos de betalactamases, redução da afinidade das proteínas ligadoras de penicilina (PLP), impermeabilidade de membrana celular bacteriana e aumento do efluxo do antimicrobiano (JACOBY, 2009).

Resistência ou suscetibilidade diminuída a CFO foi observada em dos isolados de UPEC resistentes a ciprofloxacina e ESBL-negativos correspondentes a 5,7% (3/52) dos isolados desta coleção. Na Coreia do Sul e no Irã, taxas de resistência a CFO descritas em UPECs foram, respectivamente, de 5,1% (LEE et al., 2015) e 15,5% (HAGHIGHATPANAH, MOJTAHEDI, 2019). No Brasil, taxas diversas de resistência a cefoxitina são relatadas, sendo de 11% no Hospital e Maternidade de São Paulo (ARAÚJO et al., 2012), 6,2% em um pronto atendimento no município de Rio Grande – RS (ARAÚJO et al., 2017) e 9,0% em amostras de ITU adquiridas na comunidade do Rio de Janeiro (DA SILVA et al., 2017).

Especificamente a resistência a CFO está associada à produção bacteriana, incluindo em muitos uropatógenos Gram-negativos, de enzimas betalactamases tipo AmpC as quais hidrolisam a maioria das penicilinas e cefalosporinas. Além disso, enzimas AmpC não são inibidas pelo ácido clavulânico, sulbactam ou tazobactam, fármacos frequentemente associados a betalactâmicos que inibem as ESBL, possibilitando assim o uso de betalactâmicos mesmo quando o isolado é produtor destas enzimas. A maioria das betalactamases AmpC são cromossômicas e podem ser encontradas em *Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Pseudomonas spp*, *Acinetobacter spp* e *Citrobacter spp*, porém, em 2007, foram detectados genes *bla_{AmpC}* mediados por plasmídeo, possibilitando a disseminação interespecies destas enzimas (JACOBY, 2009).

A resistência a cefoxitina tem sido considerada um marcador da presença da produção de AmpC em isolados bacterianos. No entanto, para a confirmação deve ser utilizada metodologia molecular para detecção do gene *blaAmpC*, uma vez que a expressão do gene com a codificação da enzima pode estar ocorrendo em níveis baixos (ou

basal) não refletindo fenotipicamente sua produção (JACOBY, 2009; BAJAJ et al., 2016).

Os carbapenêmicos imipenem (IMP), ertapenem (ERT), e meropenem (MEM) foram incluídos nesse estudo,sendoquecorrespondemosantimicrobianos betalactâmicos para os quais os isolados de *E. coli* apresentaram maior suscetibilidade (86,5%, 86,5% e 82,7%, respectivamente).

De uma maneira geral, a suscetibilidade aos carbapenêmicos entre isolados UPECs resistentes a ciprofloxacina é alta. Na Índia, Bajaj et al. (2016) mostraram que os isolados de UPEC foram altamente susceptíveis ao IMP e MEM, com uma taxa de sensibilidade de 90% para ambos. De forma semelhante, taxas de 100% de sensibilidade foram observadas para IMP e para o ERT, respectivamente em Getafe – Madri, Espanha (GRADOS et al., 2019) e no Departamento de Urologia do Hospital Universitário da Coreia (AHN et al., 2019).

No Brasil, resultados relativamente parecidos foram observados. Em um estudo conduzido na cidade do Rio de Janeiro, DIAS et al., (2009) encontraram taxa de 100% de sensibilidade ao MEM em isolados clínicos de *E. coli* ESBL positivos recuperados de uma instituição pública. Ainda no Rio de Janeiro, outro estudo conduzido em *E. coli* de um hospital de ensino superior, CORREAL et al., (2014) observaram taxas de sensibilidade acima de 91,5% para IMP e MEM. Assim, parece que ao longo dos anos a sensibilidade aos carbapenêmicos em UPECs tem se mantido no Brasil, tanto em isolados clínicos da comunidade quanto em isolados hospitalares.

Porém,apesardaaltasensibilidadeaoscarbapenêmicos observada neste estudo, isolados ESBL positivos apresentando resistência ao ERT (1/52, 1,9%), IMP (2/52, 3,8%) e MEM (3/52, 5,8%) foram detectados. Relatos de taxas maiores de resistência aos carbapenêmicos

em isolados de UPECs vêm sendo descritas, o que é motivo de preocupação. No Nepal, SHAH et al. (2019) encontraram resistência ao MEM em 20% dos isolados de *E. coli* provenientes de amostras de urina obtidas de pacientes de uma enfermaria.

No Brasil, alguns dados também são relatados. No Sudeste do Estado do Pará, foi observada uma taxa de resistência de 42% para o ERT em isolados UPECs provenientes de gestantes atendidas em um hospital (OLIVEIRA et al., 2016). Ainda, em um hospital de Goiânia foi encontrado resistência para os carbapenêmicos com taxas acima de 72,7% para os isolados UPECs (FERNANDES, 2017). Contudo, os resultados apresentados demonstram que, tem sido observada a resistência aos carbapenêmicos de uma maneira geral, em isolados clínicos hospitalares. Vale ressaltar que neste estudo foram incluídas *E. coli* recuperadas de pacientes da comunidade e hospitalizados e apesar da resistência aos carbapenêmicos parecer baixa, é preocupante por se tratar de antimicrobianos da última geração dos betalactâmicos.

Além da resistência completa aos carbapenêmicos, entre as *E. coli* ESBL-positivas dentro da coleção analisada nesse estudo, foi observada suscetibilidade reduzida aos carbapenêmicos IMP (5/52; 9,6%), ERT (6/52, 11,5%) e MEM (5/52, 9,6%), as quais são classificadas como intermediárias pelo CLSI (2019). A redução da sensibilidade aos carbapenêmicos pode ser causada, pela produção de enzimas carbapenemases e também pela alteração ou redução da expressão de porinas, e possivelmente também por proteínas ligadoras de penicilina; ou também pode ocorrer quando a enzima carbapenemase é pouco ou não expressa, mesmo na presença do gene codificador (NORDMAN, POIREL, 2014). Importante ressaltar que, aqui, a produção de ESBL pelos isolados bacterianos, que justificou a resistência aos outros

antimicrobianos betalactâmicos testados, não tem ação sobre os carbapenêmicos. Como hipótese para os achados possivelmente a resistência observada entre os isolados, pode ser devido à exposição prévia do paciente aos carbapenêmicos, o que favorece o surgimento da resistência bacteriana.

Interessante destacar também que um isolado ESBL-negativo (EC 20) e um positivo (EC41) apresentaram suscetibilidade diminuída (intermediário) apenas ao MEM. A sensibilidade ao IMP e resistência ao MEM em uma bactéria pode ocorrer mesmo na ausência da enzima carbapenemase. Isso se deve a outros mecanismos de resistência que incluem alteração de porinas, hiperexpressão de bombas de efluxo e/ou produção de enzimas cujo substrato preferencial poderia ser altamente específico e dirigido somente para um dos carbapenêmicos (HARINO et al., 2013). Estes mecanismos têm sido esporadicamente reportados entre amostras clínicas, mas uma investigação epidemiológica mais acurada é necessária para avaliar a importância clínica da presença destes mecanismos. De nota, este estudo, apesar de não incluir a investigação de mecanismos de resistência bacteriana contra carbapenêmicos, alerta para a necessidade de monitoramento da resistência a esses fármacos bem como de pesquisas visando ampliar o conhecimento dos mecanismos de resistência circulando entre amostras clínicas de *E. coli*.

CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou o contexto da suscetibilidade aos betalactâmicos amoxicilina/ácido clavulânico, aztreonam, ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima e cefoxitina em isolados de UPECs resistentes a ciprofloxacina e revelou que a resistência a esses fármacos vem ocorrendo na população estudada, o que limita as opções terapêuticas para o tratamento de ITUs. Foi possível observar resistência a esses betalactâmicos em 30,8% das

UPECs e este fenótipo está associado não apenas com a produção de enzimas ESBL, apesar deste ser o principal mecanismo de resistência (42,3% de positividade para ESBL entre os isolados testados). Além disso, o achado de que 11,5% dos isolados ESBL-positivos apresentam suscetibilidade diminuída aos carbapenêmicos (meropenem, imipenem e ertapenem) é relevante e alerta para a necessidade de monitoramento para contenção da disseminação da resistência bacteriana. Os resultados reforçam que estudos em UPECs devem ser intensificados para promover conhecimentos sempre atualizados possibilitando revisões frequentes de protocolos de tratamento de ITUs e assim, reduzir falências terapêuticas e minimizar o desenvolvimento e a disseminação da resistência bacteriana nesse contexto.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

D.V.F. realizou os testes de atividade antibacteriana dos betalactâmicos, identificação das ESBLs, manutenção/cultura dos microrganismos, e redação do manuscrito. A.P.C. auxiliou na manutenção/crescimento dos microrganismos, interpretação dos dados, e formatação e revisão crítica do manuscrito. W.G.L. realizou a revisão crítica do manuscrito. M.C.P. participou no desenho do estudo, desenvolvimento do conteúdo intelectual, e revisão crítica do manuscrito.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não existe qualquer conflito de interesse com instituições públicas ou privadas.

AGRADECIMENTOS

W.G.L. agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado. A.P.C. agradece a CAPES pela bolsa de mestrado.

Este trabalho está devidamente cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen, sob o número A4B543B.

REFERÊNCIAS

- ABERNETHY, J.; GUY, R.; SHERIDAN, E.A. et al. Epidemiology of *Escherichia coli* bacteraemia in England: results of an enhanced sentinel surveillance programme. **Journal of Hospital Infection**. v.95, n.4, p. 365-375, 2017. doi:10.1016/j.jhin.2016.12.008.
- AHN, S.T.; KIM, S.W.; KIM, J.W.; PARK, H.S.; MOON, D.G.; OH, M.M. Does urinary tract infection caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* show same antibiotic resistance when it recurs? **Journal of Infection and Chemotherapy**. v.25, n.7, p. 498-502, 2019. doi.org/10.1016/j.jiac.2019.02.006.
- ALVES-COELHO, N.; SILVA, R.S.; DELMONDES, G.M.; LIMA, W.G.; JENSEN, C.E.M.; PAIVA, M.C. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and carbapenemases among ampicillin-resistant Enterobacteriales recovered from a municipal raw sewage in Minas Gerais, Brazil. Aceito para publicação na **Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacêuticas**, v.50, n.3, dezembro 2021.
- ARAUJO, K.L.; QUEIROZ, A.C. Análise do perfil dos agentes causadores de infecção do trato urinário e dos pacientes portadores, atendidos no Hospital e Maternidade Metropolitano-SP. **Journal of the Health Sciences Institute**. v.30, n.1, p. 7–12, 2012.
- ARAUJO, P.M.; WILHELM, E.A.; LUCHESE, C. Prevalence of Urinary Tract Infections and the Profile of Susceptibility To Antimicrobials of Isolated Bacterial. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde**. v.18, n.02, p. 271–287, 2017.
- AZARGUN, R.; SADEGHI, M.R.; SOROUSH BARHAGHI, M.H. et al. The prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and ESBL-production in *Enterobacteriaceae* isolated from urinary tract infections. **Infection and Drug Resistance**. v.11, p. 1007-1014, 2018. doi:10.2147/idr.s160720.
- BAJAJ, P.; SINGH, N.S.; VIRDI, J.S. *Escherichia coli* β -Lactamases: What Really Matters. **Frontiers in Microbiology**. v. 7:417, 2016. doi:10.3389/fmicb.2016.00417.

BASU, S.; MUKHERJEE, M. Incidence and risk of co-transmission of plasmid-mediated quinolone resistance and extended-spectrum β -lactamase genes in fluoroquinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli*: a first study from Kolkata, India. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. v.14, p. 217–223, 2018. doi.org/10.1016/j.jgar.2018.03.009.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2015. ANVISA – Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. 2016, p. 83.

BUSH, K.; BRADFORD, P.A. B-Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v.6, n.8: a025247, 2016. doi: 10.1101/cshperspect.a025247.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.54, n.3, p.969–976, 2009. doi: 10.1128/aac.01009-09.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **CLSI supplement M100 -S29**. 29th ed. Wayne, PA: CLSI; 2019.

CORREAL, J.C.D.; SANT'ANNA, L.O.; CARVALHO, A.F.C. et al. Trimethoprim-sulfamethoxazole and fluoroquinolones Resistant *Escherichia coli* in Community-Acquired and Nosocomial Urinary Tract Infections in Rio De Janeiro, Brazil. **Journal of Infectious Diseases and Therapy**. v.02, n.06, p. 6–10, 2014. doi: 10.4172/2332-0877.1000192.

COSTA, L. C.; BELEM, L.F.; FREITAS E SILVA, P.M. et al. Infecções urinárias em pacientes ambulatoriais: prevalência e perfil de resistência aos antimicrobianos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 3, p. 175–180, 2010.

DA SILVA, A.P.S.; SOUSA, V.S.; MARTINS, N. et al. *Escherichia coli* sequence type 73 as a cause of community acquired urinary tract infection in men and women in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.88, n.01, p. 69–74, 2017. doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.01.024.

DIAS, R.C.S.; MARANGONI, D.V.; SMITH, S. et al. Clonal composition of *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infections in the state of Rio de

Janeiro, Brazil. **Microbial Drug Resistance**. v.15, n.04, p. 303–308, 2009. doi.org/10.1089/mdr.2009.0067.

DINIZ, A. M. M.; SANTOS, R. M. C. S. Ocorrência de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. produtoras de ESBL em Hospital Universitário, na cidade de Manaus – AM. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**. v. 9, n. 2, p. 4–8, 2019.

FERNANDES, L.C. **Perfil fenotípico e genético de enterobactérias produtoras de carbapenemase do tipo KPC em um Hospital de Goiânia**. 2017 Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Goiás-Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP).

FERNANDO, M.M.P.S.C.; LUKE, W.A.N.V.; MITHTHINDA, J.K.N.D. et al. Extended spectrum beta lactamase producing organisms causing urinary tract infections in Sri Lanka and their antibiotic susceptibility pattern -A hospital based cross sectional study. **BMC Infectious Diseases**. v.17, n.138, p. 1–6, 2017.

FREITAS, B.V.; DIORIO, S.M.; FUSARO, A.E. Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of uropathogens in patients treated at the Instituto Lauro de Souza Lima-Bauru/SP. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v.48, n.04, p. 375–380, 2016.

GONÇALVES, L.F.; MARTIN-JUNIOR, P.O.; MELO, A.B.F. et al. Multidrug resistance dissemination by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in the Central-Western Region, Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. v.6, p. 1–4, 2016. doi.org/10.1016/j.jgar.2016.02.003.

GRADOS, M.C.; THUISSARD, I. J.; ALÓS, J.I. Stratification by demographic and clinical data of the antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* from urinary tract infections of the community. **Atención Primaria**. v.51, n.8, p. 494–498, 2019. doi:10.1016/j.aprim.2018.06.004.

HAGHIGHATPANAH, M.; MOJTAHEDI, A. Characterization of antibiotic resistance and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from Iranian inpatients with urinary tract infections. **Infection and Drug Resistance**. v.12, p. 2747–2754, 2019. doi:10.2147/idr.s219696.

HARINO, T.; KAYAMA, S.; KUWAHARA, R. et al. Meropenem resistance in imipenem-susceptible meropenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates not detected by rapid automated testing systems. **Journal of Clinical Microbiology**. v.51, n.8, p. 2735–2738, 2013. doi:10.1128/jcm.02649

HASHEMIZADEH, Z.; SADEGHI, M.R.; SADEGHI, M.H.S. *et al.* Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and ESBLs genes in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections and fecal samples in Southeast Iran. **Gene Reports**. v.17:100487, 2019. doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100487.

HOOPER, D.C.; JACOBY, G.A. Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v.6, n.6(9) : a025320, 2016. doi: 10.1101/cshperspect.a025320.

JACOBY, G.A. AmpC β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**. v.22, n.1, p.161-182, 2009. doi: 10.1128/CMR.00036-08.

KAKIAN, F.; SHAHINI SHAMS ABADI, M.; GHOLIPOUR, A. *et al.* Evaluating the prevalence of virulence genes of *Escherichia coli* in patients affected by urinary tract infection. **Gene Reports**. v.16:100433, 2019, doi: 10.1016/j.genrep.2019.100433.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**. v.2, n.2, p. 123-140, 2004.

LEE, J.H.; SUBHADRA, B.; SON, Y.J. *et al.* Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. **Letters in Applied Microbiology**. v.62, n.01, p. 84–90, 2015. doi.org/10.1111/lam.12517.

LOGAN, L.K.; WEINSTEIN, R.A. The epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace. **The Journal of Infectious Diseases**. v.215 (suppl_1) : S28-S36, 2017. doi: 10.1093/infdis/jiw282.

LOPES, H.V.; TAVARES, W. Diagnóstico das infecções do trato urinário. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.51, n.16, p.306-308, 2005. doi: 10.1590/s0104-42302005000600008.

MALEKZADEGAN, Y.; KHASHEI, R.; EBRAHIM-SARAI, H.S.; JAHANABADI, Z. Distribution of virulence genes and their association with antimicrobial resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Iranian patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, p. 572-584, 2018.

MARTINS, A. C.; PICOLI, S. U. Métodos alternativos para detecção de betalactamase de espectro estendido

em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 47, n. 4, p. 421-426, 2011.

NORDMANN, P.; POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**. v.20, n.9, p.821-830, 2014. doi:10.1111/1469-0691.12719.

OLIVEIRA, R.A.; RIBEIRO, E.A.; GOMES, M.C.; COELHO, D.D.; TOMICH, G.M. Perfil de suscetibilidade de uropatógenos em gestantes atendidas em um hospital no sudeste do Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v.7, n.3, p.43-50, 2016. doi:10.5123/s2176-62232016000300005.

PACHECO, A.J.; PACHECO, A.J.; POLO, M.A.A., OSCAÑA, M.N. Resistencias a quinolonas en aislados clínicos de *Escherichia coli* productores de betalactamases de espectro estendido. **Higiene y Sanidad Ambiental**, v. 09, p. 449-466, 2009.

PRICE, T.K.; DUNE, T.; HILT, E.E.; THOMAS-WHITE, K.J.; KLIETHERMES, S.; BRINCAT, C.; BRUBAKER, L.; WOLFE, A.J.; MUELLER, E.R.; SCHRECKENBERGER, P.C. The Clinical Urine Culture: Enhanced Techniques Improve Detection of Clinically Relevant Microorganisms. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 54, n. 5, p. 1216-1222, 2016.

QUAN, J.; ZHAO, D.; LIU, L.; CHEN, Y.; ZHOU, J.; JIANG, Y.; DU, X.; ZHOU, Z.; AKOVA, M.; YU, Y. High prevalence of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in community-onset bloodstream infections in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.72, p. 273–280, 2017. doi: 10.1093/jac/dkw372.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J.M.; MACHUCA, J.; CANO, M.E.; CALVO, J.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL, A. Plasmid-mediated quinolone resistance: two decades on. **Drug Resistance Updates**. v.29, p.13-29, 2016. doi:10.1016/j.drug.2016.09.001.

RUIZ J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.51, n.5, p.1109-1117, 2003. doi: 10.1093/jac/dkg222.

SEDIGHI, I.; ARABESTANI, M.R.; RAHIMBAKHSH, A. *et al.* Dissemination of extended-spectrum β -lactamases and quinolone resistance genes among clinical isolates of uropathogenic *Escherichia coli* in children. **Jundishapur Journal of Microbiology**. v.08, n.07, 2015.

SHAH, C.; BARAL, R.; BARTAULA, B.; SHRESTHA, L.B. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. **BMC Microbiology**. v.19, n.204, 2019. doi: org/10.1186/s12866-019-1587-3.

SHAHBAZI, S.; ASADI KARAM, M.R.; HABIBI, M.; TALEBI, A.; BOUZARI, S. Distribution of extended-spectrum β -lactam, quinolone and carbapenem resistance genes, and genetic diversity among uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Tehran, Iran. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. v.14, p.118-125, 2018. doi: 10.1016/j.jgar.2018.03.006.

SILVA, K.C.; 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.

SILVA, R.C.R.M.; JÚNIOR, P.O.M.; GONÇALVES, L.F.; MARTINS, V.P.; MELO, A.B.F.; PITONDO-SILVA, A.; CAMPOS, T.A. Ciprofloxacin resistance in uropathogenic *Escherichia coli* isolates causing community-acquired urinary infections in Brasília, Brazil. **Journal Global of Antimicrobial Resistance**. v. 9, p. 61-67, 2017.

SUÁREZ-TRUEBA, B.; SAMPER, Y.M.; RIVERA, F.E. *et al.* Susceptibilidad antimicrobiana y mecanismos de resistencia de *Escherichia coli* aisladas a partir de urocultivos en un hospital de tercer nivel. **Revista Cubana de Medicina**. v.53, n.1, p. 3-13. 2014.

TARLTON, N.J.; MORITZ, C.; ADAMS-SAPPER, S.; RILEY, L.W. Genotypic analysis of uropathogenic *Escherichia coli* to understand factors that impact the prevalence of β -lactam-resistant urinary tract infections in a community. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. v.19, p.173-180, 2019. doi: 10.1016/j.jgar.2019.03.002.

TSE, A.; CHELUVAPPA, R.; SELVENDRAN, S. Post-appendectomy pelvic abscess with extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli*: a case report and review of literature. **World Journal of Clinical Cases**. v.6, n.16, p.1175-1181, 2018. doi: 10.12998/wjcc.v6.i16.1175.

VENTURIERI, V.R.; MASUKAWA, I.I.; NEVES, F. DE S. Antimicrobial susceptibility of urine culture bacterial isolates from a teaching hospital in Brazil. **Arquivos Catarinenses de Medicina**. v.48, n.1, p. 155-172, 2019.

VERÔNICA, J.W.; DRESER, A.; GONZALES, R. Trends in antibiotic utilization in eight Latin American countries, 1997-2007. **Revista Panamericana de Salud Pública**. v.48, n.1, p. 155-172, 2019. v. 27, n. 3, p. 219-25, 2010.

YADAV, K.; PRAKASH, S. Screening of ESBL Producing Multidrug Resistant *E. coli* from Urinary Tract Infection Suspected Cases in Southern Terai of Nepal. **Journal of Infectious Diseases and Diagnosis**. v.02, n02:116, n.02, 2017.

Avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico de folhas e cascas de *Eucalyptus globulus* Labill. frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Evaluation of the antibacterial activity of the ethanol extract of Eucalyptus globulus Labill. leaves and bark against Escherichia coli and Staphylococcus aureus

Débora Marroni de Miranda; Marina Pereira Rocha*

Centro Universitário UNA, Belo Horizonte, MG.

***Autor correspondente:** Marina Pereira Rocha. ORCID 0000-0002-8895-8920. Centro Universitário UNA, Campus Guajajaras, Rua dos Guajajaras, 175 – Centro, Belo Horizonte – MG, 30180-100 – Brasil. E-mail: marina.pereira@prof.una.br. Sistema Único de Saúde de Ouro Preto e Mariana.

Data de Submissão: 25/10/2021; Data do Aceite: 02/02/2022.

Citar: Miranda, D M; Rocha M P. Avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico de folhas e cascas de *Eucalyptus globulus* Labill. frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v.4, n.1, p. 27-38, 2022. DOI: <https://doi.org/10.29327/226760.4.1-3>

RESUMO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos disponíveis tem se tornado um grave problema de saúde pública em todo o mundo, pois além da dificuldade no tratamento das doenças infecciosas, representa um grande ônus para o sistema público de saúde. O presente estudo visa avaliar a atividade antibacteriana dos extratos de folhas e cascas de *Eucalyptus globulus* Labill. frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os extratos das folhas e cascas foram produzidos por maceração dinâmica com banho de ultrassom. A análise da atividade antibacteriana dos extratos foi realizada pelo método de disco difusão em Ágar Mueller-Hinton. Os resultados encontrados na análise dos dados do extrato etanólico demonstraram que *Eucalyptus globulus* apresenta atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, na concentração de 10 mg/mL, com diâmetros de halos de inibição de 10 mm e 9 mm, para folhas e cascas, respectivamente. Na análise dos dados para *Escherichia coli*, apenas o extrato etanólico das cascas de 10 mg/mL apresentou atividade antibacteriana, com halo de inibição de 18 mm. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram o potencial antimicrobiano dos extratos de folhas e cascas de *Eucalyptus globulus* e ampliam o espectro de ação biológica da espécie. Adicionalmente, contribui para o desenvolvimento de pesquisas futuras com o *Eucalyptus globulus*, como investigação detalhada da composição química e determinação da concentração inibitória mínima, visando investigar a ação antimicrobiana da espécie. Além disso, esse estudo contribui com a valorização de espécies vegetais da biodiversidade mineira.

Palavras-chave: *Eucalyptus globulus* Labill; *Eucalipto*; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão*.

ABSTRACT

Bacterial resistance to available antimicrobials has become a serious public health problem worldwide, as in addition to the difficulty in treating infectious diseases, it represents a great burden for the public health system. The present study aimed to evaluate an antibacterial activity of extracts from leaves and bark of *Eucalyptus globulus* Labill. against *Escherichia*

coli and *Staphylococcus aureus*. The extracts of leaves and bark were obtained by dynamic maceration with an ultrasound bath. The analysis of the antibacterial activity of the extracts was performed using the disk diffusion method in Mueller-Hinton Agar. The results found in the analysis of the ethanol extract data showed that *Eucalyptus globulus* has antibacterial activity on *Staphylococcus aureus*, at a concentration of 10 mg/mL, with diameters of inhibition halos of 10 mm and 9 mm, for leaves and bark, respectively. In the analysis of data for *Escherichia coli*, only the ethanol extract of the 10 mg/mL bark has antibacterial activity, with an inhibition halo of 18 mm. The results demonstrated the antimicrobial potential of *Eucalyptus globulus* leaf and bark extracts and broaden the species' biological action spectrum, in addition to contributing to the development of future research with *Eucalyptus globulus*, such as detailed investigation of the chemical composition and determination of minimum inhibitory concentration aiming to investigate the antimicrobial action of the species. In addition, this study contributes to the appreciation of plant species from Minas Gerais biodiversity.

Keywords: *Eucalyptus globulus* Labill; *Eucalyptus*; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; Disk Diffusion Antimicrobial Tests.

INTRODUÇÃO

O surgimento e a disseminação de patógenos que adquiriram novos mecanismos de resistência a medicamentos (RAM) já existentes ameaçam a capacidade de tratar infecções comuns e, consequentemente, a saúde da sociedade global. A RAM ocorre naturalmente ao longo do tempo, geralmente por meio de alterações genéticas, sendo que esses organismos resistentes a antimicrobianos são encontrados em pessoas, animais, alimentos, plantas e no meio ambiente (na água, solo e ar). Os principais motivadores da resistência antimicrobiana incluem o uso incorreto e excessivo de antimicrobianos; falta de acesso a água potável, saneamento e higiene; prevenção e controle precários de infecções e doenças em estabelecimentos de saúde e áreas rurais; falta de consciência e conhecimento e falta de aplicação da legislação (WHO, 2020).

É notório que a resistência bacteriana é um problema de saúde pública atual. No entanto, estudos apontam que esse fenômeno pode se intensificar devido à pandemia de COVID-19, o que acarreta preocupações. Este fato está associado ao uso de antimicrobianos que têm sido utilizados

tanto com objetivo profilático à COVID-19 quanto para tratar coinfeções bacterianas, comuns em pacientes com infecções virais, podendo, assim, acarretar o desenvolvimento de resistência aos medicamentos antimicrobianos disponíveis, devido ao uso indevido desses medicamentos (SCHUELER, 2020). Além disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima que em torno de 700 mil pessoas morrem anualmente devido a doenças resistentes a medicamentos antimicrobianos, e um alerta emitido em 2019 indica que o número de mortes pode chegar a 10 milhões anualmente até 2050, de acordo com o cenário global atual (OMS, 2019).

Diante disso, é indispensável a busca por novas alternativas no tratamento antibacteriano, sendo que os produtos naturais são considerados uma fonte promissora na descoberta de novas substâncias bioativas, cuja a contribuição no arsenal terapêutico é evidenciada há milhares de anos. Ainda, as substâncias que podem ser obtidas por fontes naturais são alternativas inovadoras, devido à grande biodiversidade brasileira e mundial e ao uso etnofarmacológico relacionado ao uso de espécies vegetais medicinais (GUIMARÃES *et al.*, 2010)

O *Eucalyptus globulus* Labill., popularmente conhecido como Eucalipto, é uma planta de grande interesse industrial e medicinal, devido à sua facilidade de adaptação nas regiões de plantio e aos inúmeros usos e produtos gerados (EMBRAPA, 2019). As folhas e cascas do Eucalipto são utilizadas na medicina tradicional há milhares de anos com potencial para tratar úlceras, doença de Chagas, dermatites e problemas respiratórios (FURTADO *et al.*, 2015). Além disso, estudos já demonstraram que o Eucalipto possui atividade bactericida devido aos princípios ativos encontrados nas cascas e folhas dos Eucaliptos, como: alcaloides, fenólicos, taninos, mucilagens (GOMES *et al.*, 2019). No entanto, os estudos avaliando os extratos de diferentes partes da planta, como as cascas, ainda são incipientes.

Neste contexto, o presente estudo visa avaliar a atividade antibacteriana do extrato etanólico de folhas e cascas do Eucalipto frente à *E. coli* e *S. aureus* pelo método de disco-difusão, visando corroborar o seu uso tradicional e contribuir com estudos que podem subsidiar a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos de origem natural.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e processamento do material vegetal

O material vegetal de folhas e cascas de *Eucalyptus globulus* Labill. foi coletado em local de plantação, sem agrotóxicos, na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais – Brasil, de coordenadas: 19°50'27"S / 44°01'02"W / altitude em relação ao nível do mar: 894 metros. Ambos os materiais vegetais foram identificados e herborizados no Centro Universitário Una pela botânica Érica Fernanda Borsali e foi realizado o depósito de exsicata. Tanto as cascas quanto as folhas foram selecionadas fenotipicamente e secas em estufa, com circulação de ar a 60 °C até a secagem completa do material vegetal. Posteriormente, os materiais vegetais foram

pulverizados em moinhos de facas e obteve-se 50,06 g de cascas e 44,54 g de folhas pulverizadas.

Preparo do extrato etanólico de folhas e cascas

O procedimento extrativo foi realizado segundo Ribeiro e colaboradores (2009) com adaptações. Em béquero de 500 mL foram colocados 44,54 g de folhas secas e pulverizadas e 100 mL de álcool etílico Drako® a 96° GL, até cobrir o material vegetal por inteiro. O mesmo foi realizado para as cascas com 50,06 g de material vegetal seco e pulverizado de Eucalipto e 300 mL de álcool etílico Drako® a 96° GL. As duas soluções foram levadas ao banho de ultrassom Unique Max Clean 1400® para que pudesse ser extraído pelo método de maceração dinâmica, por 10 minutos. O extrato foi filtrado em filtro de papel. Os dois procedimentos, tanto o banho de ultrassom quanto a filtração, foram repetidos, totalizando três extrações. Os derivados vegetais obtidos foram reunidos e concentrados em chapa aquecedora Solab SL-141/A® até 60°C, até que o solvente fosse evaporado, obtendo-se os extratos secos com os seguintes rendimentos: 5,5% para folhas, e 20,31% para as cascas.

Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos etanólicos pelo método de disco-difusão

A pesquisa da potencial atividade antibacteriana dos extratos etanólicos de *Eucalyptus globulus* Labill. foi avaliada pelo método de disco-difusão em ágar utilizando discos de 6 mm, impregnados com 20 µL dos extratos etanólicos de folhas e cascas na concentração de 1 e 10 mg/mL, que foram avaliados como inibidores do crescimento das espécies padrões de *Escherichia coli* ATCC 11775 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Preparo da suspensão bacteriana

Seguindo a metodologia do Clinical & Laboratory Standards Institute (2013) a suspensão bacteriana

usada para o antibiograma corresponde a 0,5 da escala de McFarland, que propõe aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) /mL. Foi realizado um tubo padrão obtido com 99,45 mL de solução de cloreto de bário, Dinâmica Química Contemporânea Ltda., e 0,55 mL de ácido sulfúrico a 1%, Neon®. Para o preparo da suspensão bacteriana, foi utilizado tubo de ensaio com salina estéril a 0,9% e o inóculo dos micro-organismos cultivados em placa de petri. Portanto, para obtenção da suspensão os micro-organismos cultivados foram inoculados com o auxílio da alça até turvação equivalente com 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), anteriormente preparado. Os tubos foram agitados e foi feita a comparação visual da turvação ocasionada pelas bactérias. Uma vez padronizada, a suspensão foi utilizada para a inoculação na placa, conforme descrito por Silva, Nunan e Rocha (2019).

Inoculação das placas de teste

Para inoculação das amostras na placa teste, utilizou-se um *swab* embebido com as suspensões bacterianas de *S. aureus* e *E. coli* padronizadas na concentração 0,5 da escala de McFarland para semeadura dos micro-organismos em toda a superfície da placa de Petri, para que a distribuição do inóculo fosse uniforme. Após a semeadura, foi aguardado 10 minutos em temperatura ambiente para secagem da placa e absorção completa do inóculo antes de adicionar os discos (SILVA; NUNAN; ROCHA, 2019).

Técnica microbiológica: disco-difusão

Para o método de difusão em ágar foi utilizado o meio ágar Mueller Hinton Kasvi®, realizado segundo Clinical & Laboratory Standards Institute (2013), com adaptações de Silva, Nunan e Rocha (2019). Os dois extratos preparados (folhas e casca) foram pesados e ressuspensos em etanol, em suas concentrações (1 e 10 mg/mL). Os eppendorfs

foram levados ao banho de ultrassom para melhor dissolução. Cloranfenicol 30 µg/mL e etanol 96 °GL foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente, após serem impregnados aos discos e serem posteriormente secos por evaporação. Todas as amostras foram incorporadas aos discos de 6 mm. As placas de Petri de 150 mm foram divididas em quatro quadrantes para estabelecer o lugar a serem colocados os discos.

Na mesma placa foram colocados dois discos referentes aos extratos etanólicos das folhas, em duas concentrações distintas, 1 mg/mL e 10 mg/mL, e dois discos com os extratos etanólicos das cascas em duas concentrações também, 1 mg/mL e 10 mg/mL, em duplicata. Ainda, foram colocados dois discos com o controle positivo (Cloranfenicol 30 µg) e dois discos com o controle negativo (etanol evaporado). Foram utilizados volumes iguais para todas as amostras (20 µL).

Após a semeadura, as placas foram invertidas e incubadas na estufa Solab® SL-101 a 37°C por 24h, para posterior leitura e interpretação dos resultados. A medida dos halos de inibição foi realizada com o auxílio de um paquímetro e os resultados foram avaliados estatisticamente e descritos como média e desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação da potencial atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de folhas e cascas de *Eucalyptus globulus*, observou-se que para a bactéria *Escherichia coli* não houve inibição do crescimento microbiano nos seguintes extratos etanólicos e concentrações: folhas (1 mg/mL e 10 mg/mL) e cascas de 1 mg/mL. O extrato etanólico da casca (10 mg/mL) apresentou inibição do crescimento microbiano frente à *E. coli* com halo de inibição de 18 mm de diâmetro (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores de halos de inibição (mm) dos extratos etanólicos de folhas e cascas de *Eucalyptus globulus* Labill. nas concentrações de 1 mg/mL e 10 mg/mL frente à *Escherichia coli*.

	<i>Escherichia coli</i>							
	EXTRATOS ETANÓLICOS				CONTROLES			
	FOLHAS		CASCAS		POSITIVO (Cloranfenicol 30µg/mL)		NEGATIVO (Etanol)	
RÉPLICA	1 mg	10 mg	1 mg	10 mg	Disco 1	Disco 2	Disco 1	Disco 2
PLACA 1	SI	SI	SI	18 mm	SI	SI	SI	SI
PLACA 2	SI	SI	SI	18 mm	-	-	-	-
MÉDIA	0	0	0	18 mm	0		0	
DESVIO PADRÃO	0	0	0	0	0		0	

*SI – sem inibição

Observou-se que os discos impregnados com etanol (controle negativo) não apresentaram inibição do crescimento microbiano, comprovando que não interferiu na formação dos halos de inibição observados nos extratos. Porém, o controle positivo utilizado (Cloranfenicol 30 µg) não apresentou inibição do crescimento bacteriano, corroborando os achados de Franco *et al.* (2010), que obtiveram como resultado que as cepas de *E. coli* estudadas como *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC – B0125, C086, C0126 e C0128), *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC – A029) e *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC – 0157) eram resistentes ao Cloranfenicol. Ainda, Costa *et al.* (2006) isolaram 53 cepas de *E. coli* de suínos com diarreia, obtendo como resultado que 21 eram resistentes ao Cloranfenicol. O valor menos expressivo pode ser devido ao crescente aumento da resistência bacteriana entre as enterobactérias, visto que o estudo foi feito em 2006. Estes resultados estão de acordo com os achados neste experimento.

Além disso, um estudo realizado por Brito e Tagliari (2010) investigou a sensibilidade antimicrobiana

de *E. coli*, constatando que a mesma possuía alta resistência aos medicamentos estudados por eles, que incluem estreptomicina, sulfonamidas, tetraciclina e cloranfenicol. As bactérias Gram-negativas são intrinsecamente menos permeáveis a muitos antimicrobianos, pois sua membrana externa forma uma barreira de permeabilidade. A resistência de *E. coli* ao Cloranfenicol já foi descrita por Torres (2016) demonstrando a ocorrência por dois mecanismos principais: (1) Inativação enzimática mediada por acetilação que envolve a modificação no gene *cat*, que confere resistência de alto nível codificando a estrutura do Cloranfenicol e (2) Redução da permeabilidade da membrana sendo responsáveis os genes *florR* e *cmlA*.

Além disso, a cepa utilizada é uropatogênica (cepa referência para fazer antibiograma em pacientes com infecção urinária), que possui características que a torna mais patogênica para o sistema urinário e intrinsecamente resistentes ao cloranfenicol. *E. coli* uropatogênica causa infecção do trato urinário através do gene que codifica as fímbrias, que são apêndices filamentosos capazes de aderirem ao

trato urinário. Por ser um gene plasmidial, ele é instável e necessita de outros genes para estabilizá-lo e um desses genes é o de resistência ao Cloranfenicol (COSTA *et al.*, 2019).

Com relação ao efeito dos extratos etanólicos de folhas e cascas de *Eucalyptus globulus* frente à *Staphylococcus aureus*, não foi observada a inibição dos extratos de folhas e cascas na concentração de 1 mg/mL. No entanto, na concentração de 10 mg/mL apresentaram um diâmetro do halo de inibição médio de 10 mm e 9 mm, respectivamente, conforme demonstrado na Tabela 2. Para este micro-organismo, os controles positivos e negativos apresentaram inibição média de 24 mm e nenhuma inibição do crescimento bacteriano, respectivamente.

Tabela 2 – Valores de halos de inibição (mm) dos extratos etanólicos de folhas e cascas de *Eucalyptus globulus* Labill. nas concentrações de 1 mg/mL e 10 mg/mL frente à *Staphylococcus aureus*.

	<i>Staphylococcus aureus</i>							
	EXTRATOS ETANÓLICOS				CONTROLES			
	FOLHAS		CASCAS		POSITIVO (Cloranfenicol 30µg/mL)		NEGATIVO (Etanol)	
RÉPLICA	1 mg	10 mg	1 mg	10 mg	Disco 1	Disco 2	Disco 1	Disco 2
PLACA 1	SI	10 mm	SI	8 mm	24 mm	24 mm	SI	SI
PLACA 2	SI	10 mm	SI	10 mm	-	-	-	-
MÉDIA	0	10 mm	0	9 mm	24 mm		0	
DESVIO PADRÃO	0	0	0	1	0		0	

*SI – sem inibição

A avaliação do extrato etanólico de cascas de *Eucalyptus globulus* é descrita pela primeira vez neste trabalho. Kolayli e colaboradores (2009) realizaram um estudo do óleo essencial das cascas de Eucalipto, no entanto, sem concentração descrita, utilizando como metodologia a adição do óleo essencial diretamente ao Ágar Mueller-Hinton e dextrose de batata e não observada a inibição para *E. coli* e *S. aureus*. O mesmo estudo também analisou as principais classes químicas presentes no óleo essencial, como terpenos, hidrocarbonetos aromáticos, hidrocarbonetos alifáticos, aldeídos, álcoois, ácidos carbocílicos e outros ésteres. Os resultados de ausência de ação antimicrobiana no estudo de Kolayli e colaboradores (2009), em

comparação com o deste trabalho no qual foi observada inibição dos micro-organismos pode ser explicado pela forma extrativa utilizada, entre o óleo essencial e o extrato etanólico obtido, além da metodologia empregada para a avaliação da atividade antibacteriana. Nos óleos essenciais concentram-se moléculas majoritariamente apolares. Já no extrato etanólico, são extraídas moléculas tanto polares quanto apolares, de acordo com a polaridade do etanol. Sendo assim, podemos inferir que os extratos etanólicos de cascas possuem moléculas mais variadas, podendo explicar o motivo pela qual o extrato etanólico apresentou inibição e, o óleo essencial, não.

A atividade antibacteriana de diferentes extratos obtidos de folhas de *Eucalyptus globulus* já foram descritos, como no estudo de Furtado e colaboradores (2015), que na avaliação dos extratos aquosos de folhas de *Eucalyptus globulus* nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL, pelo método de disco difusão, não observaram a inibição do crescimento bacteriano para *E. coli*, mas obtiveram 13 mm, 12 mm e 10 mm de inibição para *S. aureus* nas concentrações de 10, 50 e 25 mg/mL, respectivamente. Estes achados são compatíveis com os resultados obtidos neste trabalho para *S. aureus*, mas não para *E. coli*. A diferença de inibição relacionada à *E. coli* pode ser devida à característica química dos extratos obtidos no estudo de Furtado e colaboradores (2015), no qual foi utilizada a água, extraíndo substâncias mais polares. No presente estudo, foi utilizado o etanol, um solvente anfipático, que possui a capacidade de extrair substâncias polares e apolares, o que influencia diretamente nos compostos extraídos e, consequentemente, no resultado da atividade antibacteriana observada. Além disso, fatores como solo, altitude, índice pluviométrico, entre outros, também influenciam na quantidade de compostos presentes no material vegetal e, por consequência, na ação antibacteriana (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Navarro e colaboradores (1996) observaram que o extrato metanólico de folhas de *Eucalyptus globulus* apresentaram atividade com concentração inibitória mínima de 5 mg/mL e 10 mg/mL para *S. aureus* (ATCC 6538) e *E. coli* (ATCC 8937), respectivamente. Este dado corrobora o descrito para o extrato etanólico neste estudo. As ausências na atividade antibacteriana nos extratos aquosos de *Eucalyptus globulus* para *E. coli* e inibição apresentada pelos extratos etanólicos descritos neste trabalho e no extrato metanólico descrito por Navarro e colaboradores (1996) está relacionada com a

diferença da composição química dos extratos. Nos extratos aquosos de *Eucalyptus globulus* estão presentes substâncias mais polares que as dos extratos etanólicos e metanólicos.

O estudo de Khan e colaboradores (2009) foi realizado com o extrato etanólico bruto de folhas (0,1 g/ L) de Eucalipto pelo método de disco difusão e foi evidenciada a inibição para *S. aureus* de 16 a 25 mm e sem inibição para *E. coli*. Os resultados para *S. aureus* são similares com os resultados deste experimento, entretanto, há discordâncias relacionadas à *E. coli*, podendo ser justificada pela diferença na cepa bacteriana utilizada. Khan *et al.* (2009) utilizaram *S. aureus* (ATCC 29213) e *E. coli* (ATCC 25922), sendo cepas diferentes das utilizadas neste estudo, *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 11775). Adicionalmente, fatores ambientais (solo, quantidade de sol, água, entre outros) interferem nos compostos extraídos, além da concentração investigada (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Em um outro estudo de Khan e colaboradores (2014), foram realizados testes com extratos de folhas de *Eucalyptus globulus* (10 mg/mL) obtidos das extrações com solventes de diferentes polaridades. Os resultados para *S. aureus* e *E. coli* foram, respectivamente, aquoso (23,8 mm e 20 mm), n-hexano (12,7 mm e 14,7 mm) e etanol (26,96 mm e 19,36 mm). Portanto, observamos que se obteve inibição para *E. coli*. Comparativamente, o extrato com melhor resultado proporcional foi o etanólico, que teve um halo de inibição para *E. coli* semelhante ao que obtivemos neste experimento. Em contrapartida, houve discordância nos halos de *S. aureus*, podendo ser justificado pela quantidade de compostos presentes no material vegetal que foi extraído tanto no presente experimento, quanto no de Khan e colaboradores (2014). Portanto, foi demonstrada a diferença de atividade antibacteriana dos extratos preparados com

solventes divergentes, que está relacionada com a composição química dos extratos obtidos.

A diferença na composição dos extratos de *Eucalyptus globulus* é relatada pelo Ministério da Saúde (2018), sendo descrito que o extrato das folhas (água/acetona 70%) possui a presença de ácido gálico, oenoteína, eucalbanina C, tetragaloilglucose, ácido elágico, eucaglobulina, quercetina rhaminosídeo, globulinsina e sideroxilona. O estudo de Díaz (2018) investigou os metabólitos secundários presentes no extrato etanólico de folhas de *Eucalyptus globulus* Labill., testando para aminoácidos e amina, lactose, quinonas, triterpenos, açúcares redutores, catequinas, cumarinas, flavonoides, resinas, saponinas e taninos, todos em alta intensidade. Os extratos metanólicos e hidroalcoólico (metanol/água) das cascas de *Eucalyptus globulus* Labill. apresentam compostos majoritários como ácido gálico e derivados, catequina, ácido elágico e derivados e flavonoides glicosilados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018), taninos de alto peso molecular, compostos fenólicos, lignina, carotenoides e flavonoides (LUIZ et al., 2016). Sendo que a diferença na composição química e extração desses compostos pode estar relacionada com suas atividades biológicas (BRAGATTO, 2010). No entanto, são necessárias mais investigações para elucidar toda a composição química dos extratos tanto das folhas quanto das cascas, e o teor de cada composto presente na amostra, para determinar a contribuição exata de cada componente para as atividades biológicas.

A utilização etnofarmacológica e comercial de *Eucalyptus globulus* se dá principalmente pela utilização de seu óleo essencial. Devido a este motivo, há mais estudos científicos publicados com a avaliação da atividade antibacteriana e análise da composição química do óleo essencial das folhas

de *Eucalyptus globulus*. Ait-Ouazzou e colaboradores (2011) observaram resultados positivos para atividade antimicrobiana pelo método de disco difusão, com halos de inibição em média de 14 mm para *S. aureus*. Esse resultado corrobora os dados obtidos no presente estudo, onde houve 10 mm em média de inibição para as folhas (10 mg/mL). Para *E. coli* não foram encontrados halos de inibição e essa divergência no tamanho dos halos pode ser justificada pela composição química presente no derivado vegetal avaliado. A diferença para a inibição neste estudo e para a falta de inibição no estudo de Ait-Ouazzou e colaboradores (2011) se deve ao fato de que foram utilizadas formas extrativas distintas, o que provavelmente poderá interferir nos resultados.

Em outro estudo realizado por Bachir e Benali (2012) foi demonstrado que o óleo essencial das folhas (13 µL) de *E. globulus* possui atividade antimicrobiana tanto contra bactérias Gram-negativas (*E. coli*) quanto Gram-positivas (*S. aureus*), utilizando os métodos de difusão em ágar e diluição em caldo. Ainda, o estudo de Tohidpour e colaboradores (2010) com o óleo essencial (12 µL) das partes aéreas de *E. globulus* demonstraram zona de inibição de 7 mm para *E. coli* e 17 mm para *S. aureus*. Corroborando com esses dados, um estudo de Vratnica e colaboradores (2011) sobre a atividade antimicrobiana de óleo essencial de folhas de Eucalipto, nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 30 µL do óleo essencial, tiveram, respectivamente, 23, 27, 33 e 39 mm de inibição para *S. aureus* e 23, 28, 32, 36 mm para *E. coli*.

Alzamora e colaboradores (2001) obtiveram como resultado halo de inibição de 13 mm de diâmetro para o óleo essencial puro de folhas de *Eucalyptus globulus* para *S. aureus*, não descrevendo sua concentração. Avaliando a atividade microbiológica de vários óleos essenciais pelo método de disco

difusão, Silva *et al.* (2014) encontraram halos de inibição para *E. coli* de 6 mm e 9 mm para *S. aureus*, utilizando o óleo essencial puro de folhas de Eucalipto por arraste a vapor. Já no trabalho de Mota, Turrini e Poveda (2015) foi observado um halo de 3 mm para *E. coli* e 9 mm para *S. aureus*. Em todos os três estudos houve diferenças sutis no tamanho dos halos observados, o que pode ser devido aos seus compostos que são encontrados em uma proporção maior, como componentes fenólicos e flavonoides, de forma que exerçam efeito bacteriostático mais pronunciado.

A potência dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* quando comparado com os extratos etanólicos deste estudo pode ser explicado pela hidrofobicidade de sua composição química. Por extrair moléculas hidrofóbicas, os óleos essenciais conseguem penetrar a membrana celular bacteriana com maior facilidade, provocando a lise das mesmas (SILVA, 2012). Segundo Kumar *et al.* (2012), o óleo essencial de *E. globulus* apresentou 31 componentes, que formaram 99,5% do óleo total, entre eles, composição com 1,8-cineol (33,6%), α -pineno (14,2%) e limoneno (10,1%) como componentes principais. O óleo continha ainda monoterpeno e monoterpeno oxigenado em 37,9 e 61,5%, respectivamente. O teor de 1,8-cineol do óleo de *E. globulus* relatado na literatura variou entre 18 e 65% enquanto α -pineno representaram 2–20% da composição (CIMANGA *et al.*, 2002).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que os extratos etanólicos das cascas e folhas de *Eucalyptus globulus* Labill. possuem a capacidade de inibição do crescimento de *E. coli* e de *S. aureus*. O estudo inclui novas informações a respeito da potencial ação antimicrobiana dos extratos de Eucalipto. Além disso, os dados deste estudo

contribuem para a ampliação do espectro de atividade biológica do *Eucalyptus globulus*. No entanto, outros estudos devem ser realizados visando investigar o potencial antibacteriano descrito neste trabalho como a determinação da concentração mínima inibitória e o emprego de testes quantitativos.

O estudo demonstra que a espécie vegetal investigada pode contribuir com a descoberta e desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas. Porém, sua química detalhada e sua atividade biológica devem ser melhor exploradas. Este estudo além de contribuir para a ampliação dos conhecimentos biológicos de Eucalipto contribui com a valorização da biodiversidade mineira.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Nada a declarar.

REFERÊNCIAS

- AIT-OUAZZOU, A.; LORÁN, S.; BAKKALI, M.; LAGLAOUI, A.; ROTA, C.; HERRERA, A.; PAGÁN, R.; CONCHELLO, P. Composição química e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* e *Rosmarinus officinalis* do Marrocos. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, ed. 14, p. 2643–2651, 2011. DOI 10.1002 / jsfa.4505. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21769875/>. Acesso em: 29 maio 2021.
- ALZAMORA, L.; MORALES, L.; ARMAS, L.; FERNÁNDES, G. Medicina Tradicional en el Perú: actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas medicinales. **An. Fac. Med. (Perú)**, v. 62, ed. 2, p. 156–161, 2001. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/porta1/resource/pt/lil-289396>. Acesso em: 1 jun. 2021.
- BACHIR, R.; BENALI, M. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais das folhas de *Eucalyptus globulus* contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Asian Pac J Trop Biomed.**, v. 2, ed. 9, p. 739–742, 2012. DOI 10.1016 / S2221-1691 (12) 60220-2. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3609378/>. Acesso em: 26 maio 2021.

BRAGATTO, J. **Avaliação do potencial da casca de *Eucalyptus spp.* para a produção de bioetanol.** 2010. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas). Universidade de São Paulo / USP. Piracicaba – SP. DOI 10.11606/T.11.2010.tde-13122010-104913. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11144/tde-13122010-104913/publico/Juliano_Bragatto.pdf. Acesso em: 24 maio 2021.

BRITO, B.; TAGLIARI, K.C. Sensibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de leitões com diarreia após o desmame. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, ed. 1, p. 133-137, 2010. DOI <https://doi.org/10.1590/S1516-89132000000100017>. Disponível em: <https://www.scielo.br/babt/a/b35DLCCfq5SJRNJHsbpPz/?lang=pt#>. Acesso em: 25 maio 2021.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; BRUYNE, T.D.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, ed. 2, p. 213-220, 2002. DOI 10.1016/s0378-8741(01) 00384-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11801384/>. Acesso em: 1 jun. 2021.

COSTA, I.A.C.; MATA, M.R.; SOUZA, M.C.; PINTO, S.C.V.; MAGALHÃES, S.W.F.; MENDES, T.G.R.; COSTA, V.T.; MOTTA, P.G.; OLIVEIRA, M.E. Infecção do trato urinário causada por *Escherichia coli*: revisão de literatura. **SALUSVITA**, Bauru, v. 38, n. 1, p. 155-193, 2019. Disponível em: https://secure.unisagrado.edu.br/static/biblioteca/salusvita/salusvita_v38_n1_2019/salusvita_v38_n1_2019_art_12.pdf. Acesso em: 25 maio 2021.

COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; SPRICIGO, D.; MAZZINI, W.N.; MARCHIORO, S.B.; GIRARDINI, L.K.; VARGAS, A.C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, ed. 1, p. 5-8, 2006. DOI 10.1590/S0100-736X2006000100002. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/26427421_Caracterizacao_epidemiologica_molecular_e_perfil_de_resistencia_aos_antimicrobianos_de_Escherichia_coli_isoladas_de_criatorios_suinos_do_sul_do_Brasil. Acesso em: 25 maio 2021.

DÍAZ, J.M. **Estudio de las características fisicoquímicas y fitoquímicas de las hojas de *Eucalyptus globulus* Labill. (Eucalipto).** 2018. Tese (Graduação de Farmacêutico Químico). Universidad Católica Los Ángeles Chimbote. Trujillo, Perú, Disponível em: http://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/123456789/5099/CARACTERISTICAS_FISICOQUIMICAS_JUAREZ_DIAZ_JOSE_MIGUEL.pdf?sequence=3&isAllowe%20d=y. Acesso em: 1 jun. 2021.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **O Eucalipto**. Brasília, 2019. (Versão 3.111.1). Disponível em: <https://www.embrapa.br/florestas/transfereencia-de-tecnologia/eucalipto>. Acesso em: 11 mar. 2021.

FRANCO, R.; MANTILLA, S.; GOUVÊA, R.; OLIVEIRA, L.A. Resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas de carne e dejetos suínos. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 4, ed. 1, p. 31-36, 2010. DOI <https://doi.org/10.21708/avb.2010.4.1.1511>. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/1511>. Acesso em: 25 maio 2021.

FURTADO, J.; AMORIM, A.; FERNANDES, M.; OLIVEIRA, M.A. Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Eucalyptus globulus*, *Justicia pectoralis* e *Cymbopogon citratus* frente a bactérias de interesse. **Journal of Health Sciences**, v. 17, ed. 4, 2015. DOI <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2015v17n4p%25p>. Disponível em: <https://revista.pgsskroton.com/index.php/JHealthSci/article/view/3265>. Acesso em: 19 mar. 2021.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, ed. 2, p. 374-381, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/gn5mhqcFHSbXXgTKNL-JTS9t/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 2 jun. 2021.

GOMES, S.; COSENZA, B.A.; BITTENCOURT, A.H. Estudo e avaliação da ação antibacteriana de *Eucalyptus globulus* L. e *Allium sativum* L. sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **SAPIENS: Revista de divulgação científica**. UEMG Carangola, v. 1, ed. 2, 2019. ISSN: 2596-156X. Disponível em: <https://revista.uemg.br/index.php/sps/article/view/3751/pdf>. Acesso em: 19 mar. 2021.

GUIMARÃES, D.; MOMESSO, L.; PUPO, M. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v.

33, ed. 3, p. 667-679, 2010. DOI <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000300035>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/dhKT3h4ZxxvsQdkzyZ4VnpB/?lang=pt#>. Acesso em: 31 mar. 2021.

KHAN, N.; ABBASI, A.M.; DASTAGIR, G.; NAZIR, A.; SHAH, G.M.; SHAH, M.M.; SHAH, M.H. Ethnobotanical and antimicrobial study of some selected medicinal plants used in Khyber Pakhtunkhwa (KPK) as a potential source to cure infectious diseases. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 14, ed. 122, 2014. DOI 10.1186/1472-6882-14-122. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24708514/>. Acesso em: 29 maio 2021.

KHAN, R.; ISLAM, B.; AKRAM, M.; SHAKIL, S.; AHMAD, A.A.; ALI, S.M.; SIDDIQUI, M.; KHAN, A.U. Atividade antimicrobiana de cinco extratos de ervas contra cepas multirresistentes a drogas (MDR) de bactérias e fungos de origem clínica. **Molecules**, v. 14, ed. 2, p. 586-597, 2009. DOI <https://doi.org/10.3390/molecules14020586>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/14/2/586>. Acesso em: 29 maio 2021.

KOLAYLI, S.; OCAK, M.; ALIYAZICIOGLU, R.; KARAOGU, S. Chemical analysis and biological activities of essential oils from trunk-barks of eight trees. **Asian Journal of Chemistry**, v. 21, ed. 4, 10 jan. 2009. Disponível em: http://www.asianjournalofchemistry.co.in/User/ViewFreeArticle.aspx?ArticleID=21_4_21. Acesso em: 3 jun. 2021.

KUMAR, P.; MISHRA, S.; MALIK, A.; SATYA, S. Análise composicional e atividade inseticida do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* (família: *Myrtaceae*) contra mosca doméstica (*Musca domestica*). **Acta Tropica**, v. 122, ed. 2, p. 212-218, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.01.015>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X12000162?via%3DiHu%20b>. Acesso em: 1 jun. 2021.

LUÍS, A.; DUARTE, A.; GOMINHO, J.; DOMINGUES, F.; DUARTE, A. P. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.79, p. 274-282, 2016. ISSN 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.055>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Systematized Information on the National List of Medicinal Plants of Interest to SUS: *Eucalyptus globulus* Labill. (Eucalipto)**. 1ª ed., Brasília – DF: Editora MS Ministério da Saúde, 2018,

p. 66. ISBN 978-85-334-2657-3. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/informacoes_sistematizadas_relacao_nacional_plantas_medicinais_interesse_sus_eucalipto.pdf. Acesso em: 29 maio 2021.

MOTA, V.S.; TURRINI, R.N.T.; POVEDA, V.B. Atividade antimicrobiana do óleo de *Eucalyptus globulus*, xilitol e papaína: estudo piloto. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 49, ed. 2, p. 216-220, 2015. DOI 10.1590/S0080-623420150000200005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/reeusp/a/tBnDBKzQCZ6tVHf4Chckqbg/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 3 jun. 2021.

NAVARRO, V.; VILLARREAL, M.L.; ROJAS, G.; LOZOYA, X. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, 53, ed. 3, p. 143-147, 1996. ISSN 0378-8741. DOI [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(96\)01429-8](https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)01429-8). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378874196014298>. Acesso em: 29 maio 2021.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2013. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf. Acesso em: 25 mar. 2021

OMS. Organização Mundial da Saúde. 2019. **Resistência microbiana**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/resistencia-microbiana-saiba-o-que-e-e-como-evitar>. Acesso em 02 Jan 2022.

RIBEIRO, C. M.; SOUZA, K.G.S.; RIBEIRO, T.A.C.; VIEIRA, A.B.R.; MENDONÇA, L.C.V.; BARBOSA, W.L.R.; VIEIRA, J.M.S. Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na medicina popular da Amazônia. **Infarma – Ciências Farmacêuticas**, v. 21, n. 1/2, p. 45-49, 2009. ISSN 2318-9312. Disponível em: <http://revistas.cff.org.br/infarma&page=article&op=view&path%5B%5D=172&path%5B%5D=162>. Acesso em: 21 oct. 2021.

SCHUELER, Paulo. **Resistência a antibióticos e COVID-19**. Rio de Janeiro, Brasil: Bio-Manguinhos/Fiocruz, 8 jun. 2020. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/noticias/1823-modernidade-e-sustentabilidade-no-centro-tecnologico-de-plataformas-vegetais>. Acesso em: 31 mar. 2021.

SILVA, A.A.; BERGAMO, L.; CAMARGO, L.P.; FERNANDES, C.; MUSSATO, D.; CANAZART, D.; ABREU, B.A. Atividade microbiológica de óleos essenciais obtidos por arraste a vapor. **Revista Uningá Review**, v. 20, n. 3, 2014. ISSN 2178-2571. Disponível em: <http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1604>. Acesso em: 3 jun. 2021.

SILVA, T.P. **Avaliação do processo de morte celular em bactérias aquáticas em dois modelos de ecossistemas aquáticos tropicais**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ecologia). Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora – MG. Disponível em: <https://repositorio.ufjf.br/jspui/bitstream/ufjf/1934/1/thiagopereiradasilva.pdf>. Acesso em: 1 jun. 2021.

SILVA, M.G.; NUNAN, E. A.; ROCHA, M.P. Estudo químico e de atividade antibacteriana de extratos e óleo essencial de *Citrus x limonia*. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v.1, n.4, 2019.

TOHIDPOUR, U.; SATTARI, M.; OMIDBAIGI, R.; YADEGAR, A.; NAZEMI, J. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine**,

v. 17, ed. 2, p. 142-145, 2010. DOI 10.1016/j.phymed.2009.05.007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19576738/>. Acesso em: 1 jun. 2021.

TORRES, Alfredo G. **Escherichia coli in the Americas**. Springer, 2016. P. 315. ISBN 978-3-319-45092-6.

VRATNICA, B.D.; DJAKOV, T.A.; SUKOVIC, D.; DAMJANOVIC, J. Antimicrobial effect of essential oil isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. **Czech Journal of Food Sciences**, v.29, ed.3, p.277-284, 2011. DOI 10.17221/114/2009-CJFS. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/267030222_Antimicrobial_Effect_of_Essential_Oil_Isolated_from_Eucalyptus_globulus_Labill_from_Montenegro#:~:text=The%20results%20of%20the%20antimicrobial,Acinetobacter%20baumannii%2C%20and%20K%20lebsiella%20pneumoniae. Acesso em: 1 jun. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (Estados Unidos). Antimicrobial resistance. 13 out. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 31 mar. 2021.

Brine shrimp (*Artemia salina* Leach) as an alternative model for assessing the *in vivo* antioxidant activity of rutin

Artemia salina Leach como modelo alternativo para avaliação da atividade antioxidante *in vivo* da rutina

William Gustavo Lima^{1*}; Letícia Barbosa Santos¹; Waleska Stephanie da Cruz Nize²; Raquel Oliveira Castilho¹; Júlio César Moreira Brito³

1. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

2. Carleton University, Ottawa, Ontario, Canada

3. Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

***Autor correspondente:** William Gustavo de Lima (ORCID: 0000-0001-8946-9363). Faculdade de Farmácia, Campus Pampulha, Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. E-mail: williamgustavofarmacia@hotmail.com

Data de Submissão: 17/11/2021; *Data do Aceite:* 20/01/2022.

Citar: Lima, W G; Santos, L B; Nize, W S C; Castilho, R O; Brito, J C M. Brine shrimp (*Artemia salina* Leach) as an alternative model for assessing the *in vivo* antioxidant activity of rutin. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v.4, n.1, p. 39-44, 2022. DOI: <https://doi.org/10.29327/226760.4.1-4>

ABSTRACT

Although there are currently more than 400 methods for assessing the antioxidant activity of natural compounds, all *in vivo* models still require the use of rodents. In this context, the use of alternative models, such as invertebrate species, has gained prominence. Here, we standardized an *in vivo* model to study the antioxidant activity of natural compounds using Brine shrimp (*Artemia salina* Leach) as an alternative to rodents. Exposure of *A. salina* nauplii to 0.1% hydrogen peroxide (H_2O_2) for 1h was considered a potential model. Herein, rutin, which possesses well-known antioxidant activity, abolished the H_2O_2 -induced lethality in *A. salina* nauplii. In conclusion, the low cost, easy maintenance, and absence of the need for ethical approval make *A. salina* a promising model for *in vivo* evaluation of antioxidant compounds.

Keywords: Antioxidant; *Artemia salina* Leach; Alternative model; Natural product; Rutin; Hydrogen peroxide

RESUMO

Embora existam atualmente mais de 400 métodos para avaliar a atividade antioxidante de compostos naturais, todos os modelos *in vivo* ainda requerem o uso de roedores. Nesse contexto, o uso de modelos alternativos, como espécies de invertebrados, tem ganhado destaque. Aqui, padronizamos um modelo *in vivo* para estudar a atividade antioxidante de compostos naturais usando o *Artemia salina* Leach como alternativa aos roedores. A exposição de náuplios de *A. salina* ao peróxido de hidrogênio 0,1% (H_2O_2) por 1h foi considerado um modelo potencial. Nesse sentido, a rutina, que possui conhecida atividade antioxidante, aboliu a letalidade induzida por H_2O_2 em náuplios de *A. salina*. Em conclusão, o baixo custo, a fácil manutenção e a ausência da necessidade de aprovação ética tornam *A. salina* um modelo promissor para avaliação *in vivo* de compostos antioxidantes.

Palavras-chave: Antioxidante; *Artemia salina* Leach; Modelo alternativo; Produto natural; Rutina; Peróxido de hidrogênio

INTRODUCTION

Oxidative stress is induced by free radicals and oxidants and causes harmful effects on important cellular structures (PIZZINO et al., 2017). It occurs due to an imbalance between the production and accumulation of reactive oxygen species (ROS) in cells and tissues and the ability of a biological system to detoxify these toxic products (RADI, 2018). A large body of evidence shows that oxidative stress is responsible for the onset and/or progression of several chronic diseases, such as cancer, diabetes, metabolic disorders, atherosclerosis, arthritis, dementia, obesity, osteoporosis, and cardiovascular diseases (PIZZINO et al., 2017; RADI, 2018). Thus, the use of compounds with antioxidant properties can assist in the prevention and treatment of diseases associated with oxidative damage.

Natural products are the primary source of compounds with antioxidant activity (OLIVEIRA et al., 2018). Phenolic compounds present in plants, fruits, cereals, and bee products have a potent antioxidant effect, which is associated with inhibition of ROS production, increased expression and activity of antioxidant enzymes, induction of the natural antioxidant system, and stabilization of free radicals (BANJARNAHOR; ARTANTI, 2014; DANGLES, 2012). Therefore, methodologies aimed at screening the antioxidant capacity of natural compounds are essential for developing new antioxidant agents. Currently, more than 400 *in vitro* and *in vivo* methods are used to investigate the antioxidant effects of complex samples (ALAM et al., 2013) so far, for evaluating antioxidant activity of various samples of research interest were gone through where 407 methods were come across, which were repeated from 29 different methods. These were classified as *in vitro* and *in vivo* methods. And those are described and discussed below in this review article. In the later part of this review article, frequency of *in vitro* as well as *in vivo* methods is analyzed with a bar diagram. Solvents

are important for extracting antioxidants from natural sources. Frequency of solvents used for extraction is also portrayed and the results are discussed in this article. As per this review there are 19 *in vitro* methods and 10 *in vivo* methods that are being used for the evaluation of antioxidant activity of the sample of interest. DPPH method was found to be used mostly for the *in vitro* antioxidant activity evaluation purpose while LPO was found as mostly used in *in vivo* antioxidant assay. Ethanol was with the highest frequency as solvent for extraction purpose (ALAM et al., 2013). For all *in vivo* methods, the testing samples are usually administered to the animals (generally rodents) at a definite dosage regimen. After a pre-established period, the animals are usually killed, and their blood or tissues are analyzed (ALAM et al., 2013) so far, for evaluating antioxidant activity of various samples of research interest were gone through where 407 methods were come across, which were repeated from 29 different methods. These were classified as *in vitro* and *in vivo* methods. And those are described and discussed below in this review article. In the later part of this review article, frequency of *in vitro* as well as *in vivo* methods is analyzed with a bar diagram. Solvents are important for extracting antioxidants from natural sources. Frequency of solvents used for extraction is also portrayed and the results are discussed in this article. As per this review there are 19 *in vitro* methods and 10 *in vivo* methods that are being used for the evaluation of antioxidant activity of the sample of interest. DPPH method was found to be used mostly for the *in vitro* antioxidant activity evaluation purpose while LPO was found as mostly used in *in vivo* antioxidant assay. Ethanol was with the highest frequency as solvent for extraction purpose (ALAM et al., 2013). However, the ethical issues surrounding the use of animals in research, such as the animal welfare concern and the rigor of ethics committees, have encouraged the development of alternative models (FERNANDES;

PEDROSO, 2017). In this context, some authors suggest the use of organisms that are not classified as protected animals (*i.e.*, shrimp and water flea larvae) as an alternative for rodent use.

Brine shrimp (*Artemia salina* Leach) is a saltwater microcrustacean used as food for ornamental fish. The eggs of this microcrustacean have a high hatching rate and are easily found in stores specialized in aquariums (FILHA et al., 2012). Due to the absence of notochord, this crustacean is exempt from authorization of ethical centers and stands out as a promising alternative model to the use of rodents. Here, we standardized an *in vivo* model of oxidative damage using *A. salina*. In addition, we evaluated the applicability of this model to screen the antioxidant capacity of rutin, a natural antioxidant.

METHODS

Reagents

Dimethyl sulfoxide (DMSO), hydrogen peroxide (H_2O_2 ; 35% v/v) (Synth, São Paulo, SP, Brazil), and rutin (Sigma-Aldrich, Frankfurt, Germany) were purchased from commercial suppliers and used without further purification. Sea salt (Blue Treasure SPS, USA) and high eclosion Brine shrimp (*A. salina* Leach) eggs (Maramar, Brazil) were purchased from a store specialized in aquariums (Aquario Show, Belo Horizonte, Brazil).

A. salina toxicity test using hydrogen peroxide (H_2O_2): in vivo antioxidant method

The reversibility of hydrogen peroxide (H_2O_2) toxicity by rutin and extracts was evaluated using the *A. salina* lethality test. Encysted brine shrimp eggs were incubated in artificial seawater and exposed to a 60-W lamp and pH 8. After 48h, the nauplii (10 units) were added to each set of tubes filled with 5 mL of artificial saltwater (MEYER et al., 1982). First, we determined the concentration of H_2O_2 by

exposing the nauplii to different concentrations (0.01 to 10 % v/v) of this ROS and assessing the lethality every hour up to 24h of incubation. Then, the nauplii were incubated with 0.1% peroxide for 1, 2, and 3h to determine the minimum exposure time before the treatment with antioxidants to induce and reverse oxidative damage. After each time point, rutin at 5, 50, and 500 $\mu\text{g/mL}$ previously diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to the tubes, and the lethality was assessed after 24h of the treatment (addition of rutin). The number of live nauplii was determined and compared with untreated and H_2O -treated groups. Solvent control (DMSO) was utilized in all assays.

Statistical analysis

The experiments were all realized in triplicates. Data were expressed in terms of the number of live *A. salina* nauplii as median and interquartile range. All data were evaluated using the Kruskal-Wallis test with Dunns post-test. The significance level used in the tests was 5%.

RESULTS AND DISCUSSION

Oxidative stress can be artificially induced by potent oxidizing agents, such as hydrogen peroxide (H_2O_2) (DE MATTOS et al., 2003). H_2O_2 is a low-cost, transparent liquid with a characteristic odor, non-flammable, and highly miscible in water, making it a good option for inducing oxidative damage (SCHUMB et al., 1955). Through catalysis, H_2O_2 can be converted to a hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), a ROS known to be highly reactive and induce substantial cell damage (PIZZINO et al., 2017). Moreover, H_2O_2 is naturally produced by eukaryotic cells during aerobic respiration, representing the oxidative conditions that occur in a biological context (PIZZINO et al., 2017; RADI, 2018). Thus, due to its chemical characteristics and biological effects, we used H_2O_2 as the oxidizing agent in the model proposed in this study.

Initially, we tested the concentration of H_2O_2 needed to induce oxidative damage in *A. salina* nauplii. The outcome considered in the analysis was the lethality of the larvae over 24h, with the lowest concentration capable of inducing 100% lethality being standardized. As shown in Table 1, the concentrations between 0.25% v/v and 10% v/v induced 100% lethality within a 6h post-exposure period. On the other hand, 0.1% v/v of H_2O_2 killed all microcrustaceans after 24h and was defined as the standard concentration for this study. The untreated nauplii remained alive, validating our experimental conditions.

Table 1: Time-related lethality of different concentrations of hydrogen peroxide against Brine Shrimp Larvae (*Artemia salina*)

H_2O_2 (% v/v)	Time							
	0.5 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	24 h
10	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
5	10 (10-10)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
2.5	10 (10-10)	1 (0.5-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
1	10 (10-10)	7 (7-7)	3 (2.5-3)	1 (0.5-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
0.5	10 (10-10)	9 (9-9)	6 (6-6)	3 (2.5-4)	1 (1-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
0.25	10 (10-10)	10 (10-10)	10 (10-10)	9 (9-9.5)	4 (2.5-4.5)	2 (1.5-3)	0 (0-0)	0 (0-0)
0.1	10 (10-10)	10 (10-10)	10 (10-10)	10 (10-10)	10 (9.5-10)	9 (8.5-9)	8 (8-8)	0 (0-0)
0.05	10 (10-10)	10 (10-10)	10 (10-10)	10 (10-10)	10 (10-10)	10 (10-10)	10 (10-10)	2 (2-2)
0.01	10 (10-10)	10 (10-10)	10 (10-10)	10 (10-10)	10 (10-10)	10 (10-10)	10 (10-10)	8 (8-8.5)
Control	10 (10-10)	10 (10-10)	10 (10-10)	10 (10-10)	10 (10-10)	10 (10-10)	10 (10-10)	10 (10-10)

All data represent the median and interquartile range (Q1-Q3) of the number of live *Artemia salina* nauplii

The lethality in this model can be associated with the cytotoxic effects of the hydroxyl radicals produced in the Fenton reaction involving H_2O_2 . For instance, the effects of other free radicals, such as superoxide and nitrite, are less severe than those of hydroxyl radicals since both superoxide and nitrite can be detoxified by scavenging enzymes. In contrast, no enzyme can detoxify hydroxyl radicals, making them extremely toxic and lethal to the cells (SIES, 2017) signaling and redox regulation. Generation, transport and capture of H_2O_2 in biological settings

as well as their biological consequences can now be addressed. The present overview focuses on recent progress on metabolic sources and sinks of H_2O_2 and on the role of H_2O_2 in redox signaling under physiological conditions (1–10 nM).

The deleterious effects of free radicals such as the hydroxyl radical depend on the time of exposure to the oxidizing agent (RADI, 2018). Thus, we subsequently defined the exposure time of *A. salina* nauplii to H_2O_2 that generates reversible lethality

through treatment with antioxidant agents. For this evaluation, we selected rutin, a common flavonoid found in many plant species and that has a powerful antioxidant effect (BANJARNAHOR; ARTANTI, 2014). According to Table 2, rutin at 5 mg/mL and 50 mg/mL significantly reduced the peroxide-induced lethality in *A. salina*. In groups exposed to peroxide for an extended period (2 and 3h), a clear concentration-dependent effect was observed, with the lethality of the model being lower in tubes exposed to a higher concentration of rutin (50 µg/mL). However, the maximum antioxidant effect was observed in nauplii pre-exposed for 1h to H₂O₂. It indicates that exposure for longer periods generates toxic effects that are difficult to reverse and, therefore, can compromise the model's ability to identify compounds with moderate antioxidant potential.

Table 2: Antioxidant effect of rutin in the H₂O₂-induced lethality model using Brine Shrimp Larvae (*Artemia salina*)

Rutin concentration	Time after exposure to 0.1% H ₂ O ₂			Without H ₂ O ₂ (Controls)
	1h	2h	3h	
0 µg/mL	0 (0-0) ^a	0 (0-0) ^a	0 (0-0) ^a	10 (10-10)
5 µg/mL	10 (10-10) ^b	3 (2-4) ^a	2 (2-2) ^a	10 (10-10)
50 µg/mL	10 (10-10) ^b	3 (3-4) ^a	3 (3-3) ^a	10 (10-10)
500 µg/mL*	-	-	-	5 (5-7)
Solvent control (DMSO)	-	-	-	10 (10-10)

*Toxic concentration. All data represent the median and interquartile range (Q1-Q3) of the number of live *Artemia salina* nauplii. The lethality was assessed after 24h of the treatment (addition of rutin). The data were evaluated using the Kruskal-Wallis test with Dunns post-test. Different letters indicate a statistical difference between groups within the same time interval considered (p<0.05)

CONCLUSION

In conclusion, exposure of *A. salina* nauplii to 0.1% H₂O₂ for 1h is an alternative model for evaluating the antioxidant potential of natural compounds. However, we emphasize that this methodology is limited to natural compounds that have low toxicity and that do not significantly alter the physicochemical properties of the water where the microcrustaceans are kept. In this direction, we showed that very high concentrations of rutin (500 µg/mL) killed the microcrustaceans, preventing the evaluation of the antioxidant effect in this model. Overall, the use of *A. salina* stands out as a good alternative model for the *in vivo* evaluation of the antioxidant activity of natural compounds. The low cost, easy maintenance, and absence of the need for ethical approval make this model an attractive methodology for evaluating compounds with the ability to reduce oxidative damage *in vivo*.

ACKNOWLEDGMENTS

W.G.L. is grateful to *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior* (CAPES) for a Ph.D. fellowship.

CONFLICTS OF INTEREST

None of the authors has any conflict of interest to disclose.

REFERENCES

- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013. doi: 10.1016/j.jsps.2012.05.002
- BANJARNAHOR, S. D. S.; ARTANTI, N. Antioxidant properties of flavonoids. **Medical Journal of Indonesia**, v. 23, n. 4, p.1-12, 2014. doi: 10.13181/mji.v23i4.1015

DANGLES, O. Antioxidant Activity of Plant Phenols: Chemical Mechanisms and Biological Significance. **Current Organic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 692–714, 2012. doi: 10.2174/138527212799957995

FERNANDES, M. R.; PEDROSO, A. R. Animal experimentation: A look into ethics, welfare and alternative methods. **Revista da Associacao Medica Brasileira**, v. 63, n. 11, p. 1-6, 2017. doi: 10.1590/1806-9282.63.11.923

FERRAZ FILHA, Z. S.; LOMBARDI, J. A.; GUZZO, L. S.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Brine shrimp (*Artemia salina* Leach) bioassay of extracts from *Lychnophoriopsis candelabrum* and different *Lychnophora* species. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 358–361, 2012. doi: 10.1590/S1516-05722012000200016

DE MATTOS, I. L.; SHIRAISHI, K. A.; BRAZ, A. D.; FERNANDES, J. R. Hydrogen peroxide: Importance and determination. **Quimica Nova**, v. 26, n. 3, p. 373-380, 2003.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 1, p. 31–34, 1982. doi: 10.1055/s-2007-971236

PIZZINO, G.; IRRERA, N.; CUCINOTTA, M.; et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, [s.n.], p. 1-14, 2017.

RADI, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 23, p. 5839-5848, 2018. doi: 10.1073/pnas.1804932115

SCHUMB, W. C.; SATTERFIELD, C. N.; WENTWORTH, R. L. **Hydrogen Peroxide**. 1st ed. New York: Reinhold, 1955.

SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biology**, v. 11, [s.n.], p. 613-619. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.035

TEIXEIRA DE OLIVEIRA, G.; SIQUEIRA FERREIRA, J. M.; LIMA, W. G.; et al. Phytochemical characterisation and bioprospection for antibacterial and antioxidant activities of *Lippia alba* Brown ex Britton & Wilson (Verbenaceae). **Natural Product Research**, v. 32, n. 6, p. 723–731, 2018. doi: 10.1080/14786419.2017.1335727



Rua Rodrigues Caldas, 493 – Santo Agostinho
Belo Horizonte/MG | CEP: 30190-120

www.crfmg.org.br
