

FITOCONSTITUINTES CARVACROL E TERPINEN-4-OL COMO INIBIDORES DE β -LACTAMASE DE *Klebsiella pneumoniae*

Laísa Vilar Cordeiro¹
Thamara Rodrigues de Melo²
Giulian César da Silva Sá³
Daniel Lopes Araújo⁴
Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo⁵

RESUMO

A crescente e constante evolução dos mecanismos de resistência bacteriana aos fármacos faz com que seja necessário o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para combater as infecções e driblar a resistência aos medicamentos, principalmente as enzimas beta-lactamases em bactérias Gram-negativas, como *Klebsiella pneumoniae*. Com base nisto, as plantas medicinais constituem uma ampla fonte de moléculas bioativas, que incluem o carvacrol e o terpinen-4-ol, os quais apresentam atividade antibacteriana, mas ainda não há evidências de suas atuações como inibidores de beta-lactamases. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar através de docking molecular se o carvacrol e o terpinen-4-ol são possíveis inibidores de beta-lactamase e foi observado que há encaixe favorável de ambos os fitoconstituintes com o sítio ativo da enzima 3OPR (beta-lactamase). Tal informação é importante para o desenvolvimento de novos inibidores desta enzima, de modo que é interessante que mais estudos sejam realizados, *in vitro* e *in vivo*, para investigar melhor esta possível atividade do carvacrol e terpinen-4-ol.

Palavras-chave: Carvacrol, terpinen-4-ol, fitoconstituintes, β -lactamase.

INTRODUÇÃO

Após a descoberta da penicilina, a "era de ouro" dos antibióticos revolucionou a medicina moderna, reduzindo o número de mortes por infecções como pneumonia e tuberculose, que estavam entre as principais causas de morte no mundo. Esses medicamentos também possibilitaram avanços na medicina, como quimioterapia e cirurgias complexas, tornando-se essenciais para a saúde pública moderna. No entanto, nos últimos anos, o aumento alarmante da resistência bacteriana em todo o mundo representou uma grande ameaça para a sociedade. A resistência aos antibióticos tem aumentado a taxa de mortalidade

¹ Doutoranda em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, laisavilar@gmail.com;

² Doutoranda em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, th.rmelo@outlook.com;

³ Doutorando em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, giuliancesarsa@gmail.com;

⁴ Graduando do Curso de Tecnologia em Radiologia pelo Centro Universitário de Patos - PB, daniel124.dl718@gmail.com;

⁵ Doutorando em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, pedrotrfigueiredo@gmail.com.

associada a infecções bacterianas e causando um alto impacto econômico. Estima-se que as perspectivas para os próximos anos sejam ainda piores, onde os antibióticos perderão completamente sua eficácia e o número de mortes por infecções resistentes superam as causadas por câncer (MARTENS; DEMAIN, 2017, p. 520-526; BUSH, 2018, p. e01076-18)

A interferência do homem teria contribuído para a aceleração do processo de evolução da resistência bacteriana e alguns fatores apontados como causa são: i) Uso excessivo de antibióticos e prescrição inadequada: o uso desnecessário ou incorreto desses medicamentos pode levar à seleção de resistentes espécies que pertencem à microbiota normal. Isso facilita a disseminação dos genes de resistência, porque a menor quantidade de bactérias torna o ambiente menos competitivo e mais favorável ao crescimento do fenótipo resistente (FAIR; TOY, 2014, p. S14459). Além disso, doses sub-terapêuticas de antibióticos podem induzir alterações genéticas, levando não apenas ao aumento da resistência e propagação, mas também ao aumento da virulência bacteriana (VENTOLA, 2015, p. 277). ii) Uso indevido por animais: os antibióticos são amplamente utilizados como suplementos para o crescimento de bovinos e também para prevenir infecções de animais, contribuindo para a seleção de bactérias resistentes. Ao consumir a carne desses animais, os seres humanos também ingerem essas bactérias. Além disso, os antibióticos utilizados na pecuária também contaminam o meio ambiente, sendo excretados nos materiais biológicos dos animais, expondo as bactérias ambientais ao contato direto com a substância e favorecendo a disseminação da resistência (VENTOLA, 2015, p. 277). Na maioria dos casos, os antibióticos não são biodegradáveis, o que faz com que esse efeito seja estendido ainda mais através da bioacumulação (WELLINGTON et al., 2013, p. 156).

Outra questão importante que contribui para aumentar a resistência e preocupa as autoridades de saúde em todo o mundo é a perda de interesse das indústrias farmacêuticas em produzir novos antibióticos, restringindo o leque de alternativas terapêuticas para infecções resistentes (MARTENS; DEMAIN, 2017, p. 520-526). Os antibióticos geralmente são usados por períodos relativamente curtos e são menos lucrativos para a indústria, em comparação com os medicamentos usados para tratar doenças crônicas como asma, diabetes e hipertensão; portanto, as empresas farmacêuticas preferem investir seus esforços nessa outra área. Eles também exigem um alto investimento financeiro em pesquisa e desenvolvimento e um retorno a longo prazo para esse custo inicial, uma vez que o preço dos antibióticos quando atingem o mercado consumidor está bem abaixo do custo de um medicamento quimioterápico, por exemplo. As barreiras regulatórias também são um grande impedimento para o surgimento de

novos antibióticos. As aprovações de novos medicamentos requerem testes extensivos para provar que a nova substância é superior àquelas já existentes no mercado e impõem procedimentos burocráticos excessivos que dificultam o processo de chegada do medicamento nas prateleiras (VENTOLA, 2015, p. 277; MARTENS; DEMAIN, 2017, p. 520-526).

Nas últimas décadas o surgimento de bactérias gram-positivas resistentes, como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE), lideraram os esforços para produzir novos antibióticos visando solucionar essa ameaça. No entanto, nos últimos anos, embora essas infecções ainda sejam motivo de grande preocupação, os níveis de resistência relacionados às bactérias gram-positivas estabilizaram ou até diminuíram. Por outro lado, uma onda emergente de infecções causadas por bactérias gram-negativas causou uma crise na resistência a antibióticos ainda mais alarmante. Bactérias gram-negativas são naturalmente mais resistentes a antibióticos porque sua membrana externa dificulta a penetração do medicamento, e há uma maior prevalência de bombas de efluxo nesse tipo de microorganismo. Com poucas opções de tratamento disponíveis no mercado para essas bactérias resistentes, algumas infecções causadas por gram-negativos tornaram-se intratáveis (FAIR; TOY, 2014, p. S14459).

Nesse contexto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou em 2017 uma lista das bactérias mais importantes para as quais existe uma necessidade urgente de desenvolver novos tratamentos. Os especialistas utilizaram como base para a construção deste documento critérios como: morbidade relacionada, índices de mortalidade, acometimento comunitário, prevalência de resistência, transmissibilidade, possibilidade de prevenção e tratamento atual. A lista foi dividida em três níveis de necessidade de desenvolvimento de antibióticos: crítico, alto e médio. Compõem o grupo crítico as bactérias gram-negativas, mais especificamente *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp, e *Morganella* spp.). As autoridades de saúde de todo o mundo estão buscando soluções para essa crise de resistência e enfatizam que precisamos urgentemente saber mais sobre antibióticos e mecanismos de resistência, a fim de desenvolver novas alternativas para o tratamento dessas infecções (WHO, 2017).

Bactérias gram-negativas são patógenos altamente adaptáveis que podem desenvolver resistência a antibióticos por vários mecanismos (PIDDOCK, 2017, p. 520-526). De maneira geral, as bactérias podem desenvolver resistência por mutação espontânea ou transferência horizontal de genes. A mutação espontânea nos genes cromossômicos geralmente resulta em

uma expressão aumentada de mecanismos de resistência intrínseca, como enzimas de inativação, bombas de efluxo, alteração da permeabilidade da membrana ou modificação do alvo. Enquanto a transferência horizontal de elementos genéticos móveis pode ocorrer por meio de transdução, transformação ou conjugação e, geralmente, esses genes codificam enzimas de degradação mais especializadas, além de bombas de efluxo, proteínas de proteção de alvo e também vias de desvio. Os vetores plasmídicos geralmente carregam múltiplos genes de resistência, portanto, uma única conjugação pode ser suficiente para conferir um fenótipo de resistência a vários fármacos para a cepa receptora (RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015, p. 21).

Entre os mecanismos de resistência, enzimas que modificam antibióticos são a principal forma. Notavelmente, as β -lactamases são clinicamente importantes porque são amplamente encontradas em bactérias gram-negativas e atuam na ação de agentes β -lactâmicos, como penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas, que compõem os tratamentos de escolha inicial para o tratamento dessas doenças. As β -lactamases são classificadas utilizando principalmente a classificação Ambler, que divide essas enzimas em quatro classes (A, B, C e D), com base em suas seqüências de aminoácidos e sítio ativo (BLAIR, et al., 2015 p. 42-51; SHAIKH et al., 2015, p. 90-101):

- A classe A também é conhecida como penicilinase e inclui as enzimas KPC (*Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase) e ESBL (Extended-spectrum beta-lactamases). Essas enzimas atuam hidrolisando penicilinas, monobactâmicos e cefalosporinas de terceira geração. Exceto KPC, eles são inibidos pelo clavulanato ou tazobactam *in vitro*. As enzimas da classe A são comumente encontradas em *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp e *Proteus* spp. Eles geralmente são transmitidos por plasmídeos e frequentemente carregam vários determinantes de resistência, portanto, é comum que as bactérias sejam resistentes a outras classes de antibióticos, como fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (BLAIR, et al., 2015 p. 42-51; SHAIKH et al., 2015, p. 90-101).

- Classe B são metalo- β -lactamases, descritas em muitas *Enterobacteriaceae*. Exemplos desta classe são NDM (New Delhi metallo- β -lactamase) e VIM (Verona integron-encoded metallo- β -lactamase). Hidrolisam penicilinas, cefalosporinas de primeira à quarta geração e carbapenêmicos. Também degradam inibidores da β -lactamase. Assim como a classe A, são altamente transmissíveis em plasmídeos com vários outros determinantes de resistência (BLAIR, et al., 2015 p. 42-51; SHAIKH et al., 2015, p. 90-101).

- A classe C também é conhecida como AmpC e pertence às cefalosporinas. Essas enzimas são produzidas por todas as bactérias Gram-negativas, com exceção de *Salmonella* e *Klebsiella* e codificadas cromossômicamente em várias espécies. Eles hidrolisam todas os β -lactâmicos, exceto os carbapenêmicos, e não são inibidos pelo clavulanato (BLAIR, et al., 2015 p. 42-51; SHAIKH et al., 2015, p. 90-101).

- Classe D são oxacilinas ou enzimas OXA. Esse grupo inativa penicilina, cloxacilina, oxacilina e meticilina. Eles são fracamente inibidos pelo ácido clavulânico. A classe D é geralmente transmitida por plasmídeo e se disseminou entre *Enterobacteriaceae* (BLAIR, et al., 2015 p. 42-51; SHAIKH et al., 2015, p. 90-101).

Diante da crescente resistência das bactérias Gram-negativas, há a necessidade de serem desenvolvidas novas alternativas terapêuticas a serem utilizadas contra tais micro-organismos resistentes aos antimicrobianos convencionais. Além disso, novas moléculas que apresentem a capacidade de inibir as enzimas de resistência podem ser úteis no uso em associação com os antimicrobianos. Nesse contexto, as plantas medicinais constituem uma das maiores fontes de moléculas bioativas com finalidade antibacteriana e antifúngica. Uma das principais vantagens de serem estudadas moléculas de origem vegetal, ao que se observa, é o reduzido número de possíveis efeitos tóxicos causados por tais substâncias (CHANDRA et al., 2017, p. 16).

Os óleos essenciais são constituídos por um complexo de substâncias e apresentam uma ampla gama de atividades biológicas, com notável potencial antimicrobiano. Podem ser utilizados isoladamente ou em associação, tendo eficácia até mesmo contra cepas resistentes. A atividade biológica apresentada pelos óleos essenciais também pode ser observada pelos seus fitoconstituintes isolados (NAZZARO et al., 2013, p. 1451–1474).

Um dos fitoconstituintes mais estudados é o carvacrol, um monoterpene encontrado em óleos essenciais como o do orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e outras plantas. Esse composto possui uma ampla gama de atividades biológicas já relatadas na literatura, como antioxidante, antitumoral e antimicrobiano. O carvacrol apresenta forte atividade antibacteriana, tanto contra Gram-positivas como contra Gram-negativas. Já foi relatada sua atividade frente a várias cepas, como: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumonia*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp., e *Serratia* spp. Estudos têm destacado a possibilidade do seu uso terapêutico no combate às infecções (SHARIFI-RAD et al., 2017, p. 1-13; MARINELLI; STEFANO; CACCIATORE, 2018, p. 903-921).

Outra espécie vegetal com notável atividade antimicrobiana é *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel tem seu uso na medicina tradicional como antibacteriano. O óleo essencial de *M. alternifolia* é conhecido como “tea tree oil” e é formado por mais de 100 componentes e a substância mais abundante é o terpinen-4-ol, o qual está presente neste em uma quantidade de, no mínimo, 30% (SHARIFI-RAD et al., 2017, p.1475). A atividade do terpinen-4-ol tem sido descrita na literatura e acredita-se que a substância seja a principal responsável pela atividade antibacteriana do óleo essencial de *M. alternifolia*, pois há uma similaridade da eficácia antibacteriana do óleo essencial e do composto isolado (SHARIFI-RAD et al., 2017, p.1475-1494; OLIVA et al., 2018, p. 2584; BRUN et al., 2019, p. 108).

Tem-se evidenciado características antimicrobianas do carvacrol e do terpinen-4-ol, entretanto, não há relatos sobre o potencial destas substâncias em atuar sobre enzimas de resistência bacteriana, visando sua utilização como adjuvante no tratamento de infecções resistentes. Dessa forma, tomando como base o potencial destes monoterpenos, este estudo objetivou investigar a capacidade do carvacrol e do terpinen-4-ol inibirem uma enzima β -lactamase ESBL, isolada de *Klebsiella pneumoniae*, através de uma análise *in silico* por meio de docking molecular.

METODOLOGIA

A geometria das estruturas químicas do carvacrol e terpinen-4-ol foram otimizadas utilizando o programa *Hyperchem* v. 8.0.3, através do método da mecânica molecular (MM+) e do método semi-empírico AM1 (Austin Modelo 1) (DEWAR; AMI, 1985, p. 3902-39091). A estrutura da enzima β -lactamase ESBL foi obtida do Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) juntamente com seu inibidor co-cristalizado, com ID PDB: 3OPR (1.65 Å) (SAMPSON et al., 2011, p. 2303-2309). O *docking* molecular foi realizado com o auxílio do software Molegro Virtual Docker (MVD) (v 6.0.1, Molegro ApS, Aarhus, Denmark) utilizando os parâmetros padrões do software. Foram retiradas as moléculas de água e gerado template no inibidor co-cristalizado da enzima PDB.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a validação dos protocolos realizados no docking molecular foi realizado o *redocking* e utilizados o valor do RMSD (*Root Mean Standard Deviation*) para análise da

precisão do docking molecular. Para ser considerado um docking válido os valores de RMSD devem permanecer na faixa de 0-2 Å (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006, p. 3315-3321). O valor de RMSD obtido neste estudo foi de 0.54 Å, com o MolDock score de -61.2 kcal/mol para a enzima 3OPR. Portanto, tais resultados estão dentro dos valores aceitáveis e validam o procedimento a ser realizado.

Como resultado das análises, as energias de ligação do carvacrol e do terpinen-4-ol com 3OPR estão expressas na Tabela 2.

Tabela 2 – MolDock score do inibidor-PDB, carvacrol e terpinen-4-ol com 3OPR

Enzima	Inibidor-PDB	Carvacrol	Terpinen-4-ol
3OPR	- 61.2 kcal/mol	- 38.2 kcal/mol	- 30.7 kcal/mol

Fonte: Elaboração própria, 2020.

É possível observar que a energia de ligação mais próxima da energia do inibidor-PDB foi a do carvacrol (-38.2 kcal/mol). Entretanto, este resultado é muito próximo do valor apresentado pelo terpinen-4-ol (-30.7 kcal/mol). Tais resultados demonstram que ambos os fitoconstituintes possuem capacidade de ligação no sítio ativo da β -lactamase.

Para que ocorra a formação do complexo inibidor-enzima, com um ancoramento adequado na enzima β -lactamase, são necessárias as interações com os resíduos de aminoácidos Ser70, Lys234, Thr235, Ser180, Asn132 (SAMPSON et al, 2011, p. 2303-2309). Tanto o carvacrol quanto o terpinen-4-ol apresentaram interações favoráveis para que ancorem neste sítio ativo (Tabela 1).

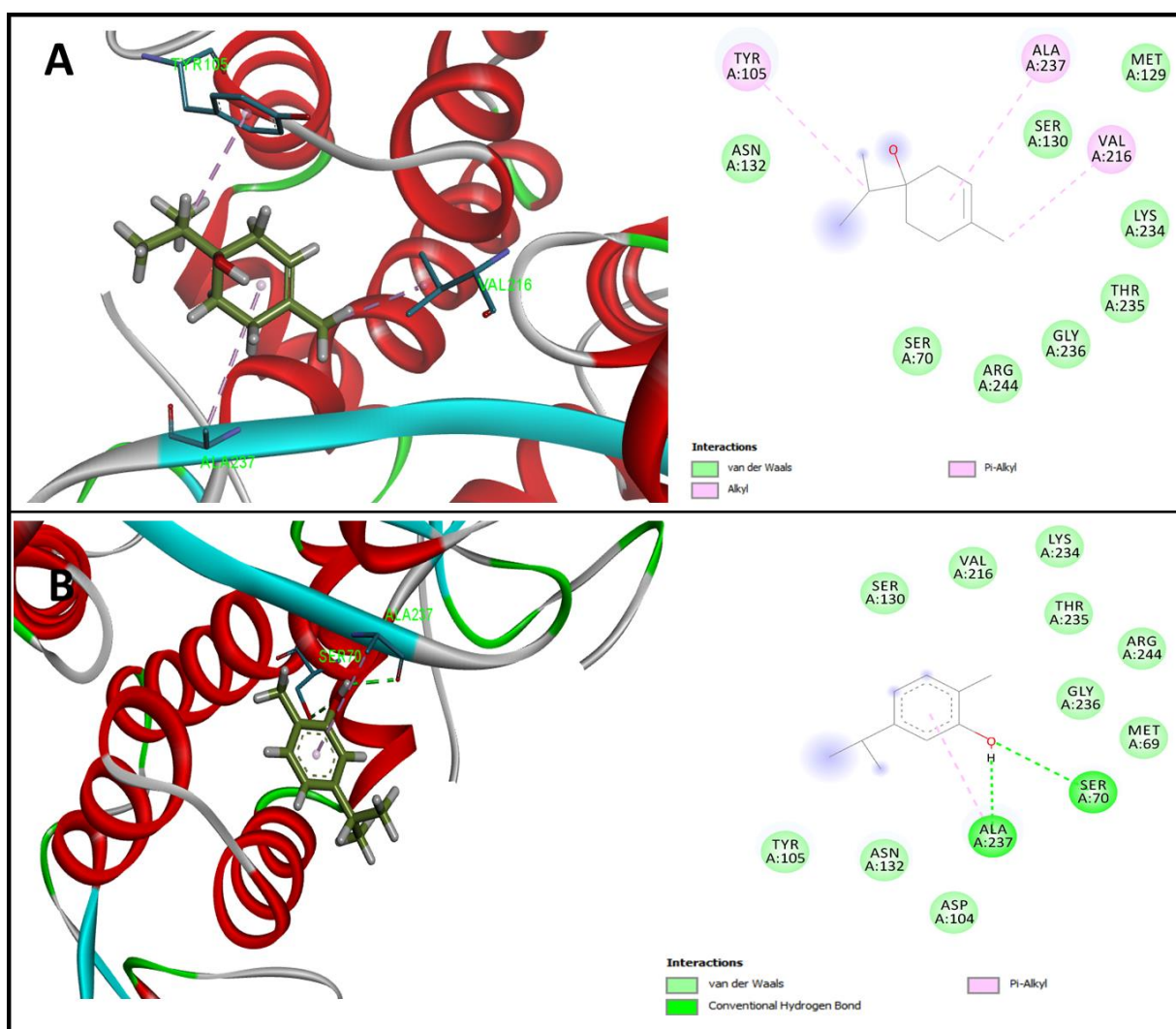
Tabela 1 – Interações entre carvacrol e terpinen-4-ol com o sítio ativo da enzima 3OPR

Enzima	Carvacrol		Terpinen-4-ol	
	Ligações de hidrogênio	Interações hidrofóbicas	Ligações de hidrogênio	Interações hidrofóbicas
3OPR	Ser70 e Ala237	Asn132, Thr235, Ser130, Tyr105	-	Tyr105, Ala237, Val216, Ser130, Asn132

Fonte: Elaboração própria, 2020.

Com base nos resultados da Tabela 1, pode-se observar que o carvacrol apresenta as interações com os resíduos Ser70, Asn132 e Thr235 da 3OPR em comum com as interações que seu ligante-PDB realiza para o encaixe no seu sítio ativo. Enquanto que terpinen-4-ol realiza apenas a interação Asn132 em comum com este. Apesar disso, interações com outros aminoácidos do sítio ativo da enzima são também realizadas, como demonstrado na Figura 1, tendo o terpinen-4-ol maior capacidade de formar interações hidrofóbicas do que o carvacrol.

Tabela 1 – Interações entre (A) terpinen-4-ol e (B) carvacrol com o sítio ativo da enzima 3OPR



Fonte: Elaboração própria, 2020.

Assim, observa-se que tanto o carvacrol quanto o terpinen-4-ol apresentam capacidade de ligação com o sítio ativo da β -lactamase 3OPR e fazem ligações com os aminoácidos do sítio ativo da enzima, algumas das quais são similares às ligações realizadas pelo inibidor presente no PDB associado à enzima.

Ainda não são encontrados relatos sobre o carvacrol e terpinen-4-ol como inibidores de β -lactamases. Entretanto, dados da literatura apontam que o sítio ativo das β -lactamases possuem afinidade por moléculas pequenas e hidrofóbicas (TORELLI et al., 2019, p. 1013-1021), tais como alguns fitoconstituintes presentes nos óleos essenciais, como o carvacrol e o terpinen-4-ol.

A enzima utilizada neste estudo pertence à classe das ESBL (Extended-spectrum β -lactamases), que atuam hidrolisando penicilinas, monobactâmicos e cefalosporinas de terceira geração, sendo largamente encontradas em *Klebsiella pneumoniae*. Tais enzimas são consideradas uma das principais causas de falhas na terapia antimicrobiana contra esta espécie Gram-negativa e é um dos mais evidentes mecanismos de resistência expresso por tais bactérias (BLAIR, et al., 2015 p. 42-51; SHAIKH et al., 2015, p. 90-101). Desta forma, é interessante que mais estudos sejam realizados com o carvacrol e terpinen-4-ol atuando como inibidores destas enzimas, pois é de grande importância que surjam alternativas terapêuticas além das que são comercializadas atualmente para inibição das enzimas de resistência.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no exposto, conclui-se que o carvacrol e o terpinen-4-ol apresentam-se como prováveis inibidores de β -lactamase, pois foi evidenciado através do docking molecular que há encaixe favorável com o sítio ativo da enzima 3OPR. Tal informação é importante para o desenvolvimento de novos inibidores desta enzima, de modo que é interessante que mais estudos sejam realizados, *in vitro* e *in vivo*, para investigar melhor esta possível atividade de tais fitoconstituintes.

REFERÊNCIAS

BLAIR, J. M.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

- BRUN, P.; BERNABÈ, G.; FILIPPINI, R.; PIOVAN, A. *In vitro* antimicrobial activities of commercially available tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oils. **Current microbiology**, v. 76, n. 1, p. 108-116, 2019.
- BUSH, K. Past and present perspectives on β -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 10, p. e01076-18, 2018.
- CHANDRA, H.; BISHNOI, P.; YADAV, A.; PATNI, B.; MISHRA, A. P.; NAUTIYAL, A. R. Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobials—a review. **Plants**, v. 6, n. 2, p. 16, 2017.
- DEWAR, M. J. AMI: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, p. 3902-39091, 1985.
- FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspectives in medicinal chemistry**, v. 6, p. S14459, 2014.
- MARTENS, E.; DEMAIN, A. L. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. **The Journal of antibiotics**, v. 70, n. 5, p. 520-526, 2017.
- MARINELLI, L.; STEFANO, A. D.; CACCIATORE, I. Carvacrol and its derivatives as antibacterial agents. **Phytochemistry Reviews**. v. 17, p. 903-921, 2018.
- NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**. v. 6, n. 12, p. 1451–1474, 2013.
- OLIVA, A.; COSTANTINI, S.; ANGELIS, M.; GARZOLI, S.; BOŽOVIC, M.; MASCELLINO, M. T.; VULLO, V.; RAGNO, R. High Potency of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil against Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacteria and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2584, 2018
- PIDDOCK, L. J. V. Understanding drug resistance will improve the treatment of bacterial infections. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 639-640, 2017.
- SAMPSON, J. M.; KE, W.; BETHEL, C. R.; PAGADALA, S. R. R.; NOTTINGHAM, M. D.; BONOMO, R. A.; BUYNAK, J. D.; VAN DEN AKKER, F. Ligand-dependent disorder of the Ω loop observed in extended-spectrum SHV-type β -lactamase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 2303-2309, 2011.
- SHAIKH, S.; FATIMA, J.; SHAKIL, S.; RIZVI, S. M. D.; KAMAL, M. A. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Saudi journal of biological sciences**, v. 22, n. 1, p. 90-101, 2015.
- SHARIFI-RAD, M.; VARONI, E. M.; IRITI, M.; MARTORELL, M.; SETZER, W. N.; DEL MAR CONTRERAS, M.; SALEHI, B.; SOLTANI-NEJAD, A.; RAJABI, S.; TAJBAKHS, M.; SHARIFI-RAD, J. Carvacrol and human health: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**. p. 1-13, 2018.
- RUPPÉ, É.; WOERTHER, P.; BARBIER, F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. **Annals of intensive care**, v. 5, n. 1, p. 21, 2015.
- SHARIFI-RAD, J.; SALEHI, B.; VARONI, E. M.; SHAROPOV, F.; YOUSAF, Z.; AYATOLLAHI, S. A.; KOBARFARD, F.; SHARIFI-RAD, M.; AFDJEI, M. H.; SHARIFI-RAD, M.; IRITI, M. Plants of the *Melaleuca* genus as antimicrobial agents: From farm to pharmacy. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 10, p. 1475-1494, 2017.
- THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315-3321, 2006.
- TORELLI, N. J.; AKHTAR, A.; DEFREES, K.; JAISHANKAR, P.; PEMBERTON, O. A.; ZHANG, X.; JOHNSON, C.; RENSON, A. L.; CHEN, Y. Active-Site Druggability of Carbapenemases and Broad-Spectrum Inhibitor Discovery. **ACS infectious diseases**, v. 5, n. 6, p. 1013-1021, 2019.
- VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacy and therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277, 2015.

WELLINGTON, E. M.; BOXALL, A. B.; CROSS, P.; FEIL, E.J.; GAZE, W.H.; HAWKEY, P.M.; JOHNSON-ROLLINGS, A. S.; JONES, D. L.; LEE, N. M.; OTTEN, W.; THOMAS, C. M.; WILLIAMS, A. P. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n. 2, p. 155-165, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>>. Acesso em: 07/04/2020.