

Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos

Lyvia Layanne Silva Rosa

**Atividade antibacteriana do Isoeugenol frente cepas clínicas de
*Staphylococcus aureus***

João Pessoa-PB
Agosto/2018

Lyvia Layanne Silva Rosa

**Atividade antibacteriana do Isoeugenol frente cepas clínicas de
*Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao
**Programa de Pós-graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos** do Centro de Ciências da Saúde
da Universidade Federal da Paraíba como
requisito parcial para a obtenção do título
de Mestre em **Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos**, na área de
concentração **Farmacologia**.

Orientadora: Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

João Pessoa-PB

Agosto/2018

R789a Rosa, Lyvia Layanne Silva.

Atividade antibacteriana do isoeugenol frente cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* / Lyvia Layanne Silva Rosa. - João Pessoa, 2018.
60 f.

Orientação: Edeltrudes de Oliveira Lima Lima.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Infecções. 2. Atividade antibacteriana. 3. Isoeugenol. 4. Óleos essenciais. 5. *Staphylococcus aureus*. 6. Sinergismo. 7. Aminoglicosídeos. I. Lima, Edeltrudes de Oliveira Lima. II. Título.

UFPB/BC

Lyvia Layanne Silva Rosa

**Atividade antibacteriana do Isoeugenol frente cepas clínicas de
*Staphylococcus aureus***

Aprovado em ___/___/___

Banca Examinadora



Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

Orientadora



Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães

Examinador Interno

Profa. Dra. Hilizeth de Luna Freire Pessoa

Examinadora Externa

João Pessoa-PB

Agosto/2018

Dedicatória

Dedico este trabalho aqueles que são a essência da minha vida:

Aos meus pais, *Luiz e Josilene*, pelo amor, confiança e por terem sempre me ensinado a seguir o caminho da fé, educação e perseverança.

As minhas tias, tios e avó, por todo apoio durante esses anos de curso, sem eles com certeza eu não teria conseguido chegar até aqui.

Agradecimentos

Primeiramente a *Deus*, por ser meu refúgio e minha fortaleza. A Ele dou graças por ter me proporcionado sabedoria, força e paciência para chegar até aqui.

Aos meus pais, *Luiz e Josilene*, a quem devo tudo que sou e tenho. Sei do grande esforço que fizeram para que eu alcançasse os meus objetivos. Obrigada por nunca terem desistido de mim e por serem os melhores pais que alguém poderia ter. Espero sempre ser motivo de orgulho e ser digna de tudo que fizeram e que fazem por mim até hoje.

A minha família, em especial as minhas tias *Jacqueline, Jacquilene, Landinha Geovana e Jaimal (in memorian)*, por terem me apoiado desde o dia que cheguei aqui em João pessoa. Cada uma com seu jeito especial, seu amor e preocupação de tia tornaram minha vida melhor diante da imensa saudade que sempre senti dos meus pais.

A minha amada avó *Júlia* que foi e sempre será minha fonte inesgotável de amor.

A *Rafael, Alex e Werson* por todo amor, carinho e apoio.

As minhas eternas e melhores amigas *Ingrid, Mírian, Emyllayne, Aninha, Amanda, Jamille, Ayssa, Jessila e Talita*, que estão sempre na torcida pelo meu sucesso.

Ao meu querido *José Lucas* que com certeza foi o melhor presente que a Farmácia me deu. Meu melhor amigo, meu apoio, meu irmão do coração! Não sei o que seria de mim sem você... sempre paciente, dedicado, generoso, humilde, fiel e preocupado comigo. Obrigada por tudo, por tudo mesmo, *Josef*. Te amo demais.

A minha companheira de curso, de apartamento, do mestrado, dos melhores momentos e grande amiga, *Hidna*. Deus é tão bom, mas tão bom que me colocou no melhor lugar com a melhor pessoa. São sete anos de uma ótima convivência,

de uma grande amizade e de muitas histórias. Obrigada por ser quem você é e por estar sempre ao meu lado.

Aos Topíssimos (*Hidna, Lucas, Fernando, Jessyca, Fiama, Renata e Filipe*) que me fizeram acreditar que realmente podemos construir amizades verdadeiras durante a graduação e que permanecem após. Que esse elo de amizade nunca se desfaça.

Aos meus queridos professores e amigos *Mariana Vieira Sobral* e *Josean Fechine*, sem o apoio, a amizade e a confiança de vocês, com certeza eu não teria chegado até aqui. Minha eterna gratidão.

A *Hermes*, que me ajudou a realizar todos os experimentos sempre com muita paciência e boa vontade. Não teria conseguido sem você.

A *Daniele* e *Jeferson*, meus colegas de laboratório, por toda ajuda sempre que precisei.

A minha querida orientadora *Edeltrudes de Oliveira Lima*, pela confiança, oportunidade e compreensão. És um exemplo de ser humano.

À banca examinadora, Prof. Dr. *Hemerson Iury Ferreira Magalhães* e Profa. Dra. *Hilzeth de Luna Freire Pessoa*. Meus sinceros agradecimentos por sua disponibilidade e pelo enriquecimento da realização desta tão sonhada conquista.

A *Capes* e a *UFPB* pelo apoio financeiro e institucional

Muito obrigada!

RESUMO

ROSA, L.L. **Atividade antibacteriana do Isoeugenol frente cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, 2018.** 60p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração: Farmacologia) CCS/UFPB, João Pessoa.

Staphylococcus aureus são microrganismos de grande importância clínica, pois são um dos principais agentes responsáveis por infecções bacterianas, tanto no ambiente hospitalar como na comunidade, e apresentam grande resistência aos antibióticos. Sabendo que bactérias resistentes a múltiplas drogas representam um desafio para o tratamento das infecções é necessário encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas que sejam eficazes no combate a estes microrganismos. Na busca de novas alternativas terapêuticas para o tratamento dessas infecções, os produtos naturais de origem vegetal constituem umas das mais importantes fontes de novas substâncias que podem ser utilizadas para estes fins, destacando os óleos essenciais e seus fitoconstituintes, como o Isoeugenol, um fenilpropanoide. Diante disso, foi avaliada a atividade antibacteriana do isoeugenol frente cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* através de ensaios realizados *in vitro*: Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), avaliação do efeito da substância sobre a cinética de crescimento microbiano (*time-kill*) e estudos de associação do isoeugenol com antibiótico padrão (gentamicina). Na avaliação da atividade antibacteriana, o isoeugenol apresentou CIM de 512 µg/mL e na CBM houve crescimento do microrganismo em todas as concentrações. No ensaio de cinética de morte microbiana (*time-kill*), o isoeugenol demonstrou atividade bacteriostática que não dependente da concentração, já que o aumento da mesma não provoca aumento significativo da atividade. A associação do fenilpropanoide com a gentamicina mostrou que para a cepa clínica de *S. aureus* S.A-116 a associação resultou em um efeito sinérgico, e para a cepa ATCC-150 efeito de aditividade ou indiferença. Com isso, os resultados desse estudo sugerem que o isoeugenol apresenta atividade antibacteriana frente cepas de *S. aureus*, seja de forma isolada ou em associação com o antimicrobiano padrão.

PALAVRAS-CHAVE: Infecções, atividade antibacteriana, Isoeugenol, óleos essenciais, *Staphylococcus aureus*, sinergismo, aditividade, aminoglicosídeos.

ABSTRACT

ROSA, L.L. **Atividade antibacteriana do Isoeugenol frente cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, 2018.** 60p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração: Farmacologia) CCS/UFPB, João Pessoa.

Staphylococcus aureus are microorganisms of great clinical importance, as they are the main agents responsible for bacterial infection, both hospital and community, and are highly resistant to antibiotics. What is resistant to resistance to a challenge for the protection process are the antimicrobial characteristics that are effective in combating these microorganisms. In search of new therapeutic alternatives for the treatment of infections, vegetable products of plant origin can be important sources of new substances that can be used for these flippers, such as essences and their phytochemicals, such as Isoeugenol, a phenylpropanoid. Therefore, the antibacterial activity of isoeugenol against clinical strains of *Staphylococcus aureus* was evaluated through in vitro assays: Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bacterial Concentration (MBC), determining the efficacy of the concentration on growth kinetics microbial. (time-kill) and association studies of isoeugenol with standard antibiotic (gentamicin). In the evaluation of the antibacterial activity, isoeugenol presented MIC of 512 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and in the CBM there was growth of the microorganism in all the concentrations. In the assay of death microbial (time-kill), isoeugenol showed bacterial activity that did not depend on the concentration, since the increase of the same did not provoke a significant increase of the activity. The association of phenylpropanoide with gentamicin was promoted for a clinical treatment of *S. aureus* S.A-116. With this, the results are studied with the use of isoeugenol presents antibacterial activity against *S. aureus*, either alone or in association with the antimicrobial standard.

KEY WORDS: Infections, antibacterial activity, isoenugenol, essential oils, *Staphylococcus aureus*, synergism, additivity, aminoglycosides

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Micromorfologia e micromorfologia do <i>S.aureus</i>	18
Figura 2: Fatores de virulência de <i>S. aureus</i>	19
Figura 3: Classificação dos antibióticos com base no seu mecanismo de ação.....	22
Figura 4: Mecanismos de resistência dos antibióticos.....	24
Figura 5: Estrutura do isoeugenol e eugenol.....	28
Figura 6: Curva de morte microbiana (Log UFC/mL) da cepa <i>S.aureus</i> S.A116, sob ação do isoeugenol e antibiótico padrão gentamicina.....	46
Figura 7: Curva de morte microbiana (Log UFC/mL) da cepa <i>S.aureus</i> ATCC 150, sob ação do isoeugenol e antibiótico padrão gentamicina.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Origem das cepas clínicas.....	35
Tabela 2: Concentrações inibitórias mínimas (CIM) e bactericidas mínima (CBM) do isoeugenol e da gentamicina sobre cepas clínicas de <i>S. aureus</i>	43
Tabela 3: Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) da associação entre o isoeugenol e a gentamicina sobre cepas de <i>S. aureus</i>	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ABSTS	[2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AN	Ágar nutriente
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CA- MRSA	<i>Community acquired-MRSA</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CE ₅₀	Concentração efetiva média
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração inibitória mínima
DL ₅₀	Dose letal média
DPPH	(1,1- difenil-2-picrilhidrazil)
HA- MRSA	<i>Hospital acquired-MRSA</i>
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
IL-1	Interleucina 1
IRAS	Infecções relacionadas com a assistência a saúde
MDR	Resistência a múltiplos fármacos
MRSA	<i>Methicillin resistente Staphylococcus aureus</i>
OMS	Organização mundial da saúde
PBPS	Proteína de ligação de penicilina
ZOI	Zona de inibição

SUMÁRIO

1 Introdução	15
2 Referencial teórico	18
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.2 Terapia e resistência bacteriana	20
2.3 Produtos naturais.....	25
2.4 Isoeugenol.....	27
3 Objetivos	322
3.1 Gerais	322
3.2 Específicos.....	322
4. Material e Métodos	344
4.1 Local de trabalho	344
4.2 Cepas Bacterianas	344
4.3 Inóculo	366
4.4 Meios de Cultura	366
4.5. Substâncias	366
4.6 Avaliação da atividade antibacteriana	377
4.6.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	377
4.6.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	388
4.6.3 Efeito do produto teste sobre a cinética do crescimento das bactérias (<i>time-kill</i>).....	388
4.7 Ensaio de associação através do método <i>checkerboard</i>	399
4.8 Análise estatística	399
5 Resultados e discussão	411
5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).....	422
5.2 Efeito do produto teste sobre a cinética do crescimento das bactérias (<i>time-kill</i>)	455
5.3 Ensaio de associação pelo método <i>checkerboard</i>	477
6 Conclusão	501
Referências	52

Introdução

1 Introdução

As doenças infecciosas são causadas por microrganismos patogênicos como vírus, fungos, parasitas e bactérias que, ao invadirem o organismo do hospedeiro, se reproduzem e causam danos aos tecidos (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) as infecções são responsáveis por um terço das causas de mortalidade no mundo em desenvolvimento, representando um grande problema de saúde pública, em virtude do impacto socioeconômico que geram a sociedade (WHO, 2015).

Diversas espécies podem causar infecções bacterianas, tanto na comunidade como no ambiente hospitalar, essas atualmente são conhecidas como infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), que conceitualmente são aquelas infecções adquiridas após o internamento do indivíduo no hospital, cuja manifestação pode ocorrer durante a internação ou após a alta (OLIVEIRA et al., 2011). Dados da OMS afirmam que estas atingem 14% dos usuários internados no Brasil (LIMA et al., 2015).

Esse tipo de infecção é comum e relevante devido à sua frequência, morbidade e mortalidade. Dentre os principais patógenos causadores destaca-se *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, principalmente em infecções de sítio cirúrgico e corrente sanguínea. Estes patógenos também são considerados principais causadores das infecções comunitárias (LIMA et al., 2015).

Staphylococcus aureus é uma das espécies do gênero mais comuns e mais virulenta, uma vez que atua como agente de uma gama de infecções. Vários mecanismos de virulência foram desenvolvidos por estas bactérias para escapar do sistema imunológico, incluindo proteínas de superfície, enzimas e toxinas, que podem causar infecções que variam de superficiais até disseminadas (SANTOS, 2007).

Inicialmente, na década de 40 a 50 as infecções causadas por *S.aureus* foram tratadas com penicilina, atuando a nível de parede celular. Porém, logo surgiram estirpes de bactérias resistentes a esses antimicrobianos que possuíam anel beta lactâmico. Com isso, novas penicilinas (meticilinas) foram desenvolvidas, contudo na década de 70 começaram a aparecer cepas de *S. aureus* com resistência à meticilina, que foram identificadas pela sigla MRSA

(*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), disseminadas rapidamente em ambiente hospitalar, como também na comunidade. Essa resistência é conferida à bactéria por fatores genéticos, como mutações e relaciona-se ao uso indiscriminado, empírico e rotineiro de antibióticos (GRILLO, 2013). A resistência a múltiplos fármacos (MDR) é o maior obstáculo para se alcançar um tratamento pleno destas doenças bacterianas, contudo a vancomicina e a teicoplanina são dois dos poucos medicamentos que realmente conseguem combater essas cepas multirresistentes. Portanto, a busca por novos medicamentos é constante, e diante disso, destaca-se a utilização dos produtos naturais como fonte de substâncias potencialmente ativas (OLIVEIRA; MACHADO; FREITAS, 2014).

Há anos as plantas são utilizadas para uso terapêutico, produzindo metabólitos secundários ativos com diversas atividades biológicas já conhecidas. Dentre esses metabólitos destacam-se os óleos essenciais que são misturas complexas, voláteis e de baixo peso molecular, geralmente constituídos por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides. Dados da literatura mostram a importância dos óleos essenciais como produtos naturais com potencial biológico, incluindo atividade antimicrobiana (MARCHESE et al., 2016; LIMA et al., 2011).

Dentre os compostos fenólicos presentes em óleos essenciais encontram-se os difenóis, sendo o eugenol (4-alil-1-hidroxi-2-metoxibenzeno) e seu isômero isoeugenol (2-metoxi-4-propenil-fenol) importantes constituintes dessa classe (BAKKALI, et al., 2008; CUNHA; ROQUE; NOGUEIRA, 2012).

Diante do exposto, pode-se inferir que é necessária a realização de estudos que investiguem o potencial antibacteriano de fitoconstituintes frente cepas clínicas, com o objetivo de avaliar seu nível de atividade, seja isoladamente ou em associação com outros antibacterianos já utilizados e, posteriormente, analisar a sua inserção como uma opção terapêutica, seja auxiliando na melhora da eficácia ou evitando sua inibição proveniente de mecanismos de resistência. Portanto, baseado no potencial biológico que apresentam os fenilpropanoides, este trabalho de pesquisa propôs avaliar a atividade antibacteriana do isoeugenol contra cepas clínicas de *S. aureus* e sua associação aos antimicrobianos na busca de uma nova alternativa no combate de infecções bacterianas causadas por essa espécie.

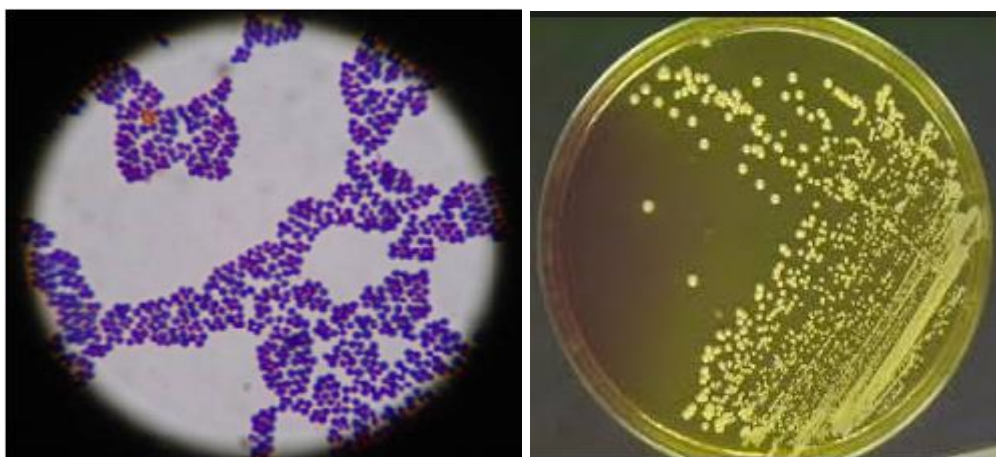
Referencial teórico

2 Referencial teórico

2.1 *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* fazem parte da família *Micrococcaceae*, são cocos Gram e catalase-positivos, que variam de 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não esporuladas e geralmente encapsuladas, encontradas aos pares ou agrupando-se em formato de cachos de uva, sendo maioria aeróbicas ou anaeróbicas facultativas. As colônias em meio de cultura sólido têm formas arredondadas e aparência rugosa e brilhante, com coloração amarelo-ouro (Figura 1) (BROOKS et al., 2009; LEVINSON, 2010; MUZI-DIAZ; PINHEIRO; ALVES, 2015; VERONESI; FOCACCIA, 2015).

Figura 1: Micromorfologia e macromorfologia de *S.aureus*

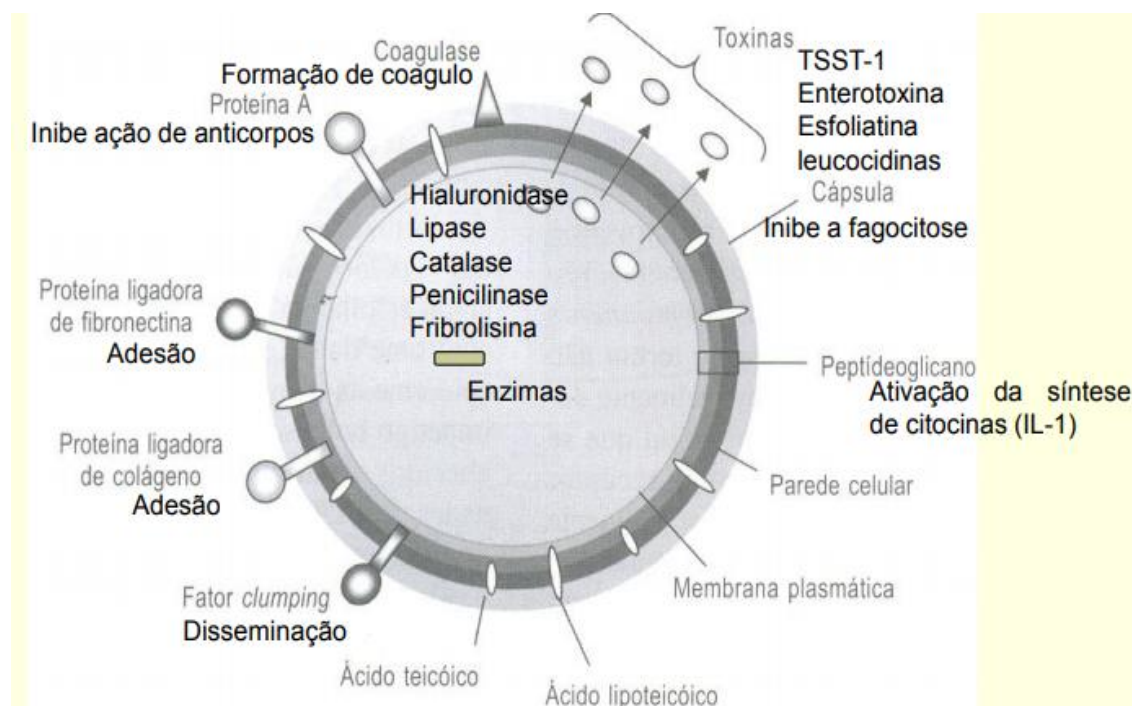


Fonte: www.researchgate.net/

O gênero *Staphylococcus* possui 33 espécies, mas apenas 17 foram isoladas de material biológico humano. Dentre as espécies, *Staphylococcus aureus* são microrganismos ubíquos, disseminados por toda parte, podendo ser encontrado na microbiota da pele e principalmente na mucosa nasal dos seres humanos. Para provocar infecções em humanos *S. aureus* apresenta vários fatores de virulência responsáveis pela sua patogenicidade, incluindo a presença da cápsula polissacarídica, que pode inibir a fagocitose bacteriana (MURRAY, 2009); presença de adesinas, que favorecem a adesão as células do hospedeiro; ácido teicoico e peptidoglicano na parede celular, que estimula a liberação de

citocinas, por exemplo IL-1, e quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares; a proteína A com efeitos anticomplementares, quimiotáticos, antifagocitários e reações de hipersensibilidade, assim como a presença de enzimas e toxinas (Figura 2) (SANTOS, 2007).

Figura 2: Fatores de virulência de *S. aureus*



Fonte: www.researchgate.net/

S. aureus é um dos patógenos humanos mais importantes, uma vez que atua como agente causador de inúmeras infecções tanto na comunidade como relacionadas a assistência à saúde (IRAS), podendo variar de infecções superficiais, como furúnculos e acnes, sistêmicas como meningite, pneumonias e endocardite, a quadros tóxicos como síndrome do choque tóxico (HOLLAND; FOWLER, 2017). Colonizando cerca de 30% das pessoas, é a principal causa de endocardite infecciosa (IE), de bacteremia, infecção osteoarticular, de pele, tecidos moles e relacionadas a dispositivos (TONG, 2015).

Das IRAS, mais de 20% são adquiridas nas UTI's, destacando-se as infecções sanguíneas associadas ao cateter, a pneumonia associada ao ventilador e as infecções do trato urinário associadas ao cateter (MARCHAIM;

KAYE, 2017). Nas Unidades de terapia intensiva neonatal estima-se que as infecções severas representam 26% das causas de mortes neonatais e, no Brasil, 60% das mortes de crianças no período neonatal estão relacionadas com sepse, sendo *S. aureus* um dos principais patógenos causadores dessas infecções de UTI's (OLIVEIRA; SAGE; PALOS, 2017).

Em uma análise de mais de 200 artigos sobre IRAS nos países em desenvolvimento *S. aureus* foi o segundo maior causador de infecções, atrás apenas das enterobactérias. Em países desenvolvidos, *S. aureus* demonstrou causar doença significativa em populações desfavorecidas, incluindo comunidades indígenas (JENNEY, 2014).

As doenças provocadas por *S. aureus* podem ser decorrentes da invasão direta dos tecidos, geralmente através da pele, entre um indivíduo portador da bactéria e outro não-portador, de forma indireta através de secreções, poeira e fômites, bacteremia primária ou, exclusivamente, ser devidos às toxinas, (BRAUNWALD, 2002) e são consideradas um problema de saúde global significativo que é exacerbado pela emergência e ampla circulação de cepas resistentes a drogas como *S. aureus* resistente à meticilina tanto no âmbito hospitalar (HA-MRSA) como na comunidade (CA-MRSA) (GORDON; LOWY 2008).

O diagnóstico laboratorial é realizado através da coleta de amostras utilizando *swab*. Os mesmos são semeados em ágar sangue ou caldo BHI, o qual é incubado em estufa a 37°C por 24 horas. Ocorrendo crescimento, as colônias são semeadas em ágar manitol salgado, meio específico para identificação. Colônias típicas e *S. aureus* são submetidas ao teste de Gram, catalase e coagulase, para confirmação desta bactéria (CHAMBERS; DELEO, 2009). Nos casos de intoxicação alimentar, o diagnóstico é realizado apenas pelas manifestações clínicas do paciente e por um histórico de ingestão de um alimento específico (PFALLER, 2014).

2.2 Terapia e resistência bacteriana

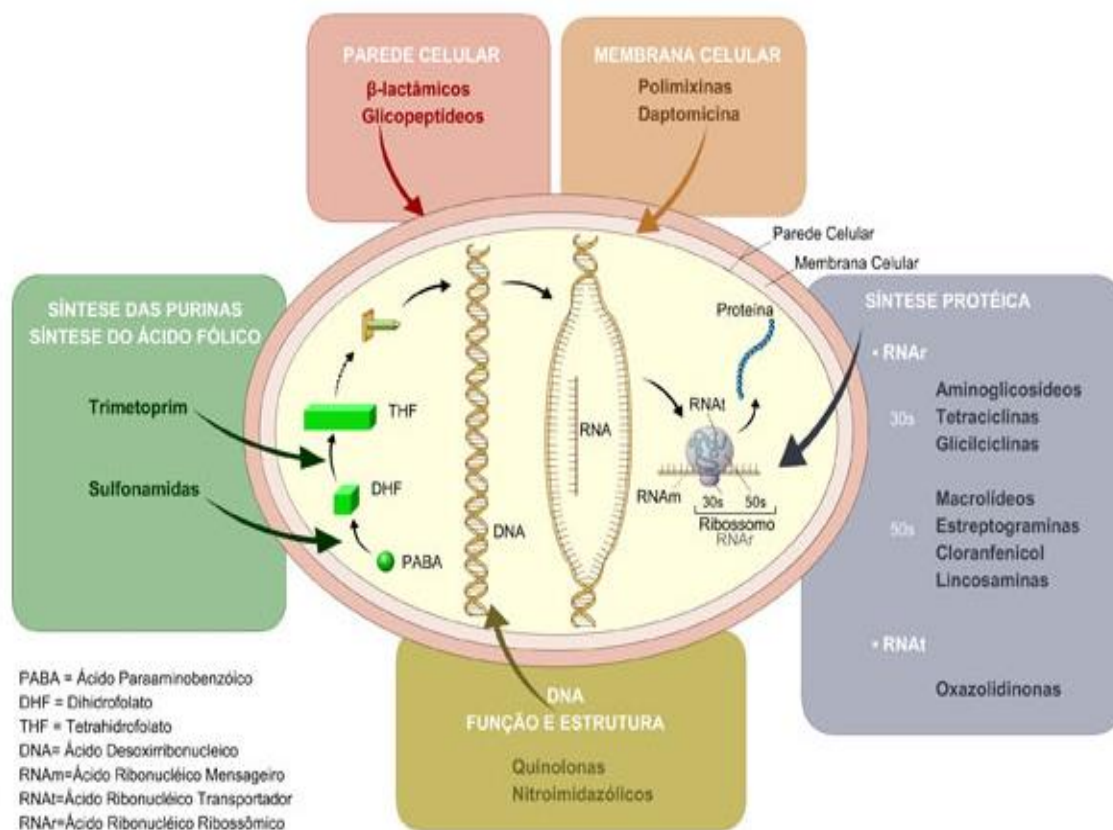
A luta da humanidade contra doenças infecciosas é bem conhecida e a descoberta de antibióticos levou ao otimismo que as infecções podem ser controladas e prevenidas. Esses podem atuar com ação bactericida, destruindo

a população bacteriana ou com ação bacteriostática, inibindo o crescimento bacteriano (PANKEY; SABATH, 2013) e assim produzindo efeitos que causam interferência sobre as vias metabólicas desses agentes infecciosos, que vão desde alteração de permeabilidade da membrana externa até processos de síntese (parede celular, ácido fólico, DNA, RNA e proteínas) (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017).

Em 1940 as penicilinas foram introduzidas para o tratamento contra infecções bacterianas, porém, dois anos após surgiram os primeiros relatos de cepas produtoras de β -lactamases, enzimas que inativam os antibióticos por hidrólise do anel β -lactâmico. Diante disso, foi desenvolvido em laboratório um grupo de drogas resistentes as β -lactamases, como a meticilina. Contudo, linhagens de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) surgiram e começaram a se disseminar pelos hospitais HA-MRSA (*Hospital acquired-MRSA*) como também na comunidade CA-MRSA (*Community acquired-MRSA*) (RICE, 2006). Hoje há uma prevalência que varia de 1% (na Holanda) até 50% (em países da América e Europa) (LOUREIRO et al., 2016). Na década de 90 deu-se início ao uso das fluoroquinolonas no tratamento de MRSA, porém muitas linhagens contornaram a susceptibilidade as mesmas e tornaram-se resistentes (RICE, 2006).

Atualmente no tratamento de infecções por *S. aureus* podem ser utilizadas cefalosporinas de primeira e segunda geração, como cefalexina ou cefaclor, agentes β -lactamicos que atuam inibindo a síntese de peptidoglicano da parede celular ao se ligarem as proteínas de ligação de penicilina (PBPs). Fluoroquinolonas de terceira geração, como levofloxacino, inibindo a replicação do DNA ao se ligarem nas proteínas relacionadas com a replicação, como DNA girase e topoisomerase, os aminoglicosídeos, como a gentamicina, sendo seu alvo principal de ação o RNA mensageiro, causando um leitura errada e terminação prematura do mesmo, inibindo então a síntese proteica. (Figura 3) A escolha do antibiótico é previamente estabelecida de acordo com o tipo de infecção e teste de sensibilidade (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017).

Figura 3 Classificação dos antibióticos com base no seu mecanismo de ação



Fonte: <http://www.anvisa.gov.br> (2007)

Especialmente para os casos de estirpes com resistência a múltiplas drogas (MDR), como é o caso de MRSA no âmbito hospitalar, a terapia padrão é a vancomicina (Figura 3), considerada muitas vezes a última arma contra essas cepas. É um glicopeptídeo que impede a ligação da subunidade D-alanil do peptideoglicano com o PBP, e, portanto, inibe a síntese da parede celular. O aumento da pressão seletiva levou ao isolamento, em 1997, da primeira cepa de *S. aureus* resistente à vancomicina no Japão e, em 2000, no Brasil. Essa cepa possuía o gene *vanA*, provavelmente adquirido de uma cepa de *Enterococcus* resistente à vancomicina (LIMA et al., 2015). Uma outra opção de terapia é a linezolida, (Figura 3) da classe das oxazolidinonas, que atua por inibir a síntese proteica e foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos para infecções de pele, tecidos moles e pneumonia por MRSA. Apresenta uma ótima eficácia, porém custo elevado e grande potencial para toxicidade, incluindo mielossupressão, neuropatia periférica e neurite óptica (MÉGIA; ZURITA; GUZMÁN-BLACO, 2010; LIMA, et al., 2015).

Diante disso, a resistência aos antibióticos é um problema de profunda preocupação científica tanto no hospital quanto na comunidade desde o início da era antibiótica, com sérias consequências no tratamento das doenças infecciosas (SHAIKH et al., 2014). Ela está associada a uma carga clínica e econômica substancial, incluindo maior mortalidade, maiores custos hospitalares e com antibióticos, e estadias mais longas em hospitais e unidades de terapia intensiva. Dados demonstram que a resistência afeta mais de 25.000 vidas na União Europeia e 23.000 vidas nos Estados Unidos todos os anos (BAYM; STONE; KISHONY, 2016).

Nesse contexto, os organismos procariotos podem apresentar resistência intrínseca, que é a resistência natural exibida por todos os exemplares de determinada espécie, e a resistência adquirida que pode ser classificada em dois grupos principais: mutação em um gene no cromossomo bacteriano ou aquisição de um gene de resistência de outro microrganismo, através de transdução, transformação ou conjugação, sendo transmitida por plasmídeos e transposons (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017).

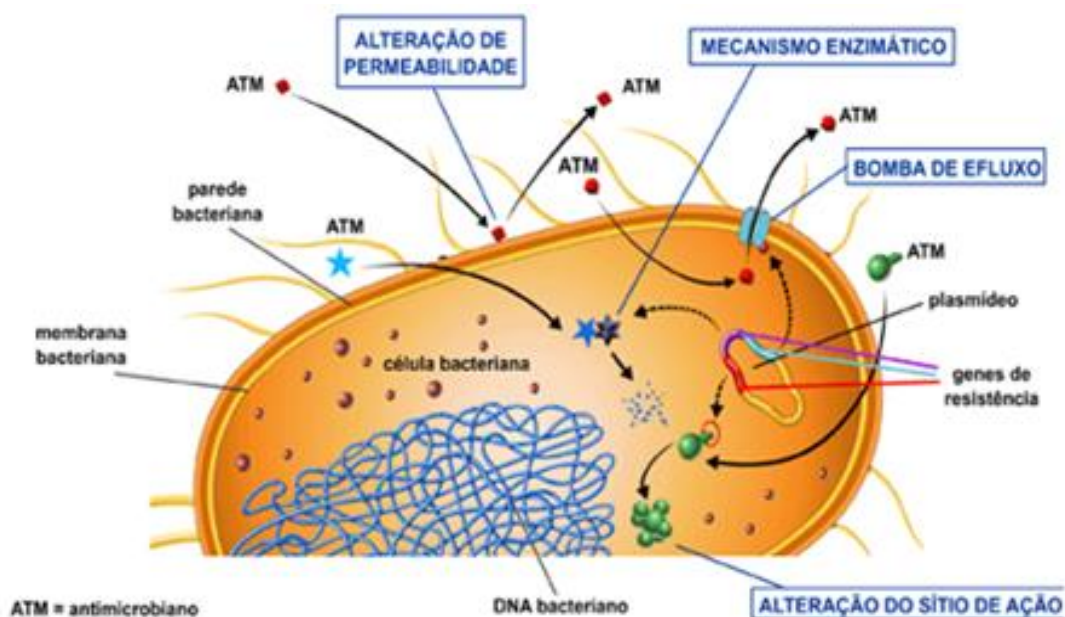
Essas mutações podem levar a uma modificação do alvo, impedindo o reconhecimento do mesmo, como exemplo tem-se alteração na subunidade 30S ou subunidade 50S do ribossomo conferindo a resistência a fármacos que afetam a síntese de proteica, ou seja, macrólídeos, tetraciclina, cloranfenicol e aminoglicosídeos. Alteração nas proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) responsáveis pela síntese da parede celular bacteriana, sendo alvo dos antibióticos β -lactâmicos, onde a aquisição de um gene denominado *mecA* permite alterações das PBP's através da codificação de uma nova proteína alvo, denominada PBP2a que apresenta baixa afinidade aos β -lactâmicos, principalmente meticilina e oxacilina. Com isso, no micro-organismo resistente como é o caso de *S. aureus* que codifica enzimas denominadas à meticilina (MRSA) não ocorrerá inibição da síntese da parede bacteriana. Como também a modificação enzimática a exemplo da topoisomerase e DNAGirase (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017).

A inativação ou modificação da droga pode ser instituída através da produção de enzimas, como as betalactamases que hidrolisam o anel β -lactâmico, conferindo resistência as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017). Uma das

abordagens de tratamento para esse caso é o uso de um β -lactâmico e um inibidor da β -lactamase, clinicamente representados por amoxicilina-ácido clavulânico, ampicilina-sulbactam, e piperacilina-tazobactam. Apesar desses inibidores garantirem a eficácia do antibiótico, eles não reduzem a prevalência da resistência no paciente ou na população (BAYM; STONE; KISHONY, 2016).

A presença de proteínas de membrana denominadas bombas de efluxo, que exportam o conteúdo de antibiótico da célula, mantendo baixas concentrações intracelulares do mesmo é considerado um importante fator que provoca a resistência das bactérias. Antibióticos de todas as classes, exceto as polimixinas são suscetíveis à ativação de sistemas de efluxo. Em gram-negativas a alteração dos canais de porina na membrana externa diminui a permeabilidade da membrana (Figura 4) (LIMA et al., 2015; KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017).

Figura 4: Mecanismos de resistência aos antibióticos.



Fonte: <http://www.anvisa.gov.br> (2007)

Além de todos os mecanismos de resistência já mencionados, há uma infinidade de meios pelos quais os humanos aceleraram a evolução da resistência bacteriana. O excesso e os erros de prescrições clínicas de antibióticos, apesar do controle através de receitas, regimes longos ou impróprios de tratamento com os mesmos exerce uma pressão sobre a

resistência, a falta de conhecimento do público sobre os antibióticos também leva ao seu uso excessivo, principalmente em países que não há o controle de venda, o uso de antibióticos em estoques de ração animal também exacerbou a disseminação da resistência (FAIR; TOR, 2014).

Sincronicamente com o aumento da resistência bacteriana, houve um declínio no desenvolvimento de antibióticos, isso se deve a vários fatores, por exemplo a curta duração dos esquemas posológicos com antibióticos, tornando-os muito menos úteis do que os medicamentos usados para tratar doenças crônicas, além de que algumas doenças não são tratáveis com antibióticos, retardando então seu investimento inicial, como também a presença de competidores no mercado e as barreiras regulatórias (FAIR; TOR, 2014).

Com a constante evolução da resistência antimicrobiana baseada no exposto, e a diminuição na produção de novo antibióticos, as infecções causadas por *S. aureus*, principalmente HA-MRSA e CA-MRSA continuam sendo um desafio clínico, onde os produtos naturais lideram como importantes protagonistas na busca de novas alternativas terapêuticas.

2.3 Produtos naturais

O uso terapêutico de plantas para tratar e prevenir enfermidades data desde a antiguidade em todas as civilizações e grupos culturais conhecidos. Em consideração à crescente importância clínica dada as infecções bacterianas, o aumento da resistência antimicrobiana, ineficiência da medicina convencional ou pela falta de acesso por grande parte da população ao tratamento farmacológico convencional (FAVELA-HERNÁNDEZ et al., 2016) há uma busca constante por novos medicamentos e terapias alternativas, e diante disso, as plantas constituem umas das mais importantes fontes de novas substâncias que podem ser utilizadas como agentes medicinais para fins terapêuticos (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

Com o passar do tempo as plantas têm adquirido cada vez mais espaço na medicina moderna. Elas possuem uma grande variedade de componentes ativos, produzidos a partir do seu metabolismo secundário, que são capazes de inibir o crescimento de patógenos. E dentre as muitas aplicações dos produtos

naturais, destaca-se a atividade antimicrobiana (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Mundialmente, o uso de plantas medicinais contribui significativamente com os cuidados com a saúde (MUKHERJEE; MUKHERJEE; GHOSH, 2015). No Brasil a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), instituída em 2006 e a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), foram criadas como iniciativa do governo para estimular o uso racional de plantas medicinais no país, permitindo o acesso seguro da população e promovendo o uso sustentável e racional da biodiversidade brasileira (BRASIL, 2006).

Diversas são as substâncias produzidas nos vegetais e estas podem ser divididas em dois grandes grupos. O primeiro, denominado de metabólitos primários ou macromoléculas, que apresentam funções vitais bem definidas e são essenciais a sobrevivência dos vegetais, incluem os açúcares simples, aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos. Enquanto que o metabolismo das vias biossintéticas para produção dessas substâncias originam, através do gasto de energia, o segundo grupo de compostos encontrados nos vegetais, os metabólitos secundários ou micromoléculas, cuja função individual não é considerada fundamental à sobrevivência das células e que geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular e marcantes atividades biológicas (WOLFFENBÜTTEL, 2007; KREIS et al., 2017).

Dentre esses metabólitos secundários destacam-se os óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis que são utilizados desde muito tempo como bactericidas, fungicidas, inseticidas, em aplicações cosméticas e farmacêuticas, na agricultura e indústria alimentícia (BAKKALI et al, 2008; DOSSOUKPEVI et al., 2016). Esses óleos, são misturas complexas (hidrocarbonetos terpênicos, álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, dentre outros) voláteis, lipofílicas, comumente líquidas e odoríferas (BETTIOL; MORANDI, 2009). Podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta, ou seja, broto, flor, folha, caule, ramo, semente, fruto, raiz e casca (BAKKALI et al, 2008), sendo armazenados nos tricomas glandulares, que ao se projetarem na epiderme atuam como uma forma de sinal para advertir sobre a toxicidade do vegetal (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; TAIZ et al. 2017).

As propriedades terapêuticas dos óleos essenciais, em geral, se devem à presença de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides. Devido a presença dessas propriedades, os óleos essenciais tem sido amplamente empregados (NAZZARO et al., 2013). Esses compostos normalmente apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como também possuem atividade contra biofilmes, mecanismo de virulência produzido por micro-organismos patogênicos resistentes a antibióticos, como por exemplo *S. aureus* (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Além dessa propriedade intrínseca, tais substâncias podem alterar o efeito de fármacos antimicrobianos convencionais, seja aumentando ou diminuindo sua atividade. Além disso, a utilização dessas substâncias pode representar um avanço contra os mecanismos de resistência que inativam fármacos antimicrobianos (MIRON et al., 2014).

Trabalhos de pesquisa já direcionam seu foco para a avaliação da atividade antibacteriana de produtos de origem natural isoladamente e em associação a fármacos já utilizados. Um horizonte de novos estudos e possibilidades promissoras na descoberta de novos tratamentos (SILVA, 2015)

Com os avanços tecnológicos, é possível realizar investigações mais exatas e precisas sobre a composição química das mesmas, podendo então analisar, qualificar e quantificar suas atividades biológicas (NEWMAN; CRAGG, 2016). Além de que, é possível utilizar as substâncias ativas, isoladas das plantas como modelo para síntese de novos fármacos, e para a realização de modificações estruturais visando a otimização de suas propriedades, como exemplo do isoeugenol (BRAZ FILHO, 2010).

2.4 Isoeugenol

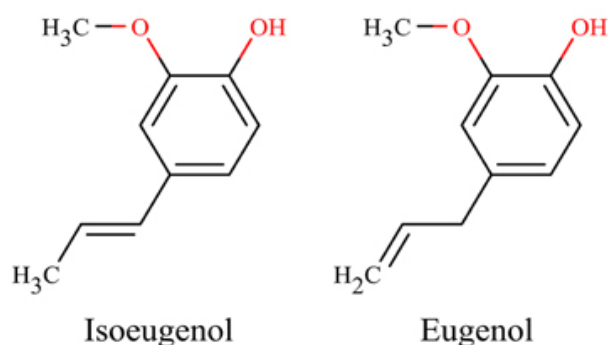
Compostos contendo um anel aromático representam um dos grupos de voláteis encontrados em óleos essenciais, destacando os fenilpropanoides que derivam de rota biosintética que se inicia com o ácido chiquímico (SIMOES *et al.*, 2007). Dentre eles, destaca-se o eugenol (4-alil-1-hidroxi-2-metoxibenzeno). (BAKKALI, et al., 2008; CUNHA; ROQUE; NOGUEIRA, 2012)

O Isoeugenol (2-metoxi-4-propenil-fenol) o isômero do eugenol (Figura 5) pode ser extraído de várias plantas ou flores, incluindo cravo, cálamo, cananga do Japão (ylang-ylang), manjerição, noz-moscada, junquilha, sândalo, gardênia,

petúnia, e ainda ser sintetizado por isomerização do eugenol, que ocorre naturalmente na folha de louro, cravo, pimenta e canela e é usado como agente de aromatização e armazenamento, comumente incorporado na preparação de alimentos e perfumes, artigos de higiene, incluindo cremes, sabões e detergentes (CERVENY; KREJCIKOVA; MARHOUL, 1987; DEMOLE; DEMOLE; ENGGIST, 1976; GENNARO, 1985; HATTORI; MURAKI; YOSHIDA, 1978; OPDYKE, 1975).

Ele demonstrou uma atividade antimicrobiana comparável e até mesmo superior à sua isoforma eugenol, que já apresentava atividade antimicrobiana (ZEMEK et al., 1987; JANSSENS et al., 1990; LAKEMAN et al., 1990; Dal Pozzo et al., 2012). Essa atividade abrange bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *Escherichia coli*, *Bacillus licheniformis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella tipo B* e *Staphylococcus aureus* (ZEMEK et al., 1987; JANSSENS et al., 1990).

Figura 5: Estrutura do isoeugenol e eugenol



FONTE: Sigma-Aldrich

Estudo comparativo entre o eugenol e isoeugenol de ZHANG et al., 2017 demonstrou algumas atividades biológicas dos mesmos frente estirpes de bactérias Gram-positivas e Gram negativas. Dentre os testes realizados destacam-se a avaliação da atividade antibacteriana contra patógenos de origem alimentar através da determinação da concentração inibitória mínima (MIC), concentração bactericida mínima (CBM) e avaliação da zona de inibição (ZOI), atividade antioxidante mediante a realização dos ensaios de captura de radicais, como o DPPH (1,1- difenil-2-picrilhidrazil) e o ABTS [2,2'-azino-bis (3-

etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)], (ZHANG et al., 2017), sendo o DPPH um radical estável de coloração púrpura que absorve em comprimento de onda de 515nm e na presença de antioxidante ele recebe prótons sofrendo uma redução e passando a ter uma coloração amarelada. Sendo assim, a atividade de redução foi expressa de acordo com o valor de CE_{50} , que representa a concentração efetiva em que os radicais livres são desmanchados em 50%. A taxa de eliminação para ABTS também é expressa pela CE_{50} (SANCHEZ-MORENO, 2002; MOLYNEUX, 2004; ROGINSKY; LISSI, 2005).

Nesse mesmo estudo também foi avaliada a inibição da peroxidação lipídica. Em todos os testes o isoeugenol se destacou apresentando resultados superiores quando comparados ao eugenol (ZHANG et al., 2017).

Um estudo que avaliou a atividade antibacteriana do isoeugenol inibindo a formação de biofilmes produzidos por *S.aureus*, *L. monocytogenes*, e *Pseudomonas fluorescens* foi realizado por (NIELSEN et al., 2017). Neste estudo foram revestidas com isoeugenol via adsorção física as superfícies de aço inoxidável e polietileno, e após a realizações dos testes foi observado que não houve detecção de bactérias vivas de *P. fluorescens*, *S. aureus*, e *L. monocytogenes* sobre as superfícies, mesmo após 24 h de incubação em meios nutrientes para permitir o crescimento bacteriano.

Em alguns estudos de toxicidade do isoeugenol, foi observado que na toxicidade aguda a DL_{50} do isoeugenol foi de 1.560 mg/kg de peso corporal, quando administrado em ratos por via oral (TAYLOR; JENNER; JONES, 1964) e que o consumo de 500 mg/kg de peso corporal na dieta dos ratos de ambos os sexos por algumas semanas não resultou em alterações no peso corporal, como também no peso dos órgãos, na alimentação e na avaliação sanguínea. (HAGAN et al., 1967).

O Programa Nacional de Toxicologia (2010) dos Estados Unidos realizou ensaios de genotoxicidade, em camundongos machos administrando isoeugenol (37,5 a 600 mg/kg), por gavagem durante três meses. Os resultados obtidos demonstraram que não houve aumento da incidência de eritrócitos policromáticos micronucleados e eritrócitos normocromáticos micronucleados, nas amostras de sangue periférico, sugerindo ausência de toxicidade relacionada à exposição à medula óssea (NTP, 2010).

O programa também realizou estudos de carcinogenicidade do isoeugenol com ratos machos e camundongos de ambos os sexos durante 2 anos e foi possível observar que não houve atividade carcinogênica em ratos machos e fêmeas, enquanto que os camundongos machos apresentaram aumento da incidência de adenoma e/ou carcinoma hepatocelular e camundongos fêmeas, aumento das incidências de sarcoma histiocítico (NTP, 2010).

Objetivos

3 Objetivos

3.1 Gerais

- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do fitoconstituente Isoeugenol frente a cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*.

3.2 Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fitoconstituente Isoeugenol sobre cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) e isolados clínicos de *S.aureus*;
- Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do fitoconstituente Isoeugenol sobre cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) e isolados clínicos de *S.aureus*;
- Avaliar a cinética de morte microbiana do Isoeugenol sobre as cepas em análise;
- Avaliar os resultados da associação do Isoeugenol com o antibacteriano padrão através do método de *checkerboard*.

Material e métodos

4. Material e Métodos

4.1 Local de trabalho

Os ensaios laboratoriais referentes ao estudo da atividade antibacteriana foram realizados no Laboratório de Pesquisas de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba.

4.2 Cepas Bacterianas

Para os ensaios de atividade antibacteriana, foram utilizadas cepas padrão (ATCC) e de origem clínica isoladas de diversos tipos de infecções por *S.aureus* (S.A), sendo estas: ATCC-150, S.A-2, S.A-40, S.A-45, S.A-116, S.A-182, S.A-220, S.A-232, S.A- 262, S.A-297; S.A-314, S.A- 349, S.A-356, S.A-418, S.A- 419 e S.A-433

Tabela 1 - Origem das cepas

Cepas Bacterianas	Origem das Cepas
ATCC – 150	
S.A – 2	Secreção Nasal
S.A – 40	Secreção Nasal
S.A – 45	Secreção de Orofaringe
S.A – 116	Secreção de Orofaringe
S.A – 182	Secreção Nasal
S.A – 220	Secreção Nasal
S.A – 232	Secreção Nasal
S.A – 262	Secreção de Traqueia
S.A – 297	Secreção Nasal
S.A – 314	S. Lesão de Tíbia
S.A – 349	S Lesão de Pele
S.A – 356	Secreção de Traqueia
S.A – 418	Secreção Ocular
S.A - 419	S. Úlcera de perna
S.A – 433	S. Lesão de Perna

Todas as linhagens bacterianas clínicas foram cedidas pela farmacêutica-bioquímica Darci de Magalhães Melo, obtidas através de isolados clínicos no Laboratório de Patologia Clínica HEMATO, localizado em João Pessoa – PB. A cepa ATCC pertence à coleção da MICOTECA do Laboratório de Pesquisas de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba. Dentre as linhagens que apresentaram CIM e CBM condizente com a maioria, foi escolhida aleatoriamente uma cepa para os ensaios de associação e cinética de morte microbiana, sendo a cepa clínica S.A-116 a escolhida

As cepas foram mantidas no Laboratório de Pesquisa de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos, à

temperatura de 4°C, em meio Ágar Nutriente (AN) (DIFCO Laboratories/USA/France).

Para utilização nos ensaios, estas culturas serão descongeladas e reativadas através de repique em caldo Infusão Cérebro e Coração (*Brain Heart Infusion* – BHI) (DIFCO Laboratories/USA/France) durante 24 horas a 35 ± 2 °C. Os meios de cultura foram preparados conforme as instruções dos fabricantes.

4.3 Inóculo

Para preparação do inóculo, colônias obtidas de culturas recentes de *S.aureus* mantidas em caldo BHI foram suspensas em solução estéril de cloreto de sódio (NaCl) 0,85%, e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 de *McFarland*, que corresponde à aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL) (CLEELAND; SQUIRES, 1991; NCCLS, 2000; HADACEK; GREEGER, 2000; NCCLS, 2002; ANTUNES et al., 2006; FREIRE et al., 2014).

4.4 Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados foram: Ágar Nutriente (DIFCO Laboratories/USA/France), Infusão Cérebro e Coração (*Brain Heart Infusion* – BHI) (DIFCO Laboratories®/EUA/França), caldo *Mueller-Hinton* (*Mueller-Hinton Broth - Oxoid*®/Reino Unido) e ágar *Mueller-Hinton* (*Oxoid*®/Reino Unido), os quais foram preparados conforme as descrições dos fabricantes.

4.5. Substâncias

O fitoconstituente utilizado neste trabalho foi o fenilpropanoide Isoeugenol ($C_{10}H_{12}O_2$) (Sigma-Aldrich®). Para utilização nos ensaios, este composto foi solubilizado em dimetil-sulfóxido (DMSO) numa proporção de até 10%, tween 80 a 0,02% e água destilada em quantidade suficiente para completar 3 mL de emulsão em concentração 1024µg/mL (CEELAND; SQUIRES, 1991;

NASCIMENTO, et al., 2000). O antibacteriano padrão utilizado nos ensaios como controle foi a gentamicina ($C_{21}H_{43}N_5O_7$) (SigmaAldrich®)

4.6 Avaliação da atividade antibacteriana

4.6.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima do isoeugenol e da Gentamicina foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo, por meio de placas de 96 poços com fundo em forma de “U” (ALAMAR®) estéreis, conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Inicialmente, foram distribuídos 100µL de caldo BHI em cada orifício da placa. Em seguida, 100µL da emulsão duplamente concentrada do fitoconstituente foram diluídos em série no meio de cultura (BHI), de modo que foram obtidas concentrações de 1024µg/mL até 2µg/mL de isoeugenol, onde na primeira linha de cada coluna da placa se encontra a maior concentração do composto, e na última linha a menor. Por fim, foram adicionados 10 µL dos inócuos das suspensões bacterianas nas cavidades, de maneira que cada coluna da placa correspondente a uma cepa de *S. aureus* específica. Paralelamente, foram realizados controles com Gentamicina (1024 µg/mL até 2 µg/mL), caldo BHI como controle de esterilidade e caldo BHI com inócuo bacteriano como controle de viabilidade das bactérias. Todo o ensaio foi realizado em duplicata e as placas assepticamente fechadas foram incubadas a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h para posterior leitura.

O crescimento bacteriano foi indicado pela adição de 20 µL de solução de resazurina sódica em água destilada (Sigma-Aldrich®) a 0,01%. Após incubação à temperatura ambiente durante 1h, foi realizada a leitura. Bactérias viáveis reduziram o corante, mudando sua coloração do azul para rosa. A CIM foi determinada como a menor concentração da substância que inibiu a mudança de coloração da resazurina (SOUSA et al., 2010).

Os resultados foram expressos pela média aritmética das CIMs obtidas nos dois ensaios. A avaliação dos resultados obtidos foi realizada conforme análise de SARTORATTO et al, 2004 que propôs uma classificação com base

nos resultados da CIM, considerando como forte poder antimicrobiano os produtos com CIM até 500 µg/mL, moderado poder antimicrobiano aqueles com CIM entre 600 e 1500 µg/mL e de fraco poder antimicrobiano os produtos com CIM acima de 1600 µg/mL.

4.6.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Após a leitura da CIM, foram retiradas alíquotas de 10µL dos sobrenadantes das cavidades a partir de diferentes concentrações (CIM, CIM x2 e CIM/2) e semeadas na superfície do meio BHI. A leitura do resultado foi realizada após 24h de incubação a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. A CBM foi considerada como a menor concentração do fitoconstituente capaz de matar 99% do inóculo (crescimento inferior a 3 colônias bacterianas). Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado foi expresso pela média aritmética das CBMs obtidas (HAFIDH, et al., 2011).

4.6.3 Efeito do produto teste sobre a cinética do crescimento das bactérias (time-kill)

A cinética de morte da cepa S.A 116 frente ao Isoeugenol foi realizada de acordo com a metodologia descrita por KLEPSEK et al, 1998. Neste ensaio, frente às concentrações inibitórias mínimas dos produtos, foi observado o comportamento da cepa selecionadas ao longo de 24 h. Inicialmente, 1 mL da suspensão de bactérias foi inoculado em 9 mL de BHI contendo o fenilpropanoide em diferentes concentrações de acordo com a sua CIM, a saber: CIM/2, CIM e CIMx2, que correspondem a 256 µg/mL, 512 µg/mL e 1024 µg/mL, respectivamente. Também foram realizados o controle com a gentamicina na concentração da CIM a 2 µg/mL, controle de esterilidade do meio e controle de viabilidade bacteriana. Nos intervalos 0 h, 2 h, 4 h, 8 h e 24 h após a incubação, uma alíquota de 10 µL desse inóculo foi uniformemente semeada em placa de BHI. As placas inoculadas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24-48 h. Após período de incubação foi realizada a contagem de UFC presentes nas placas de Petri e determinada a quantidade por mL de solução em cada período para cada substância em suas concentrações. O experimento foi realizado em duplicata. As curvas de crescimento foram construídas plotando a contagem média de

colônias (\log_{10} UFC/mL) em função do tempo (horas) com o software estatístico *GraphPadPrism 7.0*. Foi considerada atividade bactericida da droga quando houve redução no crescimento maior ou igual a 3 \log_{10} (99,9%) a partir do inóculo inicial, e atividade bacteriostática quando houve redução no crescimento menor que 3 \log_{10} (< 99,9%) UFC/mL (KLEPSEK et al., 2000).

4.7 Ensaio de associação através do método *checkerboard*

O Método de *Checkerboard* é um teste de microdiluição que avalia a CIM de drogas sozinhas e combinadas. A partir do índice da concentração inibitória fracionada (ICIF), são realizados os cálculos para avaliar se a associação resultou em sinergismo, antagonismo ou indiferença.

Para realização deste ensaio, 100 μ L de caldo BHI foram adicionados nos poços de microplacas estéreis contendo 96 cavidades, com fundo em forma de “U” (Alamar®). Em seguida, 50 μ L de diferentes concentrações (CIM \div 16, CIM \div 8, CIM \div 4, CIM \div 2, CIM, CIM \times 2, CIM \times 4 e CIM \times 8) do fitoconstituente isoeugenol e da Gentamicina foram adicionados no sentido vertical (Gentamicina) e horizontal (fitoconstituente) da microplaca. Por fim, foi adicionado 20 μ L da suspensão bacteriana. O ensaio foi realizado em duplicata, sendo as microplacas incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24-48 h. O ICIF foi calculado através da soma do CIFA + CIFB (CIFA= Concentração Inibitória Fracionada do produto teste; CIFB= Concentração Inibitória Fracionada do antibacteriano padrão). O CIFA, por sua vez, foi calculado através da relação CIMA combinado/CIMA isolado, enquanto que o CIFB = CIMB combinado/CIMB isolado. Este índice foi interpretado da seguinte forma: sinergismo (ICIF < 0,5), antagonismo (ICIF > 4,0) e indiferença (> 0,5 - 4) (ODDS, 2003; SHIN, 2003).

4.8 Análise estatística

Os dados dos ensaios de CIM, CFM e estudo de associação foram analisados por meio de estatística descritiva e inferencial. A curva de cinética de crescimento microbiana foi plotada pelo \log_{10} UFC/mL em função dos intervalos de tempo e das concentrações estudadas das substâncias utilizadas. Para

organização e análise dos dados referentes aos resultados da presente pesquisa foi utilizado o software *GraphPad Prism* (versão 7.0 para Windows, San Diego, CA - USA). Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

5 Resultados e discussão

5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Os resultados do ensaio de avaliação de atividade antibacteriana do fitoconstituente isoeugenol contra cepas clínicas de *S. aureus*, bem como os referentes controles estão expressos na tabela 1.

Como pode ser observado, o fitoconstituente isoeugenol foi capaz de inibir o crescimento das 16 cepas clínicas de *S. aureus* testadas, tendo sua CIM estabelecida em 512 µg/mL. Ao avaliar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do produto teste frente as 16 cepas, observaram-se crescimento bacteriano em todas as cepas após o período de incubação.

Tabela 2 - Concentrações inibitórias mínimas (CIM) e bactericidas mínima (CBM) do isoeugenol e da gentamicina sobre cepas clínicas de *S.aureus*

CEPAS BACTERIANAS	Isoeugenol		Gentamicina		Controle	
	CIM (µg/mL)	CBM	CIM (µg/mL)	CBM	Meio (µg/mL)	M.O
ATCC – 150	512	+	2	16	-	+
S.A – 2	512	+	2	16	-	+
S.A – 40	512	+	2	16	-	+
S.A – 45	512	+	2	16	-	+
S.A – 116	512	+	2	16	-	+
S.A – 182	512	+	2	16	-	+
S.A – 220	512	+	2	16	-	+
S.A – 232	512	+	2	16	-	+
S.A – 262	512	+	2	16	-	+
S.A – 297	512	+	2	16	-	+
S.A – 314	512	+	2	16	-	+
S.A – 349	512	+	2	16	-	+
S.A – 356	512	+	2	16	-	+
S.A – 418	512	+	2	16	-	+
S.A – 419	512	+	2	16	-	+
S.A – 433	512	+	2	16	-	+

O controle realizado com a Gentamicina, apresentou resultados satisfatórios com CIM de 2 µg/mL para todas as cepas de *S.aureus*, e CBM não superior a 16 µg/mL. Todas as bactérias foram capazes de crescer em caldo BHI sem adição do fitoconstituente, o que caracteriza a viabilidade do microrganismo. Da mesma forma um controle de esterilidade foi realizado para certificar que o caldo BHI utilizado nos ensaios não estava contaminado com microrganismo.

As infecções causadas por *S. aureus*, encontrada na microbiota humana, em determinadas circunstâncias pode provocar desde simples infecções até as mais graves. Sua enorme capacidade de adaptação e resistência à maioria dos

antimicrobianos colocou-a atualmente entre as espécies de maior importância nas IRAS, dificultando o tratamento dos indivíduos (VERONESI; FOCACCIA 2015). Com isso a busca por novas alternativas de tratamento é de grande relevância, e alguns estudos comprovam a atividade antibacteriana de extratos e óleos essenciais de plantas (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

De acordo com a classificação de SARTORATTO et al., 2004, considerando o valor da CIM do isoeugenol para cepas clínicas e ATCC este apresenta um forte poder antimicrobiano visto que a CIM foi de 512 µg/mL

Estudos de LAKEMAN et al., 1990 para avaliar a atividade antibacteriana do eugenol e isoeugenol contra cepas de *S.aureus*, *E coli*, *Streptococcus viridans*, *Mycobacterium fortuitum* e cepas de alguns fungos utilizou o teste de difusão em ágar, e ao avaliar a zona de inibição ao redor dos poços observou que os resultados indicaram susceptibilidade significativa do composto teste para *S.aureus* e *E.coli*

HYDGAARD et al., 2015 investigou a atividade antibacteriana do isoeugenol usando os microrganismos modelo *E. coli* e *L. innocua*, os dados da concentração inibitória mínima foram 0,0006 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente, sugerindo que o isoeugenol exibe uma atividade inibitória contra células de *E. coli* e *L. innocua*.

Um estudo comparativo entre o eugenol e isoeugenol de ZHANG et al., 2017 demonstrou algumas atividades biológicas dos mesmos frente estirpes de bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*, *Bacillus subtilis* e *Listeria monocytogenes* e Gram negativas, como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Shigella dysenteriae* de origem alimentar. Dentre os testes realizados neste estudo destacam-se a avaliação da atividade antibacteriana através da determinação da CIM e CBM, onde os resultados para cepas de *S. aureus* foram de 312,5 µg/mL e 312, 5 µg/mL, respectivamente. Neste contexto, os resultados encontrados neste trabalho sobre o potencial antibacteriano do isoeugenol sobre espécies de *S. aureus* são satisfatórios. Desta forma, o isoeugenol com CIM de 512 µg/mL do presente estudo foi classificado como tendo forte atividade antibacteriana.

NIELSEN et al., 2017 demonstra que a ação antibacteriana se deve a presença grupo hidroxila livre, a posição da ligação dupla no carbono $\alpha\beta$ da cadeia lateral, e um grupo metila na posição γ .

Uma substância quando possui atividade antibacteriana, pode ser de natureza bacteriostática ou bactericida, que pode ser obtida através do cálculo entre CBM/CIM. O efeito bactericida é considerado quando a razão entre CBM/CIM for ≤ 4 e bacteriostático quando esta for > 4 (SIDDIQUI et al., 2013). No presente estudo, foi determinada a CIM do isoeugenol, mas não foi possível determinar a sua CBM, pois todas as cepas foram insensíveis as concentrações estabelecidas no ensaio para sua determinação e, portanto, a natureza da atividade do isoeugenol não pode ser caracterizada de acordo com os resultados de CBM.

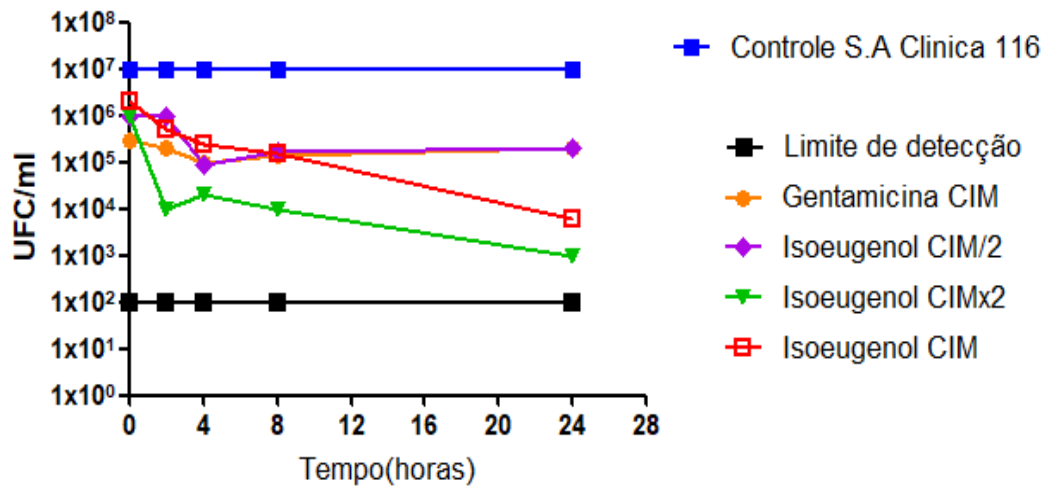
5.2 Efeito do produto teste sobre a cinética do crescimento das bactérias (time-kill)

Após a avaliação da CIM, foi analisada a cinética de morte microbiana, que determina a viabilidade das bactérias após exposição ao isoeugenol e gentamicina em diferentes concentrações e intervalos de tempo, e para tal fim, é realizado a contagem de células viáveis, verificando se a atividade do isoeugenol é bactericida ou bacteriostática, como também se esta atividade é concentração ou tempo-dependente.

Os resultados dos ensaios da cinética microbiana foram expressos em gráficos que mostram curvas do \log_{10} UFC/mL de *S.aureus* S.A116 e *S.aureus* ATCC 150 em função do tempo, na ausência do fitoconstituente (controle), na presença da CIM/2, CIM, CIMx2 do isoeugenol e na presença da Gentamicina.

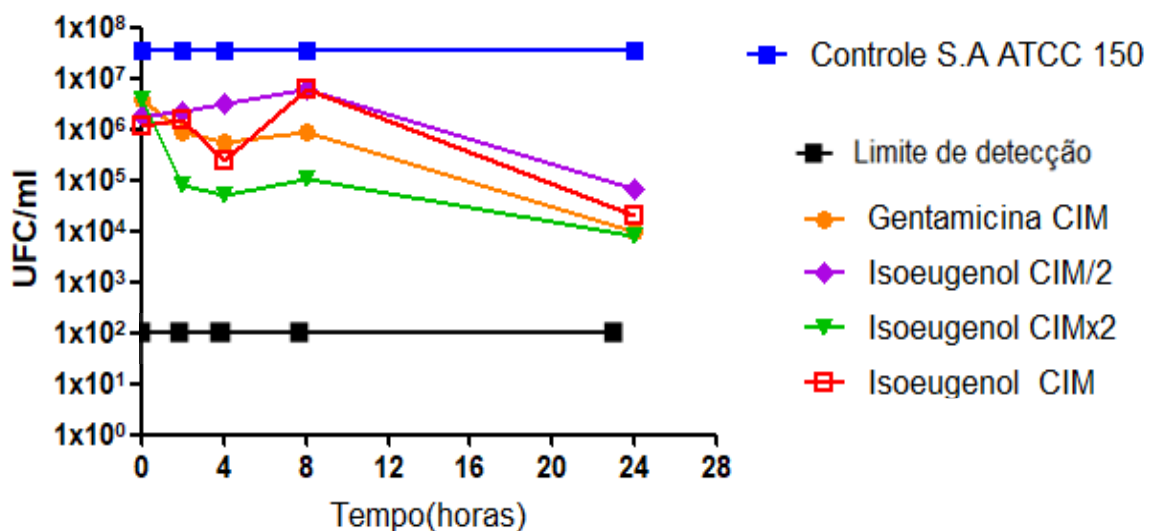
Como mostrado na figura 6, para a cepa clínica *S. aureus* (S.A 116) o isoeugenol apresentou um efeito bacteriostático, pois não houve redução maior ou igual a $3 \log_{10}$ UFC/mL a partir do inóculo inicial na CIM em todos os tempos analisados. Em uma concentração maior (CIMx2) foi possível observar uma diminuição na viabilidade das bactérias, mas também apresentando efeito bacteriostático, visto que essa redução não foi maior que $3 \log_{10}$ UFC/mL. Na concentração subnitória (CIM1/2) nota-se efeito bacteriostático, visto que ao longo do tempo não houve diminuição da viabilidade. A gentamicina CIM também apresentou um efeito bacteriostático seguindo o mesmo perfil ao não reduzir a concentração mais que $3 \log_{10}$ UFC/mL.

Figura 6 - Curva de morte microbiana (Log₁₀UFC/mL) da cepa *S.aureus* S.A116, sob ação do isoeugenol e antibiótico padrão gentamicina



Na cepa de *S. aureus* ATCC 150 (Figura 7), observou-se um efeito bacteriostático (redução menor que 3 log₁₀UFC/mL a partir do inóculo inicial) do isoeugenol tanto na CIM, quanto em uma maior concentração CIMx2, como em uma concentração subinibitória ao decorrer de todos os tempos analisados. O mesmo foi observado na análise da gentamicina, antibiótico padrão.

Figura 7 - Curva de morte microbiana (Log₁₀UFC/mL) da cepa *S.aureus* ATCC 150, sob ação do isoeugenol e antibiótico padrão gentamicina.



Em um estudo de BARBER et al., 2014 ao realizar a cinética de morte para de 20 estirpes de *S.aureus*, com a CIM de alguns antimicrobianos como, daptomicina, vancomicina, e ripampicina foi observado que para todas as estirpes, a exposição aos fármacos individuais não resultou em morte sustentada, com crescimento demonstrado dentro de 8 h, já com a combinação entre os fármacos houve uma redução relevante. Baseado nisso, pode-se pensar que talvez ao realizar a cinética, no presente estudo com gentamicina em associação a outros fármacos, a mesma poderia desenvolver uma ação bactericida ao invés de bacteriostática, como foi visto.

HYDGAARD et al., 2015 também avaliou o efeito do isoeugenol na viabilidade celular de *E. coli* e *L. Innocua*, observando se ele atuou como bactericida ou bacteriostático. O isoeugenol na CIM ou CIMx2 inicialmente diminuiu viabilidade 1-2 unidades de log, mas após 16 horas de tratamento, as células de *E. coli* na CMI recuperaram o crescimento, sugerindo que o isoeugenol exibe uma atividade inibitória reversível contra as células de *E. coli*, já contra *L. innocua*, isoeugenol teve uma atividade bactericida inicial que diminuiu após uma hora na CIM, CIMx2 matou células de *L. innocua* a níveis indetectáveis. Portanto o efeito bacteriostático apresentado pelo isoeugenol no estudo de HYDGAARD et al., 2015, corrobora com o efeito bacteriostático que ele apresentou no presente estudo.

A análise das figuras 5 e 6 sugerem que pela cinética de morte, tanto concentrações inferiores da CIM do isoeugenol, como concentrações superiores, apresentaram atividade bacteriostática que não dependente da concentração, já que o aumento da concentração não provoca aumento significativo da atividade

5.3 Ensaio de associação pelo método *checkerboard*

A identificação de produtos naturais com atividade antibacteriana intrínseca ou a combinação com antibióticos de uso comum podem representar promissora alternativa de tratamento, potencializa-los ou até mesmo agregar benefícios como diminuição de reações adversas, diminuir a dose do fármaco e aumentar o espectro de ação (COUTINHO, 2008).

Paralelamente ao ensaio de associação, foi feita a determinação da CIM, onde permaneceu de 512 µg/mL para o isoeugenol e 2 µg/mL para gentamicina. Estes resultados reforçam a atividade antibacteriana do isoeugenol demonstrada nos ensaios anteriores, visto que não ocorreu qualquer mudança significativa nos valores de CIM ao ser realizado este novo ensaio.

Os resultados das combinações entre o isoeugenol e a gentamicina contra cepas de *S. aureus* clínica S.A 116 e ATCC estão mostrados na Tabela 3. Os resultados demonstraram que os microrganismos das cepas de *S. aureus* S.A 116 não cresceram em ambiente com concentração superior nem sequer em concentração inferior a CIM isolada de qualquer uma das substâncias, diferente do ocorrido para a cepa ATCC que houve crescimento acima da CIM isolada de cada substancia

Tabela 3: Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) da associação entre o isoeugenol e a gentamicina sobre cepas de *S.aureus*

CEPAS BACTERIANAS	CIF _A	CIF _B	ICF	Tipo de Interação
	Isoeugenol	Gentamicina		
ATCC – 150	1	1	2	Aditividade
S.A – 116	0,125	0,125	0,25	Sinergismo

De acordo com a Concentração Inibitória Fracionada (CIF) da associação, a combinação do isoeugenol e gentamicina pôde ser caracterizada como do tipo sinérgica para a cepa clínica S.A 116 e aditividade para a cepa ATCC. Um estudo de MORAIS BRAGA et al., 2015 com o objetivo de avaliar a associação entre a gentamicina e o extrato etanólico da samambaia *Lygodium venustum* utilizando o método de *checkerboard* verificou que quando testado sozinho, o extrato não mostrou qualquer atividade antibacteriana clinicamente relevante, no entanto, quando o extrato foi associado com gentamicina, houve um efeito aditivo ICIF= 0,5 para estirpes de bactérias gram negativas e positivas. Esse resultado demonstra que *L. venustum* pode ser uma fonte de metabólitos que podem ser

usados na terapia contra microrganismos patogênicos com multirresistência a antibióticos em associação com antibióticos, como gentamicina.

SIEBRA et al., 2018 demonstraram em seu estudo o efeito da associação do extrato hidroalcolico de de várias partes da planta *Passiflora cincinnata* em associação com antibioticos, como gentamicina, amicacina e β -lactâmicos em linhagens de MRSA resistentes aos mesmos. Sendo assim, foi observado que a associação não foi capaz de alterar o fenótipo das linhagens de resistente para sensível, mas houve uma diminuição na CIM suficiente para impedir o crescimento do patógeno, atuando de forme sinergica com esses atibioticos.

Apesar da escassez de dados para a atividade antibacteriana do isoeugenol contra *S. aureus* a respeito da terapia combinatória com outros antibacterianos, os resultados se mostram promissores, uma vez que a associação do fenilpropanoide a gentamicina não apresentou antagonismo, o que seria um efeito indesejável; como também os rsultados corroboram com estudos anteriores que demosntram que a associação de gentamicina com produtos naturais resultou em resultados semelhantes ao do presente estudo.

Estes dados obtidos reforçam a importância do isoeugenol como notável substância antibacteriana, estimulando sucessivas pesquisas com o objetivo de permitir sua inserção na terapeutica tradicional.

Conclusão

6 Conclusão

Com base nos estudos de atividade antibacteriana realizados com o fitoconstituente isoeugenol frente cepas de *S. aureus* foi observado que:

O isoeugenol apresentou atividade antibacteriana contra cepas clínicas de *S.aureus* com CIM de 512 µg/mL.

De acordo com a cinética de morte microbiana demonstrou que o isoeugenol apresenta efeito bacteriostático que não depende de concentração, já que o aumento da mesma não reduziu significativamente a viabilidade das células;

A associação do isoeugenol com a gentamicina apresentou efeito sinérgico para a cepas clínicas, já para a cepa ATCC apresentou um efeito de aditividade ou indiferença.

Referências

Referências

- ANTUNES, R. M. P; LIMA, E. O; PEREIRA, M. S. V; CAMARA, C. A; ARRUDA, T. A; CATÃO, R. M. R; BARBOSA, T. P; NUNES, X. P; DIAS, C. S; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 517-524, 2006.
- BAKKALI, F; AVERBECK, S; AVERBECK, D; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BARBER, K. E; WERTH, B. J; MCROBERTS, J. P; RYBAK, M. J. A novel approach utilizing biofilm time–kill curves to assess the bactericidal activity of ceftaroline combinations against biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journals ASM**, 2014.
- BAYM, M; STONE, L. K; KISHONY, R. Multidrug estratégias evolutivas para inverter a resistência aos antibióticos. **Reveja**, v. 351, 2016.
- BETTIOL, W; MORANDI, M. A. B. Óleos essenciais no controle fitossanitário. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**, p. 139-152, 2009.
- BIZZO, H. R; HOVELL, A. M. C; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BRASIL, Ministério da saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF). **Decreto Nº 5.813**, de 22 de junho de 2006.
- BRAUNWALD, E. H. Medicina Interna. **Mcgraw-Hill Interamericana do Brasil**, 2002.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229–239, 2010.
- BROOKS, G. F; CAROL, K. C; BUTEL, J. S; MORSE, S. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro, 2009.
- CERVENY, L; KREJCIKOVA, A; MARHOUL, A. Isomerization of eugenol of isoeugenol. **Reaction kinetics and catalysis letters**, v. 33, n. 2, p. 471-476, 1987.
- CHAMBERS, H. F; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629-641, 2009.
- CLEELAND, R; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**, p. 739-788, 1991.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2012.

COUTINHO, H. D. M. Avaliação da atividade antibacteriana e fotossensibilizante de produtos naturais da região do cariri cearense. 2008. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Departamento de Farmacologia**, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2008.

CUNHA, A. P; ROQUE, O. R; NOGUEIRA, M. T. Plantas aromáticas e óleos essenciais – Composição e aplicações. **Fundação Calouste Gulbenkian**, 2012.

DAL POZZO, M; LORETO, É. S; SANTURIO, D. F; ALVES, S. H; ROSSATTO, L; DE VARGAS, A. C. Antibacterial activity of essential oil of cinnamon and trans-cinnamaldehyde against *Staphylococcus spp.* Isolated from clinical mastitis of cattle and goats. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, p. 1080, 2012.

DEMOLE, E; DEMOLE, C; ENGGIST, P. A chemical investigation of the volatile constituents of East Indian sandalwood oil (*Santalum album L.*). **Helvetica Chimica Acta**, v. 59, n. 3, p. 737–747, 1976.

DOSSOUKPEVI, R; AHANHANZO, C; GBAGUIDI, F; AGBANGLA, C; AGBIDINOUCOUN, A; CACAÏ, G. Incidence des plantes régénérées in vitro sur les huiles essentielles de deux espèces de *Ocimum* cultivées au Bénin. **Journal of Applied Biosciences**, v. 99, n. 1, p. 9441-9449, 2016.

FAIR, R. J; TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspectives In Medicinal Chemistry**, 2014.

FAVELA-HERNÁNDEZ, J. M; GONZÁLEZ-SANTIAGO, O; RAMÍREZ-CABRERA, M.A; ESQUIVEL-FERRIÑO, P. C; CAMACHO-CORONA, M. D. E. L. R. **Chemistry and Pharmacology of Citrus sinensis**. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 24, 2016.

FREIRE, I. C. M; PÉREZ, A. L. A. L; CARDOSO, A. M. R; MARIZ, B. A. L. A; ALMEIDA, L. F. D; CAVALCANTI, Y. W; PADILHA, W. W. N. Atividade antibacteriana de óleos essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, 2014.

GENNARO, A. R. Remington's pharmaceutical sciences. **Mack Publishing**, p. 1058, 1985.

GORDON, R. J; LOWY, F. D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 350–359, 2008.

GRILLO, V. T. R. S. Incidência bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital público de Rondônia, Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 117-123, 2013.

GUIDO, R. C; ANDRICOPULO, A. D; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 7, p. 81-98, 2010.

HADACEK, F; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HAFIDH, R. R; ABDULAMIR, A. S; VERN, L. S; BAKAR, F. A; ABAS, F; JAHANSHIRI, F; SEKAWI, Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, p. 98-106, 2011.

HAGAN, E. C; HANSEN, W. H; FITZHUGH, O. G; JENNER, P. M; JONES, W. I; TAYLOR, J. M. Food flavourings and compounds of related structure. II. Subacute and chronic toxicity. **Food Cosmetics Toxicology**, v. 5, p. 141-157, 1967.

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

HATTORI, R; MURAKI, S; YOSHIDA, T. Chemical composition of the absolute from gardenia flower. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, p. 1351-1356, 1978.

HOLLAND, T; FOWLER, V. G. Manifestações clínicas da infecção por *Staphylococcus aureus* em adultos. **Disponível em:** <https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-of-staphylococcus-aureus-infection-in-adults?source=search_result&search=staphylococcus%20aureus&selectedTitle=3~1> Acesso em 30/07/2017.

HYDGAARD, M; MYGIND, T; PIOTROWSKA, R; FOSS, M; MEYER, R. L. Isoeugenol has a non-disruptive detergent-like mechanism of action. **Frontiers in Microbiology**, 2015.

JANSSENS, J; LAEKEMAN, G. M; PIETERS, L. A; TOTTE, J; HERMAN, A. G; VLIETINCK, A. J. Nutmeg oil: identification and quantitation of its most active constituents as inhibitors of platelet aggregation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, p. 179–188, 1990.

JENNEY, A; HOLT, D; RITIKA, R; SOUTHWELL, P; PRAVINS, S; BUADROMO, E; CARAPETIS, J; TONG, S; STEER, A. The clinical and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections in Fiji. **Infectious Diseases**, 2014.

KAPOOR, G; SAIGAL, S; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. Review Articl. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 300-305, 2017

KLEPSE, M. E; ERNST, E. J; LEWIS, R. E; ERNST, M.E; PFALLER, M. A. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 1207-1212, 1998.

KLEPSE, M. E; ERNST, E. J; LEWIS, R. E; ERNST, M.E; PFALLER, M. A. Evaluation of voriconazole pharmacodynamics using time-kill methodology. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1917 – 1920, 2000.

KREIS, W; MUNKE, R.T.J; DE PÁDUA, R. M; SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A; PETROVICK, P.R. Biossíntese de metabólitos primários e secundários. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**, 1 ed, v. 1, p. 167-184, 2017.

LAKEMAN, G. M; VAN HOOFF, L; HAEMERS, A; BERGHE, D. A. V; HERMAN, A. G; VLIETINCK, A. J. Eugenol a valuable compound for in vitro experimental research and worthwhile for further in vivo investigation. **Phytotherapy Research**, v. 4, p. 90-96, 1990.

LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. Porto Alegre, 2010.

LIMA, B; LÓPEZ, S; LUNA, L; AGUERO, M. B; ARAGÓN, L; TAPIA, A; ZACCHINO, S; LÓPEZ, M. L; ZYGADLO, J; FERESIN, G. E. Essential Oils of Medicinal Plants from the Central Andes of Argentina: Chemical Composition, and Antifungal, Antibacterial, and Insect-Repellent Activities. **Chemistry & biodiversity**, v. 8, n. 5, p. 924–936, 2011.

LIMA, M. F. P; BORGES, M. A; PARENTE, R. S; JÚNIOR, R. C. V; OLIVEIRA, M. E. Staphylococcus aureus e as infecções hospitalares - Revisão de Literatura. **Revista Uningá Review**, v. 21, n. 1, p. 32-39, 2015.

LOUREIRO, R. J; ROQUE, F; RODRIGUES, A. T; HERDEIRO, M. T; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

MARCHAIM, D; KAYE, K. Infecções e resistência antimicrobiana na unidade de terapia intensiva: epidemiologia e prevenção. **Disponível em:** <https://www.uptodate.com/contents/infections-and-antimicrobial-resistance-in-the-intensive-care-unit-epidemiology-and-prevention?source=search_result&search=infec%C3%A7%C3%B5es%20em%20icu&selectedTitle=1~150> Acesso em 30/07/2017.

MARCHESE, A; ORHAN, I. E; DAGLIA, M; BARBIERI, R; DI LORENZO, A; NABAVI, S. F; GORTZI, O; IZADI, M; NABAVI, S. M. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, v. 210, p. 402–414, 2016.

MEGIA, C; ZURITA, J; GUZMÁN-BLACO, M. Epidemiologia e vigilância de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina na América Latina. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. 79-86, 2010.

MIRON, D; BATTISTI, F; SILVA, F. K; LANA, A. D; PIPPI, B; CASANOVA, B; GNOATTO, S; FUENTEFRÍA, A; MAYORGA, P; SCHAPOVAL, E. E. S. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 660 – 667, 2014.

MOLYNEX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MORAIS-BRAGA, M. F. B; SOUZA, T. M; SANTOS, K. K. A; GUEDES, G. M. M; ANDRADE, J. C; TINTINO, S. R; SOBRAL-SOUZA, C. E; COSTA, J. G. M; SARAIVA, A. A. F; COUTINHO, H. D. M. Assitive effect of *Lygodium venustum* SW. in association with gentamicin. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, 2015.

MUKHERJEE, D; MUKHERJEE, A; GHOSH, T. C. Evolutionary Rate Heterogeneity of Primary and Secondary Metabolic Pathway Genes in *Arabidopsis thaliana*. **Genome Biology Evolution**, v. 8, n. 1, p. 17-28, 2015.

MURRAY, P. R. Microbiologia Médica. 6ª ed. **Elsevier**, 2009.

MUZI-DIAZ, A. L; PINHEIRO, M. G; ALVES, F. A. Características epidemiológicas e fatores de virulência em *Staphylococcus aureus*. **Acta Scientiae Technical**, v. 3, n. 1, p. 9-23, 2015.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP). Toxicology and carcinogenesis studies of isoeugenol (CAS No. 97-54-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). **National Toxicology Program Technical Report Series**, v. 551, p. 1–178, 2010.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing. Twelfth informational supplement, v. 22, n. 01, 2002.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Twelfth informational supplement, 2000.

NAZZARO, F; FRATIANNI, F; DE MARTINO, L; COPPOLA, R. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451–1474, 2013.

NEWMAN, D. J; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629 – 661, 2016.

NIELSEN, C. K; KJEMS, J; MYGIND, T; SNABE, T; SCHWARZ, K; SERFERT, Y; MEYER, R. L. Efeito antimicrobiano de isoeugenol encapsulado-emulsão contra biofilme LMS de agentes patogênicos e bactérias de deterioração de alimentos. **Jornal Internacional de Microbiologia Alimentar**, 2017.

NORDMANN, P; CUZON, G; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 228-236, 2009.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1 – 1, 2003.

OLIVEIRA, J. D. S; MACHADO, K. D. C; FREITAS, R. M. D. Produtos naturais aplicados adoenças negligenciadas: prospecção tecnológica. **Revista GEINTEC-Gestão,Inovação e Tecnologias**, v. 4, n. 2, p. 729–734, 2014.

OLIVEIRA, P. A; SALGE, A. K. M; PALOS, M. A. P. Infecções relacionadas à assistência em saúde em unidades de terapia intensiva neonatal: uma revisão integrativa. **Revista eletrônica trimestral de enfermagem**, n. 45, 2017.

OLIVEIRA, T. F.L; GOMES, F. I. S; PASSOS, J. S; CRUZ, S. S; OLIVEIRA, M. T; TRINDADE, S. C. Fatores associados á pneumonia nosocomial em indivíduos hospitalizados. **Revista Da Associação Medica Brasileira**, v. 57 n. 6, p. 630-6, 2011.

OPDYKE, D. L. J. Monographs on fragrance raw materials. **Food Cosmetic Toxicology**, v. 13, p. 815–817, 1975.

PANKEY, G; SABATH, L. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of gram positives bacterial infections. **Oxford journals**, v. 38, p. 864-865, 2013.

PFALLER, M. R. **Microbiologia médica**, p. 605, 2014.

RAUT, J. S; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

RICE, L. B. Antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6, p. 11-19, 2006.

ROGINSKY, V; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidante activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

SANCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, p. 121-137, 2002.

SANTOS, A. L. D. *Staphylococcus aureus*: visitando umacepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275 – 280, 2004.

SHAIKH, S; FATIMA, J; SHAKIL, S; MOHD, S; RIZVI, D; KAMAL, M. A. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2014.

SHIN, S. Anti-Aspergillus activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin b. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 5, p. 389 – 393, 2003.

SIDDIQUI, Z. N; FAROOQ, F; MUSTHAF, T. N. M; AHNMAD, A; KHAN, A. U; Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 237 – 243, 2013.

SIEBRA, A. L. A; OLIVEIRA, L. R; MARTINS, A. O. B. P. B; SIEBRA, D. C; ALBUQUERQUE, R. S; LEMOS, I. C. S; DELMONDES, G. A; TINTINO, S. R; FIGUEIREDO, F. G; COSTA, J. G. M; COUTINHO, H. D. M; MENEZES, I. R. A; FELIPE, C. B. F; KERNTOPF, M. R. Potentiation of antibiotic activity by *Passiflora cincinnata* Mast. front of strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, p. 37-43, 2018.

SILVA, V. A. Atividade antimicrobiana, citotóxica e genotóxica do óleo essencial *Ocimum basilicum*(Lamiaceae) e do linalol. **Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**, João Pessoa, 2015.

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P; MELLO, J. C. P; MENTZ, L. A; PETROVICK, P.R. Biossíntese de metabólitos primários e secundários. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**, v. 1, p. 167-184, 2007.

SOUSA, E. O; BARRETO, F. S; RODRIGUES, F. F. G; COSTA, J. G. M. Atividade antibacteriana e interferência de *Lantana camara* L.e *Lantana montevidensis* (Spreng.) Briq. na resistência de aminoglicosídeos. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, p. 1-5, 2010.

TAIZ, L; ZEIGER, E; MOLLER, I. M; MURPHY, A. Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal, p. 373, 2017.

TAYLOR, J. M; JENNER, P. M; JONES, W. I. A comparison of the toxicity of some allyl, propenyl, and propyl compounds in the rat. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 6, p. 378–387, 1964.

TONG, S. Y. C. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Review**, v. 28, n. 3, 2015.

VERONESI, R; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. 5ª Ed, 2015.

WHO, Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance, 2015.

WOLFFENBÜTTEL, A. N. A química dos óleos essenciais. **Informativo do Conselho Regional de Química da 5ª Região**, p. 06 - 07, 2007.

ZEMEK, J; VALENT, M; PODOVÁ, M; KOSIKOVÁ, B; JONIAK, D. Antimicrobial properties of aromatic compounds of plant origin. **Folia Microbiology**, v. 32, p. 421–425, 1987.

ZHANG, L. L; ZHANG, L. F; XU, JIAN-GUO; HU, Q. P. Comparison study on antioxidant, DNA damage protective and antibacterial activities of eugenol and isoeugenol against several foodborne pathogens. **Food & Nutrition Research**, v. 61, 2017.