

ISIS CAROLINE DA SILVA CIRINO

**MODULAÇÃO DA RESISTÊNCIA A DROGAS POR ÓLEOS
ESSENCIAIS EM LINHAGENS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

João Pessoa – PB
2014

ISIS CAROLINE DA SILVA CIRINO

**MODULAÇÃO DA RESISTÊNCIA A DROGAS POR ÓLEOS
ESSENCIAIS EM LINHAGENS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos necessários para a obtenção do título de **Mestre em Biologia Celular e Molecular**.

Orientador: Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior

João Pessoa - PB
2014

C578m Cirino, Isis Caroline da Silva.
Modulação da resistência a drogas por óleos essenciais em
linhagens de *Staphylococcus aureus* / Isis Caroline da Silva
Cirino.-- João Pessoa, 2014.
96f. : il.
Orientador: José Pinto de Siqueira Júnior
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN
1. Biologia celular e molecular. 2. Resistência bacteriana.
3. *Staphylococcus aureus*. 4. Produtos naturais. 5. Óleos
essenciais.

UFPB/BC

CDU: 576.577.2(043)

ISIS CAROLINE DA SILVA CIRINO

Dissertação de Mestrado Avaliada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFPB
Orientador

Prof.^a Dra. Darlene Camati Persuhn

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFPB
Examinadora Interna

Prof.^a Dra. Vivyanne dos Santos Falcão Silva

Departamento de Medicina – Faculdade Ciências Médicas
Examinadora Externa

Prof. Dra. Krystyna Gorlach-Lira

Departamento de Biologia Celular e Molecular – UFPB
Suplente Interna

Prof. Dra. Cybelle de Oliveira Dantas

Unidade Acadêmica de Tecnologia de Alimentos – UFCG
Suplente Externa

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética de Micro-organismos, do Departamento de Biologia Molecular, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba, subvencionado pelo CNPq, CAPES e FAPESQ/PB

*Dedico estas linhas, tão tortuosamente escritas,
a todas as pessoas que amo e que fazem parte da minha vida,
especialmente aos meus pais sem os quais eu nada seria...*

“Quem luta com monstros deve velar por que, ao fazê-lo, não se transforme também em monstro. E se tu olhares, durante muito tempo, para um abismo, o abismo também olha para dentro de ti.”

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por tudo que fizeram em minha vida para que eu chegasse até aqui. Por todo sacrifício feito para que eu me tornasse a pessoa que sou e sempre serei. Sou eternamente grata pela presença de vocês em minha vida.

Às minhas irmãs e cunhados (Thais, Daniele, Fabíola, Germano e Valdécio) pelo apoio, incentivo, presença e por terem me dado os maiores presentes da minha vida... meus lindos sobrinhos (Arthur, Gustavo, Ludmila, Henrique e Benjamin) e demais familiares pela presença de cada um de vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior pela oportunidade e paciência durante todos estes anos de convivência.

Aos membros da banca, professoras Darlene, Vivyanne, Krystyna e Cybelle, pela disponibilidade, atenção e contribuições para este trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Genética de Microrganismos, D. Severina e Seu Bosco, pelo cuidado, carinho, companhia, preocupação e empenho para que nossas atividades sempre fossem realizadas da melhor forma possível.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Biologia Molecular, em especial à Ludmila Maul, secretária do Programa de Pós-Graduação, pelo carinho, disponibilidade, apoio, profissionalismo e dedicação.

A minha família LGM: Vivyanne e Suéllen pelos ensinamentos, paciência e amizade dentro e fora dos muros da UFPB. Helena e Ryldene, com um menor tempo de convivência, mas sempre com muito carinho, respeito, amizade e admiração. Saibam que sempre levarei vocês na minha vida.

Aos agregados Gregório e Antônio pela amizade e carinho em todos estes anos de caminhada e agradecer, especialmente, a Raphael pelas palavras certas e por me ajudar a chegar até aqui. Sou e serei sempre muito grata a você.

A turma do mestrado, Derek, Layanne, Sandro, Talita, Rachel, Allane e Pamella, em especial Derek e Rachel pelas longas noites de estudos, finais de semanas debruçados sobre os livros para que conquistássemos nossos sonhos. Meu muitíssimo obrigada a todos vocês.

A minha turma de graduação “Eternos Feras” por me proporcionarem anos maravilhosos em minha vida acadêmica.

As minhas amigas Ana Esther, Clara, Cláudia, Heloisa, Joany e Natália amizades sinceras que carrego deste o ensino médio e que sempre se fazem presentes em minha vida me proporcionando bons momentos.

Aos meus amados amigos Carolina, Débora, Gitanna, Wedja e Vlademir, pela amizade, carinho, incentivo e presença em momentos tão importantes de minha vida.

À “Grande Família”: S. João, D. Geyse, Julianna, Tatianna, Jeferson, Jansem, Robinson, Rossana, Kellinne, Jackson, Tia Chaguinha, João Francisco e Raoni Filho, por me acolherem como membro desta família tão maravilhosa. Não tenho palavras para expressar meu amor e agradecimento por ter vocês em minha vida.

Ao meu amigo, irmão, companheiro e cúmplice, João Neto, pela amizade, cuidado, inúmeros conselhos e broncas dadas, por sempre estar ao meu lado seja nos bons ou maus momentos, por segurar minhas lágrimas, pelas risadas e todas as memórias criadas nesta nossa amizade.

A todos os professores do Mestrado em Biologia Celular e Molecular, pelos ensinamentos e exemplos de caminhos a serem seguidos ou evitados. Contribuindo com a minha formação pessoal e profissional.

A CAPES, ao CNPq e a FAPESQ-PB, pelo apoio financeiro para elaboração deste trabalho.

RESUMO

A resistência bacteriana a drogas pode ser ocasionada por diferentes mecanismos. Dentre esses, podemos destacar as chamadas bombas de efluxo as quais são partes integrantes da membrana plasmática. A crescente incidência de bactérias resistentes tem minado o valor terapêutico dos antibacterianos existentes, criando a necessidade, cada vez maior, da busca por alternativas capazes de reverter ou diminuir a resistência. Na tentativa de encontrar uma solução para esse problema, os produtos de origem vegetal (extratos, óleos essenciais e fitoconstituintes) surgem como uma rica fonte de pesquisa na busca de potenciais “moduladores da resistência à droga”, ou seja, drogas que aumentam a atividade de certos antibióticos ou mesmo reverterem a resistência bacteriana. Neste trabalho, avaliamos o efeito modificador da atividade antibiótica em linhagens de *Staphylococcus aureus* - portadoras das bombas de efluxo - o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L., *Illicium verum* Hook., *Cananga odorata*, *Eucalyptus globulus*, *Pelargonium graveolens*, *Citrus paradisi*, *Cymbopogon flexuosus*, *Melaleuca alternifolia*, *Mentha Spicata*, *Origanum vulgare*, *Cymbopogon Martini* e seus constituintes majoritários, 1,8 cineol, Anetol, Trans-Caryophyllene, Citronelol, Limoneno, Citral, Terpinen-4-ol, L-carvone, Carvacrol e Geraniol. Como resultado, observou-se que os produtos naturais avaliados, de maneira geral, apresentaram significativa atividade antibacteriana e podem atuar como modificadores da atividade antibiótica ao reduzirem a CIM dos antibióticos testados (tetraciclina, eritromicina e norfloxacin) de 2 a 16 vezes. Os resultados indicam que produtos naturais de origem vegetal são, de fato, potenciais adjuvantes de antibióticos.

Palavras-chave: resistência bacteriana; *Staphylococcus aureus*; produtos naturais.

ABSTRACT

Bacterial resistance to drugs can happen due to different mechanisms. Among these, efflux pumps highlights and these structures are integral part of membrane cell. The increasing incidence of resistant bacteria has undermined the therapeutic value of available antibacterials, creating the necessity, increasingly, the search for alternatives that can reverse or decrease the resistance, as the search for inhibitors of resistance mechanisms. In order to resolve this problem, products from plants (extracts, essential oils and phytoconstituents) rise as rich research source on “drug resistance modulators”, that is, drugs that increase antibiotics activity or even revert bacterial resistance. In this work, we investigated how modifiers of antibiotic activity act in *Staphylococcus aureus* strains that are efflux pumps carriers. The essential oils used were extracted from *Rosmarinus officinalis* L., *Illicium verum* Hook., *Cananga odorata*, *Eucalyptus globulus*, *Pelargonium graveolens*, *Citrus paradisi*, *Cymbopogon flexuosus*, *Melaleuca alternifolia*, *Mentha Spicata*, *Origanum vulgare*, *Cymbopogon Martini*, and their major constituents used were 1,8-cineol, Anetol, Trans-Caryophyllene, Citronelol, Limonene, Citral, Terpinen-4-ol, L-carvone, Carvacrol and Geraniol. Our results show that the natural products evaluated, in general, present significant antibacterial activity, and probably they operate as modifiers of antibiotic activity, strains through reduction of CIM of tested antibiotics (tetracycline, erythromycin and norfloxacin) from 2 to 16 fold. The results show that natural products from plants are in fact potential antibiotics adjuvants.

Key words: bacterial resistance; *Staphylococcus aureus*; natural products

LISTA DE ABREVIATURAS

5'MHC – 5'-methoxyhydnocarpin-D

ABC - Superfamília “*ATP binding cassette*”

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BAB – Blood Agar Base

BHI – Brain Heart Infusion (caldo infusão cérebro-coração)

BrEt – Brometo de Etídio

CCDEP – Center for Disease Dynamics, Economics & Policy

CIM – Concentração Inibitória Mínima

EPIs – Efflux Pump Inhibitors (inibidores de bomba de efluxo)

FDA – Food and Drug Administration

FQS – Fluoroquinolonas

KCR – Kaempferol-3-O-a-l-(2,4-bis-E-p-coumaroyl) rhamnoside

MATE - Multidrug And Toxic Compound Extrusion

MDR - Multiple drug resistance (Resistência múltipla as drogas)

MRSA - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* resistente a meticilina)

MsrA – Macrolide Efflux Protein (proteína de efluxo para macrolídeos)

MSSA - Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* sensível a meticilina)

MFS - “*Major Facilitator Superfamily*”

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards

NorA – Proteína de efluxo para fluoroquinolonas e outras substâncias

OMS – Organização Mundial de Saúde

OEA – Óleo Essencial de Alecrim

OEAE – Óleo Essencial de Anis Estrelado

OEC – Óleo Essencial de Cananga

OEEG – Óleo Essencial de Eucalipto Globulus

OEGA – Óleo Essencial de Gerânio África

OEG – Óleo Essencial de Grapefruit

OEL – Óleo Essencial de Lemongrass

OEM – Óleo Essencial de Melaleuca

OEMS – Óleo Essencial de Menta Spicata

OEO – Óleo Essencial de Orégano

OEP – Óleo Essencial de Palmarosa

RND - Resistance Nodulation Division

SMR - Small Multidrug Resistance

TetK – Proteína de efluxo para tetraciclina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Início da história da descoberta e desenvolvimento dos antibióticos	06
Figura 2 -	Disponibilidade de dados sobre a resistência de bactérias selecionadas - combinações de drogas antibacterianas	08
Figura 3 -	Dados sobre <i>S. aureus</i> resistentes a β -lactâmicos – resistente à meticilina (MRSA)	11
Figura 4 -	Mecanismos de transferência da resistência bacteriana	12
Figura 5 -	Os mecanismos de resistência das bactérias	13
Figura 6 -	Representação esquemática das principais famílias de MDR transportadores	15
Figura 7 -	História do desenvolvimento dos agentes antimicrobianos x subsequente aquisição da resistência pelos microrganismos	16
Figura 8 -	Número de novos agentes antibacterianos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) em períodos de 5 anos	17
Figura 9 -	Atuação de um inibidor de efluxo.	18

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Estrutura de Inibidores de Bomba de Efluxo Naturais	18
Quadro 2 - Linhagens bacterianas ensaiadas	31
Quadro 3 - Estrutura dos componentes majoritários dos óleos essenciais	33
Tabela 1 - Solventes e Diluentes para a Preparação de Soluções Padrão de Agentes Antimicrobianos	32
Tabela 2 - Atividade Antibacteriana dos óleos essenciais e terpenóides	36
Tabela 3 - Atividade Moduladora dos óleos essenciais e terpenóides	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 Da Era Pré-Antibiótica a Era Antibiótica Moderna.....	5
2.2 A Problemática da Resistência Bacteriana.....	7
2.2.1 Resistência Bacteriana no Brasil e no Mundo.....	7
2.3 Gênero <i>Staphylococcus</i>.....	9
2.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.4 Mecanismos de Resistência.....	11
2.4.1 Bomba de Efluxo.....	14
2.5 Modificadores da resistência bacteriana.....	15
2.6 Produtos Naturais.....	22
2.6.1 Óleos Essenciais.....	22
2.6.1.1 <u>Óleo Essencial de Alecrim</u>	23
2.6.1.2 <u>Óleo Essencial de Anis Estrelado</u>	23
2.6.1.3 <u>Óleo Essencial de Cananga</u>	23
2.6.1.4 <u>Óleo Essencial de Eucalipto Globulus</u>	24
2.6.1.5 <u>Óleo Essencial de Gerânio África</u>	24
2.6.1.6 <u>Óleo Essencial de Grapefruit</u>	24
2.6.1.7 <u>Óleo Essencial de Lemongrass</u>	25
2.6.1.8 <u>Óleo Essencial de Melaleuca (Tea Tree)</u>	25
2.6.1.9 <u>Óleo Essencial de Menta Spicata</u>	25
2.6.1.10 <u>Óleo Essencial de Orégano</u>	26
2.6.1.11 <u>Óleo Essencial de Palmarosa</u>	26
2.7 Terpenóides.....	26

3. OBJETIVOS

3.1 Geral.....	29
3.2 Específicos.....	29

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens Bacterianas.....	31
4.2 Óleos Essenciais.....	31
4.3 Constituintes Majoritários.....	32
4.4 Solução de Antibióticos e Brometo de Etídio.....	32
4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	34
4.6 Determinação Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos na presença dos óleos essenciais e terpenóides.....	34

5. RESULTADO E DISCUSSÕES

5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais e terpenóides.....	36
5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos na presença dos óleos essenciais e terpenóides.....	38

6. CONCLUSÕES..... 45

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 47

ANEXO

Laudos Dos Óleos Essenciais

APÊNDICE

Artigo Submetido: The essential oil from *Origanum vulgare* L. and its related compounds carvacrol and thymol enhance the effect of tetracycline against *Staphylococcus aureus*

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A introdução dos antibióticos no tratamento das infecções bacterianas foi uma das mais importantes realizações da medicina nos últimos 60 anos. Entretanto, seu uso inadequado favoreceu o aumento da resistência bacteriana minando a utilidade terapêutica de muitos dos agentes existentes, criando a necessidade, cada vez maior, da descoberta de novas drogas antibacterianas (TAVARES, 2000).

Em 2004, mais de 70% das bactérias patogênicas foram estimadas como resistentes a pelo menos um dos antibióticos disponíveis na clínica. Os chamados "superbugs" (organismos que são resistentes à maioria dos antibióticos utilizados clinicamente) estão surgindo em ritmo acelerado. Entre eles, destaca-se a bactéria *Staphylococcus aureus*, responsável por crescentes casos de infecções (LINDSAY et al, 2004; DEMAÏN; SANCHEZ, 2009). Estes dados foram recentemente atualizados por um relatório divulgado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em abril de 2014 e mostra que a situação se agravou, principalmente, nos países subdesenvolvidos.

O sistema de efluxo é um dos principais mecanismos da resistência microbiana e consiste de proteínas transmembranas, também chamadas de bombas de efluxo. Neste mecanismo, as drogas podem ser expulsas seletivamente ou por meio de bombas MDR (*Multi Drug Resistance*) que exportam uma ampla gama de compostos estruturalmente independentes (LI, 2004; MCKEEGAN, 2004; IDAILLAC, 2007) desta forma, a concentração intracelular do antimicrobiano é insuficiente possibilitando a sobrevivência da bactéria.

A necessidade de novos antimicrobianos mais eficazes continua crescendo, no entanto, ao longo das duas últimas décadas a procura por novos antimicrobianos tem declinado, uma vez que para as grandes empresas farmacêuticas o mercado destes produtos representa um risco econômico, devido ao alto investimento aplicado. Em contrapartida, após pouco tempo essas drogas podem se tornar inúteis devido a ocorrência de espécies de bactérias resistentes, declinando as vendas, e consequentemente o lucro (COATES et al., 2002; CHRISTOFFERSEN, 2006).

Uma estratégia para o problema da resistência envolve o desenvolvimento de análogos aos antibióticos existentes. Dentro dessa perspectiva, estão sendo consideradas abordagens válidas às pesquisas com “drogas não-antibióticas”, as quais apresentam alguma influência na fisiologia e na viabilidade de microrganismos – influência essa que pode se

revelar pela atividade do antibiótico, pela modificação da atividade antimicrobiana do antibiótico e pela atividade na fisiologia e na patogenicidade do microrganismo. Agentes modificadores de atividade antibiótica ou moduladores da resistência são compostos que potencializam a atividade de um antimicrobiano contra cepas resistentes, sendo que alguns desses agentes atuam como inibidores de bombas de efluxo (EPIs) (KAATZ ET AL, 2003; MARQUES, 2005).

Espécies vegetais constituem uma rica fonte de potentes inibidores e diversos fitoconstituintes já foram identificados como tal (GIBBONS, 2004; STRAVI et al, 2007). Diante da problemática da resistência aos antibióticos, torna-se cada vez mais necessária a avaliação da atividade antimicrobiana direta, bem como a atuação de produtos naturais de origem vegetal como "adjuvantes de antibióticos" uma vez que, alguns inibidores de efluxo conhecidos não podem ser utilizados, devido à toxicidade na concentração desejada. Portanto, produtos naturais vêm, nos últimos anos, sendo avaliados como fonte na busca por moduladores da resistência às drogas, em especial como inibidores de bomba de efluxo em bactérias (TEGOS et al., 2006; STRAVI et al, 2007).

Diante do exposto, a relevância deste trabalho dar-se pela necessidade de realização de estudos na busca de produtos naturais como possíveis modificadores da atividade antibiótica em linhagens de *S. aureus*.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Da era pré-antibiótica à era antibiótica moderna

A pesquisa com quimioterápicos é anterior aos estudos dos antibióticos, exemplo disto é a utilização quinina no tratamento de algumas doenças, como a malária, sem exercer ação tóxica sobre o organismo doente. Contudo, os antimicrobianos são, provavelmente, uma das formas mais bem sucedidas de quimioterapia na história da medicina tendo em vista a redução da mortalidade em decorrência das infecções bacterianas (AMINOV, 2010).

Historicamente a era pré-antibiótica desconstrói a ideia de que o emprego de antimicrobianos estaria restrito apenas à era antibiótica moderna, uma vez que a utilização da tetraciclina tem sido relatada – a partir da análise de esqueletos humanos – em uma antiga população que data de 350-550 D.C. na região da Núbia Sudanesa (BASSETT et al., 1980, NELSON et al, 2010), bem como em estudos histológicos de amostras femorais de esqueletos do final do período romano em Dakhleh Oasis, Egito (COOK et al, 1989).

O século XX marca o início da era moderna dos antibióticos. Neste período dois nomes se destacam: Paul Ehrlich e Alexander Fleming. Em 1904, Ehrlich inicia uma intensa pesquisa na busca de um medicamento contra a sífilis – doença sexualmente transmissível e quase incurável na época – mas apenas 5 anos depois (1909), juntamente com o químico Alfred Bertheim e o bacteriologista Sahachiro Hata, chegaram a uma droga que se mostrou promissora, mesmo diante dos efeitos colaterais apresentados (AMINOV, 2010). A descoberta de Ehrlich fomentou a indústria farmacêutica que agora buscava novos métodos de isolamento e identificação de novos fármacos (FIGURA 1), dentre os quais destacam-se os medicamentos de sulfonamidas (1932 por GERHARD DOMAGK), a classe mais antiga de antibióticos sintéticos sendo, até os dias atuais, muitos de seus derivados uma opção viável para terapia.

Uma das conquistas científicas fundamentais do século XX ocorreu quando Alexander Fleming descobriu, em 1928, que uma substância produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum* (anteriormente conhecido como *Penicillium notatum*) apresentava atividade antibacteriana. Embora este achado tenha ocorrido antes das principais realizações da Domagk e colaboradores, as sulfas, totalmente sintéticas, foram difundidas clinicamente

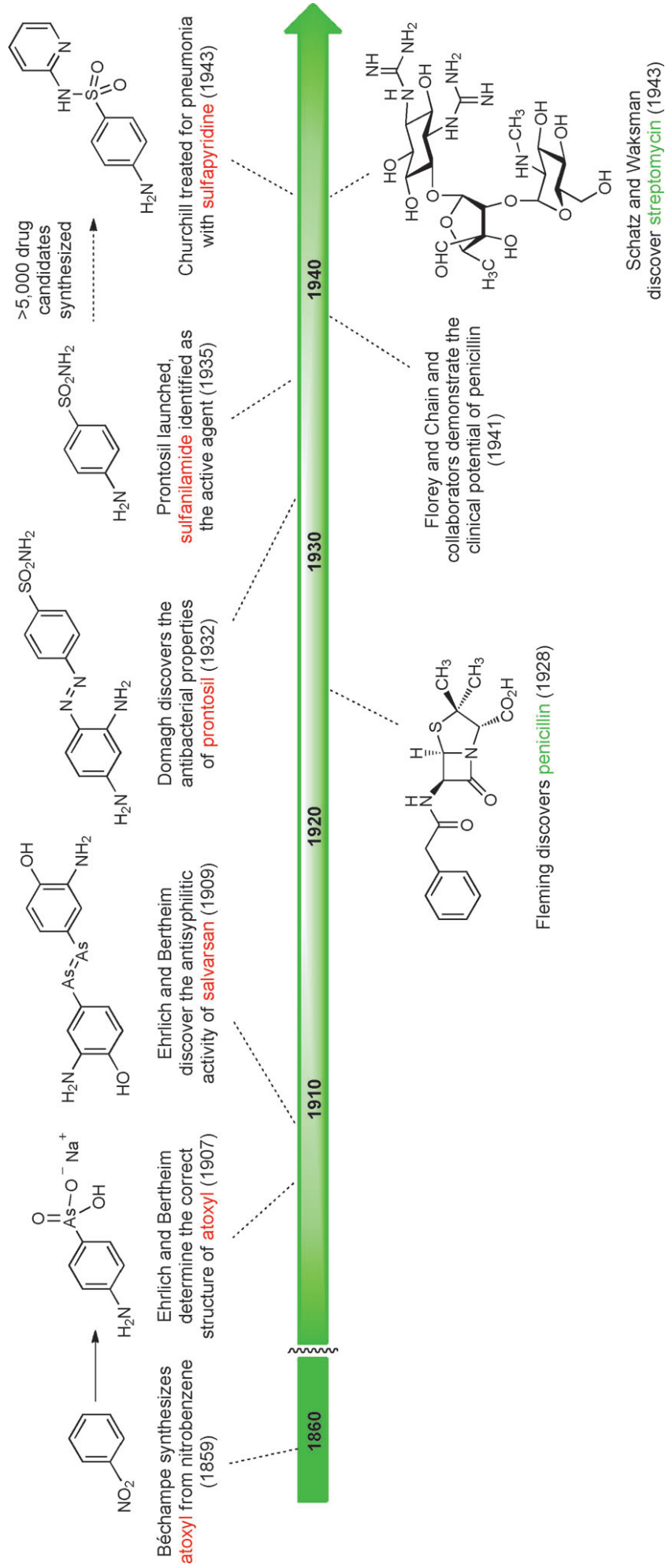


Figura 1. Início da história da descoberta e desenvolvimento dos antibióticos (WRIGHT et al, 2014)

muitos anos antes da penicilina tornar-se disponível para o tratamento de infecções bacterianas (WRIGHT et al, 2014).

Essa disponibilidade de antibióticos permitiu revolucionárias intervenções médicas, como a quimioterapia, transplantes de órgãos e praticamente todas as grandes cirurgias invasivas (GERARD, 2010).

2.2 A problemática da resistência bacteriana

O aumento da disponibilidade de antibióticos para salvar vidas no mundo em desenvolvimento é um fato positivo. Contudo, em todo o mundo, o uso excessivo desses medicamentos tem criado cepas resistentes de bactérias patogênicas – fato que pode ser uma ameaça maior em países mais pobres do que nos mais ricos, em parte, devido à falta de regulamentação na prescrição e venda destes fármacos (REARDON, 2014).

O desenvolvimento da resistência é um processo evolutivo normal para os microrganismos, mas é acelerado pela pressão seletiva exercida pela utilização generalizada de agentes antibacterianos. Cepas resistentes são capazes de se propagar onde há descumprimento de medidas de prevenção e controle de infecções (OMS, 2014).

2.2.1 Resistência bacteriana no Brasil e no mundo

A Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou em abril deste ano um relatório intitulado “Antimicrobial Resistance: Global Report on surveillance” no qual revela a atual situação da problemática da resistência bacteriana no mundo. Segundo o documento, o mundo está prestes a entrar em uma era “pós-antibióticos”, uma vez que em algumas regiões, o uso de antibióticos não se faz eficaz. Na Nigéria, por exemplo, alguns estudos sugerem que até 88% das infecções por *S. aureus* não podem ser tratadas com meticilina. Ainda segundo o relatório, o problema também parece ser particularmente agudo nas economias emergentes, conhecidos como estados do ‘BRIC’: Brasil, Rússia, Índia e China.

Entretanto, países desenvolvidos também são afetados em grande escala por estes microrganismos. A exemplo dos Estados Unidos, onde *S. aureus* resistente à meticilina apresenta taxa de mortalidade maior do que somados os casos de morte por HIV e Hepatite B, e a *Escherichia coli* é o principal patógeno causador de infecções do trato urinário (Center for Disease Dynamics, Economics & Policy – CDDEP, 2010).

Um panorama mundial, a partir da análise de dados oficiais nacionais (FIGURA 2), mostra que o quadro é preocupante. A começar pela falta de informações dos países sobre a situação de seus territórios, uma vez que apenas 114 dos 194 países membros forneceram dados nacionais sobre resistência aos medicamentos (OMS, 2014).

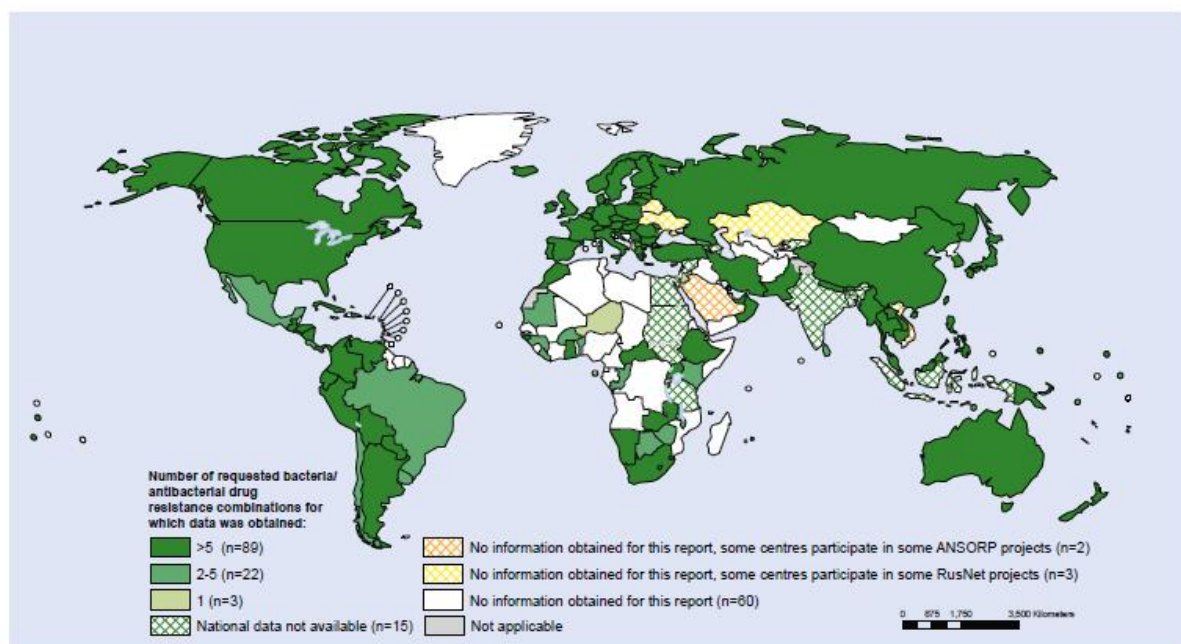


Figura 2. Disponibilidade de dados sobre a resistência de bactérias selecionadas - combinações de drogas antibacterianas, 2013 – OMS, 2014).

No Brasil – embora seja o maior país da América Latina e apresente centros médicos de excelência – a resistência bacteriana nos hospitais representa um grande problema e um desafio no tratamento, uma vez que o país não possui um laboratório central de referência microbiológica e a coleta de dados nacionais sobre a resistência bacteriana não é uma tarefa fácil devido à falta de publicações oficiais (ROSSI, 2011).

O uso de antibióticos na pecuária, o lançamento de águas residuais das indústrias farmacêuticas em rios utilizados pela população, falta de saneamento básico e, principalmente, uso descontrolado de antibióticos, são as prováveis causas para o acelerado aumento da resistência bacteriana. Na China, por exemplo, hospitais e clínicas recebem incentivos financeiros para a prescrição, e os antibióticos são a sua maioria. Além disto, muitos países permitem que a venda de antibióticos sem receita médica – o que pode levar ao seu uso em outras doenças, como a malária (REARDON, 2014).

Diante deste quadro mundial e da crescente problemática dentro do território brasileiro, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) por meio da resolução – RDC Nº 20, de 5 de maio de 2011 – torna mais rígida a venda de antibióticos. Esta medida busca reduzir/inibir a automedicação já que, mesmo sendo necessária a apresentação da receita médica, esta nem sempre era solicitada e a venda destes medicamentos acontecia de maneira indiscriminada.

As taxas de resistência ao redor do mundo estão subindo, novos mecanismos de resistência estão surgindo e infecções causadas por bactérias multi-resistentes estão cada vez mais difíceis de tratar. Nosso arsenal atual de antibióticos está constantemente a perder a sua eficácia e há poucos sinais de que será devidamente repostado em um futuro próximo (WRIGHT et al, 2014).

2.3 Gênero *Staphylococcus*

Em meados de 1880, o cirurgião escocês, Alexander Ogston, observou que uma série de doenças humanas piogênicas estavam associadas a um aglomerado de formação de microrganismos. Posteriormente, em 1882, ele nomeou esses organismos de *Staphylococcus*, um nome derivado do grego *staphyle* (cachos de uvas) e *coccus* (grão ou baga) (OGSTON, 1882). Atualmente, *Staphylococcus* corresponde ao gênero caracterizado por indivíduos anaeróbios facultativos, catalase positiva e cocos Gram-positivos (ANVISA, 2008).

No ano de 1884, Anton J. Rosenbach (1842-1923), um cirurgião alemão, isolou duas cepas de *Staphylococcus*, as quais foram nomeadas de acordo com o pigmento de suas colônias: *S. aureus*, do latim *aurum* (ouro), e *S. albus* (atualmente *epidermidis*), do latim *albus* (branco) (ROSENBAACH, 1884).

O gênero *Staphylococcus* – juntamente com outros três gêneros (*Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*) – pertence à família Micrococcaceae e apresentando 37 espécies, sendo que 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. De maneira geral, esse gênero é constituinte da microbiota normal da pele humana e de outros sítios anatômicos. *S. aureus* é a espécie de maior interesse clínico, visto que está frequentemente relacionado com diversas infecções em seres humanos (CASSETTARI et al, 2005; TRABULSI et al, 2005).

2.3.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus são cocos Gram-positivos pertencentes à família Micrococcaceae. Suas colônias medem geralmente cerca de 1 a 3 mm, produzem enzimas catalase e coagulase, e na maioria das vezes, um pigmento amarelo-dourado devido à presença de carotenóides. São bactérias anaeróbicas facultativas que estão dispostas sozinhas, em pares ou formando grupos irregulares com aspecto de cacho de uva (TRABULSI et al, 2005).

São constituintes da microbiota normal da pele e da mucosa humana, sendo a nasofaringe o principal local colonizado presente em 30-70% da população humana. Porém, caso as barreiras naturais, isto é, pele ou membranas das mucosas, estejam comprometidas por trauma ou cirurgia, poderá infectar qualquer tipo de tecido do corpo, causando lesões no local (LINDSAY; HOLDEN, 2004).

S. aureus é frequentemente implicado em uma grande variedade de infecções comunitárias e hospitalares, incluindo bacteremia, infecções da pele e tecidos moles, pneumonia, infecções ósseas e articulares e endocardite (DENG et al, 2012; SCHINDLER et al, 2013). Também é a causa mais comum de infecções de feridas pós-operatórias e algumas cepas de *S. aureus* produzem toxinas que podem causar uma variedade de sintomas específicos, incluindo a síndrome do choque tóxico e intoxicação alimentar (OMS, 2014). A virulência de *S. aureus* tem sido associada à combinação de mais de 40 toxinas extracelulares diferentes, enzimas e proteínas ligadas à parede celular. Esses fatores de virulência proporcionam a adesão da bactéria às células e tecidos do hospedeiro, aquisição de nutrientes e evasão da resposta imune do hospedeiro (ARVIDSON; TEGMARK, 2001; VELÁZQUEZ-MEZA, 2005).

O surgimento de cepas de *S. aureus* resistente a uma ampla distribuição de antibióticos – incluindo *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) da classe dos β -lactâmicos (FIGURA 3), aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamidas, fluoroquinolonas (FQS), cloranfenicol, sulfonamidas, estreptomicina e tetraciclina – é uma causa de preocupação crescente em todo mundo e tornou-se um problema de pandemia devido a opções terapêuticas limitadas disponíveis (SCHINDLER et al, 2013).

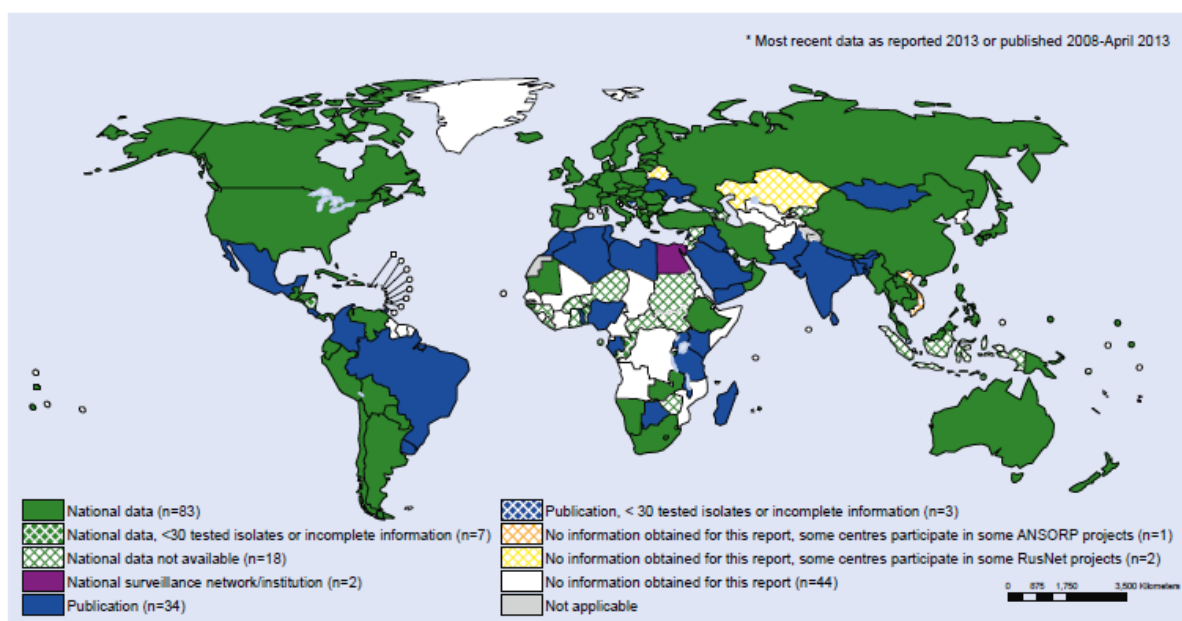


Figura 3. Dados sobre *S. aureus* resistentes a β -lactâmicos – resistente à meticilina (MRSA) - OMS,2014

2.4 Mecanismos de resistência

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético relacionado a existência de genes contidos no microrganismo que codificam diferentes proteínas, responsáveis por mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas. Tal resistência pode ser originada por mutações espontâneas que ocorrem no microrganismo durante seu processo replicativo, resultando em uma modificação na sequência de bases no DNA cromossômico. Outra forma de aquisição de resistência é a importação de genes causadores desse fenômeno, consistindo na resistência transferível (SMITH; JARVIS, 1999).

A transferência é realizada por meio dos processos de transdução – via bacteriófagos; conjugação – via plasmídeos e transposons conjugativos; e transformação – por simples incorporação de material genético exógeno (DNA cromossômico e plasmídeos) de organismos mortos (ALEKSSHUN; LEVY 2007) (FIGURA 4).

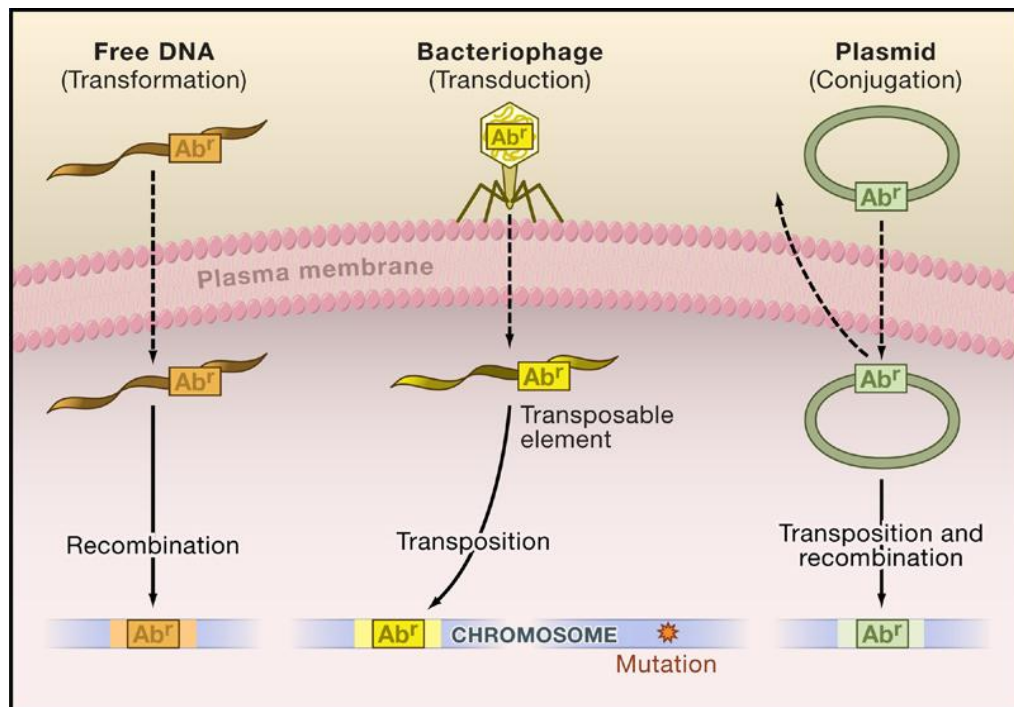


Figura 4. Mecanismos de transferência da resistência bacteriana (ALEKSSHUN; LEVY 2007).

Durante este processo de transferência da resistência bacteriana, o material genético é transferido de uma bactéria doadora para uma receptora. Os elementos genéticos transferíveis são: plasmídeos – moléculas de DNA circular que podem prover uma vantagem seletiva para as bactérias que os possuem, como genes de resistência a antibióticos; transposons – também chamados genes saltadores, são elementos genéticos móveis que podem transferir DNA dentro de uma célula, de uma posição para outra no genoma ou entre diferentes moléculas de DNA (plasmídeo-plasmídeo ou plasmídeo-cromossomo) e também podem conter genes de resistência a antibióticos; e integrons – segmentos de DNA fita dupla, menores que os transposons, também são elementos genéticos móveis, mas não se auto duplicam e estão relacionados a captura de genes de resistência a drogas antimicrobianas, apresentando um enorme potencial para criação de um "Superbug". (GUILFOILE, 2007).

Sem dúvidas, o desenvolvimento e uso de antibióticos foi um dos passos mais importantes para o controle de doenças infecciosas. No entanto, o aparecimento e subsequente disseminação de resistência a antibióticos em organismos patogênicos têm tornado muitos antibióticos, atualmente disponíveis, ineficazes (NEU, 1992; MOELLERING, 1998). Como consequência, sem uma ação urgente e coordenada entre as diferentes partes envolvidas nessa

questão, o mundo caminha rumo a uma era pós-antibiótico, em que infecções comuns e ferimentos simples que são tratáveis há décadas podem matar novamente (OMS, 2014).

Os mecanismos conhecidos de resistência incluem: **1)** inativação da droga catalisada por enzima – por hidrólise ou a formação de derivados inativos; **2)** mutação, destruição ou superprodução do alvo – a molécula alvo pode ser alterada por mutação ou modificação enzimática de tal modo que a afinidade do antibiótico para o alvo está reduzida; **3)** diminuição das concentrações intracelulares de drogas – absorção prejudicada ou bombas de efluxo dependentes de energia que promovem a eliminação de agentes antimicrobianos para o meio extracelular mais rápido que a difusão pela membrana plasmática de maneira que a concentração intracelular do agente se mantém insuficiente para bloquear as funções celulares; **4)** redução da permeabilidade da membrana externa – a droga não consegue penetrar eficientemente na célula bacteriana (KÖHLER et al, 1999; POOLE, 2002; SCHINDLER et al, 2013).

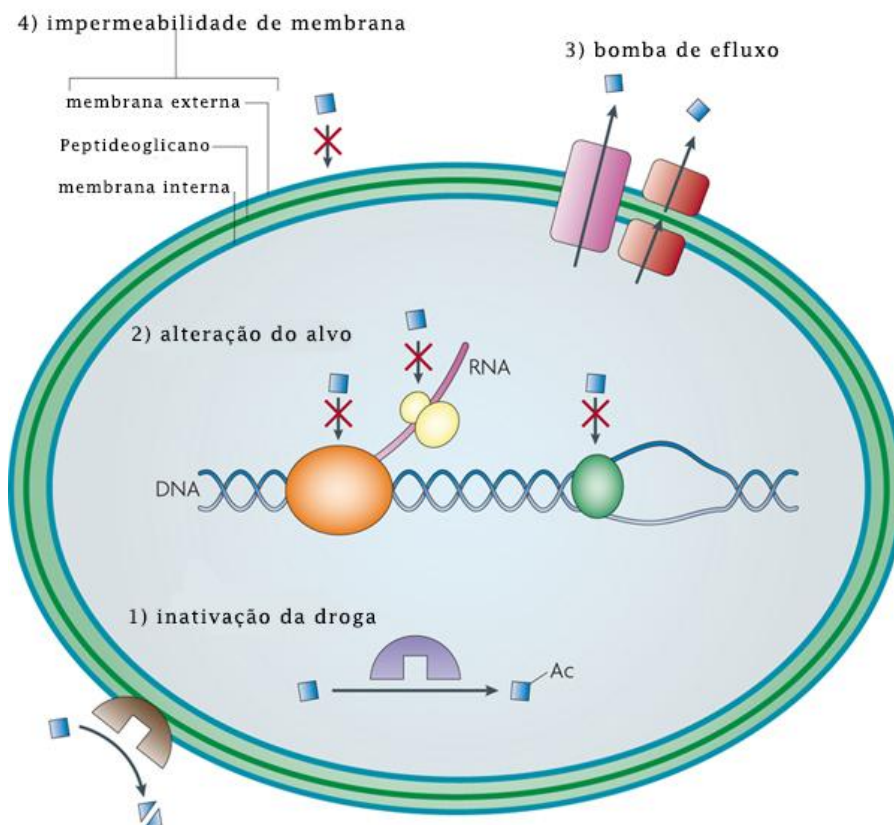


Figura 5. Os mecanismos de resistência das bactérias (adaptado de ALLEN et al, 2010)

2.4.1 Bomba de Efluxo

A Resistência a antibióticos mediada por efluxo tem sido amplamente descrita na literatura (McCALLUM et al, 2010, SCHINDLER et al, 2013). Ela é causada por uma expressão aumentada de bombas de efluxo através de uma ação reguladora da proteína, mutações reguladoras, aquisição de plasmídeo ou mutações que potencializam as bombas aumentando o efluxo da droga. São proteínas hidrofóbicas, capazes de exportar classes específicas de drogas ou compostos estruturalmente diversos e toxinas, utilizando ATP ou gradiente de íons como fonte de energia (SCHINDLER et al, 2013).

O efluxo de antibiótico foi descrito pela primeira vez em 1980, quando descoberto o mecanismo de resistência à tetraciclina em enterobactérias. Os genes das proteínas de efluxo e seus produtos estão presentes em todos os organismos, desde bactérias até fungos e eucariotos superiores (VAN BAMBEKE et al, 2003). Através dos anos, o papel do mecanismo de efluxo de resistência bacteriana tem sido mostrado para quase todos os antibióticos (LI; NIKAIDO 2004). Algumas bombas de efluxo bacterianas podem ser seletivas para uma substrato, tal como a tetraciclina, ou relativamente não-seletiva, em outro caso, o transporte de uma série de compostos diferentes, incluindo classes de vários antibióticos, conferindo o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR), que consiste em resistência à antimicrobianos de pelo menos três diferentes classes de antibióticos (WEBBER; PIDDOCK, 2003; POOLE, 2005).

Os sistemas de efluxo são classificados em 5 grandes famílias. De acordo com a energia usada para expulsar o substrato e a similaridade na sequência, são elas: superfamília MFS (*major facilitator*), superfamília ABC (*ATP binding cassette*), família RND (*resistance nodulation division*), família MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) e família SMR (*small multidrug resistance*) (KUMAR; SCHWEIZER, 2005; SÁNCHEZ, 2003). Todos esses sistemas utilizam gradiente de próton (H^+/Na^+) como energia para exportar os substratos, exceto a família ABC, que utiliza hidrólise de ATP (FIGURA 6).

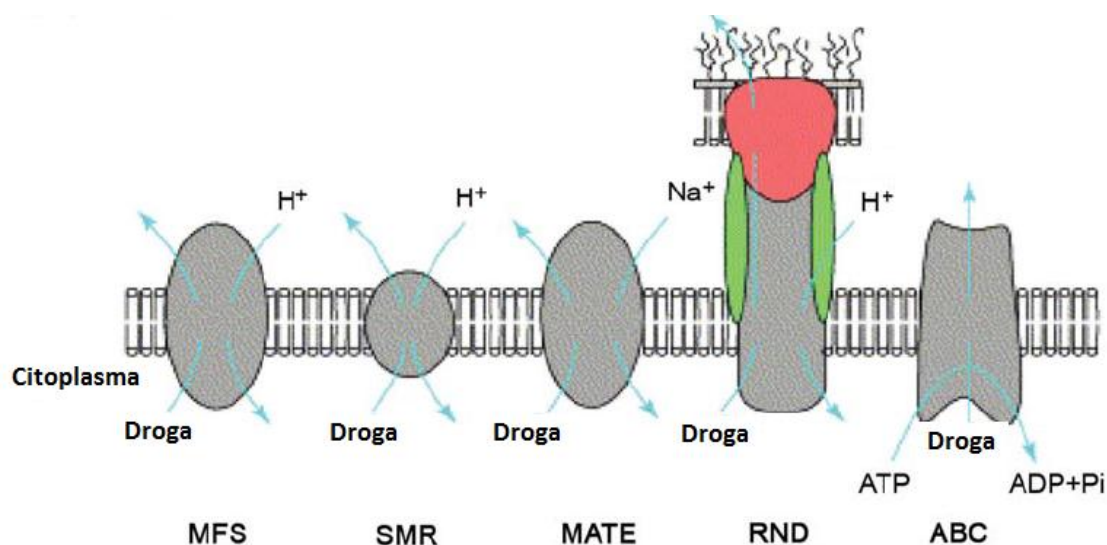


Figura 6. Representação esquemática das principais famílias de MDR transportadores (Adaptada de TEGOS et al., 2011).

A maior proteína de efluxo MDR caracterizado em *S. aureus* é a NorA, encontrada tanto em linhagens MSSA como MRSA (GIBBONS et al., 2004; PIDDOCK, 2006a). O gene *norA* foi o primeiro identificado em *S. aureus*, em 1990. Sua proteína (NorA) transporta diversos substratos, tais como: fluorquinolonas hidrofílicas (norfloxacin, ciprofloxacin, lomefloxacin e ofloxacin), brometo de etídio, acriflavina, rodamina, centrimida, cloreto de benzalcônio, brometo de tetrafenilfosfônio, clorafenicol, além do alcalóide berberina (NEYFAKH et al, 1993; AESCHIMANN, et al, 1999; KAATZ; SEO, 1995). A desativação da proteína NorA fornece o aumento da susceptibilidade bacteriana de quatro a oito vezes para as fluorquinolonas (YAMADA et al., 1997; HSIEH et al., 1998). Sabe-se que as bombas de efluxo têm sido responsabilizadas por diversos casos de resistência bacteriana a antibióticos (PIDDOCK, 2006b) fazendo-se necessário o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos ou de mecanismos que diminuam, ou revertam esta resistência.

2.5 Modificadores da resistência bacteriana

O aparecimento da resistência aos antibióticos tem minado o valor terapêutico dos agentes existentes (FIGURA 7) criando a necessidade da descoberta de novos agentes antibacterianos cada vez mais eficientes – sejam de origem natural, semi-sintética ou sintética (SILVEIRA et al., 2006; CHOPRA et al., 2002) – sendo também necessários estudos que levem à criação de formas mais ágeis de diagnóstico, que ajudem a entender como os

microrganismos se tornam resistentes a medicamentos, e sobre como o comportamento humano influencia essa resistência (OMS, 2014)

Desenvolvimento da resistência	
Penicilina (1942)	Propagação da Penicilinase (1945) Penicilinas transferidas a <i>Gonococcus</i> (1976) <i>Enterococcus</i> resistente a penicilina (1983)
Estreptomicina (1947)	Resistência à estreptomicina (1947)
Tetraciclina (1952)	Resistência à tetraciclina (1956)
Vancomicina (1958)	Raramente usada até meados de 1980 <i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina (VRE) (1987) <i>S. aureus</i> resistente intermediário à vancomicina (VISA) (1996) <i>S. aureus</i> resistente à vancomicina (VRSA) (2002)
Meticilina (1959)	<i>S. aureus</i> resistente à metilina (MRSA) (1961) MRSA adquirida na comunidade (1999)
Cefalotina (1964)	Resistência à cefalotina: 1ª cefalosporina (1966)
Gentamicina (1967)	Resistência à gentamicina (1970)
Cefatoximina: aprovada pela FDA (1981)	Resistência à cefatoximina (1983) 1º surto de <i>K. pneumoniae</i> resistente à 3ª geração de cefalosporina (1987)
Imipenem, 1ª carbapenem (1984)	<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente à carbapenem (1998)
Linezolida, 1ª oxazolidinona: FDA aprovada (2000)	<i>S. aureus</i> e VRE resistente à linezolida (2001)
Desenvolvimento dos antibióticos	

Figura 7: História do desenvolvimento dos agentes antimicrobianos x subsequente aquisição da resistência pelos microrganismos (adaptado de HUH; KWON, 2011).

Os problemas alavancados pela resistência bacteriana são agravados pela falta de novas drogas antimicrobianas (em desenvolvimento) (Figura 8) e isso é mais do que apenas um problema de oferta futura de antibióticos. Ensaio clínico das empresas farmacêuticas de antibióticos constituía uma valiosa fonte de dados de resistência para os pesquisadores de saúde pública. Entretanto, há poucos novos antibióticos, o que dificulta o acesso a tais dados e, como resultado, os pesquisadores não sabem quais os fatores que levam a resistência a crescer, por exemplo, tão rapidamente nos países em desenvolvimento (REARDON, 2014).

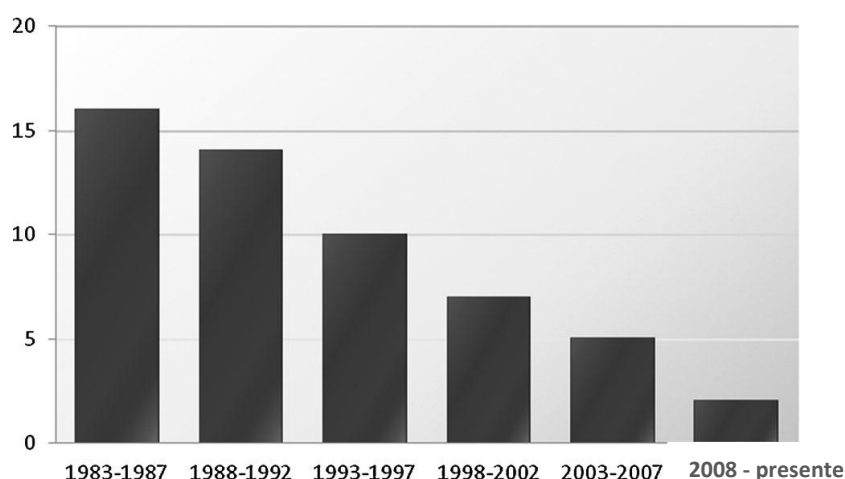


Figura 8. Número de novos agentes antibacterianos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) em períodos de 5 anos (WRIGHT et al, 2014).

Diante da necessidade crescente por formas que revertam os mecanismos de defesa apresentado pelos microrganismos, os modificadores da resistência bacteriana, também chamados “moduladores da resistência a drogas” ou “modificadores da atividade antibiótica”, são considerados como a alternativa mais apropriada das novas terapias antibacterianas (VAN BAMBEKE et al, 2006; LYNCH, 2006).

Dada a importância clínica das bombas de efluxo na resistência bacteriana, a inibição farmacológica do efluxo ativo parece ser uma estratégia promissora para restabelecimento da atividade de antibióticos existentes (OJEDA-SANA, 2013). Neste contexto, os inibidores de bomba de efluxo mostram ser uma promessa considerável tanto na batalha contra a resistência antimicrobiana quanto agentes que podem comprometer a sobrevivência das bactérias e reduzir o potencial patogênico. Várias pesquisas estão sendo desenvolvidas nesta área, porém ainda não estão disponíveis como agentes de uso clínico (COSTA, et al, 2011; FERNEBRO, 2011).

Os mecanismos pelos quais os inibidores de bomba de efluxo podem atuar (FIGURA 9) não estão claramente compreendidos, contudo algumas formas de ação têm sido propostas: ligação direta a um ou mais sítios de ligação na proteína de efluxo – de maneira competitiva ou não-competitiva; afinidade pelo substrato transportado pela bomba – formando um complexo que poderá não ser mais reconhecido pela bomba de efluxo; interferência no gradiente de próton; interação com a membrana plasmática modificando a

conformação da proteína de efluxo ou inibição da expressão do gene de efluxo. Todos esses mecanismos interferem no efluxo do substrato da bomba. A aplicação desses inibidores em associação com antibióticos convencionais poderá aumentar a concentração intracelular desses antibióticos, restaurando sua eficiência, além de reduzir o emergente desenvolvimento da resistência bacteriana (LOMOVSKAYA; BOSTIAN, 2006; ZLOH et al., 2004; POOLE; LOMOVSKAYA, 2006; MARKHAM et al, 1999).

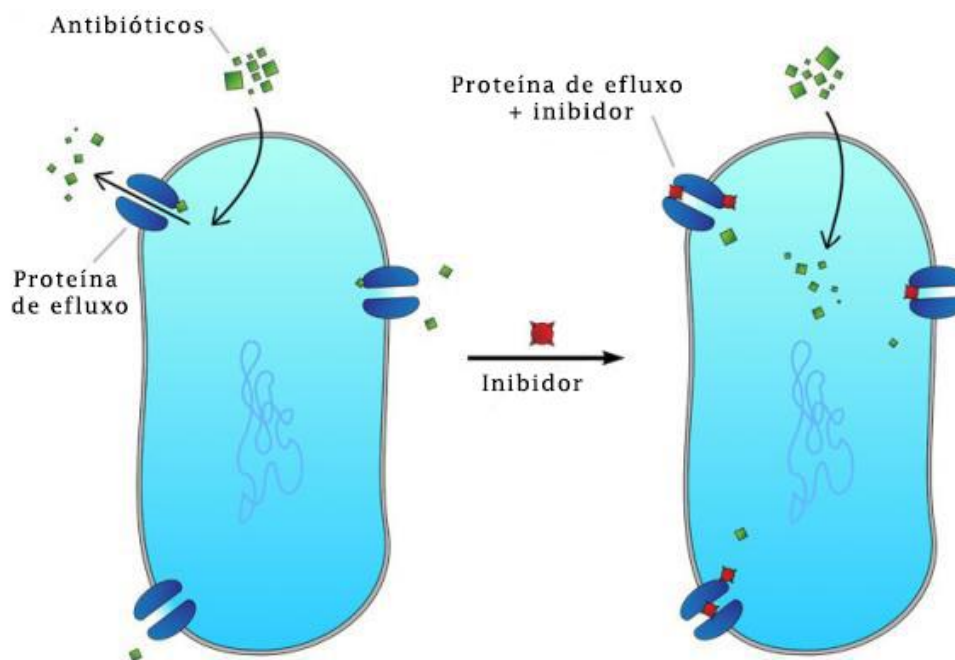


Figura 9. Atuação de um inibidor de efluxo.

(Fonte: <https://news.brown.edu/articles/2011/11/bacteria>, acesso em 13/09/2014)

Durante as duas últimas décadas, numerosos compostos estruturalmente diferentes têm sido estudados e mostram ter uma atividade inibidora de efluxo. Estes incluem medicamentos atualmente disponíveis utilizados para outras indicações, bem como as moléculas naturais e sintéticas (PIDDOCK et al, 2010; SABATINI et al, 2011).

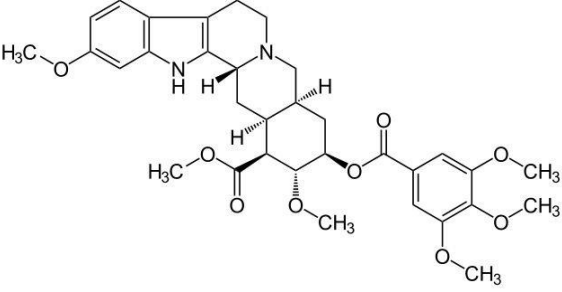
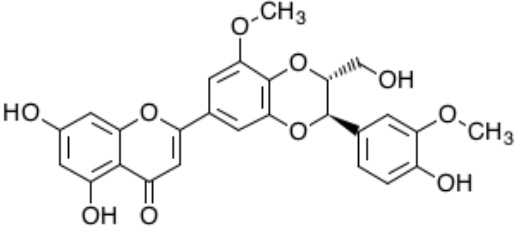
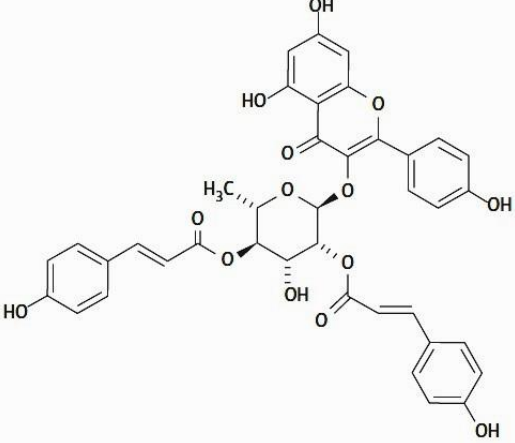
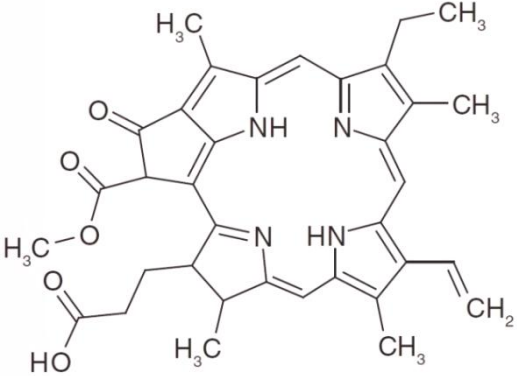
As plantas produzem uma grande quantidade de metabólitos secundários e parte significativa dessa diversidade química serve para protegê-la contra patógenos microbianos. Espécies vegetais constituem uma rica fonte de potentes inibidores de bomba de efluxo e diversos constituintes já foram identificados como tal (GIBOONS, 2004; STRAVI et al, 2007).

Muitos tem sido os compostos naturais que apresentaram capacidade de atuar como inibidores de bomba de efluxo (QUADRO 1) tais como: Reserpina, Orizabin IX e XV,

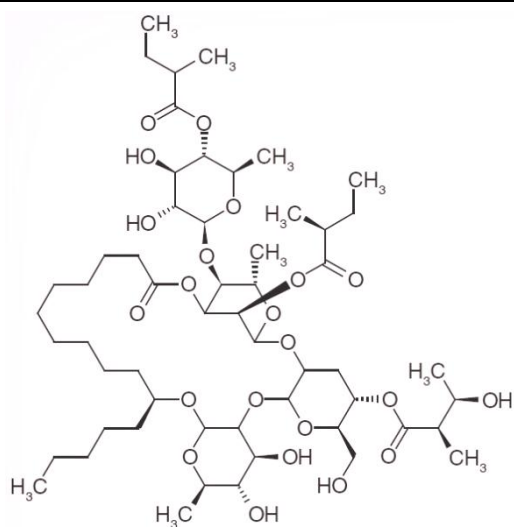
5'-methoxyhydnocarpin-D – (5'-MHC-D), Kaempferol-3-O-a-l-(2,4-bis-E-p-coumaroyl) rhamnoside (KCR) e Pheophorbide A (SCHINDLER et al 2013). Contudo, nem sempre estes compostos podem ser utilizados na terapia, a exemplo da reserpina (alcalóide), cuja concentração necessária para inibir a bomba de efluxo é neurotóxica para os humanos (MARKHAM et al, 1999).

Devido ao baixo desenvolvimento de novos fármacos e a propagação das bactérias de MDR, existe uma urgente necessidade de identificar metas claras para bloquear mecanismo de efluxo, para selecionar as moléculas com uma elevada eficácia inibitória e ausência de efeitos tóxicos em células de mamíferos. A procura por novos agentes tem focado os produtos naturais como moduladores da atividade antibiótica por bomba de efluxo (DICKSON et al., 2006; KAATZ et al., 2003; BARBARA et al, 2009).

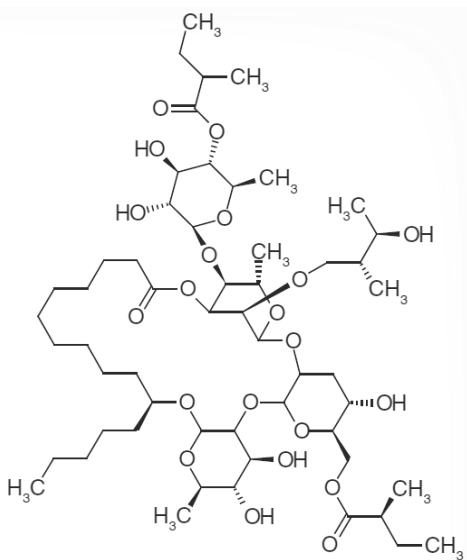
Quadro 1. Estrutura de inibidores de bomba de efluxo de origem natural (adaptado de SCHINDLER, 2013)

Inibidores de Bomba de Efluxo Naturais	
Reserpina	
5'-methoxyhydnocarpin-D	 C11162
Kaempferol-3-O-α-l-(2,4-bis-E-p-coumaroyl) rhamnoside	
Pheophorbide A	

Orizabin IX



Orizabin XV



2.6 Produtos Naturais

Os produtos naturais constituem uma excelente fonte de moléculas com atividades biológicas promissoras, não apenas pelo grande número de espécies encontradas nesses habitats naturais, mas principalmente pela variedade estrutural dos compostos produzidos e pelas propriedades medicinais inexploradas (NIELSEN, 2002; NEWMAN; CRAGG; SANDER, 2003).

Óleos e extratos de plantas há muito tempo têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular, entre elas, a produção de antissépticos tópicos. Tal realidade serviu de base para diversas investigações científicas, com vistas na confirmação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Contudo, essa tarefa tem sido dificultada pelas peculiaridades que os óleos apresentam, tais como: volatilidade, insolubilidade em água e complexidade – características que interferem significativamente nos resultados (NASCIMENTO et al, 2007).

2.6.1 Óleos Essenciais

Óleos essenciais são substâncias aromáticas, voláteis, solúveis em solventes apolares. São constituídos principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos podem ser encontrados também diterpenos, fenil-propanóides e ésteres. Estes metabólitos secundários são solúveis em gorduras, hidrofóbicos e caracterizam-se por um odor forte. Os óleos essenciais podem ser encontrados em todos os órgãos de plantas aromáticas, desempenhando os mais variados papéis – proteção contra microrganismos; insetos e animais herbívoros; ou a atração de insetos responsáveis pela dispersão de pólen e sementes (VALE-SILVA et al, 2010).

As propriedades naturais dos óleos essenciais justificam a sua utilização ampla, geralmente distribuído na indústria alimentar, na maior parte dos casos, mas também em produtos de perfumaria e cosméticos, na indústria farmacêutica, e como materiais de partida para o isolamento de compostos bioquímicos. Os efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais já foram relatados em vários estudos. Sendo, em muitos casos, esta atividade resultado da complexa interação entre as diferentes classes de compostos, tais como fenóis, aldeídos, cetonas, alcoóis, ésteres, éteres ou hidrocarbonetos. Embora, em alguns casos, as bioatividades dos óleos estejam relacionadas com a atividade dos principais componentes

destes, vários estudos relatam que, quando testado separadamente, um bom número desses compostos apresentaram propriedades antimicrobianas significativas (BASSOLÉ et al, 2012).

2.6.1.1 Óleo essencial de alecrim

Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L., Lamiaceae) é uma erva perene e lenhosa, nativa da região mediterrânea. Cultivada como planta ornamental e planta aromática e suas folhas são comumente utilizadas para aromatizar alimentos como condimento. Na medicina tradicional, o alecrim tem sido utilizado como um estimulante e analgésico para o tratamento de dores de cabeça, doenças inflamatórias e cansaço físico e mental.

Óleo essencial de alecrim (OEA) é um líquido límpido de cor amarelo palha, com o odor característico. Algumas propriedades do óleo são conhecidas tais como: anti-inflamatório, antidepressivo, além das atividades antioxidante e antimicrobiana as quais têm sido atribuídas principalmente a seus principais diterpenos, carnosol e ácido carnósico, bem como para os componentes de óleo essencial (RAŠKOVIĆ et al, 2014).

2.6.1.2 Óleo essencial de anis estrelado

Anis estrelado (*Illicium verum* Hook. f., Illiciaceae) é uma planta perene de médio porte, distribuído principalmente nas zonas tropicais e subtropicais da Ásia. Seus frutos são frequentemente usados como condimento bem conhecido na indústria de alimentos, sendo também utilizados para o tratamento de dores de estômago.

O óleo essencial de anis estrelado (OEAE) é um líquido amarelo claro de aparência límpida com odor doce e herbáceo, sendo seu principal componente de óleo essencial o trans-anethole. Algumas propriedades farmacológicas do OEAE já foram relatada como as atividades antimicrobianas e antioxidantes, além das atividades inseticidas e antifúngicas (HUANG et al, 2010).

2.6.1.3 Óleo essencial de cananga

Cananga (*Cananga odorata* (Lam). Hook.f. & Thomson, Annonaceae), também conhecida como ylang-ylang e no Brasil por Kananga do Japão, é uma árvore tropical, perene e nativa da Indonésia. O óleo essencial de cananga (OEC) é um líquido claro de cor amarelo palha e odor doce e floral, sendo, principalmente, utilizado na indústria de cosméticos e como ingrediente alimentar (BENINI et al, 2012).

Algumas propriedades farmacológicas do OEC já são conhecidas dentre elas, as atividades anti-biofilme, anti-hemólise e anti-virulência foram relatadas em linhagens de *S. aureus* (LEE et al, 2014).

2.6.1.4 Óleo essencial de eucalipto globulus

Eucalipto globulus (*Eucalytus globulus*, Myrtaceae) também conhecido por eucalipto-comum ou eucalipto-da-Tasmânia, é uma espécie florestal de folhas perene, de crescimento rápido, sendo originário da Austrália, mas amplamente distribuído em todo o mundo.

O óleo essencial de eucalipto globulus (OEEG) é um líquido límpido e incolor de odor fresco e canforado e tem como principal componenete o 1,8 Cineol e algumas de suas propriedades já são conhecidas tais como analgésicas e anti-inflamatórias, bem como atividades antifúngica e antibacteriana – incluindo linhagens de *S. aureus* resistentes (MULYANINGSIH et al, 2010)

2.6.1.5 Óleo essencial de gerânio áfrica

Gerânio áfrica (*Pelargonium graveolens* L., Geraniaceae) popularmente conhecido como gerânio ou malva-cheirosa é uma planta aromática, originária da África do Sul e comercialmente conhecido como óleo de gerânio, sendo amplamente usado em sabonetes e nas indústrias de perfumaria e cosméticos, bem como para fins terapêuticos (aromaterapia) para combater problemas da menopausa, de pele, tensão nervosa e ansiedade (ARRIGONI-BLANK et al, 2011).

O óleo essencial de gerânio áfrica (OEGA) é um líquido amarelo de odor característico tendo algumas propriedades já descritas anteriormente como suas atividades antifúngicas (SHIN; LIM, 2004) e antibacterianas (ROSATO et al, 2007).

2.6.1.6 Óleo essencial de grapefruit

Grapefruit (*Citrus paradisi*, Rutaceae), também conhecida no Brasil por toranja, é uma árvore frutífera de tamanho médio de origem híbrida resultante do cruzamento entre pomelo (*C. maxima*) e uma laranja doce (*C. sinensis*). Acredita-se que seja originária do Caribe, descrita pela primeira vez em Barbados na década de 1750, sendo, atualmente, cultivada em muitas regiões temperadas tropicais, semi-tropicais e quentes.

O óleo essencial de grapefruit (OEG) é um líquido amarelo de odor característico, sendo já descrito na literatura como um potencial inibidor de bomba de efluxo em cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (ABULROB et al, 2004).

2.6.1.7 Óleo essencial de lemongrass

Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*, Poaceae) é uma gramínea de crescimento rápido (cresce até 1,5 metros), perene e aromática. Nativa da Ásia, mas sendo cultivada principalmente nas Índias Ocidentais, África e Ásia Tropical.

O óleo essencial de lemongrass (OEL) é um líquido límpido de cor amarelo a alaranjado e odor fresco e encorpado. Conhecido por suas propriedades revigorantes e anti-sépticas, anti-depressivo, repelentes, também tem sido descrito na literatura como inibidor na produção de biofilmes em cepas de *S. aureus* (ADUKWU et al, 2012).

2.6.1.8 Óleo essencial de melaleuca (Tea Tree)

Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*, Myrtaceae) é uma planta arbustiva e nativa da Austrália. Amplamente distribuído pelo mundo devido as já conhecidas propriedades terapêuticas. Da planta é extraído um óleo, o qual tem sido objeto de estudo para os diversos fins.

O óleo essencial de melaleuca (OEM) é um líquido límpido de cor amarelo palha e de odor característico o qual tem sido amplamente comercializado devido as suas propriedades antifúngicas, anti-inflamatório, antiviral, antiprotozoários e antibacteriano (CARSON et al, 2006).

2.6.1.9 Óleo essencial de menta spicata

Menta Spicata (*Mentha Spicata*, Lamiaceae), também conhecida por hortelã, é uma planta herbácea, perene, originária da Ásia, mas há muito cultivada em todo o mundo, sendo utilizada como tempero na culinária, aromatizante em certos produtos alimentares, ou para a extração do seu óleo essencial e, ainda, cultivada como planta ornamental.

O óleo essencial de menta spicata (OEME) é um líquido límpido de cor amarelo palha e odor característico. Algumas propriedades do óleo já são conhecidas como suas atividades antifúngica e antibacteriana (ADAM et al, 1998; TAJKARIMI et al, 2010).

2.6.1.10 Óleo essencial de orégano

Orégano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae), tem características arbustiformes de ocorrência sazonal e perene sendo nativa do Mediterrâneo, Ásia, México e de algumas localidades da América do Sul, sendo utilizado em diversas regiões como condimento alimentar (SIGNOR et al., 2007).

O óleo essencial de orégano (OEO) é um líquido límpido, marrom de odor característico e tem sido alvo de várias investigações *in vitro* devido ao seu já conhecido largo espectro de atividade antimicrobiana (LAMBERT et al, 2001).

2.6.1.11 Óleo essencial de palmarosa

Palmarosa (*Cymbopogon martini*, Poaceae) é uma espécie de capim, perene e nativo do sudeste da Ásia, especialmente Índia e Paquistão, e é cultivado pelo seu óleo.

O óleo essencial de palmarosa (OEP) é um líquido límpido de cor amarela e odor floral adocicado. Algumas propriedades do óleo são conhecidas dentre elas as atividades antielmíntica, repelente, antifúngica, além de seus efeitos bactericidas e bacteriostáticos (MAYAUD et al, 2008).

2.7 Terpenóides

Os terpenóides constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo este termo empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno (SIMÕES; SPITZER, 2004). Constituem um grupo de metabólitos secundários vegetais que apresentam uma série de ações sobre o sistema nervoso central e também utilizados na medicina popular. Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos voláteis são os monoterpenos – cerca de 90% dos óleos voláteis – e os sequiterpenos. Os monoterpenos podem ser divididos em três subgrupos: acíclicos; monocíclicos e bicíclicos. Tendo, ainda, cada um destes subgrupos outras subdivisões (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Os Monoterpenos são constituintes da essência volátil de flores e óleos essenciais extraídos de plantas medicinais e ervas aromáticas, justificando sua importância para a indústria de perfumes e aromatizantes. Consistem em duas unidades de isoprenos vinculados e incluem, de modo estrito, só hidrocarbonetos. Muitas vezes, o termo monoterpeno é aplicado a monoterpenóides que são caracterizados por grupos funcionais contendo oxigênio, assim como uma variedade de substituições resultando numa grande

diversidade de moléculas. Atualmente, são conhecidos mais de 55 mil isoprenoides diferentes (MARMULLA; HARDER, 2014).

Muitas propriedades dos monoterpenos já foram descritas na literatura, dentre elas as atividades antifúngica e antibacteriana. Como, por exemplo, os monoterpenos citral e carvacrol os quais são componentes comuns de muitos óleos essenciais e que têm sido amplamente estudados como agentes antimicrobianos, mas cujos mecanismos de inativação microbiana não foram totalmente elucidados (CHUECA et al, 2014). Estes dados reforçam a importância das pesquisas relacionadas a estes compostos.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

O objeto geral deste trabalho detém-se à avaliação de produtos naturais, de origem vegetal, no que se refere à sua atividade antimicrobiana direta, bem como, sua atuação como moduladores da resistência a drogas em linhagens de *Staphylococcus aureus* portadoras de bomba de efluxo.

3.2 Específicos

- Avaliar os óleos essenciais de: Alecrim (*Rosmarinus officinalis*); Anis Estrelado (*Illicium verum*); Cananga (*Cananga odorata*); Eucalipto Globulus (*Eucalypto globulus*); Gerânio África (*Pelargonium graveolens*); Grapefruit (*Citrus paradisi*); Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*); Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*); Menta Spicata (*Mentha spicata*); Orégano (*Origanum vulgare*); e Palmarosa (*Cymbopogon martini*) como possíveis modificadores da atividade antibiótica.
- Avaliar o componente majoritário de cada óleo essencial: 1,8 cineol; Anetol; Trans-Caryophyllene; Citronelol; Limoneno; Citral; Terpinen-4-ol; L-carvone; Carvacrol; e Geraniol como possíveis modificadores da atividade antibiótica.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens bacterianas

As atividades biológicas dos monoterpenos e óleos essenciais foram avaliadas em linhagens de *S. aureus* resistentes (QUADRO 2) – as quais foram fornecidas pelo Dr. Simon Gibbons (University of London).

Quadro 2. Linhagens bactérias ensaiadas

LINHAGENS ENSAIADAS				
Estirpe bacteriana	Gene ou plasmídeo	Proteína expressa	Antibiótico utilizado	Fonte
IS-58	Gene <i>tetK</i> (plasmidial)	TetK	Tetraciclina	GIBBONS; UDO, 2000; GUAY et al, 1993
RN4220	Plasmídeo pUL5054	MsrA	Eritromicina	ROSS et al,1989; CHAN et al, 2013
SA-1199B	Gene <i>norA</i>	NorA	Norfloxacin	GIBBONS; UDO, 2000

As linhagens foram mantidas em meio de cultura ágar (*Blood agar base* – Difco) inclinado. Antes de serem utilizadas, as células foram cultivadas em caldo nutritivo de infusão (*Brain heart infusion* - BHI, Difco) por 18-24hs a 37°C.

4.2 Óleos essenciais

Para a realização dos ensaios bacteriológicos foram utilizados 11(once) óleos essenciais, todos obtidos da Ferquima (FERQUIMA IND. COM. LTDA. CNPJ: 51.699.205/0001-48) e os laudos dos mesmos encontram-se no Anexo 1 deste trabalho.

As soluções os óleos essenciais foram preparadas a 10% de concentração, misturando 0,1mL de óleo com 0,1mL de Tween 80, levados sob agitação em vortex para homegeinização e o volume completado a 1mL pela adição de solução de ágar/água à 0,15% .

4.3 Contituíntes majoritários

Para a realização dos ensaios bacteriológicos utilizou-se o componente majoritário de cada óleo essencial. Todos os compostos pertencem a classe dos terpenóides (QUADRO 3) e foram obtidos do fabricante Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

As soluções dos terpenóides foram preparadas a 10% de concentração, nas quais 0,1mL do componente foi incorporado a 0,1mL de Tween 80 levados sob agitação em vortex para homogeneização e o volume completado a 1mL pela adição de solução de ágar/água à 0,15%

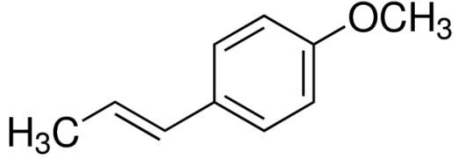
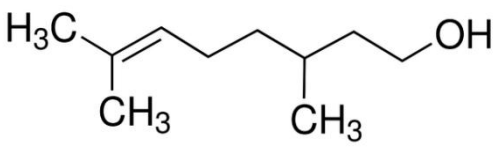
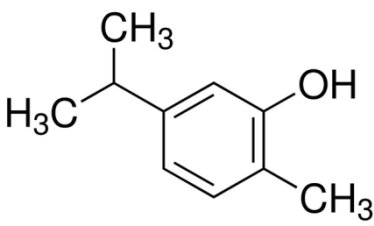
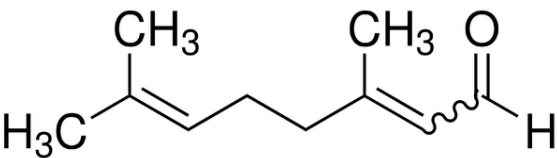
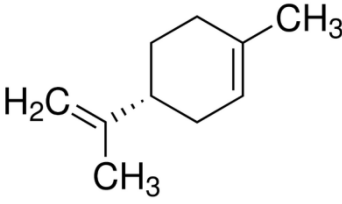
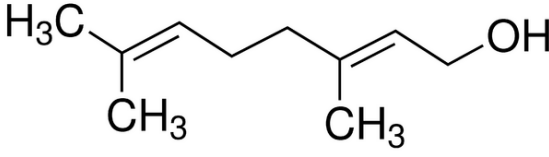
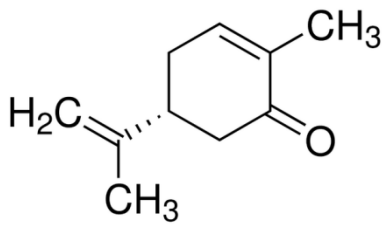
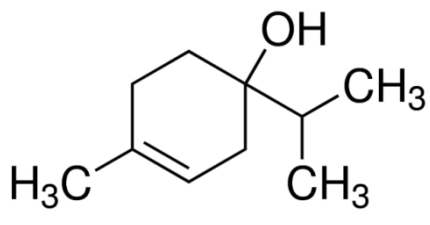
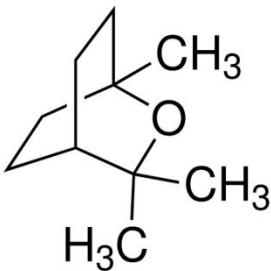
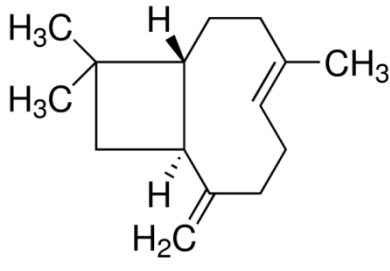
4.4 Solução de antibióticos e brometo de etídio

Os antibióticos – norfloxacin, tetraciclina e eritromicina – foram obtidos do fabricante Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) e as soluções estoque foram preparadas conforme recomendações do documento M100-S15 da NCCLS – Clinical and Laboratory Standards Institute (TABELA 1). A solução de brometo de etídio (BrEt) foi preparada a uma concentração de 1280µg/mL (12,8mg de brometo diluído em 10mL de água destilada esterelizada).

Tabela 1. Solventes e Diluentes para a Preparação de Soluções Padrão de Agentes Antimicrobianos (Adaptado de M100-S15 da NCCLS, 2005).

Agente Antimicrobiano (concentração de 1280µg/mL)	Solvente	Diluyente
Tetraciclina	10 mL Água (100%)	Água
Eritromicina	10 mL Álcool absoluto (P.A) (100%)	-
Norfloxacin	1 mL NaOH 0,1 mol/L (10%)	9 mL Água (90%)

Quadro 3: Estrutura dos componentes majoritários dos óleos essenciais

Terpenóides	
 Anetol	 β-Citronellol
 Carvacrol	 Citral
 Limoneno	 Geraniol
 L-Carvone	 Terpinen-4-ol
 1,8-Cineol	 Trans-Cariofileno

Fonte: Sigma-Aldrich Co.

4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM dos compostos testados (antibióticos, óleos essenciais, brometo de etídio e terpenóides) foi determinada pelo método de diluição em ágar (BAB - *Blood Agar Base* – Fabricante Himedia) usando tubo inclinado. Tubos de ensaio (com tampa de rosca) foram preparadas através da incorporação de diluições em série dos compostos testados em 5 mL (volume final) de BAB com Tween 20 (0,1% p/v). O Intervalo de concentração da droga nos tubos foi 1 a 03125% (p/v) quando os óleos essenciais e terpenóides foram testados, ou 256-1 µg/mL quando os antibióticos e o brometo de etídio foram testados.

As cepas bacterianas foram cultivadas em BHI a 37 ° C (durante a noite) e diluídas em solução salina (NaCl a 0,85% (p/v) e em seguida inoculados (aproximadamente 10^4 ufc) em tubos de ensaio por estrias e perfuração. Os tubos, bem vedados, foram incubados durante a noite a 37 ° C e a CIM foi considerada como a menor concentração que evitou completamente o crescimento bacteriano de aparência visível.

4.6 Determinação Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos na presença dos óleos essenciais e terpenóides.

Para avaliar o efeito dos óleos essenciais e seus respectivos constituintes majoritários como moduladores de resistência a antibióticos nas linhagens de *S. aureus* ensaiadas, foi utilizado o “ensaio de modulação”, um método que tem sido amplamente aplicado para identificar potenciais inibidores de bomba de efluxo, ou seja, a CIM dos antibióticos foram determinadas na presença de cada um desses compostos com uma concentração sub-inibitória ($\frac{1}{4}$ CIM). Todas os experimentos foram realizados em triplicata em três ocasiões diferentes, com resultados consistentes.

RESULTADO E DISCUSSÕES

5. RESULTADO E DISCUSSÕES

5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais e terpenóides

Os óleos essenciais e seus constituintes majoritários apresentaram atividade antibacteriana frente às linhagens de *S. aureus* ensaiadas com valores de concentração inibitória mínima (CIM) entre 1% e 0,031% (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade Antibacteriana dos óleos essenciais e terpenóides

Concentração inibitória mínima (%) de óleos essenciais e componentes majoritários em <i>Staphylococcus aureus</i>.			
Óleos essenciais e componentes majoritários (terpenóides)	Linhagem		
	IS-58	RN4220	SA-1199B
<i>Rosmarinus officinalis</i>	1	0,5	0,5
1,8-Cineol (47%)	0,25	0,25	0,25
<i>Illicium verum</i>	> 1	> 1	0,125
Trans Anetol (87%)	1	1	0,062
<i>Cananga odorata</i>	0,5	0,5	1
Trans cariofileno	> 1	> 1	> 1
<i>Eucalyptus globosus</i>	0,5	0,5	0,5
1,8-Cineol (81%)	0,25	0,25	0,25
<i>Pelargonium graveolens</i>	0,125	0,125	0,125
β -Citronelol	0,125	0,125	0,062
<i>Citrus paradisi</i>	0,5	0,5	0,5
Limoneno (94%)	1	> 1	1
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	0,062	0,062	0,031

Citral (69%)	0,031	0,031	0,031
<i>Melaleuca alternifolia</i>	0,25	0,25	0,25
Terpinen-4-ol (43%)	0,125	0,125	0,125
<i>Mentha spicata</i>	0,125	0,125	0,062
L-Carvone (70%)	0,125	0,125	0,062
<i>Origanum vulgare</i>	0,125	0,125	0,125
Carvacrol	0,031	0,062	0,062
<i>Cymbopogon martinii</i>	0,125	0,125	0,062
Geraniol (82%)	0,125	0,125	0,062

Os testes de diluição em caldo ou em ágar são utilizados para a determinação da sensibilidade *in vitro* de um microrganismo a um agente antimicrobiano. Por este método se determina a concentração inibitória mínima (CIM) de um antimicrobiano, ou seja, a menor concentração de antimicrobiano que inibe o crescimento de um microrganismo. Esse método é também utilizado na confirmação de alguns perfis de resistência detectados inicialmente por disco-difusão (NCCLS, 2003)

Para os compostos antibacterianos, apenas $CIM \leq 0,25\%$ são descritos na literatura com atividade antibacteriana relevante (GIBBONS, 2004). Desta forma, observou-se que 6 (seis) dos 11 (onze) óleos essenciais testados apresentaram atividade antibacteriana relevante para todas ou pelo menos uma das linhagens de *S. aureus* ensaiadas. (TABELA 2).

Com relação aos constituintes majoritários dos óleos essenciais, 8 (oito) dos 10 produtos testados apresentaram atividade antibacteriana relevante (seguindo o mesmo padrão de análise dos óleos essenciais) para todas ou pelo menos uma das linhas em estudo. De maneira geral, os compostos apresentaram melhor atividade antibacteriana que os óleos essenciais com variação de CIM de 2 a 4 vezes. Apenas os óleos de *M. spicata* e *C. martinii* e seus, respectivos, componente majoritário L-carvone e geraniol apresentaram a mesma atividade para as linhagens em questão. Já o óleo de *P. graveolens* e seu constituinte β -citronelol apresentaram a mesma atividade para as

linhagens IS-58 e RN4220, mas para linhagem SA-1199B, β -citronelol apresentou melhor atividade.

Estes dados corroboram com a literatura encontrada – já descrita na revisão bibliográfica deste trabalho – na qual, óleos essenciais e os terpenóides são descritos por sua eficácia como agentes antimicrobianos e confirmam, ainda mais, o fato de que, muitas vezes, o composto isolado exerce melhor atividade do quando em combinação com outros elementos.

5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos na presença (atividade moduladora) dos óleos essenciais e terpenóides.

A atividade moduladora dos óleos essenciais e dos componentes majoritários mostra que muitos dos produtos utilizados tiveram significativa atividade ao reduzirem a CIM dos antibióticos de 2 a 16x (Tabela 3).

Tabela 3: Atividade Moduladora dos óleos essenciais e terpenóides

Óleos essenciais e componentes majoritários (terpenóides)	Linhagem (antibiótico)		
	IS-58	RN4220	SA-1199B
	(tetraciclina)	(eritromicina)	(norfloxacina)
Só antibiótico	64	256	64
+ <i>Rosmarinus officinalis</i>	8 (8x)**	32 (8x)	32 (2x)
+ 1,8 Cineol (47%)	8 (8x)	128 (2x)	32 (2x)
<i>Illicium verum</i> * ³	16 (4x)	64 (4x)	32 (2x)
Trans Anetol (87%)* ³	8 (8x)	64 (4x)	32 (2x)
<i>Cananga odorata</i>	8(8x)	128(2x)	32(2x)
Trans cariofileno	8 (8x)	256	64
<i>Eucalyptus globosus</i>	16 (4x)	128 (2x)	64
1-8 Cineol (81%)	8 (8x)	128 (2x)	32 (2x)
<i>Pelargonium graveolens</i> * ^{1,2,3}	8(8x)	256	32(2x)
β -Citronelol* ^{1, 2, 3}	4 (16x)	16 (16x)	32 (2x)
<i>Citrus paradisi</i>	32 (2x)	128 (2x)	32 (2x)
Limoneno (94%)	16 (4x)	128 (2x)	64
<i>Cymbopogon flexuosus</i> * ^{1,2,3}	16 (4x)	128 (2x)	64
Citral (69%)* ^{1,2,3}	16 (4x)	256	64

<i>Melaleuca alternifolia</i>	8 (8x)	128 (2x)	32 (2x)
Terpinen-4-ol (43%)* ^{1,2,3}	16 (4x)	128 (2x)	32 (2x)
<i>Mentha spicata</i> * ^{1,2,3}	32 (2x)	128 (2x)	64
L-Carvone (70%)* ^{1,2,3}	8 (8x)	128 (2x)	32 (2x)
<i>Origanum vulgare</i> * ^{1,2,3}	16(4x)	256	64
Carvacrol (71%)* ^{1,2,3}	32(2x)	256	64
<i>Cymbopogon martinii</i> * ^{1, 2, 3}	16 (4x)	256	32 (2x)
Geraniol (82%)* ^{1, 2, 3}	16 (4x)	256	16 (4x)

*atividade antibacteriana relevante (CIM $\leq$ 0,25%) para a linhagem indicada

**entre parênteses o fator de redução da CIM dos antibióticos

Após a determinação da CIM de cada composto, estes foram incorporados ao meio em uma concentração subinibitória ($\leq 1/4$ CIM). É importante mencionar que o uso de uma concentração subinibitória ($1/4$ da CIM) é recomendada para evitar possíveis resultados falso-positivos (STRAVI, 2007). Como resultado, observou-se que tanto os óleos essenciais quanto os terpenóides modificaram a atividade antibiótica, modulando entre 2x à 16x a resistência bacteriana (TABELA 3).

Para a linhagem IS-58 que codifica o gene de efluxo para a proteína TetK, observou-se que todos os óleos essenciais testados assim como os terpenóides apresentaram atividade moduladora, reduzindo a CIM do antibiótico tetraciclina de 2 à 16 vezes. Dentre os resultados, destaca-se o efeito modulador dos óleos essenciais de *R. officinalis*, *M. alternifolia*, *C. odorata* e *P. graveolens* com redução da CIM da tetraciclina em oito vezes. Os demais óleos essenciais modularam de duas a quatro vezes o valor da CIM.

Os óleos essenciais de *R. officinalis* e *E. globulus* apresentam o mesmo componente majoritário (1,8-cineol), porém com diferentes porcentagens de concentração 47% em *Rosmarinus* e 81% em *Eucalyptus*. Esta diferença, em relação à linhagem IS-58, pode indicar o potencial de 1,8-cineol visto que, mesmo aparecendo em concentração menor que 50%, teve o mesmo efeito modulador que o óleo de *Rosmarinus*, indicativo que, neste caso, os demais componentes pouco influenciaram na atividade. Já para o óleo de *Eucalyptus*, embora o 1,8-cineol represente a quase totalidade da composição, pôde-se observar que os demais constituintes interferiram na atividade moduladora do óleo visto que este apresentou um menor efeito modulador.

Resultados semelhantes foram observados nos óleos de *I. verum*, *C. paradisi* e *M. spicata* onde seus, respectivos, compostos majoritários trans-anetol (87%), limoneno (94%) e L-carvone (70%) tiveram efeito modulador de 2 a 4 vezes maior em comparação com os mesmos, ou seja, um indicativo que os óleos essenciais têm sua eficiência reduzida em virtude dos demais componentes. No caso dos óleos de *C. martinii*, *C. odorata* e *C. flexuosus* tanto estes quanto seus respectivos constituintes geraniol (82%), trans-cariofileno (34%) e citral (69%) apresentaram valores de redução da CIM de quatro vezes.

Resultado interessante foi obtido com óleo de *P. graveolens* e β -citronelol. Mesmo o composto representando 32% da constituição do óleo, este reduziu a CIM em dezesseis vezes, enquanto que o óleo reduziu oito vezes reforçando a ideia de que outros componentes do óleo podem interferir na atividade biológica do mesmo. Contrariamente a todos os resultados obtidos, os óleos essenciais de *M. alternifolia* e *O. vulgare* apresentaram melhores resultados (modulação de oito e quatro vezes respectivamente) que seus constituintes terpinen-4-ol (45%) e carvacrol (71%), respectivamente, indicando que, neste caso, interação entre os demais componentes potencializou o efeito modulador dos óleos essenciais.

Diferentemente do observado na linhagem IS-58, nos ensaios para a linhagem RN4220 a qual possui o plasmídeo pUL5054 que codifica para a bomba de efluxo MsrA, responsável pelo efluxo de eritromicina, nem todos os produtos apresentaram atividade porém, quando observada, a redução da CIM do referido antibiótico foi de 2 à 16 vezes.

Da mesma forma que para tetraciclina, é digno de destaque o efeito do terpenóide β -citronelol o qual teve efeito modulador ao reduzir a CIM de eritromicina de 256 μ g/mL para 16 μ g/mL (modulação de dezesseis vezes) enquanto que o óleo de *Pelargonium* não apresentou modulação, ou seja, 32% não é suficiente para o efeito, ou efeito antagônico com outros componentes, o que merece investigações futuras. Os óleos de *C. paradisi*, *I. verum*, *M. alternifolia* e *M. spicata* apresentaram a mesma atividade que seus constituintes majoritários limoneno (94%), trans-anetol (87%), terpinen-4-ol (43%) e L-carvone (70%) com efeito modulador de 2 a 4 vezes. *C. martinii* e *O. vulgare* assim como geraniol (82%) e carvacrol (71%) não apresentaram atividade frente a linhagem. Os óleos essenciais de *C. flexuosus* e *C. odorata*

apresentaram efeito modulador ao reduzir a CIM da eritromicina em duas vezes, entretanto não foram observadas atividades em citral (69%) e trans-cariofileno (34%), ou seja, indicativo que a interação entre os componentes promoveu a atividade biológica.

O óleo essencial de *R. officinalis* teve modulação de oito vezes enquanto que 1,8-cineol (47%) modulou duas vezes assim como o óleo essencial de *E. globulus*. Uma vez que este óleo apresenta 81% de 1,8-cineol, pode-se dizer que o efeito modulador deu-se em virtude do composto majoritário, fato não observado em *Rosmarinus* no qual é indicativo que os demais componentes influenciaram no bom resultado obtido.

Apesar dos produtos testados, em sua maioria, apresentarem efeito modulador ao reduzir a CIM do antibiótico eritromicina, não se pode afirmar que o referido efeito seja devido a inibição da bomba de efluxo uma vez que REYNOLDS et al (2003) sugere que a proteína MsrA provavelmente não seria uma bomba de efluxo.

Todos os óleos e terpenóides também foram testados para a linhagem SA-1199B a qual codifica o gene para a proteína NorA, proteína de membrana de 388 aminoácidos que confere resistência a compostos hidrofílicos e baixa ou nenhuma resistência a fármacos hidrofóbicos. Estudos sobre a especificidade do substrato demonstraram que esta proteína é um verdadeiro transportador, mediando a resistência a uma variedade de drogas estruturalmente diferentes (PUTMAN et al, 2000) dentre estas, a norfloxacin.

Os óleos de *C. flexuosus* e *O. vulgare* assim como para seus respectivos constituintes (citral e carvacrol) não apresentaram atividade moduladora. Os óleos de *M. spicata* não apresentou efeito modulador, sendo este observado em seus constituintes majoritários L-carvone (modulação de duas vezes). Resultado semelhante ao observado no óleo de *E. globulus* o qual não apresentou modulação sendo esta observada no majoritário 1,8-cineol (modulação de duas vezes) a mesma atividade obtida no óleo de *R. officinalis*, indicando que um provável sinergismo entre os componentes do óleos potencializou seus efeitos.

I. verum, *P. graveolens* e *M. alternifolia* apresentaram a mesma atividade que seus constituintes anetol, β -citronelol e terpinen-4-ol (modulação de duas

vezes). Os óleos de *C. paradisi* e *C. odorata* modularam duas vezes não sendo observada atividade nos seus majoritários (limoneno e trans-cariofileno) e o óleo essencial de *C. martinii* apresentou modulação de duas vezes enquanto que seu principal componente, geraniol, teve atividade duas vezes maior (modulação de quatro vezes).

A linhagem SA-1199B além de superexpressar a proteína de efluxo NorA, também apresenta uma mutação no gene *griA* (topoisomerase IV subunidade A), conferindo resistência por modificação do alvo, ao impedir a inibição da replicação do DNA pelas fluoroquinolonas (KAATZ; SEO, 1997). Pelo fato desta linhagem apresentar dois mecanismos de resistência, e considerando que a resistência ao brometo de etídeo (BrEt) está restrita ao sistema por bomba de efluxo (KUMAR et al, 2008), o BrEt foi utilizado como controle para a modulação desse sistema.

Desta forma, tanto os óleos essenciais quanto os componentes majoritários que apresentaram modulação para a linhagem SA-1199B foram testadas com BrEt como forma de definir se o efeito modulador se dá por inibição de bomba de efluxo. Como resultado observou-se que nenhum dos compostos apresentou atividade moduladora frente a BrEt o que indicativo que, não se trata de modulação de resistência pelo sistema de efluxo, mas, provavelmente, pela modulação de resistência por inibição da topoisomerase.

Dentre os óleos essenciais testados, alecrim foi o que apresentou melhor resultado. Dados estes que reforçam as atividades já descritas do óleo essencial de *R. officinalis* como modulador da resistência a drogas em linhagens resistentes de *Salmonella spp.* e *E.coli* - embora não seja relatado a CIM do óleo essencial – e de seus extratos como modificadores da resistência em cepas de *S. aureus* (OLUWATUYI et al, 2004; JARRAR et al, 2010; RIBEIRO et al, 2012).

Os bons resultados obtidos tanto com os óleos essenciais quanto com os terpenóides pode ser explicado pelo fato de ambos serem substâncias apolares, pois um caráter lipofílico pode afetar a solubilidade na membrana e interagir com as proteínas de efluxo (ANEIROS et al, 2004; STAVRI et al, 2007), ou talvez interferir no local de substrato da bomba (GIBBONS, 2004), causando inibição da remoção da droga, embora outros meios de inibição de bomba de efluxo, tais como um efeito sobre a transcrição/tradução da bomba, não possa ser descartada (FALCAO-SILVA et al, 2009; ZLOH et al, 2004).

Assim, a aplicação desses inibidores em associação com antibióticos convencionais poderá aumentar a concentração intracelular desses antibióticos, restaurando sua eficiência, além de reduzir o emergente desenvolvimento da resistência bacteriana (SMITH et al, 2007; OLIVEIRA et al, 2011).

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- Os óleos de *R. officinalis*, *I. verum*, *E. globulus*, *C. odorata* e *C. paradisi* e os terpenóides, trans-anetol, limoneno trans-cariofileno, não apresentaram atividade antibacteriana para todas ou pelo menos uma das linhas ensaiadas. Os demais produtos apresentaram significativa atividade para as linhagens ensaiadas.
- Todos os produtos testado tiveram efeito modulador frente a linhagem IS-58, reduzindo a CIM da tetraciclina. Os mesmo produtos, em sua maioria, também apresentaram atividade moduladora nas linhagens RN4220 e SA-1199B reduzindo a CIM da eritromicina e norfloxacin, respectivamente.
- Os óleos essenciais e terpenóides avaliados são potenciais fontes de adjuvantes de antibióticos, ou seja, agem como moduladores da resistência a drogas, modulando ou até revertendo a resistência bacteriana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABULROB, A.-N., SULLER, M. T. E., GUMBLETON, M., SIMONS, C., & RUSSELL, A. D. Identification and biological evaluation of grapefruit oil components as potential novel efflux pump modulators in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterial strains. **Phytochemistry**, v. 65, p. 3021–3027, 2004.
- ADAM, K., SIVROPOULOU, A., KOKKINI, S., LANARAS, T., ARSENAKIS, M. Antifungal Activities of *Origanum vulgare* subsp . *hirtum* , *Mentha spicata* , *Lavandula angustifolia* , and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1739-1745, 1998.
- ADUKWU, E. C., ALLEN, S. C. H., & PHILLIPS, C. A.. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 1217–27. 2012.
- AESCHLIMANN, J. R., DRESSER, L. D., KAATZ, G. W., RYBAK, M. J. Effects of NorA inhibitors on in vitro antibacterial activities and postantibiotic effects of levofloxacin, ciprofloxacin, and norfloxacin in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 335-340, 1999.
- ALEKSHUN, M. N., & LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v. 128, p. 1037–1050, 2007.
- ALLEN, H. K., DONATO, J., WANG, H. H., CLOUD-HANSEN, K. A., DAVIES, J., & HANDELSMAN, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 8, p. 251–259. 2010.
- AMINOV, R. I. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. **Frontiers Microbiology**, v.1, p. 1-7, 2010.

- ANEIROS, A., GARATEIX, A. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. **Journal of Chromatography**, v. 803, p. 41-53, 2004.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/pas_web/modulo3/gramp_staphylo.htm> Acesso em agosto de 2014.
- ARRIGONI-BLANK, M.F.; ALMEIDA, S.A.; OLIVEIRA, A.C.L.; BLANK, A.F. Micropropagação e aclimatização de gerânio (*Pelargonium graveolens* L .). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, p.271-275, 2011.
- ARVIDSON, S.; TEGMARK, K. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, p. 159-170, 2001.
- BARBARA ZECHINI, ILARIA VERSACE. Inhibitors of Multidrug Resistant Efflux Systems in Bacteria. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 4, p. 37-50, 2009.
- BASSETT E. J., KEITH M. S., ARMELAGOS G. J., MARTIN D. L., VILLANUEVA A. R. Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D.350). **Science**, v. 209, p. 1532–1534, 1980.
- BASSOLÉ, I. H. N., & JULIANI, H. R.. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 17, p. 3989–4006, 2012.
- BENINI, C., MAHY, G., BIZOUX, J.-P., WATHELET, J.-P., DU JARDIN, P., BROSTAUX, Y., & FAUCONNIER, M.-L.. Comparative chemical and molecular variability of *Cananga odorata* (Lam.) Hook.f. & Thomson forma genuina (ylang-ylang) in the Western Indian Ocean Islands: implication for valorization. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, p. 1389–402, 2012.

- CARSON, C. F., HAMMER, K. A., & RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 50–62, 2006.
- CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, p. 70-76, 2005.
- CDDEP – Center for Disease Dynamics, Economics & Policy. **Resistance Map**: disponível em <<http://www.cddep.org/map>> Acesso em setembro de 2014.
- CHAN, B. C. L., IP, M., GONG, H., LUI, S. L., SEE, R. H., JOLIVALT, C., LAU, C. B. S. Synergistic effects of diosmetin with erythromycin against ABC transporter over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) RN4220/pUL5054 and inhibition of MRSA pyruvate kinase. **Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 20, p. 611–614, 2013.
- CHOPRA, I., HESSE, L. e O'NEIL, A. J. Exploiting current understanding of antibiotic action for discovery of new drugs. **Journal of Applied Microbiology, Symposium Supplement**, v. 92, p.4-15, 2002.
- CHRISTOFFERSEN, R.E. Antibiotics-an investment worth making? **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 1512-1514. 2006.
- CHUECA, B., PAGÁN, R., & GARCÍA-GONZALO, D. International Journal of Food Microbiology Oxygenated monoterpenes citral and carvacrol cause oxidative damage in *Escherichia coli* without the involvement of tricarboxylic acid cycle and Fenton reaction. **International Journal of Food Microbiology**, v. 189, p. 126–131. 2014.
- COATES, A., HU, Y., BAX, R., PAGE, C. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, p. 895-910. 2002.

- COOK, M., MOLTO, E., ANDERSON, C. Fluorochrome labelling in Roman period skeletons from Dakhleh Oasis, Egypt. *Am. J. Phys. Anthropol.* v. 80, p. 137–143, 1989.
- COSTA, S.S., FALCÃO C., VIVEIROS, M., et al. Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **BMC Microbiol**, v. 11, p. 241, 2011.
- DEMAIN, A.L., SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of Antibiotics**, v. 62, p. 5–16, 2009.
- DENG, X., SUN, F., JI, Q., LIANG, H., MISSIAKAS, D., LAN, L., & HE, C. Expression of multidrug resistance efflux pump gene *norA* is iron responsive in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, p. 1753–1762. 2012.
- DICKSON, R. A., HOUGHTON, P. J., HYLANDS, P. J., GIBBONS, S. Antimicrobial, resistance-modifying effects, antioxidant and free radical scavenging activities of *Mezoneuron benthamianum* Baill., *Securinega virosa* Roxb. & Wlld. And *Microglossa pyrifolia* Lam. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 41-45, 2006.
- FALCAO-SILVA, V.S., SILVA, D.A., SOUZA, Mde F., SIQUEIRA-JUNIOR, J.P. Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by a kaempferol glycoside from *Herissantia tiubae* (Malvaceae) **Phytotherapy Research**. v. 23, p. 1367–1370, 2009.
- FERNEBRO J. Fighting bacterial infections—future treatment options. **Drug Resistance Updates**, v. 14, p. 125–139, 2011.
- GERARD D. WRIGHT. Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it?. **BioMedCentral**, v. 8, p. 123, 2010.
- GIBBONS S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**, v. 21, p. 263–277, 2004.
- GIBBONS, S., MOSER, E., KAATZ, G. W. Catechin gallates inhibit multidrug resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus*. **Plant Letter**, v. 70, p.1-3, 2004.

- GIBBONS, S., UDO, E. E. The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux, on the *in vitro* activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the *tet(K)* determinant. **Phytotherapy Research**, v.14, p. 139-140, 2000.
- GUAY, G. G., KHAN, S. A., & ROTHSTEIN, D. M.. The *tet(K)* gene of plasmid pT181 of *Staphylococcus aureus* encodes an efflux protein that contains 14 transmembrane helices. **Plasmid**, v. 30, p. 163–166, 1993.
- GUILFOILE, P. G., Antibiotic-Resistant Bacteria. **Deadly Diseases and Epidemics**, p. 64-66, 2007.
- HSIEH, P., SIEGEL, S. A., ROGERS, B., DAVIS, D., LEWIS, K. Bacteria lacking a multidrug pump: A sensitive tool for drug discovery. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States**, v. 95, p. 6602-6606, 1998.
- HUANG, Y., ZHAO, J., ZHOU, L., WANG, J., GONG, Y., CHEN, X., ... JIANG, W.. Antifungal activity of the essential oil of *Illicium verum* fruit and its main component trans-anethole. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 15, p. 7558–7569, 2010.
- HUH, A. J., & KWON, Y. J.. “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of Controlled Release**, v.156, p. 128-145, 2011.
- IDAILLAC C, GUILLON J, ARPIN C, ET AL. Synthesis of omeprazole analogues and evaluation of these as potential inhibitors of the multidrug efflux pump NorA of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, p. 831–838, 2007.
- JARRAR, N., ABU-HIJLEH, A., & ADWAN, K.. Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. alone and in combination with cefuroxime against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, p. 121–123, 2010.

- KAATZ, G. W., MOUDGAL, V. V., SEO, S. M., KRISTIANSEN, J. E. Phenothiazines and Thioxanthenes Inhibit Multidrug Efflux Pump Activity in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 47, p. 719–726, 2003.
- KAATZ, G. W., & SEO, S. M. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 2733–2737, 1997.
- KAATZ, G. W.; SEO, S. M. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 2650–2655, 1995.
- KÖHLER, T., PECHÈRE, J. C., PLÉSIAT, P. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, p. 771–778, 1999.
- KUMAR, A., KHAN, I. A., KOUL, S., KOUL, J. L., TANEJA, S. C., ALI, I., ... QAZI, G. N.. Novel structural analogues of piperine as inhibitors of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, 1270–1276, 2008.
- KUMAR, A., SCHWEIZER, H. P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1486–1513, 2005.
- LAMBERT, R. J., SKANDAMIS, P. N., COOTE, P. J., & NYCHAS, G. J.. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453–462, 2001.
- LEE, K., LEE, J.-H., KIM, S.-I., CHO, M. H., & LEE, J. Anti-biofilm, anti-hemolysis, and anti-virulence activities of black pepper, cananga, myrrh oils, and nerolidol against *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Publisher Online, July, 2014.

- LI, X. Z., AND H. NIKAIDO. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. **Drugs**, v. 64, p. 159–204, 2004.
- LINDSAY, J. A., HOLDEN, M. T. G. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? **Trends in Microbiology**, v. 12, p. 378-385, 2004.
- LOMOVSKAYA, O., BOSTIAN, K. A. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic – a vision for applied use. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 910-918, 2006.
- LYNCH, A. S. Efflux systems in bacterial pathogens: an opportunity for therapeutic intervention? An industry view. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 949-956, 2006.
- MARMULLA, R., & HARDER, J.. Microbial monoterpene transformations-a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 346, 2014.
- MARQUES, B., Bacterial efflux systems and efflux pump inhibitors. **Biochimie**, v.87, p.1137-1147, 2005.
- MARKHAM, P.N. Inhibition of the emergence of ciprofloxacin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by the multidrug efflux inhibitor reserpine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 988-989, 1999.
- MARKHAM, P., WESTHAUS, E., KLYACHKO, K., JOHNSON, M. E., NEYFAKH, A. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 2404-2408, 1999.
- MCCALLUM N, BERGER-BACHI B, SENN MM. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Med. Microbiol**, v. 300, p. 118–129, 2010.
- MCKEEGAN, K. S., M. I. BORGES-WALMSLEY, AND A. R. WALMSLEY. Structural understanding of efflux-mediated drug resistance: potential routes to efflux inhibition. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, p. 479–486, 2004.

- MOELLERING, R. C., JR. Introduction: problems with antimicrobial resistance in Gram-positive cocci. **Clinical Infectious Diseases**, v. 16, p. 1177–1178, 1998.
- MULYANINGSIH, S., SPORER, F., ZIMMERMANN, S., REICHLING, J., & WINK, M.. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. **Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 17, p. 1061–1066, 2010.
- MAYAUD, L., CARRICAJÓ, A., ZHIRI, A., & AUBERT, G.. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 167–173, 2008.
- NASCIMENTO, P. F. C., NASCIMENTO, A. C., & RODRIGUES, C. S.. Divulgação Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais : uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 108–113, 2007.
- NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. **CLSI/NCCLS document M100-S15**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2005.
- NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. **NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4)**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2003.
- NELSON M. L., DINARDO A., HOCHBERG J., ARMELAGOS G. J. Brief communication: mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains of an ancient population from Sudanese Nubia 350–550 CE. **Am. J. Phys. Anthropol**, v. 143, p. 151–154, 2010.
- NEU, H. C. The crisis in antibiotic resistance. **Science**, v. 257, p. 1064–1073, 1992.

- NIELSEN, J. Combinatorial synthesis of natural products. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p. 297-305, 2002.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. SANDER M. K. Natural products as sources over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.
- NEYFAKH, A. A., BORSCH, C. M., KAATZ, G. W. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 128-129, 1993.
- OGSTON, A. Micrococcus poisoning. **Journal Anatomy and Physiology**, v.16, p. 526-526, 1882.
- OJEDA-SANA, M. A., REPETTO, V., MORENO, S. Carnosic acid is an efflux pumps modulator by dissipation of the membrane potential in *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 29,p. 137-144, 2013
- OLIVEIRA, C.S., FALCÃO-SILVA, V. S., SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P., HARDING, D.P., et al. Drug Resistance Modulation in *Staphylococcus Aureus*, a New Biological Activity for Mesoionic Hydrochloride Compounds. **Molecules**, v. 16, p. 2023-2031, 2011.
- OLUWATUYI, M., KAATZ, G.W., GIBBONS, S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 3249–3254, 2004.
- OMS – Organização Mundial de Saúde. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, 2014.
- PIDDOCK, L.J., GARVEY, M.I., RAHMAN, M.M., GIBBONS, S. Natural and synthetic compounds such as trimethoprim behave as inhibitors of efflux in Gram-negative bacteria. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 65, p. 1215–1223, 2010.
- PIDDOCK, L. J. V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacterial. **Clinical Microbiology Review**, v. 19, p. 382-402, 2006a.

- PIDDOCK, L.J.V. Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 629-636, 2006b.
- POOLE, K., LOMOVSKAYA, O. Can efflux inhibitors really counter resistance?. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 3, p. 145-152, 2006.
- POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **J Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 20-51, 2005.
- POOLE, K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology, Symposium Supplement**, v. 92, p. 55-64, 2002.
- PUTMAN, M., VAN VEEN, H.W., KONINGS, W.N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 672–693, 2000.
- RAŠKOVIĆ, A., MILANOVIĆ, I., PAVLOVIĆ, N., ČEBOVIĆ, T., VUKMIROVIĆ, S., & MIKOV, M.. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 225, 2014.
- REARDON, S. Antibiotic resistance sweeping developing world: Bacteria are increasingly dodging extermination as drug availability outpaces regulation. **Nature: News Infocus**, v. 509, p.141, 2014.
- REYNOLDS, E. Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: incomplete transporters? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, p. 228–236, 2003.
- RIBEIRO, D. S., MELO, D. B., GUIMARAES, A. G., & VELOZO, E. S. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, p. 687–696, 2012.
- ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 52, p. 1138–43, 2011.

- ROSATO, A., VITALI, C., DE LAURENTIS, N., ARMENISE, D., & ANTONIETTA MILILLO, M. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. **Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 14, p. 727–32, 2007.
- ROSENBACH, A. J. Mikro-Organismen bei den Wund-Infections-Krankheiten des Menschen. Wiesbaden, **J.F. Bergmann**, p. 18. 1884.
- ROSS, J. I., FARRELLI, A. M., EADY, E. A., COVE, J. H, CUNLIFFE, W. J. Characterization and molecular cloning of the novel macrolide-streptogramin B resistance determinant from *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 24, p. 851-862, 1989.
- SABATINI, S., GOSETTO, F., MANFRONI, G., et al. Evolution from a natural flavones nucleus to obtain 2-(4-propoxyphenyl) quinoline derivatives as potent inhibitors of the *S. aureus* NorA efflux pump. **J. Med. Chem**, v. 54, p. 5722–5736, 2011.
- SÀNCHEZ, P. D. Sistemas MDR y resistencia a los antimicrobianos. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 16, p. 172-187, 2003.
- SCHINDLER, B. D., JACINTO, P., KAATZ, G. W. Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: current status of potentiating existing antibiotics. **Future Microbiology**, v. 8, p. 491–507, 2013.
- SELLO/LAB. NEW COMPOUND DEFEATS DRUG - RESISTANT BACTÉRIA. Disponível em: <<https://news.brown.edu/articles/2011/11/bacteria>> Acesso em setembro de 2014.
- SHIN, S., & LIM, S.. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton spp*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 1289–1296, 2004.
- SIGNOR, D.; KOWALSKI, A. P. J.; ALVES, M. A.; LIMA, F. L.; BIASI, L. A. Estaquia herbácea de orégano. **Scientia Agraria**, v.8, p.431-434, 2007.

- SILVEIRA, G. P., NOME, F., GESSER, J. C., SÁ, M. M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, p. 844-855, 2006.
- SIMÕES, C. M. O., SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: Simões CMO, Schenkel EP; Gosmann G, Mello JCP de, Mentz LA, Petrovick PR (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, cap. 18, p. 475, 2004.
- SMITH, E. C. J., KAATZ, G. W., SEO, S. M., WAREHAM, N., WILLIAMSON, E. M., GIBBONS, S. The phenolic diterpene totarol inhibits multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother** v. 51, p. 4480–4483, 2007.
- SMITH, T. L.; JARVIS, W. R.. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. **Microbes and infection**, v. 1, p. 795-805, 1999.
- STAVRI, M., PIDDOCK, L. J. V. e GIBBONS, S., Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, p.1247-1260, 2007.
- TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 281-301, 2000.
- TAJKARIMI, M. M., IBRAHIM, S. A., & CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, p.1199–1218, 2010.
- TEGOS, G. P., HAYNES, M., STROUSE, J. J., KHAN, M. M. T., BOLOGA, C. G., OPREA, T. I., & SKLAR, L. A. Microbial efflux pump inhibition: tactics and strategies. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 1291–302, 2011.
- TEGOS, G. P., & HAMBLIN, M. R. Phenothiazinium Antimicrobial Photosensitizers Are Substrates of Bacterial Multidrug Resistance Pumps. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 196–203, 2006.

- TEGOS, G., STERMITZ, F.R., LOMOVSKAYA, O., LEWIS, K. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 46, p. 3133–3141, 2002.
- TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. Microbiologia. *Staphylococcus aureus*. São Paulo: Atheneu, cap. 20, p. 175-182, 2005.
- VALE-SILVA, L. A., GONÇALVES, M. J., CAVALEIRO, C., SALGUEIRO, L., & PINTO, E.. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus x viciosoi* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Planta Medica**, v. 76, p. 882–888, 2010.
- VAN BAMBEKE, F., PAGÈS, J. LEE, V. J. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 1, p. 157-175, 2006.
- VAN BAMBEKE, F., PLÉSIAT, G. P, PECHÈRE, J. C., TULKENS, P. M. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 1055-1065, 2003.
- VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. **Salud Pública de México** v. 47, p. 381-387, 2005.
- WEBBER, M. A., PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 9-11, 2003.
- WRIGHT, P. M., SEIPLE, I. B., & MYERS, A. G. The Evolving Role of Chemical Synthesis in Antibacterial Drug Discovery. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, 8840–8869, 2014.
- YAMADA, H., KUROSE-HAMADA, S., FUKUDA, Y., MITSUYAMA, Y., TAKAHATA, M., MINAMI, S., WATANABE, Y., NARITA, H. Quinolone

susceptibility of norA-disrupted *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 2308-2309, 1997.

ZLOH, M., KAATZ, G. W., GIBBONS, S. Inhibitors of multidrug resistance (MDR) have affinity for MDR substrates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 881-885, 2004.

ANEXOS

APÊNDICE