

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus limon*
FRENTE CEPAS MULTIDROGA RESISTENTES DO GÊNERO *Acinetobacter*.

FELIPE QUEIROGA SARMENTO GUERRA

JOÃO PESSOA

2012

FELIPE QUEIROGA SARMENTO GUERRA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus limon*
FRENTE CEPAS MULTIDROGA RESISTENTES DO GÊNERO *Acinetobacter*.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Produtos
Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de
Ciências da Saúde da Universidade Federal da
Paraíba, em cumprimento aos requisitos
necessários para a obtenção do grau de Mestre
em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.
Área de concentração: FARMACOLOGIA.

ORIENTADORA:

Prof.^a. Dr.^a Edeltrudes de Oliveira Lima

JOÃO PESSOA

2012

FELIPE QUEIROGA SARMENTO GUERRA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus limon*
FRENTE CEPAS MULTIDROGA RESISTENTES DO GÊNERO *Acinetobacter*.**

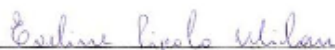
Dissertação de mestrado em 14 de Fevereiro de 2012.

Banca Examinadora



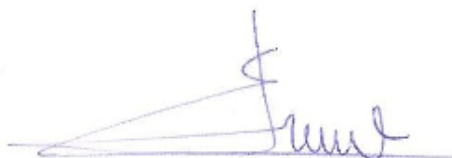
DR. JOSÉ PINTO DE SIQUEIRA JUNIOR

(Avaliador interno)



Dr.ª EVELINE PIPOLO MILAN

(Avaliadora externa)



Dr.ª EDELTRUDES DE OLIVEIRA LIMA

(Orientadora)

À minha avó

Maria das Neves Queiroga Sarmento

In memoriam.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

“Tudo posso naquele que me fortalece”. Obrigado Pai pela saúde, disposição e por ter me circundado por pessoas maravilhosas em todas as fases de minha existência.

À minha família por fazerem este momento possível, não tenho palavras para expressar o quanto sou grato a Deus por ter nascido em um lar tão maravilhoso. De pais, Adriana e Antônio, dedicados integralmente em dar a melhor educação aos seus filhos, no exemplo de cidadãos e de amor incondicional para conosco. De um irmão, Hugo, verdadeiro amigo para todas as horas. De tios, Ana, Marconi e Francisca e de Avôs, José Sarmento, Maria das Neves e Nilta Marques que torceram por mim.

À minha orientadora Dr.^a Edeltrudes de Oliveira Lima primeiramente pela confiança que me foi depositada, pelo apoio e amizade; um verdadeiro exemplo de profissional, dedicada, eficiente e humilde que terei como espelho profissional pelo resto da minha vida.

Ao anjo que Deus colocou em minha vida, Anna Walkyria de Almeida Ribeiro, por sempre ter me apoiado, por ter aguentado, pacientemente, meus estresses e acima de tudo por me fazer cada dia mais tentar ser uma pessoa melhor. Muito obrigado meu Amor! E a toda a sua família que sempre me deram toda a força possível.

Aos meus colegas de laboratório, Wylly Oliveira, Egberto Santos, Fillipe Oliveira, Vinicius Nogueira, Everton, Zilmara, Kelly, Patrícia Pinheiro, Catiana Oliveira, Igara Oliveira, Juliana Moura Mendes, Janiere Pereira de Sousa pelo companheirismo, pelos momentos de descontração proporcionados e principalmente pelo sentimento que nos foi dado durante estes 2 anos que pesquisa não se faz sozinha, logo, sem dúvida alguma, a possibilidade de desenvolver o trabalho fica mais tranquila quando estamos em meio a essas pessoas.

À minha turma do mestrado pelos momentos de descontração e estresses que passamos juntos no decorrer desta caminhada, com eles tudo se tornou mais prazeroso de ser realizado.

Aos meus queridos amigos que me apoiaram incondicionalmente para realização deste trabalho e ficaram sempre do meu lado, torcendo.

Ao Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho e todos que fazem o laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, URCA, pelo acolhimento maravilhoso que me foi proporcionado no Crato e pelos ensinamentos fornecidos.

Ao Prof. Fábio Santos de Souza e a Vinicius Nogueira Trajano pela realização da análise do óleo essencial.

À Prof.^a Dr.^a Zélia B. V. S. Pontes que me acompanha desde a graduação com seus ensinamentos, conselhos e disponibilidade para comigo sempre que ela foi solicitada.

Aos Professores Lauro Santos Filho e Adalberto Coelho da Costa, professores dedicados que sempre me aconselharam e apoiaram durante toda a minha vida acadêmica.

Aos professores Dr. José Pinto de Siqueira Junior e Dr.^a Eveline Pipolo Milan pelas contribuições que foram realizadas na avaliação desta dissertação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos que nos passaram todos seus conhecimentos com dedicação.

Às funcionárias do Laboratório de Micologia e Microbiologia nominalmente, Maria de Fátima F. P. Carvalho, Neuza M. C. Oliveira e Bernadete Helena Cavalcante Santos pela disposição de estar sempre nos orientando e nos fornecendo todo o material solicitado.

Aos funcionários da PgPNSB que me deram suporte durante o período da Dissertação, em especial à Caroline Manguiera e a Tânia Alves.

A CAPES e a UFPB pelo apoio financeiro e as condições para a realização do trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho, o meu muito obrigado!

“Todas as pessoas podem ser grandes porque todos podem servir.

Não é preciso ter um diploma universitário para servir.

Não é preciso fazer concordar o sujeito e o verbo para servir.

Basta um coração cheio de graça. Uma alma gerada do amor.”

Martin Luther King

RESUMO

Espécies do gênero *Acinetobacter* ganharam importância nos últimos anos devido ao seu envolvimento crescente em infecções graves e resistência antimicrobiana. Uma vez que bactérias resistentes a múltiplas drogas representam um desafio para o tratamento de infecções, é necessário encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas no combate a estes microrganismos. Para tentar superar este panorama, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas em busca de novos produtos antibacterianos, dentre elas estão os estudos com os metabólitos de plantas, como o óleo essencial de *Citrus limon* (OECL). Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do óleo essencial de *Citrus limon* contra cepas de *Acinetobacter* multidroga resistentes. Sua composição química foi determinada por CG/EM e sua atividade antibacteriana avaliada pela determinação de sua CIM e CBM pela técnica de microdiluição, sua cinética de morte microbiana também foi analisada. Verificou-se também seu efeito modulador da ação dos antibióticos convencionais por técnicas de microdiluição. Entre os fitoconstituintes, neral (29,4%) apresenta-se como o principal componente de OECL. O referido óleo inibiu o crescimento de 67% das 24 cepas ensaiadas, tendo sua CIM estabelecida em 625 µg/mL e a CBM em 1250 µg/mL. Este óleo possui atividade antibacteriana dependente de sua concentração e do tempo de exposição no microrganismo e é um modulador da ação dos antibióticos convencionais. Os resultados deste estudo sugerem que o referido óleo pode suprimir o crescimento de espécies de *Acinetobacter* e poderia ser uma fonte de metabólitos com atividade modificadora antibacteriana.

Palavras chaves: *Acinetobacter*, óleo essencial, *Citrus limon*, atividade antibacteriana, modulação, efeito sinérgico, efeito aditivo, aminoglicosídeos, carbapenems.

ABSTRACT

Acinetobacter species have gained importance in recent years due to their increased involvement in serious infections and antimicrobial resistance. Since multidrug resistant bacteria pose a challenge to the treatment of infections, it is necessary to find new substances with antimicrobial properties in combating these microorganisms. Thus, medicinal plants are studied, since they are used for treatment of various illnesses. Therefore, many studies on biological activity have been performed with essential oils obtained from medicinal plants, such as the essential oil from *Citrus limon* (EOCL), attempting to help overcome this problem. Thus the present study aimed to evaluate the effect of the essential oil of EOCL against multidrug resistant strains of *Acinetobacter* spp. Its chemical composition was determined by GC/MS and its antibacterial activity was assessed by determining their MIC and MBC by microplate bioassay, its Time kill too was determinated. Also was analyzed the effect of modulating action of conventional antibiotics by microplate bioassay. Among phytochemicals, Neral (29.4%) presented as the major essential component of EOCL. The oil caused growth inhibition in 16 (67%) of 24 strains tested, showing a MIC of 625 µg/ml and MBC of 1250 µg/mL. In a time kill study, the oil displayed a concentration-dependent antibacterial activity. Results of combining antibiotics and EOCL had shown us a synergistic and additive effect with EOCL /antibiotics combinations. The results of this study suggest that essential oil of *C. limon* may suppress the growth of *Acinetobacter* species and could be a source of metabolites with modified antibacterial activity.

Keywords: *Acinetobacter*, essential oil, antibacterial activity, *C. limon*, modifying activity, synergistic effect, additive effect, aminoglycosides, carbapenems.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH: Agar Mueller Hinton

BHI: caldo de infusão de cérebro e coração

CFM: Concentração Fungicida Mínima

CG: Cromatografia gasosa

CIF: Concentração Inibitória Fracionada

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CMH: Caldo Mueller Hinton

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EM: Espectrômetro de massa

EMA: Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos

OE: Óleo essencial

OECL: Óleo Essencial de *Citrus limon*

OMS: Organização Mundial de Saúde

sp: espécie

spp: espécies

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UTIs: Unidades de Terapia Intensiva

µg/mL: microgramas por mililitro

µg: micrograma

mL: mililitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alvos das drogas antimicrobianas	24
Figura 2. Mecanismos de resistência das bactérias contra as drogas antimicrobianas	27
Figura 3. <i>Citrus limom</i> , imagens da planta.....	34
Figura 4. Curva de tempo de morte bacteriana da cepa A-04 de <i>Acinetobacter</i> causada pelo óleo essencial de <i>C. limon</i>	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química (%) do óleo essencial de <i>C. limon</i>	43
Tabela 2. Atividade inibitória do óleo essencial de <i>Citrus limon</i> contra cepas de <i>Acinetobacter</i>	46
Tabela 3. Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos aminoglicosídeos e carbapenems na presença e na ausência do Óleo essencial (OE) de <i>C. limon</i> contra <i>Acinetobacter</i> spp., cepa A-06	50
Tabela 4. CIM dos antibióticos e efeito combinado com óleo essencial de <i>C. limon</i> (OECL) contra <i>Acinetobacter</i> spp., cepa A-06.....	51

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Perfil de resistência fenotípico das espécies de <i>Acinetobacter</i>	45
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1-OBJETIVO GERAL	19
2.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 GÊNERO <i>Acinetobacter</i> spp	21
3.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS POR <i>Acinetobacter</i> spp	22
3.3 TERAPÊUTICA MEDICAMENTOSA PARA AS INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>Acinetobacter</i> spp	23
3.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIAS AOS ANTIBACTERIANOS	26
3.5 PRODUTOS NATURAIS	29
3.5.1 <i>Citrus limon</i>	33
3.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE ANTIMICROBIANOS	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 LOCAL DO TRABALHO	37
4.2 MATERIAL BOTÂNICO	37
4.3 MICRORGANISMO	37
4.4 MEIOS DE CULTURA	37
4.5 INÓCULO	37
4.6 METODOLOGIA	38
4.6.1 Análise dos componentes do óleo essencial	38
4.6.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	38
4.6.3 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	39
4.6.4 Cinética de morte bacteriana	39
4.6.5 Ensaio de modulação dos compostos sobre os antibióticos convencionais	40
4.6.6 Ensaio de associação dos óleos essenciais com antibióticos convencionais frente <i>Acinetobacter</i> spp.	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 ANÁLISE DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL	43
5.2 DETERMINAÇÃO DA CIM E CBM	44
5.3 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE MORTE MICROBIANA	47

5.4 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO.....	49
6 CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS	54
APÊNDICE	68

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Uma das maiores revoluções na saúde pública e na medicina foi a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928. Com sua produção em massa, a partir de 1940, esta mudou a forma como a medicina estava sendo praticada, dando origem à “era dos antibióticos”. A terapia e profilaxia com antibióticos transformaram-se em regra na prática médica, em todos os tipos de tratamentos, com ou sem indicação correta. Chegou-se até a pensar que o problema com as doenças infecciosas seria extinto. No entanto, ainda em 1940, Chain e Abraham descobrem uma substância originária da *Escherichia coli* que podia inativar a penicilina, demonstrando a capacidade, por parte das bactérias, de desenvolver mecanismos de resistência que debelavam o efeito das drogas utilizadas para combatê-las (ROSSI; ANDREAZZI, 2005; BOUZA et al., 2003).

As bactérias do gênero *Acinetobacter* compreendem um grupo de seres vivos que no passado foram considerados microrganismos de baixa virulência, mas, agora, são reconhecidos como importantes patógenos hospitalares. As manifestações clínicas mais comuns causadas pelo *Acinetobacter* são a pneumonia nosocomial seguida pela bacteremia, infecções da pele e dos tecidos moles, meningite e raramente por outro tipo de infecções. Estas doenças tendem a ocorrer principalmente em pacientes imunossuprimidos, em indivíduos com doenças subjacentes graves e naqueles submetidos a procedimentos invasivos e tratados com antibióticos de amplo espectro (ROBERTS; FINDAY; LANG, 2001).

O tratamento destas infecções tem sido motivo de muita preocupação, este fato é justificado pelo aumento nos casos de morbidade e mortalidade no cenário mundial e pelo surgimento de cepas cada vez mais resistentes aos antibacterianos utilizados na prática clínica.

Para tentar superar este panorama, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas em busca de novos produtos antibacterianos nos últimos anos. E uma fonte considerada promissora de novos compostos com propriedades antimicrobianas são os produtos naturais e os seus derivados. Logo, pesquisadores de todo o mundo têm se dedicado ao estudo de produtos naturais através do conhecimento de seus aspectos da botânica, da etnofarmacologia, da química e de sua atividade biológica.

No Brasil há aproximadamente 100.000 espécies vegetais catalogadas, mas somente 8 % foram estudadas quanto a sua química, e estima-se que apenas 1.100 espécies tenham sido avaliadas quanto às suas propriedades terapêuticas (VARANDA, 2006).

Dentre os produtos de plantas, destacam-se os óleos essenciais (OE) chamados também de óleos voláteis e aromáticos obtidos de várias partes da planta. Estudos de atividade

antibacteriana com óleos essenciais obtidos de plantas merecem destaque. Os óleos essenciais são produtos oriundos do metabolismo secundário das plantas com algumas propriedades farmacológicas já evidenciadas, como a antimicrobiana. E acredita-se que estas propriedades são normalmente um reflexo do seu próprio papel nos vegetais, no controle biológico de microrganismos fitopatogênicos. Inserido neste contexto encontra-se o óleo essencial de *Citrus limon*, rico em compostos biologicamente ativos.

A busca de princípios ativos mais eficazes e menos agressivos ao homem, tem colocado a pesquisa com produtos naturais num importante patamar científico. Estudos de atividade antibacteriana de óleos essenciais sobre bactérias multidroga resistentes parecem ainda escassos, fator de significativo estímulo para a realização desta proposta de trabalho.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1-OBJETIVO GERAL

- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do óleo essencial de *Citrus limon* frente a cepas do gênero *Acinetobacter* multidroga resistentes.

2.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os componentes do óleo essencial;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial;
- Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial;
- Avaliar a cinética de morte microbiana do óleo essencial sobre a espécie bacteriana;
- Avaliar a interferência do óleo sobre a resistência aos antibióticos convencionais pelas cepas de *Acinetobacter*.

REVISÃO DA
LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 GÊNERO *Acinetobacter*

A classificação do gênero *Acinetobacter* tem uma longa história de mudanças taxonômicas, passando pelas famílias *Neisseriaceae*, *Moraxellaceae*. As bactérias que constituem este gênero, durante um longo tempo também receberam várias denominações, sendo que entre as mais conhecidas estão *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*, *Micrococcus calcoaceticus* e *Moraxella lwoffii*. Ainda hoje, entretanto, a proposta taxonômica para estes microrganismos e o delineamento das espécies pertencentes ao gênero são objetos de estudos (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996).

O gênero *Acinetobacter* é caracterizado por bactérias que apresentam a forma de bacilo durante a fase de crescimento rápido e de cocobacilo na fase estacionária, são Gram-negativas, não fermentadoras de glicose, estritamente aeróbicos, imóveis, catalase positiva e oxidase negativa, apresentando as melhores taxas de crescimento entre 20 e 30°C, sem requerimento de fatores de crescimento e raramente reduzindo o nitrato (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996; BOUVET; GRIMONT, 1986).

Usando hibridização de DNA, Bouvet e Grimont (1986) delinearam 12 grupos diferentes (genomoespécies) dentro do gênero *Acinetobacter*, os quais podiam ser diferenciados por vinte e oito testes fenotípicos. Quatro novas espécies *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii* e *Acinetobacter junii* foram propostas e as espécies *Acinetobacter calcoaceticus* e *Acinetobacter lwoffii* foram redescritas (GERNER-SMIDT; TJERNBERG; URSING, 1991). Atualmente, existem pelo menos 31 genomoespécies descritas dentro do gênero *Acinetobacter* (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Entre as espécies caracterizadas destaca-se a genomoespécie tipo 1: *A. calcoaceticus*; tipo 2: *A. baumannii*, tipo 4: *A. haemolyticus*, tipo 5: *A. junii*, tipo 7: *A. johnsonii*, tipo 8: *A. lwoffii* e a tipo 12: *A. radioresistens*. As genomoespécies remanescentes são, em sua maioria, inominadas (BOUVET; GRIMONT, 1986).

As diferentes espécies de *Acinetobacter* são isoladas de diversos habitats naturais como no solo, na água, em vegetais e em hospedeiros animais e humanos. Outras espécies, como *A. johnsonii*, *A. lwoffii* e *A. radioresistens*, fazem parte da microbiota comensal da pele e das mucosas humanas. No entanto, a espécie *A. baumannii* raramente é encontrada na pele humana (DIJKSHOORN et al., 2005). *A. baumannii* é a espécie mais comumente encontrada

em amostras clínicas humanas, seguida de *A. lwoffii*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, genomoespécies 3 e 6 (SEIFERT et al., 1997; TJEMBERG; URSING, 1989)

No ambiente hospitalar, estas bactérias podem estar presentes em locais úmidos, como pias, torneiras e qualquer equipamento que forme aerossóis. (MANIKAL et al., 2000). As espécies de *Acinetobacter* têm sido frequentemente relatadas como agentes causadoras de surtos em hospitais. As circunstâncias de alguns surtos demonstram a sobrevivência longa do *Acinetobacter* em ambientes secos e inanimados, favorecendo sua disseminação (JAWAD et al., 1998). *A. baumannii* sobrevive melhor à dessecação do que outras espécies como *A. johnsonii*, *A. junii* e *A.lwoffii*, as quais raramente têm sido relatadas em surtos (DIJKSHOORN et al., 2005).

3.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS CAUSADAS POR *Acinetobacter* spp.

As manifestações clínicas mais comumente causadas pelo *Acinetobacter* spp. tendem a ocorrer principalmente em pacientes imunossuprimidos, em indivíduos ou pacientes com doenças subjacentes graves e naqueles submetidos a procedimentos invasivos e tratados com antibióticos de amplo espectro (GAYNES; EDWARDS, 2005; GARMENDIA et al., 2001). No entanto, uma série de casos de infecções por *A. baumannii*, causando infecções em moradores da comunidade, foram detalhados na literatura. Uma ocorrência de pneumonia adquirida na comunidade associada à elevada mortalidade em pacientes no norte da Austrália e sul da Ásia foi descrito. Estes achados clínicos levantam a possibilidade de alguns isolados terem adquirido fatores de virulência que não são normalmente encontrados na maioria dos *Acinetobacter* spp. (PEREZ et al., 2007)

Antes de 1970 as infecções por *Acinetobacter* eram, em sua maioria, infecções urinárias pós-cirúrgica, e *Acinetobacter* spp. eram isoladas principalmente de pacientes hospitalizados em unidades cirúrgicas ou clínicas. Atualmente, o papel principal desta bactéria é o de causar pneumonia nosocomial, seguida ao uso de procedimentos de ventilação mecânica. A pneumonia pelo *Acinetobacter* spp. está associada a uma mortalidade elevada variando entre 35% a 75% (JOLY-GUILLOU, 2005).

O trato urinário inferior pode ser colonizado ou infectado pelo *Acinetobacter* nos doentes hospitalizados, sobretudo naqueles com cateteres urinários. No entanto, é baixa a incidência da infecção do trato urinário (ITU) por este agente (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Quando se identifica *Acinetobacter* na urina de um doente sem sinais ou

sintomas sistêmicos de infecção, presume-se que a colonização esteja presente e que *Acinetobacter* seja apenas um microrganismo contaminante.

Bacteremia causada por *Acinetobacter* é oportunista e atinge quase que exclusivamente pacientes suscetíveis, que tenham internamento prolongado em UTIs, ventilação mecânica, grandes cirurgias, utilização de antibióticos de largo espectro, imunossupressão, trauma, queimaduras, cateteres venosos centrais e outros procedimentos invasivos. As fontes de infecção mais comuns são cateteres intravasculares e no trato respiratório. O choque séptico ocorre em cerca de um terço dos doentes com bacteremia pelo *Acinetobacter* e as taxas de mortalidade variam entre 20% e 60% (CISNEROS; BAÑO, 2002).

Outras infecções, causadas por este patógeno, são relatadas na literatura incluindo infecções de pele e tecidos moles. A maioria das infecções da pele e tecidos moles pelo *Acinetobacter* envolvem frequentemente as extremidades dos membros e por vezes em alguns casos são complicados por osteomielite (DAVIS et al., 2005).

Os doentes com queimaduras graves constituem outro grupo de risco para a colonização e posterior infecção pelo *Acinetobacter*. Para além da infecção cutânea e dos tecidos moles, os queimados frequentemente desenvolvem infecções invasivas como bacteremia e pneumonia (WONG et al., 2002, DAVIS et al., 2005).

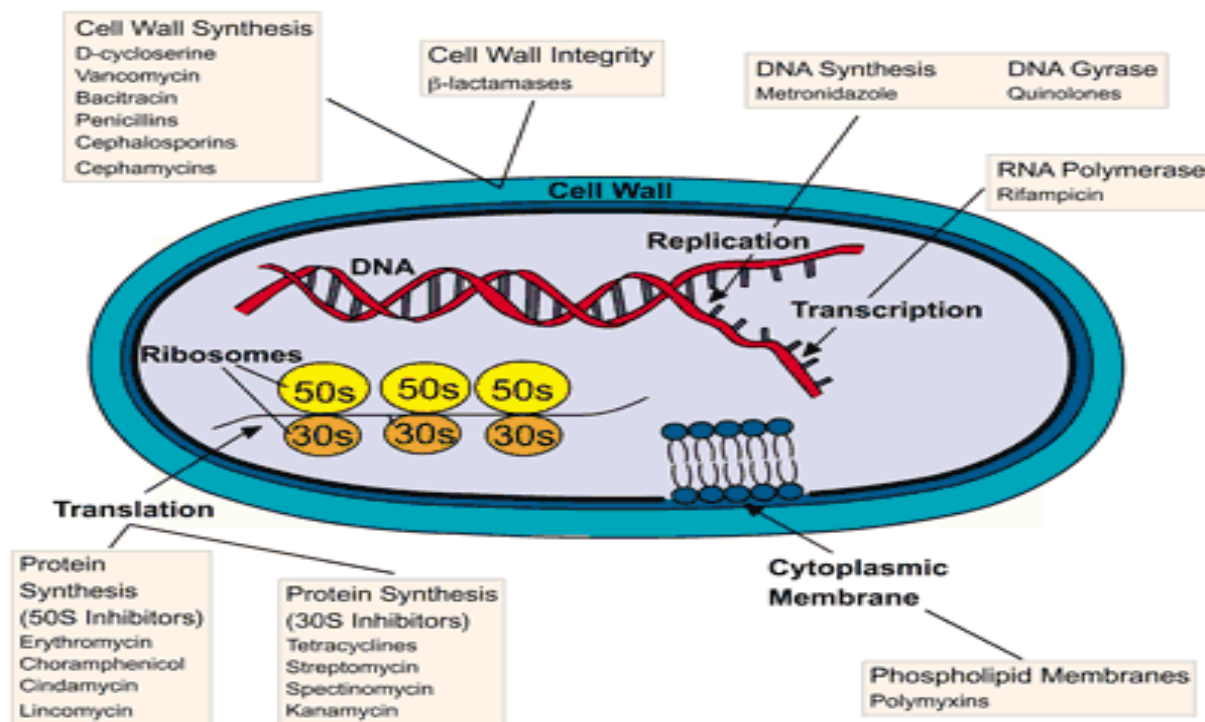
O isolamento de *Acinetobacter* em líquido é raro, pois o microrganismo não é um patógeno comum em meninges, tendo a maioria dos casos de meningite ocorrido de maneira secundária a intervenções neurocirúrgicas (TOWNER, 1997).

Outras manifestações clínicas causadas pelo *Acinetobacter* são raras do que as previamente descritas e consistem na endocardite, particularmente em próteses valvulares, sinusite, peritonite e infecções oculares (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

3.3 TERAPÊUTICA MEDICAMENTOSA PARA AS INFECÇÕES CAUSADAS PELO GÊNERO *Acinetobacter*.

Tratamento de infecções por *Acinetobacter* spp. multidroga resistentes tem sido limitado a um pequeno espectro de agentes, incluindo carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem), aminoglicosídeos (amicacina), algumas tetraciclina (minociclina, doxiciclina) e ampicilina/sulbactam. A resistência aos carbapenêmicos e outros agentes tem emergido, o que torna a classe das polimixinas (colistina e polimixina B) mais usada com sucesso clínico, Figura 1 (JONES et al., 2007).

Figura 1. Alvos das drogas antimicrobianas.



Fonte: http://www.wiley.com/college/pratt/0471393878/student/activities/bacterial_drug_resistance/index.html, acessado em 12 de Dezembro de 2011.

Os aminoglicosídeos são parte importante do arsenal terapêutico antibacteriano desde seu descobrimento, na década de 40. Em 1943, após examinar vários *Actinomycetos* de solo, Waksman e colaboradores isolaram uma cepa de *Streptomyces griseus*, o qual produzia uma substância que inibia o crescimento do bacilo da tuberculose e de diversos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, e a partir daí, em 1944, a estreptomicina foi isolada. Desde então, foi descoberta uma série de novas substâncias com potencial antibacteriano, derivadas dos *Actinomycetos*, assim como os aminoglicosídeos semi-sintéticos, amicacina e netilmicina derivados da canamicina e sisomicina, respectivamente (TAVARES, 2001).

Todos os aminoglicosídeos agem pelo mesmo mecanismo da ação, exercendo seu efeito bactericida ao se ligarem ao ribossomo bacteriano. Desta forma, é necessário que penetrem no interior da célula bacteriana para que possam agir. Isto ocorre por meio da interação do aminoglicosídeos com a superfície celular, o seu transporte por meio da membrana e, finalmente, o acoplamento com a subunidade 30S do ribossomo, diminuindo a síntese proteica e levando à leitura incorreta do RNA mensageiro, causando alteração no funcionamento da membrana celular com saída de constituintes essenciais ao funcionamento da célula, provocando a morte celular (MANDELL; BENNETT; DOLIN, 1995).

Os carbapenêmicos, representados na prática clínica pelo imipenem, meropenem e ertapenem, são os antimicrobianos beta-lactâmicos de maior espectro, apresentando uma boa atividade frente a muitas bactérias Gram-positivas e a maioria das Gram-negativas. Entre as características responsáveis por seu amplo espectro estão o baixo peso molecular e sua estrutura zwitteriônica que permitem uma rápida penetração através das membranas, sua elevada afinidade pelas Proteínas ligadoras de Penicilina (PBP) e sua grande estabilidade frente à hidrólise pela maioria das beta-lactamases. Uma das aplicações clínicas mais relevantes dos carbapenems é o tratamento das infecções nosocomiais por bactérias Gram-negativas multidroga resistentes, que em algumas ocasiões são o último recurso terapêutico disponível (OLIVER, 2004).

A administração conjunta de um inibidor de β -lactamase e um antimicrobiano β -lactâmico tem tido sucesso em superar a resistência mediada por β -lactamase. Inibidores de β -lactamase possuem uma estrutura β -lactâmica, mas uma atividade antimicrobiana limitada. Seu principal valor é o de bloquear a atividade catalítica das β -lactamases contra os antimicrobianos β -lactâmicos através de ligação irreversível aos sítios ativos das enzimas produzidas pela bactéria. Há três inibidores de β -lactamase em uso clínico: sulbactam, tazobactam e ácido clavulânico (LEVIN, 2002).

Além de ser utilizado como inibidor das β -lactamases, o sulbactam surge também como outra opção terapêutica no combate as espécies de *Acinetobacter*. Sulbactam é uma molécula β -lactâmica sintética, com estrutura, propriedades farmacocinéticas e químicas similares às das aminopenicilinas. Uma característica que distingue sulbactam de outros inibidores de β -lactamase disponíveis é sua atividade antimicrobiana direta contra *Bacteroides fragilis* e *Acinetobacter* spp. A ligação do sulbactam à PBP2 destes organismos concede a atividade intrínseca antibacteriana. A maioria das espécies de *Acinetobacter* permanece suscetível a ampicilina/sulbactam (CORBELLA et al., 1998; LEVIN, 2002). Infecções graves por *Acinetobacter* spp. respondiam anteriormente ao sulbactam, mas a eficácia dessa droga tem diminuído contra as bactérias resistentes aos carbapenêmicos (CISNEROS; BAÑO, 2002).

Dados clínicos, em sua maioria derivados de poucos estudos mostrando resultados clínicos favoráveis, indicam atividade antimicrobiana confiável das polimixinas contra *Acinetobacter* spp. isoladas com ampla resistência, estes também têm afirmado que a polimixina não é tão tóxica quanto previamente se pensava. Alguns estudos têm relatado a reintrodução da polimixina B para tratamento de infecções por bacilos Gram - negativos multidroga resistentes (GALES; REIS; JONES, 2001; MARKOU et al., 2003).

Polimixinas constituem um grupo de peptídeos policatiônicos naturalmente sintetizados pelo *Bacillus polymyxa*. Membros desta classe de antimicrobianos agem primariamente na parede celular bacteriana de Gram - negativos, levando a alterações rápidas de permeabilidade na membrana citoplasmática e por último a morte da célula. Estas drogas atravessam a membrana externa bacteriana através de uma substituição competitiva de cátions divalente por policações, os quais atravessam de modo não covalente a ponte adjacente ao componente polissacarídico. Consequentemente, a membrana externa é corrompida e torna-se mais permeável, o que permite a entrada aumentada de componentes permeabilizantes (GALES; REIS; JONES, 2001).

Entre as cinco polimixinas conhecidas (A até E), apenas a polimixina B e E tem uso terapêutico avançado. Desde 1980 outros agentes antimicrobianos menos tóxicos foram disponibilizados, e o uso clínico das polimixinas foi limitado a formulações tópicas para tratamentos de pele, ouvido e olho. Formulações tópicas de polimixina B também têm sido usadas de modo profilático na prevenção de infecções em pacientes neutropênicos ou com fibrose cística. Recentemente, o surgimento de isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp multiresistentes causando infecções tem renovado a indicação terapêutica potencial do uso parenteral de polimixinas (GALES; REIS; JONES, 2001).

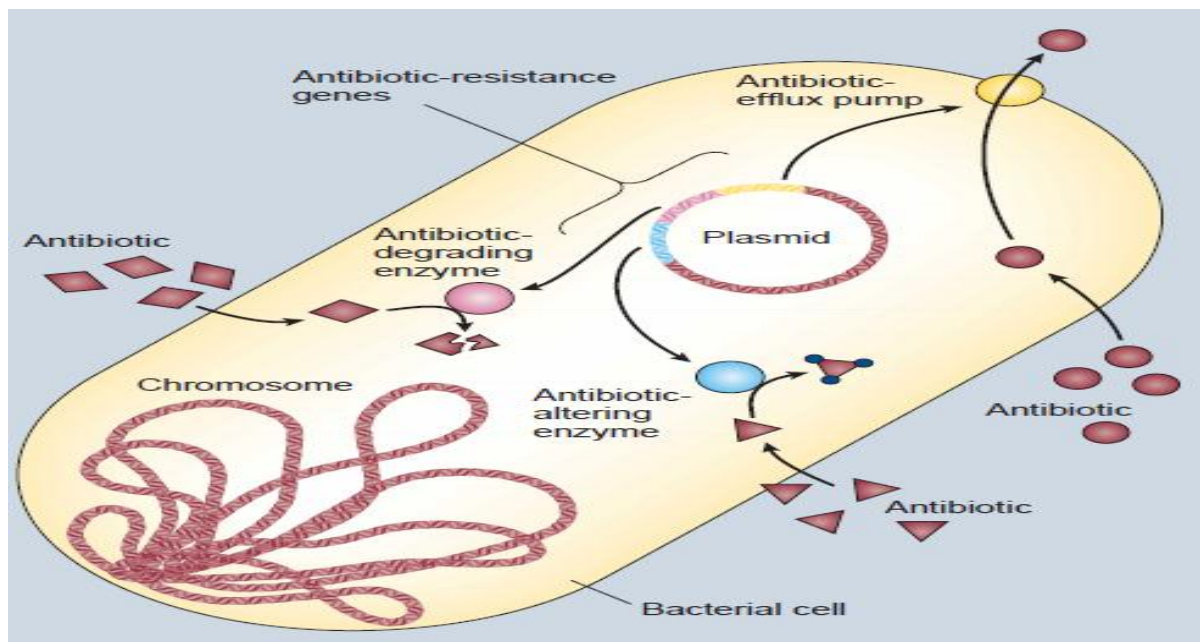
Novos antimicrobianos são sintetizados e testados contra microrganismos resistentes aos medicamentos utilizados na prática clínica. A tigeciclina, um novo antibiótico da classe das glicilciclinas, tem apresentado atividade promissora *in vitro* contra muitos patógenos, incluindo cepas multidroga resistentes de *A. baumannii* (LOPES, 2006). Tigeciclina é o primeiro antimicrobiano da classe das glicilciclinas e possui estrutura análoga à minociclina, que foi desenvolvida para evitar a resistência à tetraciclina pelos determinantes *tet(M)* e *tet(O)* que promovem proteção ribossomal e bomba de efluxo por *tet(A-E)* e *tet(K)*.

3.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBACTERIANOS

A resistência pode ser classificada natural (intrínseca) ou adquirida. A resistência intrínseca é aquela que faz parte das características naturais, fenotípicas do microrganismo, transmitida apenas verticalmente à prole. Faz parte da herança genética do microrganismo. A resistência adquirida ocorre quando há o aparecimento de resistência em espécie bacteriana anteriormente sensível à droga em questão. É obtida por mutações gênicas espontâneas e a resistência adquirida é através da transferência de fragmentos de DNA, como os transposons, de uma bactéria para outra. A aquisição da resistência ao antibiótico por parte da bactéria é

devido a três razões: modificação do sítio ativo do alvo, resultando em redução na eficiência de ligação da droga; destruição direta ou modificação do antibiótico por enzimas produzidas pelo organismo ou o efluxo do antibiótico da célula, Figura 2 (SHELDON, 2005).

Figura 2. Mecanismos de resistência das bactérias contra as drogas antimicrobianas.



Fonte: LEVY e MARSHALL, 2004.

Introdução de mutações nos sítios alvos, alterando-o, leva a uma redução da ação do antimicrobiano. Dois exemplos de receptores (alvos) alterados são: a mutação no RNA polimerase e na DNA girase, levando à inativação de rifampicinas e quinolonas e a modificação na conformação das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) levando também ao desenvolvimento de resistência contra as penicilinas e seus derivados. Outra maneira de obtenção de resistência é através da síntese de enzimas que selecionam o alvo e destroem ou modificam o antibiótico através de hidrólização, transferência de grupo ou mecanismos redox. As β -lactamases são um exemplo deste grupo, enzimas capazes de inativar os antibióticos β -lactâmicos (ex. Cefalosporinas, penicilinas). Além disso, a redução do acúmulo de antimicrobiano dentro da célula do microrganismo pode ser devido a duas razões: ou pela diminuição da permeabilidade da droga através membrana plasmática ou pelo efluxo da droga para fora da célula (HEMAISWARYAA; KRUTHIVENTIB; DOBLE, 2008).

Acinetobacter é um gênero que esteve exposto por longos períodos a organismos produtores de antimicrobianos no solo e por pressão seletiva pode justificar a capacidade do microrganismo de desenvolver resistência aos antimicrobianos de forma rápida. Este é um

contraste em comparação a outras bactérias de importância clínica, que parecem requerer mais tempo para adquirir mecanismos de resistência efetivamente elevada (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996).

Os mecanismos de resistência em espécies de *Acinetobacter* incluem a produção de β -lactamases e enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, alterações quantitativas e qualitativas das porinas da membrana externa, mutações nas topoisomerasas e bombas de efluxo (BONOMO; SZABO, 2006).

As bactérias têm desenvolvido inúmeras estratégias para resistir aos antimicrobianos β -lactâmicos, incluindo a produção de uma família de enzimas denominadas de β -lactamases. Estas enzimas catalisam a hidrólise dos antimicrobianos β -lactâmicos, abrindo o anel β -lactâmico e tornando o antimicrobiano inativo. As β -lactamases têm sido agrupadas em quatro classes moleculares A, B, C e D, baseadas na homologia da sequência dos aminoácidos. Aquelas que pertencem às classes A, C e D são denominadas serina- β -lactamases, pois possuem serina no sítio ativo para facilitar a catálise, e aquelas que pertencem à classe B são denominadas metalo- β -lactamases, pois contêm um ou dois íons zinco no sítio ativo. Estas enzimas têm a propriedade comum de hidrolisar, ao menos parcialmente, imipenem ou meropenem, além de hidrolisar outras penicilinas e cefalosporinas (JIN et al., 2004).

Além da produção das β -lactamases, há descrito outros mecanismos de resistência de *Acinetobacter* spp. aos β -lactâmicos: alteração nas proteínas ligadoras de penicilina (PBP), impedindo a sua ação, alterações na estrutura e número de proteínas porinas que resultam na diminuição da permeabilidade dos antimicrobianos através da membrana externa da célula bacteriana e a atividade de bombas de efluxo que promovem a diminuição da concentração do antimicrobiano no interior da bactéria (PEREZ et al., 2007).

As bombas de efluxo são um exemplo único na resistência às drogas por parte das bactérias, pois este mecanismo pode causar a resistência contra as mais variadas classes de antibióticos. Estas bombas multicomponentes mediam o efluxo de substâncias tóxicas das células bacterianas, incluindo os antibacterianos, em uma troca com os prótons (POOLE, 2005). Em espécies de *Acinetobacter*, a bomba de efluxo ABC tem sido bem caracterizada, atuando sobre aminoglicosídeos, cefotaxima, tetraciclinas, eritromicina, cloranfenicol, trimetoprim e fluoroquinolonas. A expressão da bomba de efluxo ABC também pode conferir resistência de alto nível aos carbapenêmicos (MAGNET; COURVALIN; LAMBERT, 2001).

A resistência aos aminoglicosídeos em *Acinetobacter* também é mediada por Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos (EMAs) capazes de inativá-los. Estas incluem

aminoglicosídeos fosfotransferases, aminoglicosídeos acetiltransferases, e aminoglicosídeos nucleotidiltransferases. Para as quinolonas a resistência é frequentemente causada devido a mutações nas regiões determinantes de resistência (genes *gyrA* e *parC*) levando a modificações na estrutura da DNA girase, resultando em uma menor afinidade de ligação por parte das quinolonas à DNA girase (PEREZ et al., 2007).

Dois mecanismos diferentes de resistência às tetraciclinas têm sido amplamente descrito em *A. baumannii*. TetA e TetB são bombas de efluxo específicas mediadas por transposon; TetB determina o efluxo de ambos antibióticos tetraciclina e minociclina, enquanto TetA determina o efluxo de apenas as tetraciclinas. O segundo mecanismo é através da proteína ribossomal de proteção, que protege o ribossomo da ação da tetraciclina. O tet (M) é gene que codifica esta proteína (HUYS et al., 2005).

O provável mecanismo de resistência às polimixinas reside em modificações na estrutura dos lipopolissacarídeos de *Acinetobacter* spp. (acilação acidificação, ou a presença de antígenos que interferem com a ligação do antibiótico à membrana celular) (PETERSON; FESIK; MCGROARTY, 1987).

3.5 PRODUTOS NATURAIS

Em consideração à crescente importância clínica dada as infecções hospitalares causadas por bactérias multidroga resistentes, incluindo as do gênero *Acinetobacter*, importantes estudos objetivando a busca de novos produtos com atividade antibacteriana tem aumentado. Entre estes produtos promissores estão aqueles derivados de plantas (FALAGAS; BLIZIOTIS; SIEMPOS, 2006).

As primeiras descrições sobre plantas feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers. Este papiro foi descoberto e publicado por Georg Ebers, sendo traduzido pela primeira vez, em 1890, por H. Joachin. Foi encontrado nas proximidades da casa mortuária de Ramsés II, porém pertence à época da XVIII dinastia. Enumera mais ou menos 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal (PINTO et al., 2002).

No passado, a fitoterapia era mais adotada pela população carente da área rural ou urbana, devido à fácil disponibilidade e menores custos. Atualmente, o uso de plantas como uma fonte de medicamentos é predominante em países em desenvolvimento como uma solução alternativa para problemas de saúde e está bem estabelecido em algumas culturas e

tradições, especialmente na Ásia, América Latina e África (SHALE; STIRK; VAN STADEN, 1999).

De acordo com a OMS (Organização Mundial de Saúde), 20 mil espécies de plantas estão sendo usadas atualmente para fins medicinais. Em todo o mundo, e especialmente na América do Sul, o uso de plantas tem contribuído significativamente para os cuidados primários com a saúde. Os vegetais são inestimáveis fontes de produtos farmacêuticos e o Brasil tem fornecido uma incrível matriz de plantas que tem chamado a atenção de etnofarmacologistas em todo o mundo (DUARTE et al., 2005; SCORZONI et al., 2007).

No Brasil, país dotado de imensa biodiversidade, diversas experiências atreladas ao conhecimento popular aproximam a utilização de plantas aos recursos terapêuticos disponíveis, sendo, inclusive, esta prática recomendada pelo poder público. Em 3 de maio de 2006, o Ministério da Saúde, através da Portaria nº 971, aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006).

É inegável a importância dos produtos naturais no desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas. Neste ponto, os produtos naturais e seus produtos derivados, são reconhecidamente importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas. Isto tanto porque podem ser utilizados diretamente como agentes terapêuticos, como também de fonte de matéria-prima para a síntese, ou ainda podem servir de protótipos para novos modelos farmacologicamente ativos (BRASIL, 2006).

Os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em dois grandes grupos. Os primeiros, denominados metabólitos primários ou macromoléculas, são essenciais a todos os seres vivos. Incluem os lipídeos, protéicos e glicídeos, que têm funções vitais bem definidas. Os produtos do metabolismo primário, através de rotas biossintéticas diversas e frequentemente desconhecidas, originam, à custa de energia, o segundo grupo de compostos químicos – os metabólitos secundários ou micromoléculas - que geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, marcantes atividades biológicas e, diferentemente daqueles do metabolismo primário, são encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinados grupos de plantas (POSER; MENTZ, 2004).

Os metabólitos secundários garantem vantagens para sobrevivência dos vegetais e para perpetuação de sua espécie, em seu ecossistema. Apresentam várias funções como, por exemplo, a defesa contra herbívoros e microrganismos, a proteção contra os raios UV, a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes. Os vegetais possuem elevada

capacidade biossintética de metabólitos secundários, tanto em relação ao número de substâncias produzidas quanto à sua diversidade numa mesma espécie (SANTOS, 2004).

Os metabólitos secundários apresentam várias atividades biológicas. Muitos são de importância comercial tanto na área farmacêutica quanto nas áreas: alimentar, agrônômica e de perfumaria. Entre os metabólitos secundários, os principais grupos de compostos encontrados com atividade biológica são os alcalóides, flavonóides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais (PEREIRA, 2006).

Os óleos essenciais são também chamados de óleos voláteis e aromáticos obtidos de várias partes das plantas como flores, brotos, sementes, folhas, madeira, frutos e raízes. Em geral são incolores ou ligeiramente amarelados. São geralmente muito instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais; a maioria dos óleos voláteis possui índice de refração e são opticamente ativos. Têm apresentado atividade biológica e servem como uma fonte alternativa de agentes antimicrobianos contra patógenos causadores de doenças. O aumento da resistência bacteriana para antibióticos e os esforços para desenvolver conservantes naturais em alimentos industrializados têm aumentado o interesse na pesquisa destes compostos (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004).

A maioria dos óleos essenciais é derivada de fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo que estes últimos predominam. Os fenilpropanóides se originam biossinteticamente a partir do ácido chiquímico, enquanto os terpenóides se formam pela condensação de um número variável de unidades do isopreno. A unidade isoprênica, por sua vez, origina-se a partir do ácido mevalônico. Os terpenos são frequentes nos óleos essenciais são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos (SIMÕES; SPITZER, 2004; VAN DE BRAAK; LEIJTEN, 1999).

Existem vários métodos para extrair óleos essenciais. Estes podem incluir: destilação à vapor, hidrodestilação, extração com solvente orgânico, destilação assistida por micro-ondas, hidrodifusão por micro-ondas e gravidade, extração com solvente a alta pressão, fluido supercrítico com CO₂, extração ultra-sônica e extração por micro-ondas sem solventes (OKOH, SADIMENKO, AFOLAYAN, 2010). Entretanto, o método de destilação a vapor é mais comumente utilizado para produção comercial (PRABUSEENIVASAN, JAYAKUMAR, IGNACIMUTHU, 2006).

O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo influi sobre a composição química dos óleos essenciais (WILLIAMS, STOCKLEY, 1998). O produto da extração pode variar em quantidade e qualidade da composição em função do clima, composição do solo, órgão da planta, idade e fase vegetativa do ciclo (MASOTTI et al.,

2003). Os teores de macronutrientes (N, P, K) e o grau de hidratação do terreno influenciam a composição dos óleos voláteis. As plantas ricas em óleos essenciais devem ser coletadas pela manhã ou à noite, pois o período de exposição ao sol pode provocar uma perda quantitativa importante do óleo existente no vegetal. Entretanto, não se pode prever ou estabelecer um único, pois cada espécie reage de forma diferenciada (CASTRO, 2006).

Sabe-se que alguns óleos essenciais são amplamente usados especialmente pelas indústrias farmacêuticas, sanitárias, cosmética, agricultura e de alimentos devido às suas ações bactericida, fungicida, parasiticida, inseticida e virucida, além de outras propriedades medicinais. Alguns aspectos devem ser considerados quanto à importância desses produtos para os próprios vegetais, nesse caso, atuam como inibidores da germinação, na proteção contra predadores, e contra a perda de água, aumento da temperatura, além de estarem envolvidos na atração de polinizadores e atuarem contra herbívoros, ao reduzirem o apetite desses animais pelas plantas (CRAVEIRO; MACHADO, 1986; BAKKALI et al., 2008; SANTOS, 2004).

Os mecanismos pelos quais os óleos essenciais podem inibir microrganismos envolvem diferentes modos de ação, e em parte pode ser devido à sua hidrofobicidade. Como resultado, eles se particionam na bicamada lipídica da membrana celular, afetando a cadeia respiratória e a produção de energia (NICOLSON; EVANS; O'TOOLE, 1999), e levando à liberação de conteúdos vitais das células (BURT, 2004). Dano ao sistema enzimático bacteriano também pode ser um potencial mecanismo de ação (WENDAKOON; SAKAGUCHI, 1995).

O estudo apropriado da química e farmacologia de produtos naturais e seus derivados, como os óleos essenciais, se apresentam como um instrumento relevante de investigação de suas propriedades. Entre os óleos essenciais estudados, destaca-se o óleo essencial de *Citrus limon* (limão).

3.5.1 *Citrus limon*

Citrus limon, limão siciliano, é o fruto do limoeiro, árvore da família Rutaceae, que é originário da região sudeste da Ásia. A família Rutaceae possui cerca de 150 gêneros e

2000 espécies, amplamente distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios. Este possui as seguintes sinônimas: *Citrus limonelloides*, *Citrus medica* var. *limon*, *Citrus limonum*, *Citrus aurantifolia*, *Citrus latifolia*, *Citrus limon* var. *rajahmudri*, *Citrus limonia* var. *digitata*, *Citrus limonia* var. *limetta* (BELLETTI et al., 2004; LUZIA; JORGE, 2009).

Árvore perenifólia, pequena de 3-6 metros de altura, com numerosos ramos e espinhos. Folhas unifolioladas de cor verde, formato lanceolada, elíptico-ovada de 6-12,5 cm de comprimento e 3-6 cm de largura, ponta obtusa, margem serreada-dentada, pecíolo curto e extensamente alado. As flores são brancas, reunidas em inflorescências com 2 a 20 unidades. Os frutos têm forma oblonga, com casca amarela e esponjosa. A casca é verde-clara ou amarela quando o fruto amadurece (Figura 3). Originário da Índia ou da Malásia, o limão foi introduzido na Assíria e de lá passou para a Grécia e Roma. Depois se espalhou pelo norte da África e Europa antes do descobrimento da América. Os portugueses o trouxeram para o Brasil. Hoje é amplamente cultivado no norte da África, Itália e Espanha. O Brasil se destaca como o segundo maior produtor de frutos cítricos e o maior exportador de sucos cítricos (LUZIA; JORGE, 2009).

Em estudos fitoquímicos desta espécie observou-se a presença de compostos flavonóides, terpenóides, além dos ácidos: cítrico, málico, oxalílico e ascórbico (vitamina C). Suas sementes são fontes inexploradas de óleo essencial que pode alcançar 55% de rendimento. Embora as frutas frescas e os sucos sejam os principais produtos comerciais das frutas cítricas, seus óleos essenciais são usados como ingredientes na indústria farmacêutica, bem como na perfumaria. Na indústria de alimentos, o óleo essencial e essências derivadas de suas concentrações são amplamente utilizados como realçadores de sabor em refrigerantes e bebidas alcoólicas (BELLETTI et al., 2004).

Figura 3. *Citrus limon*, imagens da planta.



Fonte: http://www.institutohorus.org.br/index.php?modulo=inf_banco_imagens_citrus_limon, acessado em 12 de dezembro de 2011.

Tendo o citral, citronelal, linalol, limonina, pineno, terpineno e limoneno como constituintes químicos do óleo essencial, componentes responsáveis por suas propriedades farmacológicas observadas: antioxidante, anti-inflamatórias, antiparasitária, analgésica, antimicrobiana, anticancerígena e antiviral (GARCIA et al., 1997; LUZIA; JORGE, 2009; LIMA et al., 2006; SÁ et al., 1996; PRABUSEENIVASAN; JAYAKUMAR; IGNACIMUTHU, 2006).

Devido ao grande número de relatos na literatura relacionados à sua atividade antimicrobiana (LIMA et al., 2006; BURT, 2004; PRABUSEENIVASAN; JAYAKUMAR; IGNACIMUTHU, 2006), o óleo essencial de *Citrus limon* foi escolhido para a realização deste estudo.

3.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE ANTIMICROBIANOS

Espécies de *Acinetobacter* têm uma predisposição para a aquisição de múltiplos mecanismos de resistência aos antibióticos, levando a uma dificuldade no que diz respeito ao tratamento das infecções causadas por esta bactéria (TOWNER, 1996).

Uma estratégia empregada para responder aos mecanismos de resistência é o uso combinatório de drogas. Exemplo deste método é a utilização de inibidores de β -lactamases (subactam, tazobactam ou ácido Clavulânico) com drogas β -lactâmicas contra linhagens produtoras destas enzimas. No entanto, o frequente uso do ácido clavulânico, por exemplo, levou ao surgimento de cepas bacterianas resistentes. O aparecimento de β -lactamases de

espectro estendido e resistentes contra as cefalosporinas e os carbapenens exigiu, ainda mais, a necessidade de desenvolver novos inibidores de β -lactamases (HEMAISWARYAA; KRUTHIVENTIB; DOBLE, 2008).

Além de suas propriedades antibacterianas intrínsecas, produtos naturais e seus derivados podem alterar o efeito de antibióticos, seja aumentando a atividade antimicrobiana ou revertendo à resistência aos antibióticos convencionais. A utilização destas substâncias pode representar um avanço contra os mecanismos de resistência que inativam antibióticos (CASTRO, 2010).

Zago et al. (2009) destacam a possibilidade do uso de produtos naturais combinados aos antibacterianos tradicionais, no intuito de aumentar o potencial antimicrobiano das drogas. Os autores relataram que mesmo produtos naturais que apresentam um efeito antimicrobiano não tão eficiente, quando associados aos produtos sintéticos apresentam sinergismo.

Assim, o estudo e a descoberta de produtos naturais com princípios ativos que apresentem atividade antimicrobiana intrínseca ou combinada com antibióticos de uso comum podem representar uma nova forma de fazer frente aos microrganismos multidroga resistentes, além de impedir o contato destes com os produtos sintéticos, diminuindo o risco de se selecionar novos ou melhores mecanismos de resistência. Dessa forma, pode-se direcionar a indústria farmacêutica de forma a favorecer a produção e o uso de fitoterápicos como adjuvantes para o combate aos agentes infecciosos (COUTINHO, 2008).

Além da associação dos produtos naturais com os antibióticos convencionais, estudos tem demonstrado que estes também podem ser combinados para intensificação dos seus efeitos antimicrobianos. Bayati (2008) observou que quando combinados os óleos essenciais e os extratos de metanólicos de *Thymus vulgaris* e de *Pimpinella anisum* demonstraram um efeito aditivo na ação contra os patógenos testados, incluindo a *Pseudomonas aeruginosa*.

Várias pesquisas têm focado na utilização dos produtos naturais com relação à modificação da resistência aos antimicrobianos ou como potencializadores dos efeitos antimicrobianos dos antibióticos convencionais (RODRIGUES; COSTA; COUTINHO, 2009; COUTINHO et al., 2008; COUTINHO et al., 2010; PALANIAPPAN; HOLLY, 2010). No entanto, estudos de produtos naturais com antibióticos convencionais frente linhagens multidroga resistentes são escassos na literatura.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DO TRABALHO

Os ensaios laboratoriais foram realizados no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. A análise do óleo essencial foi realizada no Laboratório Unificado de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos do Departamento de Ciências Farmacêuticas no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

4.2 MATERIAL BOTÂNICO

O óleo essencial de *Citrus limon* foi adquirido na Indústria Ferquima Ind. e Com. Ltda (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil), sendo seus parâmetros físico-químicos descritos pelo fornecedor, que produz e comercializa os óleos essenciais em escala industrial. A emulsão do óleo foi obtida seguindo as proporções sugeridas pelo protocolo recomendado por Allegrini, Bouchberg e Maillols (1973).

4.3 MICRORGANISMO

As cepas de *Acinetobacter* spp. com seus respectivos perfis de resistência antimicrobiana através do método de difusão com discos (CLSI, 2008), foram disponibilizadas pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

4.4 MEIOS DE CULTURA

Na execução dos testes para avaliação da atividade antibacteriana dos produtos, os meios de cultura utilizados foram o ágar e o caldo Mueller-Hinton e o BHI (caldo de infusão de cérebro e coração) (DIFCO - Laboratories Co./USA/France). O preparo destes meios seguiu as instruções do fabricante e foram distribuídos em balões e/ou tubos de ensaios adequados para os ensaios microbiológicos.

4.5 INÓCULO

Para o inóculo, as cepas selecionadas foram mantidas no meio de cultura, durante 24-48 horas a 35-37 °C. O mesmo foi preparado e padronizado em solução fisiológica (0.85 %) esterilizada, comparando-se com uma suspensão de sulfato de bário e ácido sulfúrico do tubo nº 0,5 da escala Mc Farland, obtendo-se aproximadamente, 10^8 UFC/mL (BAUER; KIRBY; TURCK; 1966; CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000).

4.6 METODOLOGIA

4.6.1 Análise dos componentes do óleo essencial:

Para este teste foi utilizado um Cromatógrafo Gasoso (CG) da Shimadzu, modelo GC17-A, com sistema equipado com um Espectrômetro de Massa (EM). A coleta de dados e integração foi realizada com o software Class5000. A fase móvel composta de hélio e bombeada na vazão de 1,6 mL/min com split 1:5.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). A temperatura do forno da coluna foi programada para passar de uma temperatura inicial de 60 °C a 105 °C a 5 °C/min, de 105 °C a 190 °C a 10 °C/min e de 190 °C a 280 °C a 20 °C/min. A temperatura do injetor e do detector foram 260 e 280 °C, respectivamente. O tempo total foi de 22 minutos e o volume de injeção foi 1,0 µL.

A identificação dos constituintes do óleo essencial foi efetuada junto ao sistema de computação e processamento de dados (*workstation*) interligado ao CG-EM. O sistema é equipado com uma biblioteca Wiley, 6ª Edição da classe-5000, 1999, com 229,119 espectros.

4.6.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

A determinação da CIM foi realizada através da técnica da Microdiluição em Placa de 96 orifícios e fundo em “U” com tampa (INLAB/Indústria Brasileira). Nas citadas placas, esterilizadas, foi distribuído, inicialmente, 100 µL de caldo Mueller Hinton, duplamente concentrado, a partir da primeira coluna (1) até a última (12). Em seguida, foram distribuídos 100 µL do óleo essencial selecionado, na concentração inicial estabelecida de 10000 µg/mL, e duplamente concentrado, na primeira linha das cavidades- A até H. E a partir

da concentração inicial, foram feitas as diluições seriadas à razão de 2 até a antepenúltima linha, obtendo-se as concentrações de 10000 a 20 µg/mL. As linhas 11 e 12 foram reservadas, respectivamente, para os controles do crescimento microbiano no meio de cultura na ausência do óleo essencial e do controle de esterilidade do meio (ELOFF, 1998; CLEELAND; SQUIRES, 1991).

O ensaio foi realizado em duplicata e incubado a 35-37 °C durante 24-48 horas. Após o tempo de incubação adequado dos ensaios com as bactérias, foi realizada a primeira leitura dos resultados. Em seguida, foram adicionados 20 µL da solução de resazurina sódica (0,01%; p/v) (SIGMA), reconhecido como indicador colorimétrico de óxido-redução para bactérias. Foi feita uma nova incubação a 35-37 °C. A leitura se procedeu, visualmente, pela ausência ou presença de crescimento do microrganismo pela formação de aglomerado de células (botão). E também pela observação da mudança da coloração da solução, de azul para rosa, indicando crescimento do mesmo. Portanto, foi determinada como CIM, a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento do microrganismo ensaiado, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador (ALLEGRINI; BOUCHBERG; MAILLOLS, 1973; MANN e MARKHAM, 1998; PALOMINO et al., 2002).

Óleos essenciais com CIM até 500µg/mL são considerados com forte atividade antimicrobiana, com CIM entre 600 e 1600µg/mL possuem atividade moderada e CIM acima de 1600µg/mL é considerado com atividade fraca (SARTORATTO et al., 2004).

4.6.3 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM):

Após a leitura dos resultados, foram feitos inóculo (10 µL) de três diluições a partir da CIM para o meio de caldo Mueller-Hinton (100 µL/cavidade) em placa de microdiluição esterilizada (DISPOPETRI/Indústria Brasileira/90 X 15 mm) para a determinação da CBM. Após a incubação a 35 °C por 24 horas foi adicionado 20 µL de resazurina. Os ensaios foram incubados a temperatura de 35°C por mais 24 horas para confirmação da concentração capaz de inibir o crescimento total das espécies bacterianas, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador (MANN; MARKHAM, 1998; PALOMINO et al., 2002).

4.6.4 Cinética de morte bacteriana:

A cinética de morte de *Acinetobacter* frente ao óleo essencial foi realizada de acordo com trabalho de Klepser et al. (1998), com algumas modificações. A cepa 004, escolhida aleatoriamente, foi cultivada em meio Agar Mueller Hinton (AMH) 24 horas antes do teste. Colônias oriundas da cultura em AMH foram suspensas em NaCl 0,9% e turvação ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL). Logo, foram adicionados 0,5 mL da suspensão bacteriana em 4,5 mL de caldo Mueller Hinton com ou sem o óleo essencial nas várias concentrações apropriadas (CIM/2, CIM e CIM x 2). Logo, as culturas foram incubadas a 37°C. Em vários períodos de tempo (0, 2, 4, 8 e 24 horas) uma alíquota de 1 µL de cada diluição foi removida e semeada em placas com Ágar Mueller Hinton. As placas foram incubadas a 37°C por 24-48 horas e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi contado. O limite mínimo de detecção deste método é 1000 UFC/mL (KLEPSETER et al., 1998).

O $\log_{10}$ UFC/mL foi plotado em um gráfico em função do tempo para verificar a taxa e a extensão de atividade antibacteriana em várias concentrações do óleo essencial. Foi considerada atividade bactericida quando houve uma diminuição maior ou igual a 3 $\log_{10}$ UFC/mL do inóculo inicial, o que resultou em uma redução de 99,9% ou mais em UFC/mL em 24 – 48 horas comparado com o inóculo inicial. Uma atividade menor do que a descrita foi considerada bacteriostática (KLEPSETER et al., 1998).

4.6.5 Ensaio de modulação dos compostos sobre os antibióticos convencionais:

Para a avaliação da interferência do óleo essencial sobre a resistência antibiótica foi utilizados antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) e antibióticos da classe dos carbapenens (imipenem e meropenem), a CIM destes antimicrobianos foram avaliados na presença e na ausência do óleo essencial em microplacas estéreis. Todos os antibióticos testados foram obtidos junto a Sigma.

O óleo essencial foi misturado em caldo BHI 10% em concentrações subinibitórias (aproximadamente CIM/8). As soluções dos antibióticos foram preparadas com água destilada estéril em concentrações dobradas em relação a concentração inicial definida e

volumes de 100 µL foram diluídas seriadamente 1:1 em caldo BHI 10%. Em cada cavidade com 100 µL do meio de cultura terá 10 % da suspensão bacteriana. Utilizaram-se os mesmos controles que foram usados para avaliação da CIM. As placas preenchidas foram incubadas a 35 °C por 24 horas e a leitura evidenciada pelo uso de resazurina sódica como citado anteriormente (COUTINHO, 2008).

4.6.6 Ensaio de associação dos óleos essenciais com antibióticos convencionais frente *Acinetobacter* spp.:

As soluções dos óleos essenciais e dos antibióticos foram preparadas com água destilada estéril em concentrações dobradas (2500 µg/mL) em relação à concentração inicial definida e volumes de 100 µL foram diluídos seriadamente 1:1 em caldo BHI 10%. Em cada cavidade com 100 µL do meio de cultura teve 10 % da suspensão bacteriana. Cada microplaca estéril foi preenchida no sentido vertical e horizontal com um óleo essencial e um antibiótico por vez para a obtenção do índice de Concentração Inibitória Fracionada (índice CIF) e o crescimento bacteriano foi evidenciado pelo uso da resazurina. As placas preenchidas foram incubadas a 35 °C por 24 horas.

O índice CIF foi calculado através da soma do $CIF^A + CIF^B$, onde A representa o antibiótico e B o óleo essencial em teste. O CIF^A , por sua vez, será calculado pela relação CIM^A combinado/ CIM^A sozinho, enquanto que o $CIF^B = CIM^B$ combinado/ CIM^B sozinho. Este índice foi interpretado da seguinte maneira: sinergismo (< 0.5), aditividade (0,5 – 1,0), indiferença (>1,0) ou antagonismo (>4,0) (ELIOPOULOS; MOELLERING, 1991).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL

Os fitoconstituintes e seus respectivos percentuais na composição do óleo essencial estão expostos na tabela 1. A análise CG-EM resultou na identificação de 10 componentes. Entre os fitoconstituintes, o neral se apresentou como o componente majoritário do óleo essencial de *C. limon* com 29,4% do total de constituintes presentes, seguido pelo limoneno (21,5 %), do geranial (19,9%), nerolidol (7,7%) e o citral (6,4%) em ordem decrescente de percentual.

Tabela 1. Composição química (%) do óleo essencial de *C. limon*.

Composto	Tempo de retenção (min)	Área	% na formulação
Alpha-Pineno	3.581	1033068	2,4
Beta-Pineno	4.231	2080844	4,8
Limoneno	5.217	9419960	21,5
Carenol	8.098	1850221	4,2
Myrtenal	9.198	755630	1,7
Myrtenol	9.510	890119	2,0
Neral	10.132	12851041	29,4
Citral	10.391	2795549	6,4
Geranial	10.723	8716455	19,9
Nerolidol	13.085	3370031	7,7

Fisher e Phillips (2006) isolaram o limoneno como principal fitoconstituente, seguido pelo citral e o nerolidol. Em outros relatos da literatura observou-se também o limoneno como composto majoritário, no entanto, este foi seguido pelo aldeído citral e seus estereoisômeros neral e geranial (MOUFIDA; MARZOUK, 2003). O citral tem se destacado como o componente ativo dos óleos essenciais cítricos contra patógenos (CACCIONI et al., 1998; MOLINA et al., 2010).

Essas variações na composição qualitativa e quantitativa dos óleos essenciais podem ocorrer, já que pode ser influenciada pelas condições climáticas, posição geográfica da região de crescimento, agrotecnologia de cultivo, técnica de extração aplicada, bem como o

estágio de maturação da planta no momento da colheita, também dependem de fatores genéticos (CASTRO, 2006).

5.2 DETERMINAÇÃO DA CIM E CBM

O termo multidroga resistente refere-se às cepas *Acinetobacter* spp. resistentes a pelo menos três classes de antibióticos que poderiam ser úteis no tratamento de infecções por este agente, por exemplo, quinolonas, cefalosporinas e carbapenens (MUNOZ-PRICE; WEINSTEIN, 2008; FALAGAS; BLIZIOTIS; SIEMPOS, 2006). Dadas essas premissas, pode-se afirmar que as 24 linhagens utilizadas neste trabalho são multidroga resistentes. Isto pode ser visto no Quadro 1, onde é demonstrado o perfil de sensibilidade das cepas de *Acinetobacter* spp. aos antimicrobianos de acordo com o CLSI, 2008. Os mecanismos de resistência descritos para *Acinetobacter* spp. aos antibacterianos incluem a produção de β -lactamases e enzimas modificadoras aminoglicosídeos, alterações quantitativas e qualitativas das porinas da membrana externa, mutações nas topoisomerasas e bombas de efluxo (BONOMO; SZABO, 2006).

As determinações dos valores de CIM e CBM do óleo essencial de *C. limon* foram realizadas pelo método de microdiluição. Os seus respectivos valores, bem como os referentes controles realizados encontram-se sumarizados na tabela 2. Como pode ser visualizado, o óleo essencial de *C. limon* inibiu o crescimento de 16 (67%) das 24 cepas ensaiadas, tendo sua CIM estabelecida em 625 $\mu\text{g/mL}$ e em 1250 $\mu\text{g/mL}$ para o restante das outras linhagens. Em termos gerais, todo o experimento mostrou que os valores de CBM foram sempre duas vezes acima dos respectivos valores de CIM para todas as cepas ensaiadas. Por possuir uma CIM estabelecida em 625 $\mu\text{g/mL}$ pode-se considerar que o presente óleo essencial possui um efeito antimicrobiano moderado. Todas as cepas bacterianas foram capazes de crescer em caldo Mueller Hinton sem adição do óleo essencial, o que caracteriza sua viabilidade (controle de microrganismo). Da mesma forma, um controle de esterilidade foi realizado para certificar que o caldo Mueller Hinton utilizado nos ensaios não estava contaminado com microrganismos, o que inviabilizaria a execução dos testes caso houvesse crescimento microbiano de qualquer natureza.

Sabe-se que as plantas têm sido fonte de muitas drogas aplicadas nos procedimentos clínicos. Na natureza, os óleos essenciais estão envolvidos em muitas ações importantes mostrando um papel relevante na proteção das plantas contra agentes antimicrobianos e inseticidas (BAKKALI et al., 2008). Por muito tempo tem sido reconhecido

que alguns óleos essenciais têm propriedades antimicrobianas e estas características estão possivelmente relacionadas à função desses compostos nas próprias plantas (BURT, 2004).

Os resultados, obtidos neste trabalho, apresentam coerência com os resultados observados por Sá et al. (1996) no qual o óleo essencial de *C. limon* inibiu o crescimento de cepas ensaiadas. E se mostraram superiores aqueles registrados por Araújo (2003) onde o referido óleo foi ativo sobre apenas 40 % dos microrganismos ensaiados.

No entanto, Prabuseenivasan, Jayakumar e Ignacimuthu (2006) observaram a atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. limon* sobre bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Kebsiella pneumoniae*, cujos resultados foram melhores aos obtidos no presente estudo, com a CIM estabelecida em 312 µg/mL.

Quadro 1. Perfil de resistência fenotípico das espécies de *Acinetobacter*.

Cepas	Amicacina	Ampicilina Ác. Clavulânico	Ciprofloxacino	Levofloxacino	Cefepime	Ceftazidima	Polimixina	Imipenem	Meropenem	Piperacilina - Tazobactam	Tigeciclina
A-02	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S
A-03	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
A-04	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
A-05	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
A-06	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
A-08	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
A-10	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
A-11	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
A-13	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
A-15	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
A-19	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
A-20	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
A-21	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
A-22	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
A-23	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
A-24	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
A-25	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
A-26	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
A-30	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
A-32	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
A-34	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
A-36	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
A-38	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
A-44	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R

R = resistente; S = sensível.

Tabela 2. Atividade inibitória do óleo essencial de *Citrus limon* contra cepas de *Acinetobacter*.

Cepas	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	Controles	
			Microrganismo	Esterilidade
A-02	625	1250	+	-
A-03	625	1250	+	-
A-04	1250	2500	+	-
A-05	1250	2500	+	-
A-06	625	1250	+	-
A-08	625	1250	+	-
A-10	625	1250	+	-
A-11	625	1250	+	-
A-13	625	1250	+	-
A-15	625	1250	+	-
A-19	625	1250	+	-
A-20	625	1250	+	-
A-21	625	1250	+	-
A-22	625	1250	+	-
A-23	1250	2500	+	-
A-24	1250	2500	+	-
A-25	625	1250	+	-
A-26	625	1250	+	-
A-30	625	1250	+	-
A-32	625	1250	+	-
A-34	1250	2500	+	-
A-36	1250	2500	+	-
A-38	1250	2500	+	-
A-44	1250	2500	+	-

+: presença de crescimento do microrganismo; -: ausência de crescimento de microrganismos;

5.2 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE MORTE MICROBIANA

O método experimental de cinética de morte é utilizado na determinação da viabilidade dos microrganismos, após terem sido expostos ao óleo essencial em estudo por tempo determinado (MAY et al., 2000), e para tal fim, é realizado a contagem de células viáveis, verificando se a droga analisada possui ação bactericida ou bacteriostática, este estudo é importante por poder analisar a interação entre o microrganismo e a substância testada, e caracterizar a relação entre a concentração e a atividade ao longo do tempo (KLEPSEK et al 1997).

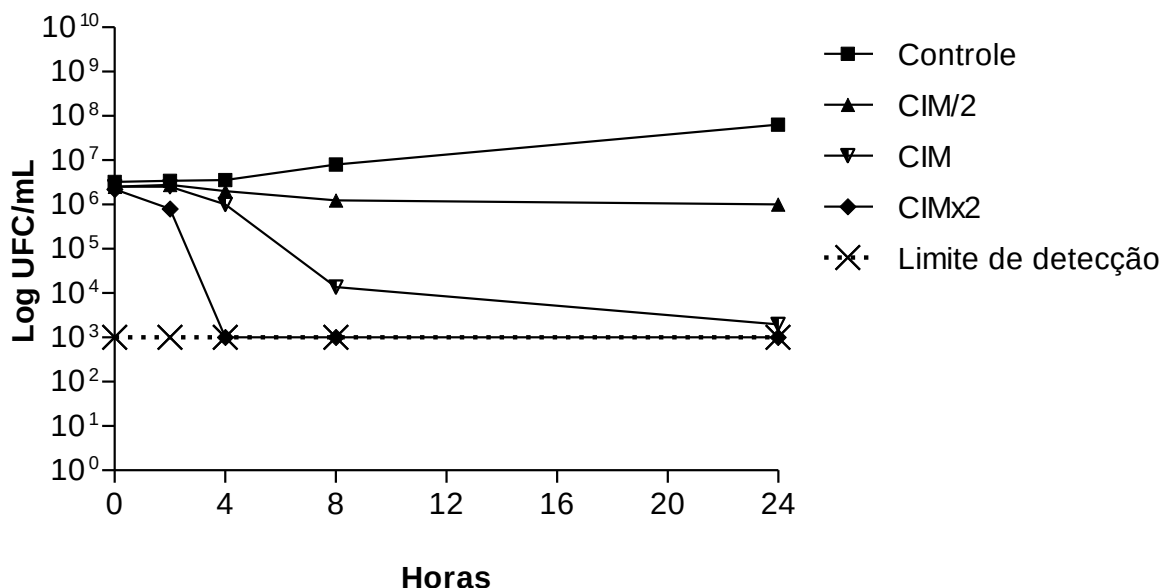
Tradicionalmente a seleção de um antimicrobiano assim como sua dose é baseada na medida laboratorial *in vitro* da Concentração Inibitória Mínima (CIM). A curva resultante do tempo de morte descreve uma interação entre a bactéria e o antimicrobiano como uma interação dinâmica da concentração e do tempo, em contraste com a CIM que demonstra o efeito do antimicrobiano em uma única concentração (MUELLER; DE LA PENA; DERENDORF, 2004).

Estudos da cinética de morte microbiana são comumente usados em investigações de novos agentes antimicrobianos, devido a estes serem relativamente de fácil execução e economicamente viáveis (TAM; SCHILLING; NIKOLAOU, 2005). Onde este relaciona a inibição do crescimento do microrganismo quando exposto a várias concentrações da droga ao longo do tempo, mostrando, se o mesmo, tem ação bactericida ou bacteriostática.

Observa-se a cinética bacteriana frente ao óleo essencial de *C. Limon* (figura 4). Nota-se que a 625 µg/mL(CIM) até às 8 horas e a CIM/2 até às 24 horas mostraram atividade bacteriostática, pois houve uma diminuição menor do que 3 log₁₀UFC/mL do inóculo inicial. Porém, no tempo de 24 horas, em uma concentração de CIM, foi verificada atividade bactericida e na concentração de CIM x 2, a partir de um tempo de 24 horas, também se observou o mesmo efeito, pois houve uma diminuição maior ou igual a 3 log₁₀UFC/mL ou 99,9% do inóculo inicial.

Observou-se na cinética de morte microbiana que na medida em que se aumenta a concentração e o tempo de exposição do óleo essencial ocorre um aumento de sua atividade antibacteriana frente à cepa de *Acinetobacter* spp., passando de um efeito bacteriostático para um efeito bactericida, assim o óleo essencial de *C. limon* possui uma atividade antibacteriana dependente de sua concentração.

Figura 4. Curva de tempo de morte bacteriana da cepa A-04 de *Acinetobacter* causada pelo óleo essencial de *C. limon*.



Higgins, Colemanb e Amyes (2000) em estudo comparativo de várias quinolonas contra cepas do gênero *Acinetobacter*, verificaram o mesmo comportamento para os antibióticos. Experimento realizado por Owen et al. (2007) utilizando colistina contra cepas *A. baumannii* mostrou atividade bactericida concentração-dependente extremamente rápida contra estas.

Outros óleos essenciais como o da *Lippia javanica* e o da *Melaleuca alternifolia* demonstraram também ser concentração – dependentes contra os respectivos microrganismos ensaiados (*Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus cereus*) (VILJOEN et al., 2005; MAY et al., 2000).

Essa caracterização do tempo de morte de um microrganismo é muito importante, pois possui implicações terapêuticas valiosas, como o ajuste da dose para tornar o tratamento mais eficaz, pois quando a CIM do antimicrobiano é atingida no local da infecção, o comportamento *in vivo* se assemelha com o comportamento *in vitro*, evitando dessa forma, efeitos tóxicos para o paciente em muitos casos, quando se utiliza drogas com ação bacteriostática (KOWALSKI et al., 2001; BARROS et al., 2009). Desta forma, agentes cuja atividade aumenta com o aumento da concentração, podem ser otimizados pela administração de grandes doses (ERNST et al., 1996). Como demonstrado neste trabalho, o aumento da

concentração do óleo essencial de *C. limon* implica no aumento da sua atividade antimicrobiana.

5.4 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO

Uma recente atenção clínica tem incidido sobre a frequência cada vez maior de espécies patogênicas de *Acinetobacter* responsáveis por infecções hospitalares e como patógenos emergentes que frequentemente causam enfermidades em pacientes em Unidades de Terapia Intensiva. Os principais mecanismos de resistência aos carbapenems são a produção de carbapenemases e a expressão diminuída de proteínas de membrana externa. Já para os aminoglicosídeos, a bomba de efluxo ABC e as Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos (EMAs) são responsáveis pela resistência a estas drogas em *Acinetobacter* (BONOMO; SZABO, 2006). Como são os antibióticos mais utilizados na prática clínica para tratamento de infecções causadas por espécies multirresistentes de *Acinetobacter*, foram também os antibióticos de escolha para o estudo.

A adição do óleo essencial de *C. limon* (OECL) no meio de crescimento em uma concentração subinibitória 156,25 µg/mL (CIM/8) resultou na diminuição da CIM da amicacina de 625 µg/mL para 312,5 µg/mL; da CIM do imipenem de 625 µg/mL para 312,5 µg/mL; da CIM do meropenem de 312,5 µg/mL para 78,125 µg/mL, como demonstrado na tabela 3. No entanto, não foi observado efeito sobre a CIM da gentamicina (Tabela 3).

Estudo conduzido por Palaniappan e Holley (2010) demonstrou efeito modulador de vários componentes dos óleos essenciais para alguns antibióticos contra linhagens de *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Rodrigues, Costa e Coutinho (2009) trabalhando com o óleo essencial derivado da espécie de *Croton zehntneri*, verificaram também efeito modulador derivado da combinação deste óleo essencial com a gentamicina contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Matias et al. (2010) demonstraram potencialização do efeito antimicrobiano da combinação entre os extratos hexano e metanólico da *Cordia verbanacea* com aminoglicosídeos contra cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

No entanto, McMahon et al. (2008) observaram que aplicação do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* em concentrações sub-inibitórias reduziu eficácia dos antibióticos tópicos utilizados com o referido óleo em terapias combinatórias.

Os mecanismos pelos quais os óleos essenciais podem inibir microrganismos envolvem diferentes modos de ação, e em parte pode ser devido à sua hidrofobicidade. Como resultado, eles se particionam na bicamada lipídica da membrana celular, afetando a cadeia respiratória e levando à liberação de conteúdo vital à célula (NICOLSON; EVANS; O'TOOLE, 1999; BURT, 2004). Vários componentes dos óleos essenciais podem permeabilizar a membrana celular, aumentando a penetração dos antibióticos. A interferência nos sistemas enzimáticos bacterianos também pode ser um potencial mecanismo de ação. Estes mecanismos de ação podem ser obtidos pela combinação do antibiótico convencional com o óleo essencial, em concentração subinibitória, aplicado diretamente ao meio de cultura (WENDAKOON; SAKAGUCHI, 1995).

Tabela 3. Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos aminoglicosídeos e carbapenens na presença e na ausência do óleo essencial (OE) de *C. limon* contra *Acinetobacter* spp., cepa A-06.

<i>Acinetobacter</i> -06		
Antibiótico	CIM* sozinho	CIM* combinado
OE <i>Citrus limon</i>	1250	-
Amicacina	625	312,5
Gentamicina	9,7656	9,7656
Imipenem	625	312,5
Meropenem	312,5	78,125

*CIM: Concentração Inibitória Mínima em $\mu\text{g/mL}$

Na tabela 4, observam-se os resultados da combinação do antibiótico e o óleo essencial de *C. limon* (OECL). Um efeito sinérgico foi observado com a combinação do OECL com a amicacina, tendo como resultado o índice CIF (Concentração Inibitória Fracionada) igual a 0,037. Um efeito aditivo foi verificado com a combinação do OECL e a gentamicina, sendo o índice CIF determinado igual a 0,5. A combinação do OECL e imipenem e meropenem mostrou índice CIF de 2 e 2, respectivamente.

Tabela 4. CIM dos antibióticos e efeito combinado com óleo essencial de *C. limon* (OECL) contra *Acinetobacter* spp., cepa A-06.

Antibiótico + OECL	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Índice CIF (Tipo de interação)
OECL	1250	-
Amicacina	625	-
Gentamicin	39	-
Imipenem	≥ 2500	-
Meropenem	625	-
OECL/ amicacina	9,7 / 19,5	0,037 (sinergismo)
OECL/ gentamicina	9,7 / 19,5	0,5 (aditividade)
OECL/ imipenem	1250 / ≥ 2500	2 (indiferente)
OECL/ meropenem	1250 / 625	2 (indiferente)

OECL: Óleo essencial de *C. limon*. CIF: Concentração Inibitória Fracionada. CIM: Concentração Inibitória Mínima

Observou-se em estudos na literatura efeitos semelhantes utilizando-se produtos naturais em combinação com antibióticos convencionais. Coutinho et al. (2010) observaram efeito aditivo quando combinaram o extrato etanólico de *Hyptis martiusii* com aminoglicosídeos contra cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. Já o extrato etanólico de *Momordica charantia* L. demonstrou efeito sinérgico quando combinados com a Canamicina e aditivo quando associados com a amicacina e a neomicina (COUTINHO et al., 2009).

O aumento da atividade antimicrobiana ou a reversão da resistência bacteriana ao antibiótico por componentes não convencionais, classifica estes compostos como modificadores da atividade antibiótica (COUTINHO et al., 2010).

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- O fitoconstituente majoritário do óleo essencial de *Citrus limon* foi o neral com 29,4% do total de constituintes presentes, seguido pelo limoneno (21,5 %), geranial (19,9%), nerolidol (7,7%) e o citral (6,4%) em ordem decrescente de percentual.
- O óleo essencial de *C. limon* inibiu o crescimento de 16 (67%) das 24 cepas ensaiadas, tendo sua CIM estabelecida em 625 µg/mL e em 1250 µg/mL para o restante das outras linhagens.
- Em termos gerais, todo o experimento mostrou que os valores de Concentração Bactericida Mínima foram sempre duas vezes acima dos respectivos valores de CIM para todas as cepas ensaiadas.
- O óleo essencial de *C. limon* possui atividade antibacteriana moderada contra cepas multidroga resistentes de *Acinetobacter* spp.
- O óleo essencial de *C. limon* possui uma atividade antibacteriana dependente de sua concentração e do tempo de exposição no microrganismo.
- O óleo essencial de *C. limon* é um modulador da ação dos antibióticos e na sua associação com amicacina observa-se um efeito sinérgico; já na combinação do referido óleo com a gentamicina verifica-se um efeito aditivo.
- Diante da ampla importância clínica e epidemiológica das infecções hospitalares ocasionadas por espécies de *Acinetobacter* os resultados deste trabalho sugerem que o óleo essencial de *C. limon* pode inibir o crescimento de espécies de *Acinetobacter* e poderia ser utilizado como fonte de metabólitos modificadores da atividade antibacteriana, com intuito de serem utilizados como adjuvantes para terapia antimicrobiana contra este patógeno.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 1995.

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-89, 2006.

ALLEGRINI, J.; BOUCHBERG, M. S.; MAILLOLS, H. Émulsions d'huiles essentielles fabrication et applications en microbiologie. **Société de Pharmacie de Montpellier**, v. 33, p. 86, 1973.

Alvos das drogas antimicrobianas. Disponível em: http://www.wiley.com/college/pratt/0471393878/student/activities/bacterial_drug_resistance/index.html, acessado em 12 de Dezembro de 2011.

ARAÚJO, J. C. L. V. **Perfil de sensibilidade de microrganismos oportunistas de origem clínica e ambiental a óleos essenciais**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2003.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARROS, J. C.; CONCEIÇÃO, M. L.; NETO, N. J. G.; COSTA, A. C. V.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; BASÍLIO JÚNIOR, I. D.; SOUZA, E. L. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **Food Science Technology**, v. 42, p. 1139-1143, 2009.

BAUER, A. W. M. M.; KIRBY, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p. 493-496, 1966.

BAYATI, F. A. A. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 403–406, 2008.

BELLETTI, N.; NDAGIJIMANA, M.; SISTO, C.; GUERZONI, M. E.; LANCIOTTI, R.; GARDINI, F. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Citrus Essences on *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6932-6938, 2004.

BERGOGNE – BÉRÉZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, p. 148-165, 1996.

BONOMO, R. A.; SZABO, D. Mechanisms of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infection Diseases**, v. 43, p. 49-56, 2006.

BOUVET, P. J. M.; GRIMONT, P. A. D. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **International Journal System Bacteriology**, v. 36, p. 228-240, 1986.

BOUZA, E.; GARROTE, F. G.; CERCENADO, E.; MARIN, M.; DIAZ, M. S.; SANCHEZ, R, I.; VIDEL, A. *Pseudomonas aeruginosa*: a multicenter study in 136 hospitals in Spain. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 16, p. 41-52, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília, DF, 2006.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

CACCIONI, D. R. L.; GUIZZARDI, M.; BIONDI, D. M.; RENDA, A.; RUBERTO, G. Relationship between volatile components of citrus essential oils and antimicrobial action on

Penicillium digitatum and *Penicillium italicum*. **International Journal Food Microbiology**, v. 43, p. 73–79, 1998.

CASTRO, N. E. A. **Caracterização e fitoquímica de óleos essenciais de eucalipto e seu efeito sobre o protozoário tripanosomatídeo *Herpetomonas samuelpessoai***. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2006.

CASTRO, R. D. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (canela) e de sua associação com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Candida***. Tese de doutorado. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2010.

CISNEROS, J. M.; BAÑO, J. R. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. **Clinical Microbiology Infection**, v. 8, p. 687-693, 2002.

Citrus limon – figura ilustrativa. Disponível em: http://www.institutohorus.org.br/index.php?modulo=inf_banco_imagens_citrus_limon, acessado em 12 de dezembro de 2011.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “in vitro” and experimental animal infection. In: **Antibiotics in laboratory medicine**. Baltimore: Willians & Wikins, 1991, p. 739-788.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement M100-S18**. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute. 2008.

CORBELLA, X.; ARIZA, J.; ARDANUY, C.; VUELTA, M.; TUBAU, F.; SORA, M.; PUJOL, M.; GUDIOL, F. Efficacy of sulbactam alone and in combination with ampicillin in nosocomial infections caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 793-802, 1998.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; FALCAO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P. *In vitro* interference of *Momordica charantia* in the resistance to aminoglycosides. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, p. 1056–1059, 2009.

COUTINHO, H. D.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; SILVA, V. S. F.; SIQUEIRA- JÚNIOR J. P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, p. 328–330, 2008.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SILVA, V. S. F.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; LIMA, E. O. *In vitro* additive effect of *Hyptis martiusii* in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, p. 1002–1006, 2010.

CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L. De aromas, insetos e plantas. **Ciência Hoje**, v. 4, p. 54-63, 1986.

DAVIS, K. A.; MORAN, K. A.; MCALLISTER, C. K.; GRAY, P. J. Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. **Emergence Infection Diseases**, v. 11, p. 1218, 2005.

DIJKSHOORN, L.; VAN AKEN, L.; VAN DER REIJDEN, T. J. K.; BERNARDS, A. T.; NEMES, A.; TOWNER, K. J. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *acinetobacter* spp in faecal samples from non-hospitalised individuals. **Clinical Microbiology Infection**, v. 11, p. 329-332, 2005.

DUARTE, M. C.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.; DELARMELINA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-11, 2005.

ELIOPOULOS, G.M.; MOELLERING, R.C. Antimicrobial combinations, In: **Antibiotics in laboratory medicine**. Baltimore: Willians & Wikins, 1991, p. 434–441.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimum inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medical**, v. 64, p. 711-713, 1998.

ERNST, M. E.; KLEPSE, M. E.; WOLFE, E. J.; PFALLER, M. A. Antifungal dynamics of LY 303366, an investigational echinocandin B analog, against *Candida* spp. **Diagnostic Microbiology Infection Diseases**, v. 26, p. 125-131, 1996.

FALAGAS, M. E.; BLIZIOTIS, I. A.; SIEMPOS, I. I. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. **Critical Care**, v. 10, R48. 2006.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 1232–1240, 2006.

GALES, A. C.; REIS, A. O.; JONES, R. N. Contemporary Assessment of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Polymyxin B and Colistin: Review of Available Interpretative Criteria and Quality Control Guidelines. **Journal Clinical Microbiology**, v. 39, p. 183-190, 2001.

GARCIA, G. O.; CASTILLO, J.; MARIN, F. R.; ORTUNO, A.; DEL RIO, J. A. Uses and properties of *Citrus* flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4505- 4515, 1997.

GARMENDIA G. J. L.; LEYBA, C. O.; MONTERO, G. J.; JIMENEZ, J. F. J.; PAREDES, P.C.; ALMODOVAR, B.A.E.; MINER, G.M.. Risk factors for *Acinetobacter baumannii* nosocomial. **Clinical Infection Diseases**, v. 33, p. 939-46, 2001.

GAYNES, R.; EDWARDS, J. R. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. **Clinical Infection Diseases**, v. 41, p. 848, 2005.

GERNER-SMIDT, P.; TJEMBERG, I.; URSING, J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. **Journal Clinical Microbiology**, v. 29, p. 277-282, 1991.

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

HEMAISWARYAA, S.; KRUTHIVENTIB A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, p. 639–652, 2008.

HIGGINS, P. G.; COLEMANB, K.; AMYES, S. G. B. Bactericidal and bacteriostatic activity of gemifloxacin against *Acinetobacter* spp. in vitro. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p. 71-77, 2000.

HUYS, G.; CNOCKAERT, M.; VANECHOUTTE, M.; WOODFORD, N.; NEMEC, A.; DIJKSHOORN, L.; SWINGS, J. Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals. **Resistance Microbiology**, v. 156, p. 348–355, 2005.

JAWAD, A. H.; SEIFERT, A. M.; SNELLING, J.; HERITAGE HAWKEY, P. M. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. **Journal Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1938-1941, 1998.

JIN, W.; ARAKAWA Y.; YASUZAWA, H.; TAKI, T.; HASHIGUCHI, R.; MITSUTANI, K.; SHOGA, A.; YAMAGUCHI, Y.; KUROSAKI, H.; SHIBATA, N.; OHTA, M.; GOTO, M. Comparative study of the inhibition of metallo- β -lactamases (IMP-1 and VIM-2) by thiol compounds that contain a hydrophobic group. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 851-856, 2004.

JOLY-GUILLOU, M. L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. **Clinical Microbiology Infection Diseases**, v. 11, p. 868-873, 2005.

JONES, R. N.; FERRARO, M. J.; RELLER, L. B.; SCHRECKENBERGER, P. C.; SWENSON, J. M.; SADER, H. S. Multicenter studies of tigecycline disk difusión susceptibility results for *Acinetobacter* spp. **Journal Clinical Microbiology**, v. 45, p. 227-230, 2007.

KLEPSER, M. E., WOLFE, E. J., JONES, R. N., NIGHTINGALE, C. H., PFALLER, M. A. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 41, p. 1392-1395, 1997.

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

KOWALSKI, R. P.; PANDYA, A. N.; KARENCHAK, L. M.; ROMANOWSKI, E. G.; HUSTED, R. C.; RITTERBAND, D. C.; SHAH, M. K.; GORDON, Y. J. An *in vitro* resistance study of levofloxacin, ciprofloxacin, and ofloxacin using keratitis isolates of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Ophthalmology**, v. 108, p. 1826-1829, 2001.

LEVIN, A. S. Multiresistant *Acinetobacter* infections: a role for sulbactam combinations in overcoming an emerging worldwide problem. **Clinical Microbiology Infection**, v. 8, p. 144-153, 2002.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, v. 10, p. 122-129, 2004.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 197-201, 2006.

LOPES, H. V. Tigecycline: a new antimicrobial weapon. **Revista Panamericana Infectologia**, v. 8, p. 45-46, 2006

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Ação antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja sob processo de termoxidação. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, p. 58-63, 2009.

MAGNET, S.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 45, p. 3375– 3380, 2001.

MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious diseases**. New York : Churchill Livingstone, p. 279-306, 1995.

MANIKAL, V. M.; LANDMAN, D.; SAURINA, G.; OYDNA, E.; LAL, H.; QUALE, J. S. O. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. **Clinical Infection Diseases**, v. 31, p. 101, 2000.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.538-544, 1998.

MARKOU, N. H.; APOSTOLAKOS, H.; KOUMOUDIIOU, C.; ATHANASIOU, M.; KOUTSOUKOU, A.; ALAMANOS, I.; GREGORAKOS, L. Intravenous colistin in the treatment of sepsis from multiresistant Gram-negative bacilli in critically ill patients. **Critical Care**, v. 7, p.78-83, 2003.

MASOTTI, V.; JUTEAU, F.; BESSIÈRE, J. M.; VIANO, J. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7115–7121, 2003.

MATIAS, E. F. F.; SANTOS, K. K. A.; ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Enhancement of antibiotic activity by *Cordia verbenaceae* DC. **Latin American Journal Pharmacology**, v. 29, p. 1049-52, 2010.

MAY, J; CHANA, C. H.; KINGA, A.; WILLIAMS, L.; FRENCHA, G. L. Time kill studies of tea tree oils on clinical isolates. **Journal Antimicrobial Chemistry**, v. 45, p. 639-43, 2000.

McLAFFERTY, F. W.; STAUFFER, D. **The Wiley/NBS registry of mass spectral data.** New York: John Wiley Sons, 1989.

MCMAHON, M. A. S.; TUNNEY, M. M.; MOORE, J. E.; BLAIR, I. S.; GILPIN, D. F.; MCDOWELL, D. A. Changes in antibiotic susceptibility in staphylococci habituated to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 263–268, 2008.

MOUFIDA, S.; MARZOUK, B. Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1283-1289, 2003.

MOLINA, E. G.; DOMÍNGUEZ-PERLES, R.; MORENO, D. A.; GARCÍA-VIGUERA, C. Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 327–345, 2010.

MUELLER, M.; DE LA PENA, A.; DERENDORF, H. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill-curves versus MIC. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, p. 369-377, 2004.

MUNOZ-PRICE, L. S.; WEINSTEIN, R. A. *Acinetobacter* Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 1271-81, 2008.

NAKAMURA, C. V.; ISHIDA, K.; FACCIN, L. C.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ D. A. G.; ROZENTAL, S.; SOUZA, W.; UEDA-NAKAMURA, T. In vitro activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species. **Research Microbiology**, v. 155, p. 579-586, 2004.

NICOLSON, K., EVANS, G., O'TOOLE, P.W. Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. **FEMS Microbiology Letter**, v. 179, p. 233–239, 1999.

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by

hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v. 120, p. 308–312, 2010.

OLIVER, A. Resistencia a carbapenemases y *Acinetobacter baumannii*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 22, p. 259-61, 2004.

OWEN, R. J.; JIAN, L.; NATION, R. L.; SPELMAN, D. *In vitro* pharmacodynamics of colistin against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 473-477, 2007.

PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, H.A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 164–168, 2010.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTALES, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 46, p.2720-2722, 2002.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. **Clinical Microbiology Review**, v. 21, p. 538 – 582, 2008.

PEREIRA, A. A. **Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2006.

PEREZ, F.; HUJER, A. M.; HUJER, K. M.; DECKER, B. K.; RATHER, P. N.; BONOMO, R. A. Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, p. 3471–3484, 2007.

PETERSON, A. A.; FESIK, S. W.; MCGROARTY, J. Decreased binding of antibiotics to lipopolysaccharides from polymyxin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 31, p. 230–237, 1987.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 20–51, 2005.

POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC, 2004. p. 75-89.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 6, p. 1-8, 2006.

ROBERTS, S. A.; FINDLAY, R.; LANG, S. D. R. Investigation of an outbreak of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care burn unit. **Journal Hospital Infection**, v. 48, p. 228-32, 2001.

RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. **Phytomedicine**, v. 16, p. 1052–1055, 2009.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência Bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

SÁ, L. D.; PAULO, M. Q.; LIMA, E. O.; XAVIER FILHO, L. Activité antimicrobienne d'huiles essentielles sur les bacteries qui causent la conjunctivite. **Boletim da Sociedade Broteriana**, v. 67, p. 99-103, 1996.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. da UFSC, 2004. Cap. 16, p. 403-434.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; GIANINNI, M. J. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida sp* and *Cryptococcus sp*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 391-397, 2007.

SEIFERT, H.; DIJKSSHOORN, L.; GENER-SMIDT, P.; PELZER, N.; TJERNBERG, I.; VANECHOUTTE, M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. **Journal Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2819-25, 1997.

SHALE, T. L.; STIRK, W. A.; VAN STADEN, J. Screening of medicinal plants used in Lesotho for anti-bacterial and anti-inflammatory activity, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 347-354, 1999.

SHELDON, A. T. Antibiotic resistance: a survival strategy. **Clinical Laboratory Science**, v. 18, p. 170–180, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC, 2004. Cap. 18, p. 467-495.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MARQUESM, O. M. Interference of heating on the antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 418-422, 2008.

TAM, H. V.; SCHILLING, A. N.; NIKOLAOU, M. Modelling time-kill studies to discern the pharmacodynamics of meropenem. **Journal Antimicrobial Chemistry**, v. 55, p. 699-706, 2005.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. São Paulo: Editora Atheneu., p. 573-626, 2001.

TJEMBERG, I.; URSING, J. Clinical strain of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. **APMIS**, v. 97, p. 277-282, 1989.

TOWNER, K. J. Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. **Journal Medical Microbiology**, v. 46, p. 721-746, 1996.

VAN DE BRAAK, S. A. A. J.; LEIJTEN, G. C. J. J. **Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union**. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p. 116.,1999.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, p. 1-7, 2006.

VILJOEN, A. M.; SUBRAMONEY, S.; VAN VUUREN, S. F.; BAŞER, K. H.; DEMIRCI, B. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96. p. 271-277, 2005.

WENDA KOON, C., SAKAGUCHI, M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 280–283, 1995.

WILLIAMS, L. R.; STOCKLEY, W. Essential oils with high antimicrobial activity for therapeutic use. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 8, p. 30- 40, 1998.

WONG, T. H; TAN, B. H.; LING, M. L.; SONG, C. Multi-resistant *Acinetobacter baumannii* on a burns unit--clinical risk factors and prognosis. **Burns**, v. 28, p. 349-57, 2002.

ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; FERNANDES-JUNIOR, A. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 828-33, 2009.

APÊNDICE

This article was downloaded by: [Felipe Guerra]

On: 28 December 2011, At: 06:17

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Natural Product Research

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>

Increasing antibiotic activity against a multidrug-resistant *Acinetobacter* spp by essential oils of *Citrus limon* and *Cinnamomum zeylanicum*

Felipe Queiroga Sarmiento Guerra ^a, Juliana Moura Mendes ^a, Janiere Pereira de Sousa ^a, Maria F.B. Morais-Braga ^b, Bernadete Helena Cavalcante Santos ^c, Henrique Douglas Melo Coutinho ^b & Edeltrudes de Oliveira Lima ^a

^a Laboratory of Mycology, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil

^b Laboratory of Research in Natural Products, Department of Physical and Biological Sciences, Center of Biological Sciences and Health, University of the Region of Cariri, Crato, Ceará, Brazil

^c Laboratory of Microbiology, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil

Available online: 23 Dec 2011

To cite this article: Felipe Queiroga Sarmiento Guerra, Juliana Moura Mendes, Janiere Pereira de Sousa, Maria F.B. Morais-Braga, Bernadete Helena Cavalcante Santos, Henrique Douglas Melo Coutinho & Edeltrudes de Oliveira Lima (2011): Increasing antibiotic activity against a multidrug-resistant *Acinetobacter* spp by essential oils of *Citrus limon* and *Cinnamomum zeylanicum*, Natural Product Research, DOI:10.1080/14786419.2011.647019

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2011.647019>

