



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

ADALBERTO COELHO DA COSTA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
DE *Origanum vulgare* L. E *Cinnamomum zeylanicum* B.
CONTRA BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES**

JOÃO PESSOA
2009

ADALBERTO COELHO DA COSTA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
DE *origanum vulgare* L. E *Cinnamomum zeylanicum* B.
CONTRA BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (Farmacologia).

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

JOÃO PESOA

2009

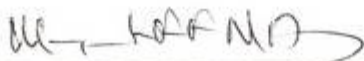
ADALBERTO COELHO DA COSTA

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Origanum vulgare*
L. E *Cinnamomum zeylanicum* B. CONTRA BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES

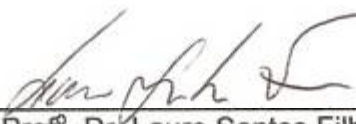
Tese apresentada para obtenção do grau de doutor e aprovada pela banca
examinadora formada pelos docentes:



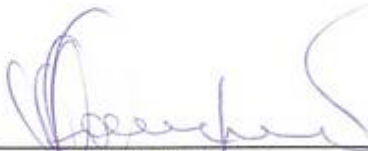
Profª. Drª. Edeltrudes de Oliveira Lima
Orientadora



Profª. Drª. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Examinadora



Profº. Dr. Lauro Santos Filho
Examinador



Examinadora
Profª. Drª. Maria Carmeli Correia Sampaio

Examinador
Profº. Dr. Alexandre José Alves

Aos meus pais José e Justina “in memoriam”

Aos meus filhos Carlos, Sílvia Lorena e Mylena

A minha esposa Alba Fracinete

Ao meu neto Alexandre

Dedico

AGRADECIMENTOS

A DEUS, meu maior Mestre e Orientador.

À Professora Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, pela anuência como orientadora, pela atenção e gentileza com que sempre me atendeu.

Ao Professor Dr. Lauro Santos Filho, amigo e conselheiro, pela competência e incentivo indispensáveis na elaboração deste trabalho.

A minha esposa, que me surpreendeu com a enorme capacidade de amar, renunciando a tudo em meu favor, compreendendo a minha ausência ao longo desta caminhada.

Aos meus queridos filhos, Carlos, Sílvia Lorena e Mylena pelo amor incondicional, apoio e incentivo para o término deste trabalho.

À Professora Dra. Márcia Regina Piuvezam Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela presteza, apoio e paciência durante as consultas solicitadas, durante a realização deste curso.

À Professora Dra. Bagnólia de Araújo Costa, pela dedicação e incentivo ao ensino e à pesquisa.

A todos os pacientes do Hospital de Trauma Senador Humberto Lucena de onde vieram as amostras clínicas que sem elas este trabalho não teria sido realizado.

Aos meus saudosos pais José e Justina, que certamente olharam, zelaram e torceram por mim, onde estiverem.

À amiga Bernadete Helena, pela sua valiosa contribuição na realização deste trabalho.

Aos colegas de turma, pelo apoio e amizade, a Fernando Oliveira, Marcelo Dantas, Marilene Rocha, Wyllly Araújo por não medirem esforços em me ajudar quando os procurei.

A Todos aqueles que não foram citados, mas, que participaram da elaboração e execução deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E REDUÇÕES

AMC = Amoxicilina / Ácido clavulânico

AMI = Amicacina

AMO = Amoxicilina

AMP = Ampicilina

ATCC = *Americam Type Culture Colletion*

ATP = Trifosfato de adenosina

ATZ = Azitromicina

AZT = Aztreonam

B = Blume

BGNNF = Bastonetes Gram Negativos Não Fermentadores

BHI = *Brain Heart Infusion*

C = Controle

C. zeylanicum = *Cinnamomum zeylanicum*

CBM = Concentração Bactericida Mínima

CCIH = Controle de Infecção Hospitalar

CCS = Centro de Ciências da Saúde

CFD = Cefadroxil

CFL = Cefalotina

CFO = Cefotaxima

CFP = Cefepime

CFX = Cefalexina

CIM = Concentração Inibitória Mínima

CIP = Ciprofloxacino

CLA = Claritromicina

CLI = Clindamicina

CLSI = National Committee for Clinical Laboratory Standards

CRO = Ceftriaxona

CTZ = Ceftazidime

DCF = Departamento de Ciências Farmacêuticas

DNA = Ácido desoxirribonucléico

E. coli = *Escherichia coli*

E. faecalis = *Enterococcus faecalis*

ERI = Eritromicina

ESBL = Beta lactamases de espectro ampliado

E – Test = Episilometer Test

GEN = Gentamicina

HTSUL = Hospital de Trauma Senador Humberto Lucena

IMI = Imipenem

K. pneumoniae = *Klebsiella pneumoniae*

L = Linnus

Log = Logaritmo

LEVO = Levofloxacino

LZD = Linezolida

LTF = Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

MBLs = Metallo β – lactamases

MER = Meropenem

mL = mililitro

MRSA = *Staphylococcus aureus* meticilina resistente

NaCl = Cloreto de sódio

NCCLS = NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY
STANDARDS

O. vulgare = *Origanum vulgare*

OXA = Oxacilina

P. aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa*

PB = Paraíba

PBPs = Proteínas ligadoras de penicilinas

PEN = Penicilina

POL = Polimixina

PTZ = Piperacilina / tazobactam

P / V = Peso por volume

R = Resistência

S = sensível

SAM = Ampicilina / sulbactam

SUT = Sulfametoxazol / Trimetoprim

T = Teste

TEC = Teicoplanina

TIM = Ticarcilina / ácido clavulânico

UFC = Unidade formadora de colônia

UFPB = Universidade Federal da Paraíba

UTI = Unidade de Terapia Intensiva

VAN = Vancomicina

α = Alfa

β = Beta

μL = Microlitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Amostras clínicas usadas para isolamento das bactérias	48
Tabela 02 - Perfil de resistência dos <i>E. faecalis</i> e MRSA utilizados na pesquisa	57
Tabela 03 – Perfil de resistência de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> frente aos antibióticos testados	58
Tabela 04 – Perfil de resistência de <i>A. baumannii</i> e <i>P. aeruginosa</i> frente aos antibióticos testados	59
Tabela 05 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de <i>C.</i> <i>zeylanicum</i> contra bactérias	60
Tabela 06 – Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de <i>O. vulgare</i> contra bactérias	64

LISTA DE QUADRO

Quadro 01 – Antimicrobianos usados no antibiograma dos microrganismos estudados	50
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Plasmídio com resistências a antibióticos (1 e 2) e um ori (3).....	26
Figura 02 – Conjugação.	28
Figura 02 – Conjugação.	29
Figura 04 – Orégano.....	32
Figura 05 – Canela.	34
Figura 06 – Teste de ESBL positivo para <i>K. pneumoniae</i>	51
Figura 07 – Teste de ESBL positivo para <i>E. coli</i>	52
Figura 08 – Determinação da CIM de <i>C. zeylanicum</i> frente às linhagens de <i>A. baumannii</i> , <i>E. coli</i> e <i>E. faecalis</i>	61
Figura 09 – Determinação da CIM de <i>C. zeylanicum</i> frente às linhagens de <i>K. pneumoniae</i> , <i>P.aeruginosa</i> e MRSA.....	62
Figura 10 – Determinação da CIM de <i>O. vulgare</i> frente às linhagens de <i>A. baumannii</i> , <i>E. coli</i> e <i>E. faecalis</i>	65
Figura 11 – Determinação da CIM de <i>O. vulgare</i> frente às linhagens de <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> e MRSA.....	65
Figura 12 – Ação do óleo essencial de <i>C. zeylanicum</i> a 0,25% contra <i>A. baumannii</i> relacionado com o tempo de incubação.	67
Figura 13 – Ação do óleo essencial de <i>C. zeylanicum</i> a 0,25% contra <i>E. coli</i> relacionado com o tempo de incubação.	68
Figura 14 – Ação do óleo essencial de <i>C. zeylanicum</i> a 0,25% contra <i>E. faecalis</i> relacionado com o tempo de incubação.	68
Figura 15 – Ação do óleo essencial de <i>C. zeylanicum</i> a 0,25% contra <i>K. pneumoniae</i> relacionado com o tempo de incubação.	69
Figura 16 – Ação do óleo essencial de <i>C. zeylanicum</i> a 0,25% contra <i>P. aeruginosa</i> relacionado com o tempo de incubação.....	70
Figura 17 – Ação do óleo essencial de <i>C. zeylanicum</i> a 0,25% contra MRSA relacionado com o tempo de incubação.	70
Figura 18 – Ação do óleo essencial de <i>O. vulgare</i> a 0,25% contra <i>A. baumannii</i> relacionado com o tempo de incubação.	71
Figura 19 – Ação do óleo essencial de <i>O. vulgare</i> a 0,125% contra <i>E. coli</i> relacionado com o tempo de incubação.	72

Figura 20 – Ação do óleo essencial de <i>O. vulgare</i> a 0,125% contra <i>E. faecalis</i> relacionado com o tempo de incubação.	72
Figura 21 – Ação do óleo essencial de <i>O. vulgare</i> a 0,125% contra <i>K. pneumoniae</i> relacionado com o tempo de incubação.	73
Figura 22 – Ação do óleo essencial de <i>O. vulgare</i> a 0,125% contra <i>P. aeruginosa</i> relacionado com o tempo de incubação.	74

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Geral.....	21
2.2 Específicos.	21
3 REVISÃO DE LITERATURA.	22
3.1 Agentes antimicrobianos.....	22
3.1.1 Agentes antibacterianos β – lactâmicos.	23
3.1.2 Agentes antibacterianos não β – lactâmicos.	24
3.2 Resistência bacteriana.....	25
3.3 Produtos naturais – óleos essenciais.	31
3.4 Óleos essenciais.....	32
3.4.1 <i>Origanum vulgare</i>	33
3.4.2 <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	34
3.5 Microrganismos.	36
3.5.1 <i>Enterococcus faecalis</i>	36
3.5.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	39
3.5.3 <i>Escherichia coli</i>	41
3.5.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	42
3.5.5 <i>Acinetobacter baumannii</i>	43
3.5.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
4 MATERIAL E MÉTODOS.	49
4.1 Amostras biológicas.....	49
4.2 Processamento das amostras clínicas e identificação bacteriana.	50
4.3 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.	51
4.4 Óleos essenciais e fitoconstituintes.	53
4.5 Teste de triagem de avaliação da atividade antibacteriana de óleos essenciais e fitoconstituintes.....	53
4.6 Determinações da concentração inibitória mínima (CIM).	55
4.7 Determinações da Concentração Bactericida Mínima (CBM).	56
4.8 Determinação do tempo de morte bacteriana.....	56

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.	58
6 CONCLUSÕES.	79
REFERÊNCIAS.....	81

ADALBERTO COELHO DA COSTA. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. e *Cinnamomum zeylanicum* B. contra bactérias multirresistentes. 2009 [Tese de Doutorado]. 98f. João Pessoa, PB

RESUMO

Um dos maiores problemas mundiais de saúde é a resistência que as bactérias vêm adquirindo aos antimicrobianos, e que se acentua cada vez mais dificultando o seu combate. As infecções hospitalares provocadas por esses microrganismos dificilmente serão debeladas com terapêutica de rotina, mesmo assim, os antibióticos permanecem a principal opção terapêutica. Como alternativa para o tratamento dessas infecções destaca-se a pesquisa de antimicrobianos de origem vegetal. Neste trabalho objetivou-se determinar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. (orégano) e *Cinnamomum zeylanicum* B. (canela) contra bactérias multirresistentes; Identificar a incidência de patógenos multirresistentes como agentes etiológicos dos processos infecciosos em pacientes atendidos em um nosocômio; determinar “*in vitro*” a concentração inibitória mínima (CIM) dos referidos óleos sobre as bactérias cujo crescimento foi inibido pelos respectivos óleos; confirmar a concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos testados sobre as cepas bacterianas após a detecção da CIM e avaliar a interferência dos óleos estudados através da curva cinética bacteriana. Foi realizado um “*screening*” preliminar, utilizando-se a técnica de difusão em ágar. A CIM foi determinada pelo método de microdiluição, partindo-se de soluções com as concentrações finais de 8,0 até 0,125%, obtendo-se os seguintes resultados: O óleo essencial de *C. zeylanicum* inibiu a multiplicação das bactérias nos seguintes percentuais e concentrações: 95,83% - 8%; 91,66 – 2% e 79,1% - 1%. O óleo essencial de *O. vulgare* inibiu a multiplicação das bactérias nos percentuais e concentrações respectivos de 75% - 0,125%; 83,33 – 0,25% e 100 % - 0,5%. Com base nos dados obtidos pode-se afirmar que nesse estudo as amostras bacterianas isoladas como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram-se multirresistentes aos antibióticos

testados. O óleo essencial de *C. zeylanicum* B. foi efetivo como bacteriostático sobre 92% das cepas bacterianas na CIM de 2% e 4% na CIM de 0,125%. O óleo essencial de *C. zeylanicum* B. não revelou propriedades bactericidas, quando testado nas CBM's sobre os microrganismos testes. O óleo essencial de *O. vulgare* L. apresentou atividade bactericida sobre a totalidade das bactérias Gram positivas e Gram negativas estudadas, em uma CBM de 0,5%. O efeito bactericida do *O. vulgare* L. sobre bactérias multirresistentes observado no estudo, foi um dado muito importante, visto que, os valores encontrados assemelham-se com as drogas de última geração utilizadas na pesquisa. Na cinética bacteriana os óleos essenciais de *C. zeylanicum* B. e *O. vulgare* L. inibiram o crescimento dos microrganismos testados no intervalo de 0,0 a 120 minutos. Os valores antimicrobianos dos óleos essenciais testados encontrados nos ensaios conduzem à aplicação de novas metodologias, visando à utilização de forma racional dos mesmos na terapêutica antibacteriana.

Palavras chave: *Origanum vulgare*, *Cinnamomum zeylanicum*, infecções bacterianas, bactérias multirresistentes

ADALBERTO COELHO DA COSTA. Antibacterial activity of the essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Cinnamomum zeylanicum* B. against bacterial multiresistant. 2009. [Thesis of Doctorate]. 98f. João Pessoa, PB.

ABSTRACT

One of the largest world health problem is the bacteria resistance acquired to the antimicrobials, and that increases more and makes difficult their treatment. The nosocomial infections caused by these microorganisms difficultly will be eradicated by routine therapeutic methods, and even so, the antibiotics are considered the main therapeutic option. As alternative to treatment of those infections are considered the research of antimicrobials obtained of vegetable origin. The aim of this work was to determine the antibacterial activity of the essential oils obtained from *Origanum vulgare* L. and *Cinnamomum zeylanicum* B. against multiresistant bacteria strains; to identify the incidence of multiresistant pathogens as etiological agents of the infectious processes in nosocomial patients; to determine "*in vitro*" the minimum inhibitory concentration (MIC) of these referred oils against the bacteria whose growth was inhibited in the preliminary tests with the respective oils; to confirm the minimum bactericidal concentration (MBC) of the tested oils on the bacterial strains after the detection of CIM and to evaluate the interference of the studied oils using the bacterial kinetic curve. A preliminary "screening" was determined using the diffusion agar technique. The CIM was determined by the microdilution method, starting with solutions in the final concentrations of 8,0 up to 0,125%, obtaining the following results: The *cinnamomum* essential oil inhibited the multiplication of the bacteria in the following percentiles and concentrations: 95,83% - 8%; 91,66 - 2% and 79,1% - 1%. The *origanum* essential oil inhibited the bacteria multiplication in the respective percentile and concentrations of 75% - 0,125%; 83,33 - 0,25% and 100% - 0,5%. Based in the obtained data could be affirmed that in these studies the isolated bacterial strains such as *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* were considered multiresistant to the tested antibiotics. The *C. zeylanicum* B. essential oil was effective as bacteriostatic agent on 92% of the bacterial strains in with the CIM or 2%, and 4% of efficacy in CIM of 0,125%. The *C. zeylanicum* B.

essential oil didn't reveal bactericidal properties, when tested in the CBM's of the considered microorganisms. The *O. vulgare* L essential oil demonstrated bactericidal activity in about the totality of the Gram positive and Gram negative bacteria studied, using a CBM of 0,5%. The bactericidal effect of the *O. vulgare* L. observed in the study against multiresistant bacteria, it was a very important die, considering that the found acquired values resemble each other with the drugs of last generation used in the research. In the bacterial kinetics the essential oils of *C. zeylanicum* B. and *O. vulgare* L. inhibited the microorganisms growth of the tested in the interval from 0,0 to 120 minutes. The antimicrobial values of the tested essential oils found in the experiments conduct or indicate to the application of new methodologies, looking for the way to a rational use of the same ones in the antibacterial therapeutics.

Key words: *Origanum vulgare*, *Cinnamomum zeylanicum*, bacterial infections, multiresistant bacteria

1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores problemas mundiais em relação à saúde, é a resistência que as bactérias vêm adquirindo aos antimicrobianos. Este problema se acentua cada vez mais e torna-se difícil combatê-lo, a exemplo das infecções hospitalares provocadas por esses microrganismos, pois, dificilmente serão debeladas de forma efetiva. Dessa maneira, para que o uso racional de antibióticos seja recomendável, se faz necessário condutas terapêuticas baseadas no conhecimento da escolha do antibiótico que deve ser prescrito, sem negligenciar tendências de perfis de resistência bacteriana, de uma forma mais abrangente.

Observa-se ainda que, as infecções bacterianas não hospitalares, do trato respiratório e trato urinário são também responsáveis por grande parte das prescrições de antibióticos. Na maioria das vezes, não há identificação do agente bacteriano e seu respectivo perfil de sensibilidade, e a seleção do antibiótico é feita de forma empírica, baseada principalmente no tipo de infecção, sítio biológico, gravidade, sexo, idade e dados epidemiológicos (OBER, 1998).

É importante observar, que os maiores índices de resistência bacteriana aos antibióticos são verificados pela automedicação, descontrole da prescrição e venda de antibióticos para o uso humano (ROSA, 2001). Outros fatores podem também influenciar este fato, como o uso excessivo ou inadequado de antibióticos na medicina humana, veterinária, e na agricultura, que contribuem para o aumento rápido da prevalência de microrganismos resistentes aos medicamentos, tornando os antibióticos ineficazes (BERQUIÓ et al., 2004).

A resistência microbiana tem resultado em crescente morbidade e mortalidade, como também tem elevado os custos à saúde. O desenvolvimento de qualquer novo antimicrobiano vem sendo acompanhado pelo aparecimento da resistência bacteriana. A emergência de patógenos resistentes aos antimicrobianos é uma ameaça a esses avanços (MOELLERING JÚNIOR, 2000). Na sua maioria os antibióticos consumidos destinam-se tanto a tratar

animais doentes, como promotores de crescimento e de destruição de patógenos no gênero alimentício (LONNROTH, 2003).

Embora existam estudos sobre o emprego desses medicamentos, não há nenhuma garantia que eles resultarão em drogas novas ou vacinas no futuro próximo. Desde 1970, não foi descoberta nenhuma nova classe de antibióticos para combater as doenças infecciosas, em média, pesquisa e desenvolvimento de drogas antimicrobianas levam 10 a 20 anos para serem concluídas. Desta maneira não se pode desperdiçar a oportunidade de controlar, e eventualmente, eliminar as doenças infecciosas mais perigosas. É necessário um programa rápido para o combate desses microrganismos durante esta década, pois poderia ser inviável a sua realização no futuro, por se tornar mais dispendioso, segundo a Organização Mundial de Saúde (2000).

Diversos fatores destacam o crescimento da indústria química farmacêutica, o crescente custo dos medicamentos sintéticos, seus efeitos colaterais entre outros. A divulgação ampla dos ideais naturalistas, atualmente vem ganhando grande impulso e ressalta a importância da fitoterapia usada como alternativa para o combate das mais variadas doenças (VERLET, 1992; SCHEFFER, 1998). Assim, a variedade de substâncias químicas presentes nas diferentes partes das plantas com ação farmacológica como cumarinas, flavonóides, terpenóides, alcalóides, taninos, entre outros (COWAN, 1999), tem despertado o interesse dos pesquisadores do mundo inteiro para investigação de novos antibióticos (CUNHA, 1995; COWAN, 1999).

Ainda hoje, considera-se, que boa parte dos antibióticos utilizados na prática médica é obtida a partir de microrganismos, dos quais são metabólitos liberados para o meio ambiente, sendo a maioria originada de fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Cephalosporium* e *Micromonospora* e de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* (TAVARES, 2001). Em virtude da crescente importância clínica dada às infecções bacterianas, comunitárias e hospitalares, causadas por cepas multirresistentes, e prevendo-se o desaparecimento de antibióticos efetivos, importantes estudos relacionados com atividade bactericida e/ou bacteriostática, de produtos obtidos a partir de plantas medicinais (extratos, óleos essenciais e outros princípios ativos isolados), foram

realizados, em todo mundo (RECIO; RIOS, 1989; COOKSON, 1993; HAMMER; CARSON; RILEY, 1999; BENKEBLIA, 2003; GIBBONS et al., 2003).

Portanto, a resistência bacteriana representa um problema de relevância mundial, que dificulta a ação na área de saúde, no combate do tratamento das infecções bacterianas, principalmente das infecções hospitalares. Este aspecto inquieta os pesquisadores, e faz aumentar os esforços na busca de novos antimicrobianos. As dificuldades encontradas na descoberta de agentes de origem sintética ou microbiana merecem a ênfase dada pelos pesquisadores ao estudo das plantas com peculiaridades medicinais. O problema é preocupante e comporta estudos que tem como objetivo principal a comprovação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais (de *Origanum Vulgare* e *Cinnamomum zeylanicum*) contra cepas multirresistentes, a partir de pesquisas que tenham esse delineamento, um eficaz bactericida poderá ser desenvolvido.

Espera-se comprovar a letalidade dos óleos essenciais, utilizados contra as bactérias multirresistentes, aspecto a ser verificado no contexto do trabalho após testes em laboratório.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Determinar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. e *Cinnamomum zeylanicum* B. contra bactérias multirresistentes

2.2 Específicos

- ✓ Identificar a incidência de patógenos multirresistentes como agentes etiológicos dos processos infecciosos em pacientes atendidos em um nosocômio;
- ✓ Determinar “in vitro” a concentração inibitória mínima (CIM) dos referidos óleos sobre as bactérias cujo crescimento foi inibido pelos respectivos óleos;
- ✓ Confirmar a concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos testados sobre as cepas bacterianas após a detecção da CIM;
- ✓ Avaliar a interferência dos óleos estudados através da curva de cinética bacteriana.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Agentes antimicrobianos

Alexander Fleming descobriu a penicilina em 1929 e seus efeitos sobre os microrganismos Gram positivos. Fleming conservou suas culturas por duas a três semanas antes de desprezá-las. Ao observá-las, percebeu que os *Staphylococcus* semeados pareciam dissolver-se e o fungo que contaminou a cultura era um organismo raro chamado *Penicilium*. A cultura foi submetida a temperaturas frias e depois mornas, condições necessárias para que houvesse o seu crescimento (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

Todavia, a terapia antibacteriana tornou-se disponível em 1932, com a descoberta das sulfonamidas por Gerhardt Domagt. Apenas em 1940 a penicilina foi produzida em maior escala, dando origem à “era dos antibióticos”, tida como a maior revolução na saúde pública e na medicina. Verificou-se ainda, que Howard Florey e Ernest Chain produziram um extrato de penicilina, nascendo assim o primeiro antibiótico potente. A partir daí, mudou-se a maneira como a medicina estava sendo praticada. A terapia e a profilaxia com antibióticos transformaram-se, em regra, na prática médica em todos os tipos de tratamento, com indicação correta ou não. Ainda em 1940, Ernest Chain e Abraham descobriram uma substância originária da *Escherichia coli* capaz de inativar a penicilina constituindo o primeiro produto bacteriano reconhecido como resistente a um agente antibacteriano (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

Os agentes antimicrobianos mais empregados contra as bactérias são os antibióticos, que representam substâncias químicas produzidas por microrganismos ou de forma sintética, com capacidade de inibir o crescimento dos mesmos. Esses agentes podem ser divididos em dois grandes grupos: β -lactâmicos e não β -lactâmicos (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

3.1.1 Agentes antibacterianos β - lactâmicos

A maioria dos antibióticos que atuam na inibição da síntese da parede celular é classificada como antibióticos β - lactâmicos estando incluídas nessa classe as penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, monobactâmicos, carbapenemas. Todos estes agentes antibacterianos possuem em comum o anel β - lactâmico, que é composto de três átomos de carbono e um de nitrogênio. A vancomicina, mesmo não sendo um β – lactâmico bem como outros antibióticos, interferem na construção da parede celular (ALTHERTHUM, 2004; MURRAY et al., 2006).

Todas as penicilinas possuem um anel β - lactâmico e apresentam cadeias laterais diferenciadas, quimicamente ligadas ao núcleo (TORTORA; FUNKE, CASE, 2002). Podem ser sintéticas ou naturais inclusive extraídas de fungos como as G e V. A penicilina (semi - sintética), mostrou-se eficiente por não ser degradada pela β - lactamase; a partir daí outras penicilinas semi-sintéticas surgiram (BLACK, 2002).

Outras substâncias como as cefalosporinas, foram isoladas de bolores como *Cephalosporium (Acremonium)*, gerando produtos de primeira, segunda, terceira e quarta geração. Alguns dos antibióticos β - lactâmicos apresentam espectro restrito (atuam somente sobre bactérias Gram negativas aeróbias), como os monobactâmicos que apresentam vantagem de combater infecções causadas por microrganismos suscetíveis sem afetar a microbiota normal (ALTHERTHUM, 2004; MURRAY et al., 2006).

O imipenem, um carbapenêmico, apresenta amplo espectro atuando sobre microrganismos aeróbios e anaeróbios, embora alguns *Staphylococcus* “resistentes a meticilina” tenham demonstrado menor sensibilidade. Este mesmo comportamento foi verificado em algumas cepas resistentes de *P. aeruginosa* quando submetidos à ação deste antimicrobiano. O imipenem, que originalmente era resistente a todas β - lactamases, apresentam hoje em dia, alguns genes cromossômicos que codificam as β - lactamases hidrolisando-as (MURRAY et al., 2006).

Os Inibidores de β - lactamases (ácido clavulânico, tazobactam e o sulbactam sódico) são capazes de atuar sobre as β - lactamases, permitindo a ação do antimicrobiano β - lactâmico. Estas substâncias são utilizadas em associação com outras que possuem o anel β - lactâmico como: amoxicilina, ticarcilina, piperacilina e ampicilina (ALTHERTHUM, 2004; MURRAY et al., 2006).

Algumas substâncias como os glicopeptídeos (vancomicina) têm a capacidade de interromper a síntese do peptidoglicano da parede celular de bactérias Gram positivas em crescimento. O mecanismo de ação é desencadeado quando o glicopeptídeo interage com o terminal D - alanil - D - alanina da cadeia lateral de pentapeptídeo, o que interfere por competição com a formação das partes entre as cadeias do peptidoglicano (MURRAY et al., 2006).

3.1.2 Agentes antibacterianos não β - lactâmicos

São compostos que atuam na inibição da síntese de proteínas e são classificados como antibióticos não β - lactâmicos. E estão incluídos nessa classe os aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol e macrolídeos, bem como os inibidores da síntese dos ácidos nucleicos, como as quinolonas e rifampicina (BLAKER, 2002; TORTORA; FUNKE; CASE, 2002; ALTHERTHUM, 2004; MURRAY et al., 2006).

Os aminoglicosídeos são substâncias obtidas de várias espécies dos gêneros *Streptomyces* e *Micromonospora*. A estreptomicina (primeira substância a ser descoberta) foi eficiente sobre algumas bactérias, que posteriormente se tornaram resistentes. Os aminoglicosídeos assim como a estreptomicina causam danos à saúde sendo nefro e ototóxica. Costumam ser administradas em associação com outras drogas produzindo sinergismo, facilitando o combate da infecção (BLACK, 2002; ALTHERTHUM, 2004).

Outros antibióticos não β - lactâmicos são as tetraciclina, também obtidas de espécies de *Streptomyces*, são absorvidas pelo trato digestivo e bem distribuídas nos tecidos e fluidos do corpo (exceto o líquido). Esta classe

apresenta o mais amplo espectro de atividade, mas destroem a microbiota normal promovendo distúrbios gastrintestinais como superinfecções por *Proteus*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* tetraciclinas resistentes (BLACK, 2002; TORTORA; FUNKE; CASE, 2002).

Os macrolídeos e as lincosamidas são bacteriostáticos sendo produzidos por diversas cepas de *Streptomyces erythreus* e *lincomensis* respectivamente, enquanto os macrolídeos são eficientes no tratamento de infecções causadas por *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Streptococcus pneumoniae* (BLACK, 2002), a lincomicina e o seu derivado clindamicina (mais utilizada por ser menos tóxica), são eficientes contra *Bacteroides* e outros anaeróbios, com exceção do *Clostridium difficile* (BLACK, 2002; MURRAY et al., 2006).

As fluoroquinolonas tratam-se de um novo grupo de drogas bactericidas sintéticas, análogas ao ácido nalidíxico, é eficiente contra muitas bactérias Gram positivas e Gram negativas. Estas drogas inibem a síntese de DNA bacteriano pelo bloqueio da DNA girase, a enzima que desenrola a dupla hélice do DNA na etapa preparatória para a sua replicação. Norfloxacino, ciprofloxacino, gatifloxacino e levofloxacino fazem parte dessa classe. Resistência pode ocorrer rapidamente em *Pseudomonas*, *Staphylococcus* resistentes à oxacilina e *Enterococcus*. Já as quinolonas de ultima geração têm melhor atividade contra bactérias Gram negativas, sendo muito eficientes em infecções urinárias causadas por microrganismos multirresistentes (MURRAY et al., 2006).

3.2 Resistência bacteriana

Em 1959, Sawada demonstrou que a resistência aos antibióticos pode ser transferida entre cepas de *Shigella* e *E. coli* por plasmídios. No mesmo ano, comenta-se que o desenvolvimento da resistência aos antibióticos ocorre como uma resposta à introdução de agentes antibacterianos (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

A resistência bacteriana a diversos antibióticos e quimioterápicos impõe sérias limitações às opções para o tratamento de infecções bacterianas representando uma ameaça para a saúde pública. Esta resistência prolifera-se rapidamente (NICOLAOU et al., 1999), através de transferência genética de bactérias Gram positivas (*Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*).

É difícil entender os mecanismos de resistência bacteriana sem conhecer a fisiologia bacteriana, a farmacologia das drogas antimicrobianas e a biologia molecular dos agentes infecciosos (KONEMAN et al., 2001).

Mediante o que expõe Amato Neto et al. (1985), a resistência microbiana pode ser natural ou adquirida. A primeira consiste nos mecanismos permanentes estabelecidos geneticamente, não apresentando ligação com o desenvolvimento de doses de antibióticos (SUSSMANN; MATTOS; RESTREPO, 2002). Sendo, portanto observada em bactérias primitivamente resistentes a determinados antibióticos (intrínseca). A referida forma de resistência já existia naturalmente, em período anterior a descoberta dos antibióticos (AMATO NETO et al., 1985).

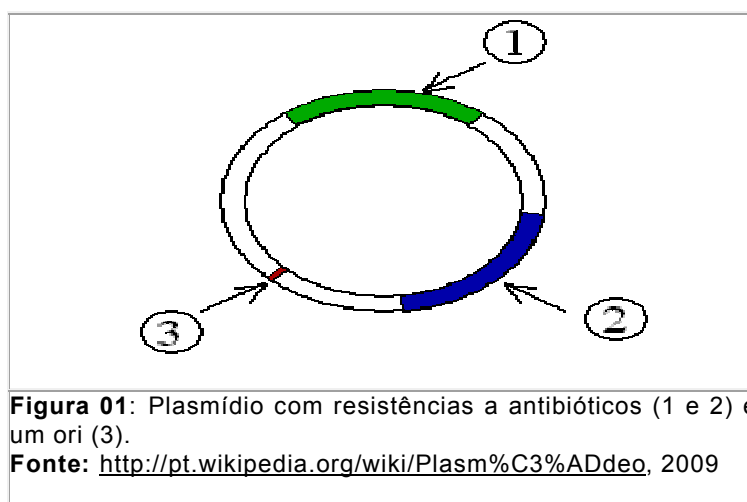
Amato Neto et al. (1985) afirmam que a resistência adquirida ocorre em uma bactéria originalmente sensível, que vem a ser resistente em certo período, pois ocorre mudança em sua estrutura celular. Essa transformação pode ocorrer no cromossomo da célula bacteriana (cromossômica). Se a modificação ocorrer fora do cromossomo da célula bacteriana, a resistência é tida como extracromossômica.

Considerando-se, que a resistência cromossômica está subordinada a mutação espontânea, constituindo evento raro, ela é direcionada na maioria das vezes a uma só droga e os genes são encaminhados com frequência relativamente baixa. Dessa forma, seu impacto clínico tem menor poder que o da resistência plasmidial (GOMES, 2008). Contudo, os mutantes cromossômicos resistentes à rifampicina aparecem com grande frequência (10^{-7} a 10^{-5}), por isso, o tratamento de infecções bacterianas com rifampicina como único fármaco quase sempre não tem êxito (JAWETZ et al., 2000).

Os mutantes cromossômicos se mostram na maioria das vezes resistentes em face da alteração causada no receptor estrutural por um agente farmacológico, assim sendo, a proteína P 12 na sua subunidade 30S do

ribossomo bacteriano, apresenta-se como receptor para a ligação da estreptomicina. A mutação no gene que controla essa proteína estrutural proporciona uma resistência à estreptomicina. Uma fração diminuta da região do cromossomo bacteriano possui genes estruturais que codificam diversos receptores de fármacos, principalmente para antimicrobianos, como a eritromicina, a lincomicina e os aminoglicosídeos. Percebe-se também, o fato que, a mutação pode ter por consequência a diminuição de proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), transformando esses mutantes resistentes em agentes β – lactâmicos (JAWETZ et al., 2000).

Na resistência extracromossômica as bactérias, majoritariamente, dispõem de elementos genéticos extras cromossômicos, designados de plasmídios (JAWETZ et al., 2000). Os plasmídios são moléculas circulares duplas de DNA que estão afastadas do DNA cromossômico. Todos os plasmídios possuem no mínimo, uma sequência de DNA que se mostra como uma fonte de replicação ou ori (um ponto inicial para a replicação de DNA), e que dá condições ao DNA do plasmídio replicar-se, independentemente, do DNA cromossômico. A figura 01 destaca o desenho esquemático de um plasmídio com resistência a antibióticos.



Os fatores de resistência (R) ou plasmídio de resistência vem a ser os originadores da resistência extracromossômica (AMATO NETO et al., 1985). Os fatores R mostram-se como remotos plasmídios que levam genes para

resistência a um ou, na maioria das vezes a diversos agentes antimicrobianos e metais pesados. Os genes plasmidiais responsáveis pela resistência antimicrobiana, sempre controlam a constituição de enzimas destruidoras desses agentes antimicrobianos. Dessa forma, os plasmídios fixam a resistência às penicilinas e cefalosporinas, comunicando genes para a criação de β -lactamases. Os plasmídios codificam enzimas, que eliminam o cloranfenicol (acetiltransferase), enzimas que “acetilam”, “adenilam” ou “fosforilam” muitos aminoglicosídeos, enzimas que geram a condução ativa de tetraciclinas mediante a membrana celular, e várias outras (JAWETZ et al., 2000; TORTORA; FUNKE; CASE, 2002).

É relevante destacar que os plasmídios têm a possibilidade de se mostrar unidos ao cromossomo, sendo capazes de transferir genes cromossômicos. A maioria transfere o gene de resistência para espécies não aparentadas geneticamente (GOMES, 2008).

O material genético e os plasmídios têm a possibilidade de ser enviados mediante mecanismos de conjugação, transdução, transformação e transposição (JAWETZ et al., 2000; TORTORA; FUNKE; CASE, 2002).

A conjugação acontece no momento em que a transferência de resistência, através do fator R, ocorre devido o contato físico entre as células bacterianas (AMATO NETO et al., 1985). No processo de conjugação, ocorre a transferência unilateral de material genético entre bactérias do mesmo gênero ou gêneros distintos. Tal mecanismo é mediado por fator de fertilidade (F), que traz por consequência a extensão de fímbrias (*pili*) sexuais da célula doadora (F+) para a célula receptora.

O DNA do plasmídio, ou outro DNA é transferido mediante esses túbulos protéicos da célula doadora à célula receptora. Portanto, pode acontecer a transferência de diversos genes próximos, estabelecendo cada um a resistência a um fármaco, de uma bactéria resistente para outra suscetível. Trata-se do método mais comum de proliferação de resistência a múltiplos fármacos, entre gêneros diferentes de bactérias Gram negativas. A transferência de plasmídio de resistência pode acontecer entre certos cocos Gram positivos (JAWETZ et al., 2000; TORTORA; FUNKE; CASE, 2002). A figura 2 demonstra a conjugação.

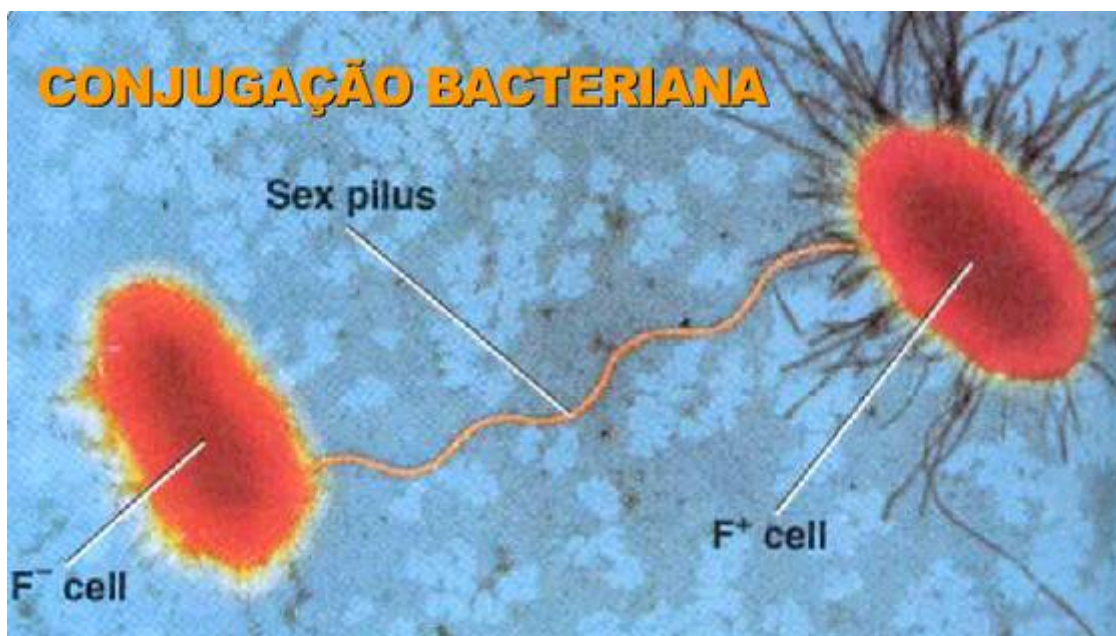


Figura 02: Conjugação

Fonte: GOMES, 2008

A transdução consiste na transferência de material genético entre duas bactérias, realizada por um vírus bacteriófago (GOMES, 2008). Logo vem a ser transferência de DNA através de vírus bacterianos. Um bacteriófago ao realizar sua cápsula no interior da bactéria tem a possibilidade de unir ao seu material genético, porções do material genético da bactéria. Dessa maneira, se for infectar a bactéria, trará para dentro dela material genético de outra célula bacteriana (m. resistência). O DNA plasmidial é agrupado em vírus bacteriano e transferido para outra bactéria da mesma espécie. Gomes (2008) traz como exemplo, o plasmídeo que transporta o gene para a produção de β – lactamase, o qual pode ser transferido de um *Staphylococcus* resistente à penicilina, para um suscetível, através de um bacteriófago adequado. Uma transdução parecida acontece nas *Salmonellas* (JAWETZ et al., 2000; TORTORA; FUNKE; CASE, 2002). A Figura 03 demonstra o mecanismo de transdução.

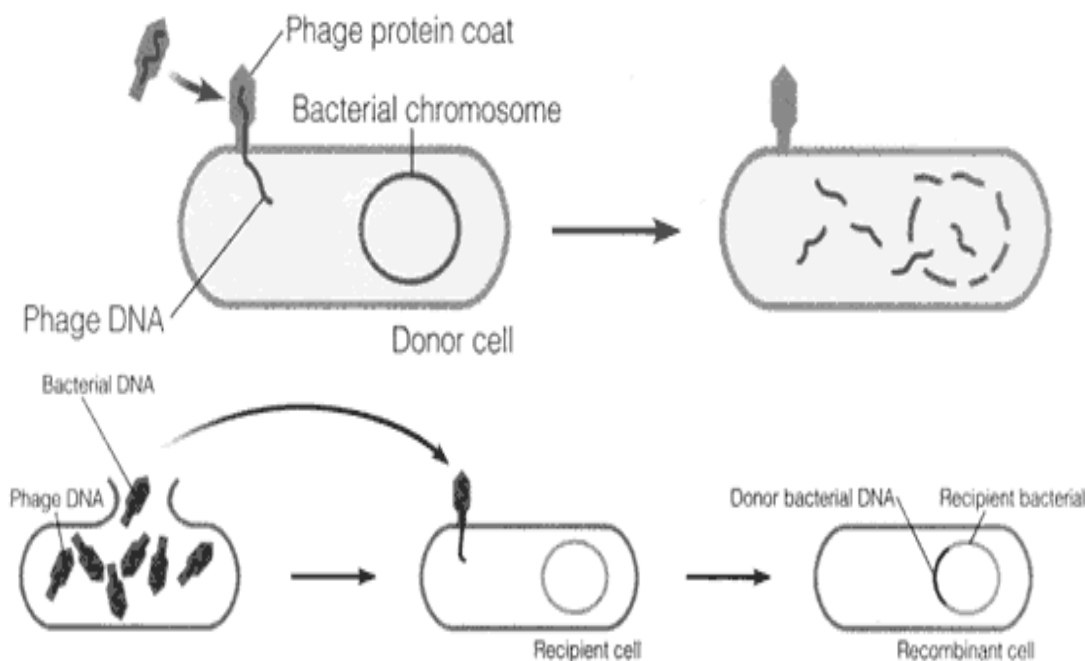


Figura 03: Transdução

Fonte: GOMES, 2008

Segundo Gomes (2008), a transformação constitui a incorporação de um material genético livre no meio, por uma célula bacteriana. Raro *in vivo*, pode acontecer das seguintes formas: Através da extração de DNA de uma espécie de bactéria, e colocá-lo em uma bactéria geneticamente diversa; ou, uma bactéria que foi morta pode liberar seu material genético e este ser capturado por outra bactéria (m. resistência).

Esse modo de transferência de genes é tido, como um fenômeno laboratorial, contudo percebeu-se transformação de ocorrência natural em culturas de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, espécies de *Bacillus* e de *Neisseria* (MURRAY et al., 2006).

Na transposição, genes determinantes de resistência podem mudar-se de um plasmídeo para outro, para um cromossomo ou para um bacteriófago, sendo designado transposon o elemento responsável (AMATO NETO et al., 1985). Os transposons constituem partes de DNA com ampla mobilidade, codificam a enzima transposase – responsável por sua transferência para frações diversas de DNA. São promíscuos, pois criam as alterações invadindo

muitos sítios do DNA hospedeiro, e, certas vezes extrapolam ocasionando mutações letais (TORTORA; FUNKE; CASE, 2002; GOMES, 2008).

Levando-se em consideração a ação farmacológica que inúmeras plantas possuem, é relevante o atual empenho dos pesquisadores demonstrado através de estudos mais aprofundados sobre novas propriedades que as plantas podem oferecer no combate a inúmeras patologias (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1995).

3.3 Produtos naturais – óleos essenciais

O uso de plantas como estratégia terapêutica é praticado por cerca de 85% da população dos países em desenvolvimento. Além disso, aproximadamente 120 medicamentos utilizados na medicina são provenientes diretamente de plantas, enquanto muitos outros fármacos são obtidos por semi-síntese de produtos vegetais ou por síntese baseada em moléculas vegetais precursoras (PEZZUTO, 1997).

A partir da década de 70 houve uma mudança do ideal de saúde, implicando na conscientização da importância do equilíbrio entre o homem e o ecossistema em que habita, em busca de uma melhoria na qualidade de vida. Dessa forma, valorizou-se a medicina natural como alternativa ao tratamento das doenças (SANTOS 1995).

O Brasil, por ser um país de miscigenação racial, e, portanto cultural, é influenciado pela credence, principalmente africana e indígena, sobre o poder mágico das ervas usadas em chás na cura de patologias (SANTOS; DIAS PINTOS; MARTINS, 1995). Além disso, a Amazônia é a maior reserva de biodiversidade do mundo, sendo considerada inestimável pela sua flora, ainda pouco conhecida.

Recentemente, a comunidade científica começou a mostrar interesse no estudo de plantas, tanto no que diz respeito à medicina natural, quanto ao estudo da toxicidade das mesmas (PINILLOS et al., 2003; PEREIRA et al., 2004; SOUZA et., 2004). As espécies vegetais utilizadas com propriedades terapêuticas no tratamento tradicional da saúde constituem uma importante fonte de novos compostos

biologicamente ativos. Aparecem como parte fundamental no controle da saúde em muitas partes do mundo e ao longo de décadas têm despertado o interesse de vários pesquisadores (CEBALLOS et al., 1993; LIMA, 1996; CUNHA, 1995; COWAN, 1999; FARIAS; LIMA, 2000; BELÉM, 2002; MICHELIN et al., 2005). Embora, na medicina popular, as plantas são utilizadas, concomitantemente, com uso de medicamentos convencionais não levando em consideração as interações medicamentosas (AMORIM, 1999).

A cultura, a crença e o desconhecimento da população, sobre a toxicidade das plantas medicinais e a quantidade ingerida pelas pessoas doentes, são fatores que dificultam o diagnóstico e o tratamento em casos de reações toxicológicas causadas por interações de produtos derivados de plantas (PINILLOS et al., 2003).

3.4 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos líquidos complexos, orgânicos, solúveis em solventes orgânicos apolares, lipofílicos, voláteis, delicados, aromáticos, de sabor ácido ou picante, incolores, quando recentemente extraídos ou ligeiramente amarelados, e de aparência oleosa. Também chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências e são extraídos de diversas partes das plantas como: folhas, flores, sementes, brotos, galhos, cascas de caule, frutos e raízes. Em contato com a água, os óleos essenciais apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas denominadas hidrolatos. E por serem voláteis, necessitam ser estocados em recipientes hermeticamente fechados e protegidos da luz direta, calor, umidade e metais (SIMÕES; SPITZER, 2003).

Os usuários de antibacterianos nas ações destinadas à Avicultura e Suinocultura, têm se preocupado pela substituição dos antibacterianos denominados promotores de crescimentos, por agentes não menos efetivos, mas de origem natural (MILTEMBERG, 2000; MENTEN, 2001). Devido aos óleos essenciais extraídos de orégano, tomilho, canela, entre outros, terem potencial antimicrobiano significativo (JEAUROUND et al., 2002; KALEMBA; KUNICKA, 2003; BURT; REINDERS, 2003); portanto, a maioria das publicações

estabelece generalizações sobre estas atividades frente a bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos, incluindo limitado número de representantes de cada espécie, sendo comum à utilização de apenas um exemplar catalogado como os da coleção ATCC (*American Type Culture Collection*) (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999; SMITH - PALMER; STEWART; FYFE, 1998).

3.4.1 *Origanum vulgare* L.

Origanum vulgare L. conhecido como orégano é um vegetal da família Lamiaceae. Herbácea, bastante ramificado, perene, ereto, aromático, de hastes certas vezes arroxeadas, possuindo proporção de 30 a 50 cm de altura, é originário de regiões montanhosas e pedregosas do sul da Europa, cultivado largamente na região sul e sudeste do Brasil, para uso culinário. A dimensão de suas folhas possui de 1 a 2 cm de comprimento ao passo que suas flores, no que se refere ao aspecto cromático, são esbranquiçadas, rosas ou violáceas, arranjadas em inflorescências paniculadas terminais (Figura 04).

Na medicina é muito usado devido as suas variadas propriedades terapêuticas como antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatórias, antioxidantes, anticancerígenas, emolientes e digestivas (JOLY, 1998; LORENZ; MATOS, 2002). Essas peculiaridades medicinais advêm do carvacrol, composto químico, inserido em sua composição, considerado o constituinte elementar desta planta, o qual se mostra em demasia na mesma (KAMEL, 2000). Ressalta-se, que o carvacrol age na parede celular das bactérias, ocasionando a quebra da membrana externa (DORMAN; DEANS, 2000).



Figura 04. Orégano

Fonte: International Plant Genetic Resources Institute, 2009

Na composição química de suas folhas e inflorescências observa-se a existência de até 1% de óleo essencial, com média de 40 a 70% de carvacrol, seguido de borneol, cineol, terpineol, terpineno e timol. A atividade antimicrobiana de carvacrol e timol vêm sendo o alvo de diversas pesquisas, e o óleo de *O. vulgare* foi identificado como de alta atividade antifúngica no combate a patógenos humanos (REHDER et al., 2004).

O óleo essencial é utilizado na composição de aromatizantes de alimentos e de perfumes. Toda a planta é usada na medicina doméstica, costume esse originário da Itália. A literatura etnofarmacológica confere a esta planta peculiaridades estimulantes do sistema nervoso, forte ação analgésica, espasmolítica, sudorífica, facilitador da digestão e da atividade uterina, assim como expectorante brando. Na homeopatia é utilizado para desenvolver a excitabilidade sexual (SIGNOR et al., 2007).

3.4.2 *Cinnamomum zeylanicum* B.

Cinnamomum zeylanicum B., canela constitui uma das mais antigas especiarias conhecidas. Sua utilização é descrita desde os tempos remotos e o controle de seu comércio foi um dos incentivadores das grandes explorações marítimas; advém o primeiro relato legítimo sobre a canela ocorreu em trabalhos escritos na China no século IV a.C. O produto é formado pela casca seca de muitas espécies do gênero *Cinnamomum*, família Lauraceae, sendo reconhecidas quatro espécies como as de maior relevância no comércio internacional: canela do Ceilão (*Cinnamomum verum* Presl, sin. *C. zeylanicum* Bl.); canela de Saigon (*C. loureirii* Nees); cássia ou canela da China (*C. cassia* Presl) e canela ou cássia da Indonésia ou de Padang (*C. burmannii* (C.G. e Th.Nees) Bl.). A canela do Ceilão, a original canela do comércio, é originária do Sri Lanka (antigo Ceilão), fundamental produtor e exportador, seguido de Seychelles, Madagascar e Índia (PURSEGLOVE et., 1981).

A caneleira atinge alturas de 8 – 17 metros de altura, é uma planta de aspectos frondosos (Figura 05). Além da Índia e Ceilão também é cultivada nas Guianas, Martinica, Jamaica e Brasil, suas cascas e folhas possuem aroma

agradável, tendo sabor adocicado brandamente picante quando utilizada em forma de pó aromatizante na culinária (VERNON; RICHARDS, 1976; SOUSA et al., 1991).



Figura 05 – Canela

Fonte: www.jardimdeflores.com.br, 2009

A obtenção do óleo essencial tanto das cascas como das folhas ocorre por destilação a vapor. O óleo essencial da casca de canela é rico em aldeído cinâmico, enquanto o das folhas apresenta composição diferente, sendo fonte de eugenol. Os óleos essenciais conseguidos com base nas cascas e das folhas, e ainda a oleoresina, são matérias – primas de grande utilização nas indústrias de alimentos e bebidas, de perfumaria e farmacêutica. O Brasil costuma importar de diversos países grandes volumes tanto de cascas como do óleo essencial, devido à ausência do seu cultivo comercial. O clima e as condições do solo atingem esta planta fortemente, caso em que uma mesma espécie ou variedade, cultivada em outro país, pode ocasionar uma casca de qualidade bem diversa da conseguida no Sri Lanka, seu país de origem (GUENTHER, 1950).

Observa-se, que no âmbito agrônomo os estudos realizados relacionados à canela são escassos, seja como associação de culturas ou no desenvolvimento da produção, até mesmo na Índia (SENANAYAKE; LEE; WILLS, 1978; RAO, 1991; REDDY; BARANWAL; SINGH, 1993; RETHINAM et al, 1994; SANDANANDAN, 1994),

Quanto ao âmbito medicinal observa-se, seu largo uso atribuindo-lhe características como aromática, estimulante da circulação, do coração e aumenta a pressão, vômitos nervosos, febre, anti- séptica, aperiente, digestiva, sedativa, tônica e vasodilatadora (ALMEIDA, 1993).

3.5 Microrganismos

3.5.1 *Enterococcus faecalis*

São cocos Gram positivos que se apresentam isolados, aos pares e em cadeia. Pertencem à família *Streptococaceae* e se diferenciam fenotipicamente dos outros *Streptococcus* por sua capacidade de se desenvolver em presença de bile a 40% e hidrolisar a esculina, sendo capazes de crescer em meio contendo 6,5 % de NaCl. Estes organismos podem ser α , β e γ hemolíticos após crescimento em Ágar sangue de carneiro. É importante saber, que a maioria dos *E. faecalis* mostra resistência à penicilina. Esses microrganismos são residentes normais do trato gastrointestinal e biliar e, em menores números, da vagina e da uretra masculina.

Atualmente, são os agentes cada vez mais importantes de doenças humanas, devido, grande parte das espécies possuir resistência a agentes antimicrobianos aos quais outros *Streptococcus* são geralmente sensíveis. Os *Enterococcus in vitro* apresentam MIC para a penicilina 10 a 100 vezes maiores do que o MIC de outros *Streptococcus*. Os *Enterococcus* constituem a segunda causa mais comum de infecções hospitalares do trato urinário e de feridas, e ainda constituem a terceira causa mais comum de bacteremia hospitalar.

Podem ser isolados também de pacientes com endocardite subaguda e septicemia, assim como de outras feridas infectadas, abscessos peritoniais e pélvicos profundos, encontrando-se geralmente em associação com outras espécies bacterianas, como parte de uma infecção polimicrobiana (KUSUDA et al., 1991; FELMINGHAM et al., 1992).

Estes microrganismos possuem uma grande capacidade em adquirir novos determinantes de resistência a agentes antimicrobianos, seja por meio de

conjugação entre espécies ou até gêneros diferentes (o que pode resultar em difusão de genes, como parte de transposons conjugativos), ou por meio de plasmídios responsáveis por feromônios (MURRAY, 1988, citado por LEME; FERREIRA, 2001).

A resistência às penicilinas e às cefalosporinas, de várias gerações, da aquisição de resistência de alto nível aos aminoglicosídeos e atualmente, do aparecimento de resistência a vancomicina, essas bactérias estão frequentemente envolvidas, em superinfecções graves entre pacientes submetidos à quimioterapia antimicrobiana de amplo espectro. Comumente *E. faecalis* é a bactéria mais isolada do gênero, estando associado 80 – 90 % das infecções enterocócicas humanas, enquanto *E. faecium* ocupa o segundo lugar, pois, é isolado de 10 – 15 % das infecções (RUOFF et al., 1990).

A resistência dos *Enterococcus* a uma variedade de agentes antimicrobianos contribui, efetivamente, para sua patogenicidade. Esses microrganismos exibem resistência intrínseca de baixo nível aos aminoglicosídeos e lincosamidas, apresentam MIC relativamente elevada para as penicilinas e cefalosporinas e mostram-se resistentes à ação das sulfonamidas *in vitro*. As MICs mais elevadas dos agentes β – lactâmicos devem-se a uma afinidade diminuída das proteínas de ligação da penicilina (PBP) da parede celular por esses fármacos. A resistência de baixo nível aos aminoglicosídeos deve-se a sua permeabilidade reduzida através da parede celular dos *Enterococcus* (ELIOPOULOS, 1993).

Até o início da década de 1980, a sensibilidade dos *Enterococcus* a ampicilina e a vancomicina permaneceu bastante previsível. A partir dessa época, foram relatadas espécies de *Enterococcus* resistentes a ampicilina e a vancomicina com frequência crescente. Foi demonstrado que a resistência de algumas cepas de *E. faecalis* a ampicilina é devido à produção de enzimas β – lactamases (PATTERSON; MASECAR; ZERVOS, 1988). Subsequentemente foi relatada a ocorrência de resistência a ampicilina em outras cepas de *Enterococcus*; no caso desses microrganismos, a resistência foi devida a uma redução da afinidade das proteínas de ligação da penicilina à parede celular (CHIRURGI et al., 1991; ELIOPOULOS, 1993; KIM et al., 2000).

A resistência adquirida a glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) em espécies de *Enterococcus* corresponde a cinco fenótipos diferentes. Designados como vanA, vanB, vanD, vanE e vanG, sendo os dois primeiros os mais prevalentes e os de maior importância clínica (DUTKA – MALEN; EVERS; COURVALIN, 1995; GOLD, 2001; WOODFORD, 2001).

Franco; Landgraf (2004) classificam os *Enterococcus* em 16 espécies e enfatizam sua utilização como indicadores de contaminação fecal dos alimentos. Apresentam algumas restrições, pois esses microrganismos também são encontrados em ambientes diferentes do trato intestinal. Além disso, por serem mais resistentes, apresentam uma sobrevivência maior do que os enteropatógenos no solo, vegetais e em alimentos, principalmente, naqueles submetidos à desidratação, ação de desinfetantes e a flutuações de temperatura.

Apesar das limitações do uso desses microrganismos como indicadores de contaminação fecal, sua presença em número elevados nos alimentos indica a utilização de práticas sanitárias inadequadas ou exposição do alimento a condições que permitiriam a multiplicação de microrganismos indesejáveis.

Em patologia animal, os *Enterococcus* estão associados a infecções diversas, destacando-se mastite e endocardite em bovinos e suínos. Em seres humanos, eles são frequentemente isolados, em cultura pura ou mista, a partir de infecções clinicamente significativas, tais como bacteremia acompanhadas ou não de endocardite, infecções do trato urinário e biliar, infecções de feridas e infecções pélvicas e intra-abdominais. Segundo Martins (2001), a literatura documenta o envolvimento dos *Enterococcus* em cerca de 10 a 12% de infecções hospitalares em geral; 46 % das infecções pós-operatórias; 10 % das infecções urinárias e em 5 a 20% dos casos de endocardite infecciosa, classificando este grupo bacteriano como os cocos Gram positivos mais comumente isolados de casos de bacteremia polimicrobiana.

O tratamento das enterococcias é preocupante, pois a concentração que a maioria dos antibióticos atinge no sangue e tecidos não é bactericida para os *Enterococcus*. Tradicionalmente, o tratamento consiste na associação de

antibióticos, um deles sendo um aminoglicosídeo e o outro, um antibiótico ativo contra a parede celular, como a penicilina ou ampicilina.

A resistência adquirida por esses microrganismos aos antibióticos tornou-se um grande obstáculo terapêutico nos últimos anos. A preocupação é maior ainda porque a resistência é transferível de um *Enterococcus* para outro, ou mesmo para outra bactéria. Os genes de resistência são geralmente transportados por plasmídios conjugativos e por transposons, que também podem ser conjugativos. Os mecanismos de resistência são diversos, e o mecanismo da resistência à vancomicina é peculiar (TEIXEIRA; TRABULSI, 2004).

3.5.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus são cocos Gram positivos imóveis, não formadores de esporos pertencentes à família *Micrococaceae*, que podem se apresentar isolados, aos pares, tétrades e cadeias curtas, porém, aparecem predominantemente agrupados em cachos irregulares, semelhante a cacho de uva. São aeróbios e anaeróbios facultativos, com maior crescimento sob condições aeróbias, quando então produzem a catalase. Estes microrganismos podem se desenvolver entre 15 e 45°C. Crescem em meios simples sem inibidores (JAWETZ et al., 2000; MURRAY et.al., 2006; KONEMAN et al., 2008).

Estes microrganismos são mais resistentes que muitas Bactérias endosporuladas e sobrevivem durante meses em placa de ágar lacrada, mantida em geladeira. A maioria das cepas resiste ao aquecimento a 60°C durante 30 minutos, e a desinfetantes como cloreto de mercúrio e fenol do que a maioria das outras bactérias. Crescem em meios de cultura com concentrações de sal elevadas, entre 10 – 20%. Produzem as enzimas catalase, coagulase e Dnase, que funcionam como fatores de patogenicidade, e algumas toxinas, como a enterotoxina estafilocócica que é responsável por intoxicação alimentar, produzida principalmente por linhagens de *S. aureus*. Depois de um curto período após a ingestão, o processo se manifesta muitas vezes de modo fulminante, sendo o vômito e a diarreia seus sintomas

principais. Atualmente, sabe-se que as espécies *S. intermedius* e *S. hyicus* também são capazes de produzir tais toxinas (JAWETZ et al., 2000; FRANCO; LANDGRAF 2004; MURRAY et al., 2006).

A coagulase é uma enzima de composição química desconhecida, com atividade semelhante à protrombina, capaz de transformar o fibrinogênio em fibrina, resultando na formação de coágulo, visível em um sistema analítico adequado (KONEMAN et al., 1997). É usada, freqüentemente, como índice de virulência ou patogenicidade (MAC FADDIN, 2003). Além disso, a coagulase pode contribuir para a patogenicidade pela inibição da fagocitose com deposição direta de fibrina na parede da célula bacteriana, embora isto não esteja claro (HOWARD et al., 1993)

Atualmente, o gênero *Staphylococcus* é constituído de 35 espécies e 17 subespécies, muitas das quais são encontradas no homem, sendo que, *S. aureus* é a espécie mais importante associada às doenças estafilocócicas, através da produção de toxinas ou da invasão direta e destruição do tecido. Exemplos e características de doenças mediadas por toxinas.

Intoxicação alimentar, que após o consumo de alimento contaminado pela enterotoxina termoestável, ocorre rápido aparecimento de vômito grave, diarreia e espasmos abdominais, com regressão em 24 horas. Síndrome da pele escaldada: há descamação disseminada do epitélio em crianças, bolhas sem microrganismos ou leucócitos. Síndrome do choque tóxico: intoxicação multisistêmica caracterizada inicialmente por febre, hipotensão e uma erupção eritematosa, macular e difusa, produzindo alta mortalidade quando não há rápida antibioticoterapia e eliminação do foco. Doenças cutâneas como carbúnculo, foliculite, furúnculos, infecções de feridas e outras (bacteremia, empiema, endocardite, osteomielite, pneumonia, artrite séptica), são citadas tendo como responsável este microrganismo (MURRAY et al., 2006).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são mesófilas que crescem em temperatura na faixa de 7 a 47,8° C; as enterotoxinas são produzidas entre 10° C e 46° C, com as condições ótimas entre 40° C e 45° C. Os extremos de temperatura estão na dependência dos demais parâmetros que devem encontrar-se em condições ótimas. Os surtos de intoxicação alimentar são provocados por alimentos que permanecem neste intervalo de temperatura por

tempo variável, de acordo com o nível de inóculo e temperatura de incubação. Em geral, quanto mais baixa for a temperatura, maior será o tempo necessário para a produção de enterotoxina. Em condições ótimas, a enterotoxina torna-se evidente em quatro a seis horas (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

Enterotoxinas estafilocócicas – foram identificadas cinco toxinas estafilocócicas sorologicamente distintas de (A-E e G-I) e três subtipos de enterotoxinas C. As enterotoxinas são resistentes à hidrólise pelas enzimas gástricas e jejunais e mostram-se estáveis ao aquecimento a 100°C durante 30 minutos. Por conseguinte, uma vez contaminado um produto alimentar com *Staphylococcus* produtores de enterotoxinas e às toxinas sendo produzidas, nenhum reaquecimento do alimento, nem a exposição aos ácidos gástricos, é capaz de destruir sua ação patogênica.

Estas toxinas são produzidas por 30 – 50% de todas as cepas de *S. aureus*. As enterotoxinas do tipo sorológico A estão comumente associadas às doenças, por outro lado as enterotoxinas C e D são encontradas em produtos lácteos contaminados, enquanto a enterotoxina B provoca enterocolite pseudomembranosa de origem estafilocócica (MURRAY et al., 2006).

3.5.3 *Escherichia coli*

É o agente mais comum das infecções do trato urinário e de septicemia causada por bastonetes Gram negativos. Constitui uma das causas principais de meningite neonatal; é o agente mais frequente associado com a “diarréia dos viajantes” (LEVINSON; JAWETZ, 1998). A *E. coli* é o anaeróbio facultativo mais abundante no cólon e nas fezes, sendo sobrepujada em número pelos anaeróbios obrigatórios como, por exemplo: *Bacteróides spp.*

Este microrganismo possui três antígenos utilizados para a sua identificação durante investigação epidemiológica: o antígeno da parede celular ou antígeno O, o flagelar ou H e o antígeno capsular ou K. Devido à existência de mais de 150 antígenos O, 50 antígenos H e 90 Antígenos K, as várias combinações entre estes, resultam em mais de 100 tipos antigênicos de *E. coli*. Sorotipos específicos estão associados a determinadas doenças, por exemplo:

o antígeno O55 e o antígeno O111 que causam epidemias de diarreia neonatal (LEVINSON; JAWETZ, 1998).

Com base nos fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiológicas, as linhagens de *E. coli* consideradas patogênicas no trato intestinal por diferentes mecanismos, atualmente, são agrupadas em cinco classes: *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Várias outras *E. coli* estão, especificamente, associadas com infecções urinárias (UPEC), meningites e provavelmente outras infecções extra – intestinais (FRANCO; LANDGRAF, 2004; TRABULSI; ORDOÑEZ; MARTINEZ, 2004; MURRAY, 2006).

3.5.4 *Klebsiella pneumoniae*

É um patógeno oportunista, que causa infecções nosocomiais, especialmente, pneumonia e infecções do trato urinário. Esse microrganismo é um importante patógeno do trato respiratório, também fora dos hospitais. É uma das espécies mais frequente envolvidas nas infecções humanas. Normalmente, encontrado no intestino grosso, estando também presente no solo e na água. *K. pneumoniae* tem uma cápsula muito grande, conferindo às colônias uma aparência mucóide brilhante (LEVINSON; JAWETZ, 1998).

Os mesmos autores inferem que essa bactéria tem a maior probabilidade de ser um patógeno primário não oportunista; estando esta propriedade relacionada com sua cápsula antifagocitária. Apesar de sua condição de patógeno primário, paciente com infecções causadas por *K. pneumoniae* apresenta frequentemente, algumas predisposições para contrair a doença infecciosa, cujos fatores desencadeantes são: idade avançada, doenças respiratórias crônicas, diabetes ou alcoolismo. O organismo se localiza no trato respiratório. Cerca de 10% dos indivíduos normais que são candidatos a contrair uma pneumonia, se as defesas naturais forem diminuídas, podem contraí-la (LEVINSON; JAWETZ, 1998).

Além de infecções urinárias e pneumonia estes microrganismos causam bacteremia e a disseminação para outras áreas, como as meninges. Essas infecções são de difícil distinção em termos clínicos, com exceção da pneumonia, que produz uma secreção espessa e sanguinolenta (secreção tipo geléia de amora), e pode progredir para uma necrose e a formação de abscesso.

Segundo Toledo (1999), a *K. pneumoniae* é um dos poucos bacilos Gram negativos que causam pneumonia lobar, uma vez que a pneumonia, geralmente, se localiza nos lobos superiores. É comum sua associação com infecções urinárias, endocardite e vários tipos de infecções pós-cirúrgicas. Algumas estatísticas demonstraram que *K. pneumoniae* pode ser responsável por 10% das infecções hospitalares, apresentando nesses casos resistência à maioria dos antimicrobianos de uso corrente.

Mais de 95% das amostras de *Klebsiella*, isoladas de diferentes espécimes clínicos, são *K. pneumoniae*. De maneira interessante, a maioria destas amostras é diplóide, com relação à fermentação da lactose, devido à presença, simultânea, de genes plasmidiais e cromossômicos. Esta propriedade tem interesse epidemiológico, pois as amostras diplóides proliferam, abundantemente, em produtos ricos em lactose, como o leite.

Todas as espécies de *Klebsiella* são fortemente capsuladas, e com base nestes antígenos, muitos sorotipos já foram caracterizados, com exceção dos sorotipos: 4, 5, 6 e 3a de *K. Pneumoniae*, que correspondem a qualquer um dos outros 72 sorotipos, sendo os sorotipos 1 e 2 os mais frequentes (TRABULSI et al., 1999).

3.5.5 *Acinetobacter baumannii*

É um cocobacilo Gram negativo, que frequentemente apresenta formas diplocócicas, assemelhando-se à *Neisseria*. São bactérias não exigentes, aeróbias estritas e não fermentadoras. Vivem na água e no solo úmido. Pode ser encontrada na microbiota normal humana da pele, conjuntiva, nariz, faringe e trato gastrintestinal, bem como em animais domésticos e

silvestres. Sabe-se que, as espécies de *Acinetobacter* desempenham um importante papel na colonização e infecção de pacientes hospitalizados, e é o segundo organismo não fermentador encontrado em laboratório clínico, após a *P. aeruginosa*. Pode ocasionar pneumonia, bacteremia, endocardite, infecções do trato urinário, meningite, peritonite em pacientes com diálise peritoneal, infecções de pele e feridas, celulite, e casos esporádicos de conjuntivite, otite média, osteomielite e sinovite. Em pacientes com queimaduras ou imunodeficientes, age como patógeno oportunista, produzindo sepse (BERGONE – BÉREZIN; TOWNER, 1996; VILLEGAS; HARTSTEIN, 2003; FRANZOLIN, 2004).

A. baumannii é também comumente isolada de torneiras, luvas, monitores, inaladores, colchões e das mãos do pessoal hospitalar. Levando à implicação de ser o contato pessoa – pessoa, a maneira mais comum de disseminação desta bactéria dentro dos hospitais. Portanto, esse microrganismo é frequentemente isolado de pacientes de UTI, especialmente daqueles em unidades de queimados e dos pacientes com fatores predisponentes como diabetes *mellitus*, administração de esteróide adrenal, diálise peritoneal, câncer, alcoolismo e longos períodos de internação (SILVA et al., 2006).

Considerando-se, que o isolamento de *Acinetobacter* em liquor é de diagnóstico complicado, principalmente se for com presença de glicose baixa, proteína alta e leucócitos polimorfonucleares. Esse microrganismo não é um patógeno comum em meningites e normalmente não atravessa a barreira hematoencefálica em pacientes saudáveis. Geralmente, meningite por *Acinetobacter* é uma infecção esporádica vista em unidades neurológicas após cirurgia ou trauma craniano, apesar de vários casos epidêmicos terem sido descritos (TOWNER, 1997).

Embora muitas espécies de *Acinetobacter* possam causar infecções, a espécie mais importante é *A. baumannii*. Antes de 1970 as infecções causadas por esses microrganismos eram em sua maioria infecções urinárias pós cirúrgica, e eram isoladas principalmente de pacientes hospitalizados em unidades cirúrgicas ou clínicas. Hoje, o principal papel dessa bactéria é o de causar pneumonia nosocomial, em procedimentos de ventilação mecânica. O tratamento das infecções causadas por estas linhagens é problemático, devido

a estes microrganismos, serem frequentemente resistentes à maioria dos antibióticos usados em rotina, portanto, a terapêutica específica deve ser orientada por um teste de suscetibilidade.

Considerando-se, que erros significativos são frequentes com as combinações de β – lactâmicos e inibidores de β – lactâmicos no método de microdiluição em caldo, observa-se maior resistência. Na realidade, não existe dados que indiquem quais os métodos disponíveis são mais relevantes. Mas, o tratamento empírico para infecções graves deve consistir em um antibiótico β – lactâmico (como: ceftazidime, imipenem entre outros) e um aminoglicosídeo (SWENSON; KILLGORE; TENOVER, 2004; JOLY – GUILLOU, 2005; MURRAY, 2006).

Verificou-se, que o tratamento combinado com um aminoglicosídeo e ticarcilina ou piperacilina é sinérgico e pode ser efetivo nas infecções graves. Para as infecções por *Acinetobacter* resistente a múltiplos fármacos, vários estudos demonstraram a eficácia clínica do sulbactam em combinação com ampicilina ou cefoperazona (JIMÉNEZ – MEJÍAS et al, 1997; PANDEY et al., 1998; JELLISON; MCKINNON; RYBAK, 2001; LEVIN, 2002; HIGGINS et al., 2004). Salientando que a colistina é o único agente antimicrobiano que se mostrou ativo contra *Acinetobacter* resistente a múltiplos fármacos (CATACHPOLE et al., 1997; LEVIN et al., 1999; JIMÉNEZ – MEJÍAS et al., 2002).

3.5.6 *Pseudomonas aeruginosa*

São bastonetes retos ou curvos, móveis com flagelação polar, Gram negativos, medindo 0,5 a 0,8 μ m por 1,5 a 3,0 μ m, aeróbios estritos. Quase todas as cepas são móveis, possuindo um flagelo simples polar (algumas cepas produzem dois ou três flagelos), e, normalmente, são diferenciados por meio de provas bioquímicas, teste de sensibilidade a antibióticos, formação de pigmentos e número de flagelos. São amplamente distribuídos na natureza (solo, água, esgoto e ar), caso em que pode ser encontrado em alimentos de origem animal e vegetal, e nos diversos ambientes hospitalares; constituindo

uma bactéria ubíqua que produz substâncias tóxicas, e são patógenos humanos oportunistas. O gênero *Pseudomonas* possui inúmeras espécies, e apenas algumas delas são associadas a infecções oportunistas. A *P. aeruginosa* é encontrada em pequeno número na microbiota intestinal normal e na pele humana. Como patógeno é a espécie mais frequente encontrada, em casos clínicos de infecção, por este grupo de microrganismo (FRANCO; LANDGRAF, 2004; LINCOPAN; TRABULSI, 2004; MURRAY et al., 2006).

Levando-se em consideração, que uma das características mais relevantes dessa espécie é a capacidade de produzir um pigmento azul – esverdeado, denominado piocianina, e também outros pigmentos menos freqüentes, como a pioverdina, que pode ser observado examinando-se as culturas sob luz ultravioleta, por esta razão é também denominada de bacilo piociânico (LEVINSON; JAWETZ, 1998). Este pigmento possui atividade antibiótica favorecendo crescimento melhor desta bactéria em relação a outras, em determinadas circunstâncias. Outros pigmentos, como a fluoresceína, e um de menor frequência como a piomelanina (marrom) são produzidos por esses microrganismos (LINCOPAN; TRABULSI, 2004; MURRAY et al., 2006). Este microrganismo cresce a 40°C, hidrolisa acetamida e produz gás a partir de nitratos, características estas observadas a partir da qual, a maior parte das cepas pode ser identificada definitivamente (KONEMAN et al., 2008).

Do gênero *Pseudomonas* a *P. aeruginosa* é a mais frequente isolada de amostras clínicas. A infecção por este microrganismo prevalece, particularmente, entre pacientes com feridas de queimadura, fibrose cística, leucemia aguda, transplante de órgãos e usuários de drogas intravenosas (BODEY et al., 1983). Em relação à patogenicidade, dificilmente esse microrganismo poderia causar infecção em um indivíduo normal, pois *P. aeruginosa* é um germe, tipicamente, oportunista. De um modo geral, o início da infecção requer uma alteração substancial das defesas de primeira linha do organismo. Tal alteração pode ser o resultado de uma interrupção das barreiras cutâneas ou mucosas (traumas, cirurgias, queimaduras, diálise, transplantes, hemoterapia ou uso prolongado de cateter), de uma imunodepressão fisiológica (prematturos, neonatos, idosos), de uma imunodepressão terapêutica (corticóides, radiação anticancerogênica) ou de uma imunodepressão clínica

(diabetes, neoplasias, imunodeficiências, fibrose cística). A patogênese pode ser resumida em três etapas: adesão bacteriana e colonização, invasão local, e infecção sistêmica disseminada (LINCOPAN; TRABULSI, 2004).

As infecções localizadas, em consequência de processos cirúrgicos ou queimaduras, podem resultar em bacteremias severas. Infecções urinárias associadas ao uso de cateteres são frequentes, e os portadores de fibrose cística demonstram em sua maioria, colonização por *P. aeruginosa*, e embora, raramente, apresentem bacteremia, quando isso acontece, provoca no paciente pneumonia mortal (MURRAY et al., 2006; KONEMAN et al., 2008).

Além de infecções primárias de pele, este microrganismo pode causar outras infecções cutâneas, sendo mais reconhecidas as queimaduras, infecções de ouvido (a otite externa é a mais frequente), e as produzidas através da natação (ouvido do nadador) constituem um importante fator de risco, sendo em último caso, a otite externa maligna, que é uma forma mais virulenta da doença. A infecção causada por este microrganismo apresenta uma exsudação purulenta azul, devido à produção de piocianina liberada por estes microrganismos (KONEMAN et al., 2008).

Em lactentes ou em pessoas debilitadas, o microrganismo é capaz de invadir a corrente sangüínea e produzir uma septicemia fatal. Este processo é mais comum em pacientes portadores de leucemia ou linfoma, que foram submetidos à quimioterapia antineoplásica ou à irradiação, e em pacientes com queimaduras graves. Na septicemia por *P. aeruginosa*, a verdoglobina (um produto de degradação da hemoglobina) ou um pigmento fluorescente, pode ser detectado em ferimentos, queimaduras ou na urina, por meio da luz ultravioleta (MURRAY et al., 2006).

Do gênero *Pseudomonas*, pela frequência com que está envolvido em doenças humanas, e também por seu perfil de resistência aos antimicrobianos, a *P. aeruginosa* tem recebido maiores atenções. Embora, raramente, seja causadora de doença em indivíduos sadios, ela é a maior ameaça para pacientes hospitalizados, particularmente, aqueles com sérias doenças de base (como câncer e pacientes queimados). A alta mortalidade associada a estas infecções deve-se à combinação de fatores como defesas enfraquecidas do hospedeiro, resistência bacteriana à maioria dos antibióticos e a produção de

enzimas extracelulares, bem como toxinas (MURRAY et al., 2006; TRABULSI et al., 1999).

A infecção costuma ocorrer em qualquer local onde existe tendência ao acúmulo de umidade – traqueostomias, cateteres de demora, queimaduras, nas orelhas externas (ouvido de nadador) e feridas cutâneas exsudativas. A *P. aeruginosa* também causa infecção das vias respiratórias inferiores; podendo essa ser grave e até mesmo potencialmente fatal, em hospedeiros imunocomprometidos. Além disso, o microrganismo pode causar infecções devastadoras dos olhos. A ceratite, a infecção de úlceras de córnea e a endoftalmite são também citadas.

Pseudomonas podem ser consideradas emergências médicas que podem ser fulminantes e ameaçar o paciente de perda permanente da visão com frequência regular. Elas aparecem na literatura em casos isolados de endocardite, meningite, abscesso cerebral e infecções ósseas e articulares devido à disseminação hematogênica do microrganismo (BERGONE– BÉREZIN; TOWNER, 1996).

Os únicos agentes antimicrobianos considerados eficazes no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* são alguns β – lactâmicos (ticarcilina, piperacilina, aztreonam, imipenem e ceftazidime), alguns aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e colistina (JONES et al., 1998; BIENDENBACH et al., 1995; DUBOIS et al., 2001). Além disso, aquisição de resistência ocorre com frequência e, dificilmente, encontra-se um tratamento efetivo para infecções por esse patógeno que possa impedir o aumento no número de mortes de pacientes infectados (DUBOIS et al., 2001).

O imipenem tem se mostrado resistente a todas as β – lactamases produzidas pela *P. aeruginosa*. Esta bactéria pode desenvolver resistência através da perda direta de uma porina da sua membrana externa, a Opr D2, da qual provém o canal de entrada do imipenem no interior da célula bacteriana (BELTRAME et al., 1996; TSAKIS et al., 2000). Outro mecanismo de resistência seria a produção de metalo β - lactamases (MBLs), que são enzimas com atividade sobre vários antibióticos β - lactâmicos, incluindo cefamicinas e carbapenens, incluindo ainda ácido clavulânico e sulbactam (ARAKAWA et al., 2000; TSAKIS et al., 2000).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras biológicas

O universo do estudo foi constituído de 170 amostras clínicas de pacientes internos, nas várias clínicas do Hospital de Emergência e Trauma Senador Humberto Lucena (HETSHL) de João Pessoa - PB. O mesmo constitui um hospital de referência para sua especialidade, classificado como de médio porte, localizado na área urbana da cidade e credenciado pelo Sistema Único de Saúde (SUS), para atendimento de urgência a toda população. A coleta da amostra foi realizada de abril a dezembro de 2006, sob a coordenação da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH).

As amostras biológicas foram provenientes de diversos sítios anatômicos relacionados com a patologia do paciente. Após a colheita das amostras, se fossem secreção, elas eram colocadas em meio de transporte Stuart (Difco), e enviadas aos Laboratórios de Microbiologia Clínica e Micologia Clínica do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde (DCF/CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), onde eram processadas para isolamento bacteriano.

Das 170 amostras analisadas, cresceram 110 bactérias das quais foram selecionadas 24 cepas para a realização desse trabalho. Na escolha das bactérias levou-se em consideração o grau de resistência das mesmas (Tabela 01).

Tabela 01 – Amostras clínicas usadas para isolamento dos microrganismos

Material	Número de cepas	%
Urina	08	33,33
Sangue	04	16,67
Lavado bronco – alveolar	04	16,67
Secreção traqueal	02	8,33
Secreção da perna direita	02	8,33
Secreção de dreno torácico	01	4,17
Fragmento de tecido	01	4,17
Secreção de pele	01	4,17
Líquido pleural	01	4,17
Total	24	100,00

4.2 Processamento das amostras clínicas e identificação bacteriana

As amostras clínicas foram inoculadas nos meios de Ágar Sangue, Ágar Manitol Salgado, Ágar MacConkey e Ágar Brolacin (Difco), possibilitando o desenvolvimento dos diferentes microrganismos responsáveis pelo quadro infeccioso. Priorizou-se, o isolamento de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, porque esses microrganismos foram os principais patógenos multirresistentes.

A identificação bacteriana foi realizada através dos métodos de rotina padronizados em Laboratório de Microbiologia, dando condições a caracterização de cocos Gram positivos, espécies de *Enterobacteriaceae* e Bastonetes Gram Negativos Não Fermentadores (BGNNF), conforme rotina estabelecida. Posteriormente, foram realizados os antibiogramas seguindo as normas preconizadas pelo laboratório de Microbiologia Clínica (MACFADIN, 2003; KONEMAN et al., 2001; SANTOS FILHO, 2003; OPLUSTIL et al., 2004).

4.3 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

O teste de sensibilidade foi realizado pelo método de difusão com discos (BAUER et al., 1966), e preconizado pelo NCCLS (2004), onde para a escolha das drogas foram levadas em consideração as bactérias e a procedência das amostras clínicas. No Quadro 01, constam os antibióticos usados na determinação da sensibilidade e resistência das bactérias isoladas e identificadas nas amostras clínicas.

Antibióticos	Sigla	Concentração do disco
Amicacina	AMI	30 µg
Amoxicilina	AMO	10 µg
Amoxicilina/ácido clavulânico	AMC	10 / 10 µg
Ampicilina	AMP	10 µg
Ampicilina sulbactam	SAM	10 / 10 µg
Azitromicina	AZT	15 µg
Aztreonam	ATZ	30 µg
Cefadroxil	CFD	30 µg
Cefalexina	CFX	30 µg
Cefalotina	CFL	30 µg
Cefepime	CFP	30 µg
Cefotaxima	CFO	30 µg
Ceftazidime	CTZ	30 µg
Ceftriaxona	CRO	30 µg
Ciprofloxacino	CIP	5 µg
Claritromicina	CLA	15 µg
Clindamicina	CLI	2 µg
Eritromicina	ERI	15 µg
Gentamicina	GEN	10 µg
Imipenem	IMI	10 µg
Levofloxacino	LEVO	5 µg
Linezolida	LZD	30 µg
Meropenem	MER	10 µg
Oxacilina	OXA	1 µg
Penicilina G	PEN	10 UI
Piperacilina / Tazobactam	PTZ	100 / 10µg
Polimixina B	POL	300 UI
Sulfametoxazol / Trimetoprim	SUT	23,75 / 1,25 µg
Teicoplanina	TEC	30 µg
Ticarcilina / ácido clavulânico	TIM	75 / 10 µg
Vancomicina	VAN	30 µg

Quadro 01. Antimicrobianos usados no antibiograma dos microrganismos isolados.

As amostras de MRSA foram confirmadas utilizando-se E-test®, para determinação da CIM e confirmação da resistência (ARAÚJO; OLIVEIRA; SANTOS FILHO, 2000). Amostras de *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de ESBL foram confirmadas utilizando-se os critérios preconizados pelo NCCLS (2004), no qual estão estabelecidos os valores para os tamanhos dos halos de inibição, no teste de difusão com discos, para a triagem presuntiva de amostras potencialmente produtoras de ESBL: ceftazidime (22mm), aztreonam (27mm), cefotaxima (27mm), ceftriaxona (25mm). As amostras que apresentaram este comportamento foram submetidas a testes confirmatórios (HONORIO et al., 2001), Figuras 06 e 07.

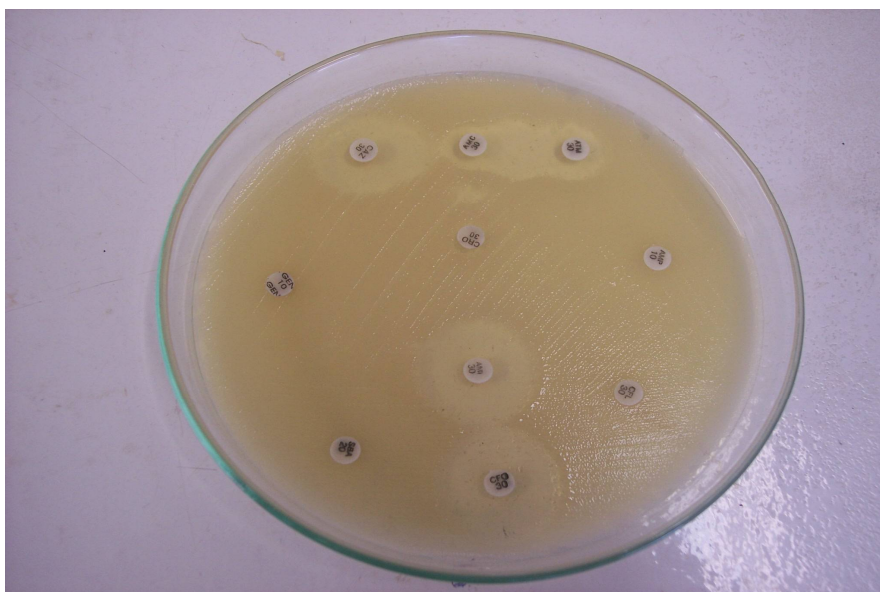


Figura 06 – Teste de ESBL positivo para *K. pneumoniae*.

As bactérias que mostraram perfil de resistência elevado, com as seguintes características: *E. faecalis* multirresistentes, *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA), *K. pneumoniae* e *E. coli* multirresistentes e/ou produtoras de beta lactamases de espectro ampliado (ESBL), linhagens de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* apresentando resistência a ceftazidime.



Figura 07 – Teste de ESBL positivo para *E. coli*

Foram selecionadas para utilização, nesse estudo, 24 linhagens bacterianas, levando em consideração as que apresentaram maiores índices de resistências e incidências. As bactérias foram subdivididas em seis grupos de espécies distintas, da seguinte forma: *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA) (04), *E. faecalis* multirresistentes (04), *K. pneumoniae* (04) e *E. coli* (04) multirresistentes e/ou produtoras de beta lactamases de espectro ampliado (ESBL), *P. aeruginosa* (04) e *A. baumannii* (04) que apresentaram resistência a ceftazidime. Após a realização dos exames preliminares na rotina de identificação, as cepas isoladas e identificadas foram mantidas em Ágar Nutriente (Biobras), até sua utilização em testes posteriores.

4.4 Óleos essenciais e fitoconstituintes

Os óleos essenciais foram fornecidos pela empresa FERQUIMA – Indústria e Comércio Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil), assim como um boletim técnico, com as informações do procedimento utilizado na sua extração (método de hidrodestilação em escala industrial). O óleo essencial utilizado atendeu todas as especificações exigidas, no decorrer da pesquisa, concernentes a seu controle de qualidade conforme análises realizadas pelo fornecedor.

4.5 Teste de triagem para avaliação da atividade antibacteriana de óleos essenciais e fitoconstituintes

Na determinação da atividade dos óleos essenciais de: *C. zeylanicum* B., *Cimbopogon citratus*, *Laurus nobilis* L, *O. vulgare* L, *Rosmarinus officinalis* L, *Origanum manjerona*, *Ocimum basilicum* L, *Lippia sidoides* Cham., *Syzigium aromaticum* e dos fitoconstituintes cariofileno, citral, eucaliptol e eugenol sobre as cepas bacterianas, foi realizado, inicialmente, o teste de triagem, da atividade antibacteriana dos referidos produtos, através do método de difusão em meio sólido (BAUER et al., 1966; COURVALIN et al., 1985; CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; NCCLS, 2004; CLSI, 2005).

Utilizando-se dos crescimentos no Agar Mueller Hinton (Difco) das cepas de *E. faecalis*; MRSA; *E. coli*; *K. pneumoniae*; *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, foram preparadas suspensões das referidas bactérias em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina (NaCl a 0,85% p/v) estéril. Em seguida, tais suspensões foram agitadas durante 2 minutos com auxílio de aparelho Vortex. Após agitação, cada suspensão teve sua turbidez comparada e ajustada à turbidez apresentada pelo tubo 0,5 da escala de MacFarland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 10^8 UFC/mL.

Introduziu-se, um “swab” estéril em cada suspensão bacteriana e retirou-se o excesso de líquido comprimindo-o na parede interna dos tubos. Semeou-se na superfície do Ágar Mueller Hinton (Difco) estriando em três direções diferentes, girando a placa cerca de 60 graus, para assegurar uma distribuição uniforme da bactéria. Em seguida foram adicionados aos discos de papel estéril 20 µL dos produtos naturais a serem testados, que foram depositados com auxílio de uma pinça estéril na superfície das placas inoculadas, fazendo ligeira pressão sobre os discos. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ / 24 horas (VINCENT; VINCENT, 1944; BAUER et al., 1966; CHIN LÜ, 1971; MCGINNIS, 1980; SHADOMMY; ESPINEL – INGROF; GEBRA, 1985). Após o período de incubação, foi considerado como possuidor de atividade antimicrobiana aquele produto que apresentou a formação de um halo de inibição igual ou superior que 10 mm de diâmetro (NAQUI; KILIAN; VOHORA, 1991; LIMA et al., 1993; COLE, 1994; ALVES et al., 2000; HADACEK; GREGER, 2000; SOUZA et al., 2005). Os ensaios foram realizados em triplicata

e o resultado final foi determinado pela média aritmética dos halos de inibição obtidos. Frisa-se que das substâncias testadas as que apresentaram atividade inibitória, sobre os microrganismos em questão foram *C. zeylanicum* B., *O. vulgare* L., e *Laurus nobilis* L.,

4.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Foram determinadas as CIMs dos óleos essenciais de *O. vulgare* L e *C. zeylanicum* B sobre as cepas de *E. faecalis*; MRSA; *E. coli*; *K. pneumoniae*; *A. baumannii* e *P. aeruginosa* isoladas das amostras clínicas. Estabeleceu-se variadas concentrações dos óleos essenciais obtidas da seguinte forma: em um tubo de ensaio estéril colocou-se 3,2 mL do óleo essencial, 0,04 mL de tween 80 e água destilada estéril quantidade suficiente para 5mL, sendo agitado por dois minutos em Vortex. Posteriormente, fez-se diluição seriada onde cada tubo estéril seguinte, contendo 2,5mL de água destilada estéril foi acrescentado de 2,5mL da diluição anterior e, agitados por dois minutos (ALLEGRINI; SIMEON, 1972). As concentrações finais obtidas corresponderam a 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,125.

A determinação da CIM dos óleos essenciais foi realizada através da técnica de microdiluição, utilizando-se microplacas com tampas estéreis contendo 96 poços distribuídos em forma de U (12X8) (NCCLS M2/A7, 2000a; HADACEK; GREGER, 2000; CLEELAND; SQUIRES, 1991). Colocou-se nos 12 poços das linhas de A – G, 100µL do caldo nutriente, previamente inoculado com as bactérias. Em seguida, adicionou-se 100µL dos óleos das plantas estudadas em concentrações decrescentes, ou seja, iniciando pelos 12 poços da linha A, até os da linha G, de modo que a primeira seqüência de poços apresentasse a maior concentração (8%) e a sétima linha apresentasse a menor concentração (0, 125 %). Sendo que da linha A – G e nos poços de 1 – 12 procedeu-se da seguinte maneira: da coluna 1 – 4 inocularam-se *A. baumannii*; de 5 – 8 *E. faecalis*; de 9 – 12 *E. coli*. O mesmo procedimento foi feito para *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e MRSA. Nos poços da linha H foi realizado o procedimento de controle da viabilidade das cepas ensaiadas, onde foram colocados 200 µL de caldo nutriente, previamente inoculado com as respectivas

bactérias. O sistema foi incubado a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas (VILJOEN et al., 2003; SAHIN et al., 2004).

Para a leitura do ensaio foi utilizado o método colorimétrico, que consistiu na adição de 20 μL da solução aquosa do corante resazurina sódica (Sigma – Aldrich) na concentração de 0,01 % (p/v) em todos os poços da placa, reconhecido como um indicador colorimétrico de óxido-redução (MANN; MARKAN, 1998; SALVAT et al., 2001; PALOMINO et al., 2002; BURT; REINDERS, 2003).

A mudança de coloração do corante azul para rosa indica crescimento microbiano, o que caracteriza a redução deste corante acusando a viabilidade bacteriana, ou seja, nessa concentração, o óleo não foi capaz de matar as bactérias. Considerou-se como CIM, a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir o crescimento da cepa ensaiada, verificado pela permanência da coloração azul do corante (ESPINEL; INGROF et al., 1992).

4.7 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para a determinação da CBM foram retirado 50 μL , das três últimas concentrações do óleo com as cepas bacterianas, na placa de microdiluição, com ausência de crescimento e foram inoculadas em placa contendo Ágar Nutriente (Biobras). As mesmas foram incubadas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas, e em seguida, realizou-se a leitura. Foi considerada bactericida a concentração do óleo que não permitiu a reativação do microrganismo, em meio isento de antimicrobiano (BENOUDIA; HASSAR; BENJILALLI., 1988; SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998; SALVAT et al., 2001; SAHIN et al., 2004).

4.8 Determinação do tempo de morte bacteriana

Este método experimental é usado na determinação da viabilidade dos microrganismos, após terem sido expostos aos óleos em estudo por tempo determinado (MAY; CHAN; FRENCH, 2000). Utilizou-se como mecanismo de

realização deste experimento o método de contagem de células viáveis. Neste ensaio, foi observado o comportamento das cepas de *A. baumannii*, *E. coli*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e MRSA. A determinação da curva de crescimento e / ou mortalidade em função do tempo de exposição, a um determinado produto, é uma das ferramentas de trabalho utilizada para determinar os efeitos de antimicrobianos, sobre as bactérias (CANTÓN PEMÁN, 1999).

Após a determinação da CIM dos óleos, frente aos 06 grupos de bactérias estudadas, selecionou-se uma cepa de cada grupo, para a realização da cinética bacteriana de cada óleo em questão. Em um tubo teste (T), com 4mL do meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI), e concentração ajustada para 10mL, foi feita a inoculação de 1mL da suspensão da cepa bacteriana teste, correspondendo a 10^8 UFC/mL. Em seguida, adicionou-se 5mL do óleo numa concentração dupla a da CIM, determinada anteriormente. O mesmo procedimento foi feito no tubo Controle (C), sendo que, o óleo foi substituído por água destilada estéril adicionando-se 0,04 mL de Tween 80.

Os tubos T e C foram incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, nos intervalos de 0, 30, 60 e 120 minutos. Neste intervalo de tempo, retirava-se 1mL das soluções, e fazia-se diluições seriadas de 1:10 (v/v), ou seja, colocava-se 1mL das soluções em tubos com 9mL de solução salina estéril, a 0,85% (p/v) (10^{-1} – 10^{-6}), agitando-se por 2 minutos em vortex, inoculando-se 0,1mL da última diluição em placa de Petri contendo Ágar Mueller Hinton (AMH) e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após este período, foi realizada a contagem do número de células viáveis, a qual foi expressa em log de UFC/mL (SAGDIÇ et al., 2003).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho estão apresentados em forma de tabelas, gráficos e figuras que serão discutidos progressivamente, como se vê na Tabela 02 o perfil de resistência de *E. faecalis* e MRSA.

A incidência de *E. faecalis* nas infecções hospitalares tem aumentado constantemente fato este que muito preocupa os profissionais da área de saúde, pois esses microrganismos adquirem resistência muito rápida aos antimicrobianos, tornando-se difícil o seu combate. Como está demonstrado na Tabela 02, das quatro cepas testadas, todas apresentaram resistência a três antibióticos, este resultado é também encontrado na literatura consultada o que justifica a realização de pesquisas (RUOFF et al., 1990; KONEMAN et al., 2008).

Tabela 02. Perfil de resistência dos *Enterococcus faecalis* e MRSA utilizados na pesquisa

Antibióticos Bactérias																	
	AMP	SAM	CIP	GEN	LEVO	AMO	AMC	CFD	CFL	CFX	PEN G	OXA	ERI	CLA	AZT	CLI	SUT
<i>E. faecalis</i> 01	S	S	R	R	R												
<i>E. faecalis</i> 02	S	S	R	R	R												
<i>E. faecalis</i> 03	S	S	R	R	R												
<i>E. faecalis</i> 04	S	S	R	R	R												
MRSA 01	R	R	R	R	NT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NT	R	R
MRSA 02	R	R	R	R	NT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MRSA 03	R	R	R	R	NT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MRSA 04	R	R	R	R	NT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Legenda: *E. faecalis* = *Enterococcus faecalis*; MRSA = *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente.

NT = Não testado; R = resistente e S = sensível

AMP = ampicilina, SAM = ampicilina sulbactam, CIP = ciprofloxacino, GEN = gentamicina, LEVO = levofloxacino, AMO = amoxicilina, AMC = amoxicilina / ácido clavulânico, CFD = cefalexina, CFL = cefalotina, CFX = cefadroxil, PEN = penicilina, OXA = oxacilina, VAN = vancomicina, TEC = teicoplanina, ERI = eritromicina, CLA = claritromicina, AZT = azitromicina, CLI = clindamicina, SUT = sulfametoxazol / trimetoprim.

S. aureus é na maioria dos casos, a bactéria mais frequente encontrada como causa de infecções hospitalares devido ao alto poder de resistência como consta na Tabela 02. Das quatro cepas estudadas, três delas 02, 03 e 04 apresentaram resistência a dezesseis antibióticos. No entanto a de nº 01 foi resistente a quinze dos antibióticos testados. Todas estas cepas foram resistentes a metilicina, o que evidencia a dificuldade da terapêutica empregada nas infecções causadas por estas bactérias.

A Tabela 03 mostra um perfil de resistência elevado das Enterobacteriaceae, visto que todas as cepas de *E. coli* apresentaram resistência a quatorze antibióticos. E duas *K. pneumoniae* 2 e 3 foram resistentes a 13 antibióticos. As cepas de *K. pneumoniae* 01 e 04 apresentaram resistência a 10 e 12 antibióticos, respectivamente.

Tabela 03 – Perfil de resistência de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* frente aos antibióticos testados

Antibióticos Microrganismos														
	AMI	CAZ	SAM	AMP	CIP	CFL	CFX	CFD	CFO	CFP	GEN	PTZ	SUT	LEVO
<i>E. coli</i> 01	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>E. coli</i> 02	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	R
<i>E. coli</i> 03	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>E. coli</i> 04	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i> 01	S	R	R	R	S	R	R	NT	R	R	R	R	R	NT
<i>K. pneumoniae</i> 02	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NT
<i>K. pneumoniae</i> 03	R	R	R	R	R	R	R	R	NT	R	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i> 04	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S

Legenda: *E. coli* = *Escherichia coli* *K. pneumoniae* = *Klebsiella pneumoniae*

R = resistente, S = sensível, NT = Não testado

AMI = ampicilina, CAZ = ceftazidime, SAM = ampicilina sulbactam, AMP = ampicilina, CIP = ciprofloxacino, CFL = cefalotina, CFX = cefadroxil, CFD = cefalexina, CFO = ceftriaxona, CFP = cefepime, GEN = gentamicina, PTZ = piperacilina / tazobactam, SUT = sulfametoxazol / trimetoprim, LEVO = levofloxacino.

O perfil de resistência aos antimicrobianos testados contra as linhagens de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, confirma a multirresistência destas bactérias, como se identifica na Tabela 04. Coincidentemente, as cepas de *P. aeruginosa* 01 e 03, foram resistentes a sete antibióticos, enquanto as amostras 02 e 04 apresentaram resistência a cinco e seis antibióticos respectivamente. As amostras 01, 03 e 04 de

A. baumannii foram resistentes a oito antibióticos e a 02 a sete antimicrobianos. Deve-se ressaltar que o perfil de resistência aos antibióticos testados nessa pesquisa, certamente reflete uma realidade preocupante quanto à eficácia da terapêutica utilizada. Por isso o uso de antibióticos não deve ser feito sem a realização de um antibiograma paralelo.

Tabela 04. Perfil de resistência de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* frente aos antibióticos testados

Antibióticos Microrganismos										
	AMI	CTZ	CIP	CFP	GEN	PTZ	LEVO	CFO	SAM	AZT
<i>A. baumannii</i> 01	R	R	R	R	R	R	R	R	NT	NT
<i>A. baumannii</i> 02	R	NT	R	R	R	R	R	R	S	NT
<i>A. baumannii</i> 03	R	R	R	R	R	R	R	R	NT	NT
<i>A. baumannii</i> 04	R	R	R	R	R	R	R	NT	NT	R
<i>P. aeruginosa</i> 01	R	R	R	R	R	R	R	NT	NT	NT
<i>P. aeruginosa</i> 02	NT	R	R	R	R	S	R	NT	NT	NT
<i>P. aeruginosa</i> 03	R	R	R	R	R	R	R	NT	NT	NT
<i>P. aeruginosa</i> 04	S	R	R	R	R	R	NT	NT	NT	R

Legenda: *A. baumannii* = *Acinetobacter baumannii*,

P. aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa*

R – Resistente, S = Sensível, NT = Não Testado

AMI = ampicilina, CTZ = ceftazidime, CIP = ciprofloxacino, CFP = cefepime, GEN = gentamicina, PTZ = piperacilina/tazobactam, LEVO = levofloxacino, CFO = ceftriaxona, SAM = ampicilina sulbactam, AZT = aztreonam.

No “Screening” todas as bactérias apresentaram sensibilidade aos óleos de *O. vulgare* e *C. zeylanicum* em concordância, com os dados obtidos por Leite (2007) que testou os referidos óleos contra cepas ATCC (American Type Culture Collection), com resultados satisfatórios. Os demais óleos e fitoconstituintes testados neste trabalho não apresentaram esta atividade.

Quanto ao teste da CIM em pesquisa realizada anteriormente utilizando-se os óleos de *C. zeylanicum* e *O. vulgare* constatou-se a eficácia com resultados promissores quanto a sua ação antibacteriana, como fonte de um novo composto biologicamente ativo.

Tabela 05 – Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de *C. zeylanicum* contra bactérias em meio líquido.

Bactérias n=24	Óleo essencial (%)						
	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
<i>A. baumannii</i> 01	-	-	-	-	-	-	+
<i>A. baumannii</i> 02	-	-	-	-	-	-	+
<i>A. baumannii</i> 03	-	-	-	-	-	+	+
<i>A. baumannii</i> 04	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. coli</i> 01	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. coli</i> 02	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 03	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. coli</i> 04	-	-	-	-	-	+	+
<i>E. faecalis</i> 01	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. faecalis</i> 02	-	-	-	-	-	+	+
<i>E. faecalis</i> 03	-	-	-	-	-	+	+
<i>E. faecalis</i> 04	-	-	-	-	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i> 01	-	-	-	-	-	-	+
<i>K. pneumoniae</i> 02	-	-	-	-	-	-	+
<i>K. pneumoniae</i> 03	-	-	-	-	-	-	+
<i>K. pneumoniae</i> 04	-	-	-	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 01	-	-	-	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 02	-	-	-	-	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 03	-	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 04	-	-	-	+	+	+	+
MRSA 01	+	+	+	+	+	+	+
MRSA 02	-	-	-	-	-	-	+
MRSA 03	-	-	-	-	-	-	+
MRSA 04	-	-	-	-	-	+	+

Legenda:- Inibiu o crescimento + Não inibiu o crescimento

A = *Acinetobacter baumannii*

E. coli = *Escherichia coli*

E. faecalis = *Enterococcus faecalis*

K. pneumoniae = *Klebsiella pneumoniae*

P. aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa*

MRSA = *Staphylococcus aureus* Metilina Resistente

Os resultados da CIM do óleo essencial de *C. zeylanicum* (Tabela 05), mostraram excelentes resultados variando de 8 a 0,125%. O produto a 0,5%

inibiu o crescimento de 14/ 24 cepas (58%) das cepas usadas no ensaio microbiológico.

De acordo com os resultados obtidos confirmou-se que o óleo essencial de *C. zeylanicum* foi capaz de inibir a multiplicação de 23 (95,83%), das 24 cepas bacterianas analisadas na CIM de 2%, mostrando um bom resultado.

As amostras de *E. coli* 01 e 03 (1%), 02 (0,125%) e 04 (0,25%). As cepas de *E. faecalis* 02, 03 e 04 foram inibidas na concentração de 0,5%, enquanto a cepa 01 a (1%). No mesmo esquema de inibição as cepas de *K. pneumoniae* 01, 02 e 03 (0,25%) e uma a 01 (2%). No caso das *P. aeruginosa* 01 e 04 foram inibidas na concentração de 2%, enquanto a 02 a (1%) e a 03 (8%). Nas concentrações ensaiadas ocorreu inibição nas cepas 02 e 03 (0,25%) e 04 (0,5%). No entanto, destaca-se a cepa 01 de MRSA, pois foi resistente ao óleo essencial em todas as concentrações testadas.

As CBM's do teste não corresponderam as CIM's, uma vez que, seus crescimentos não foram inibidos pelas diluições correspondentes as das CIM's (Figura 08 e 09).

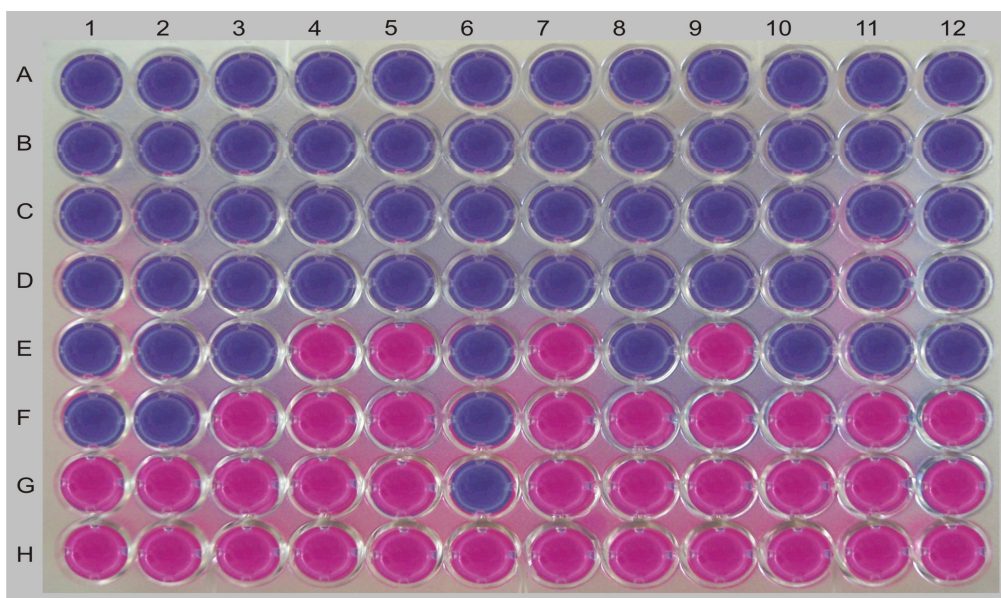


Figura 08 - CIM de *C. zeylanicum* frente a *A. baumannii*, *E. coli* e *E. faecalis*.

Legenda: A = 8%; B = 4%; C = 4%; C = 2%; D = 1%; E = 0,5%; F = 0,25%; G = 0,125%; H = Controle positivo.

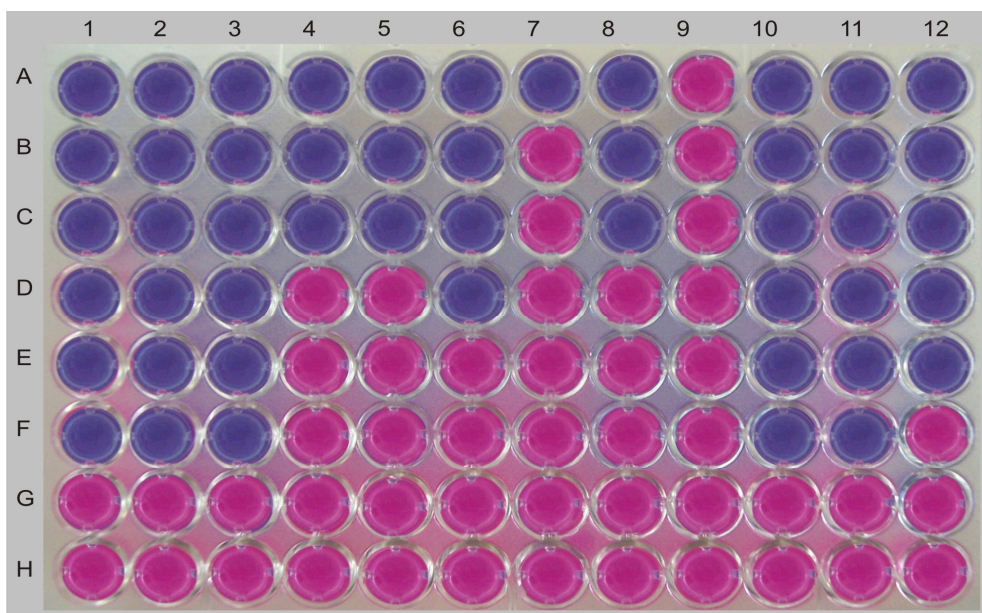


Figura 09 - Determinação da CIM de *C. zeylanicum* frente às linhagens de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e MRSA **Legenda:** A = 8%; B = 4%; C = 2%; D = 1%; E = 0,5%; F = 0,25%; G = 0,125%; H = Controle positivo.

O óleo essencial de *C. zeylanicum*, enquanto testado contra espécies bacterianas multirresistentes incluindo os gêneros *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*, mostrou uma excelente atividade inibitória sobre o crescimento dos mesmos. O produto na concentração de 0,5% inibiu o crescimento de 14/24 (58,3%) das cepas usadas nos ensaios microbiológicos caracterizando sua CIM. E a CIM de 91,66%, foi observada na concentração de 2%, onde houve inibição do crescimento de 22 das 24 cepas usadas nos ensaios de atividade. Deve-se observar que, as cepas de *P. aeruginosa* 03 e MRSA 01 apresentaram resistência ao óleo essencial de *C. zeylanicum*. A CBM não foi registrada em nenhuma das concentrações do produto, a partir da CIM (Tabela 05).

Os resultados dos ensaios microbiológicos sobre atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. zeylanicum* cujas CIM's de 50% e 90%, respectivamente, nas concentrações de 0,5 e 2%, mostram-se promissoras. E, em especial, pelo fato de se tratar de microrganismos isolados de pacientes portadores de infecção hospitalar e resistentes a várias drogas sintéticas, incluindo oxacilina, meticilina, ceftazidime, levofloxacino, ciprofloxacino, gentamicina, ceftriaxona, cefepime, aztreonam.

Os resultados encontram-se plenamente compatível com os obtidos por Sá et al (1996), usando o método de difusão em meio sólido. Os autores fizeram um estudo do óleo essencial de *C. zeylanicum* sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas, onde todos os microrganismos apresentaram-se sensível ao produto, onde os halos de inibição, em média, foram de 30 mm de diâmetro. Resultados similares utilizando-se a técnica de difusão em meio sólido, foram obtidos nos ensaios microbiológicos realizados por Pontes et al., em 2004. Nesse estudo, o óleo essencial a 4% produziu inibição sobre o crescimento de leveduras do gênero *Trichosporon* (*T. asheii* e *T. inkin*), onde 70% das leveduras foram sensíveis ao produto. E no trabalho realizado por Gayoso et al. (2004), foi registrada a atividade do óleo essencial de *C. zeylanicum* e seus constituintes α - pineno e β - pineno, produzindo inibição sobre a viabilidade do crescimento fúngico de fungos leveduriformes e filamentosos, nas respectivas concentrações de 2 e 4%. O óleo essencial de *C. zeylanicum*, a 2%, também produziu ótimo efeito inibitório sobre o crescimento de dermatófitos *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, com halos de inibição entre 10 a 22 mm de diâmetro (AQUINO et al., 2004).

Em contrapartida, no trabalho realizado por Araújo et al. (2004), o óleo essencial de *C. zeylanicum* a 4% não mostrou atividade acentuada sobre bactérias isoladas de meio ambiente, com exceção de *Staphylococcus aureus* e *Listeria seeligeri*.

Em consideração a outros estudos (MOREIRA et al., 2008), os resultados obtidos neste trabalho, adquirem uma grande importância, pois a questão dos microrganismos multirresistentes às drogas sintéticas, vem ganhando um grande espaço para as pesquisas de novas fontes de fármacos, naturais ou sintéticos.

Tabela 06– Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de *O. vulgare* contra bactérias.

Bactérias n = 24	Óleo essencial (%)							CBM (%)		
	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,5	0,25	0,125
<i>A. baumannii</i> 01	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>A. baumannii</i> 02	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>A. baumannii</i> 03	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>A. baumannii</i> 04	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>E. coli</i> 01	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i> 02	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i> 03	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i> 04	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>E. faecalis</i> 01	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>E. faecalis</i> 02	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>E. faecalis</i> 03	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>E. faecalis</i> 04	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i> 01	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i> 02	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i> 03	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i> 04	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 01	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 02	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 03	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 04	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
MRSA 01	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
MRSA 02	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
MRSA 03	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
MRSA 04	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Legenda - Inibiu o crescimento + Não inibiu o crescimento

A = *Acinetobacter*

E. coli = *Escherichia coli*

E. faecalis = *Enterococcus faecalis*

K. pneumoniae = *Klebsiella pneumoniae*

P. aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa*

MRSA = *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente

Nos ensaios para avaliação da atividade antibacteriana de *O. vulgare* sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas, os resultados estão representados na Tabela 06. O referido óleo produziu uma excelente atividade inibitória sobre o crescimento dos microrganismos, onde 50% da CIM ficaram

estabelecidas na concentração de 0,125% e 83,3% da CIM na concentração de 0,25%. A CBM de 0,5% produziu a morte (100%), sobre todas as cepas usadas nos ensaios microbiológicos (Figura 10 e 11).

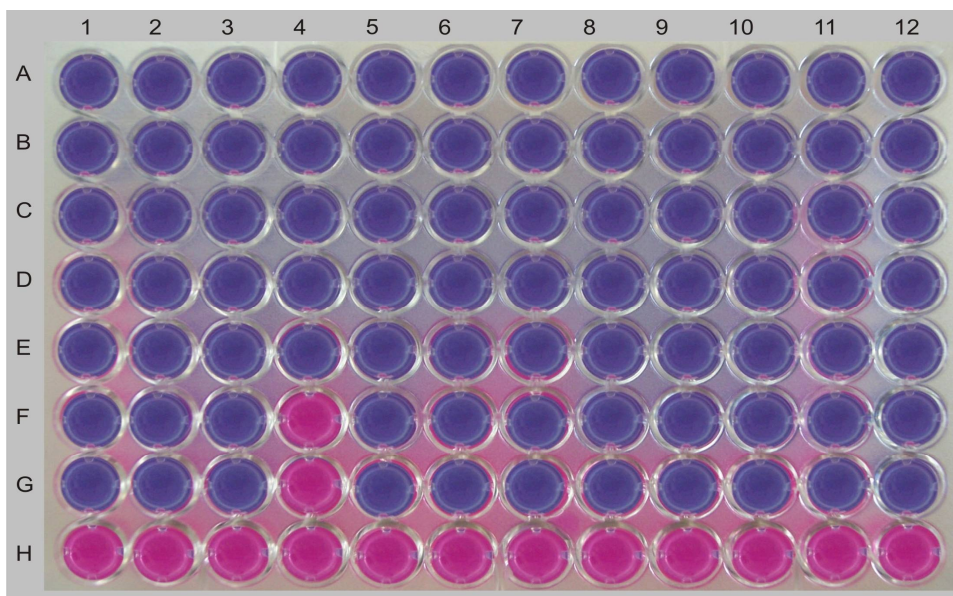


Figura 10 Determinação da CIM de *O. vulgare* frente *A. baumannii*, *E. coli* e *E. faecalis*. **Legenda:** A = 8%; B = 4%; C = 4%; C = 2%; D = 1%; E = 0,5%; F = 0,25%; G = 0,125%; H = Controle positivo.

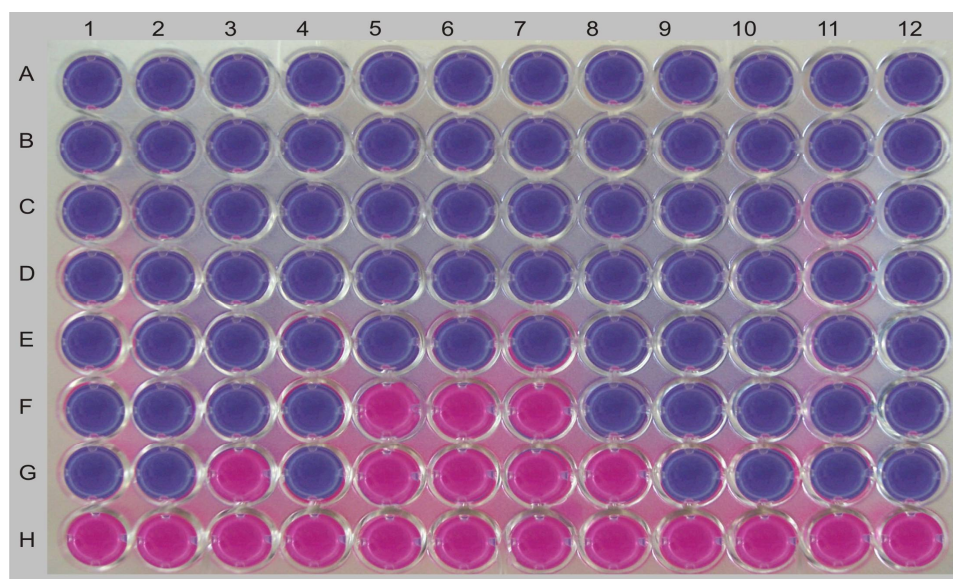


Figura 11 Determinação da CIM de *O. vulgare* frente às linhagens de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e MRSA. **Legenda:** A = 8%; B = 4%; C = 2%; D = 1%; E = 0,5%; F = 0,25%; G = 0,125%; H = Controle positivo.

Os resultados da atividade inibitória do óleo essenciais de *O. vulgare* registrados neste trabalho, com CIM < (0,125%) e CIM de 90% a (0,5%) sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas mostraram-se ainda superiores aos de vários resultados registrados na literatura (ROBERTO et al., 2000; PINTORE et al., 2002; WILKINSON et al., 2003). Esses autores obtiveram resultados sobre a atividade do óleo essencial de *O. vulgare* sobre cepas de *P. aeruginosa*, uma CIM variável de 2,5 a 20 µL/mL. E com relação a outros gêneros como *Klebsiella* e MRSA, estes microrganismos mostraram-se mais sensíveis ao produto, do que foi observado e registrado por Bayden et al. (2004) e Nostro et al., (2004), cujas CIM's foram, respectivamente, de 10 a 5 µL/mL e 1,25 µL/mL. A sensibilidade das bactérias Gram positivas e Gram negativas ao óleo essencial de *O. vulgare*, em valores baixos, estão plenamente compatível aos dados registrados por Hersch - Martinez et al. (2005), onde todas as bactérias Gram positivas e Gram negativas resistentes aos antibióticos selecionados foram sensíveis ao óleo essencial de *O. vulgare*.

Vale salientar que as CBMs destas bactérias corresponderam às CIMs, (seus crescimentos foram inibidos pelas diluições correspondentes as das CIMs). Note-se que Nostro et al. (2004), também utilizou o óleo essencial de *O. vulgare* em cepas de MRSA na mesma concentração, encontrando semelhantes resultados.

Apesar das bactérias estudadas serem multirresistentes, obteve-se bons resultados frente a este óleo, enquanto Hammer; Carson; Riley (1999) que determinaram a CIM de vários óleos e extratos e obtiveram uma inibição de $\leq 2\%$. Souza; Souza; Astolfi Filho (2004) mesmo testando à ação do óleo de *O. vulgare* contra outras espécies bacterianas, também obtiveram bons resultados. No presente trabalho a CBM correspondeu a 100% quando se utilizou a concentração de 0,5% em todas as cepas testadas mostrando a eficácia do referido óleo. Santurio et al. (2007) testando a ação do *O. vulgare* contra soros variantes de *Salmonella* entérica também determinaram uma boa CBM.

Para obtenção da curva de cinética bacteriana, foram selecionadas para o experimento as cepas *A. baumannii*, *E. coli*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e MRSA, obtidas de sítios patológicos, para avaliação do efeito da CIM na viabilidade das cepas bacterianas através da morte das mesmas.

A determinação da curva de cinética testada frente ao óleo essencial de *C. zeylanicum* (0,25%), foi feita frente *A. baumannii* e paralelamente, com meio isento do produto (grupo controle). No ensaio, observou-se que, a partir do tempo zero de incubação, houve uma curva crescente até 30 minutos na quantificação das UFC/mL de *A. baumannii*, acompanhando o mesmo crescimento da cepa utilizada sem o produto até o mesmo tempo. Em seguida houve decréscimo progressivo da curva de crescimento demonstrando a ação bioativa do óleo de *C. zeylanicum* demonstrada frente à cepa de *A. baumannii* enquanto o controle continuou com curva ascendente (Figura 12).

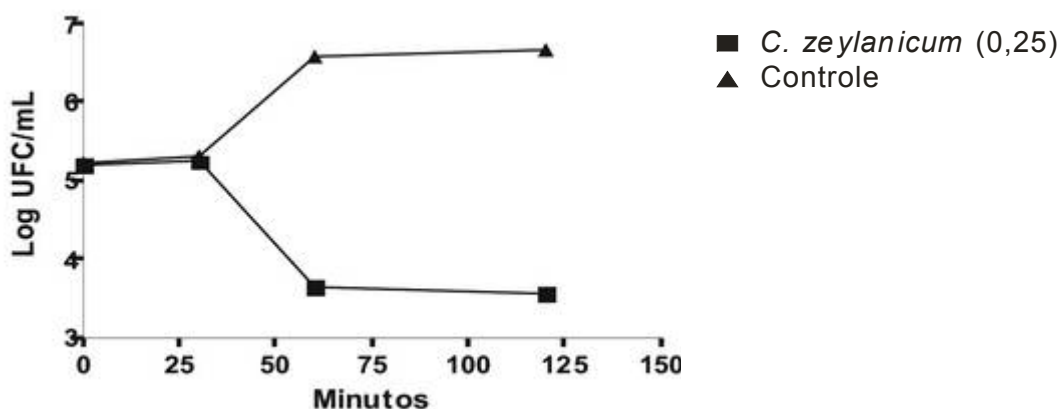


Figura 12 – Ação do óleo essencial de *C. zeylanicum* a 0,25% contra *A. baumannii* relacionado com o tempo de incubação

O resultado da curva de cinética frente o óleo essencial de *C. zeylanicum* (0,25%) versus *E. coli*, e grupo controle, revelou uma curva semelhante a do referido grupo cuja quantificação de UFC/mL foi a mesma no tempo zero até 30 minutos. No entanto os ensaios com o óleo essencial de *C. zeylanicum*, verificou-se uma curva progressivamente descendente até 60 minutos, mostrando a excelente ação antimicrobiana, inibição completa de todas as cepas.

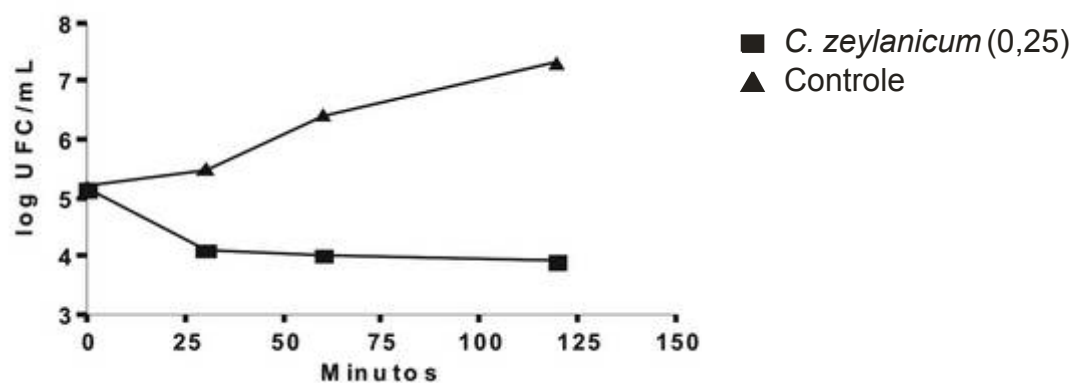


Figura 13 – Ação do óleo essencial de *C. zeylanicum* a 0,25% contra *E. coli* relacionado com o tempo de incubação

Na determinação da viabilidade bacteriana frente o óleo de *C. zeylanicum* e o grupo controle, foi verificado que, a curva de crescimento bacteriano foi levemente decrescente nos primeiros 30 minutos. Ocorreu uma elevação progressiva até 60 minutos, onde atingiu o seu ápice paralelamente com o grupo controle. Em seguida, a curva passou a ser progressivamente decrescente até o tempo de 120 minutos. O ensaio evidenciou que após 60 minutos o óleo de *C. zeylanicum* inibiu as UFC/mL, sendo, portanto efetivo sobre o crescimento

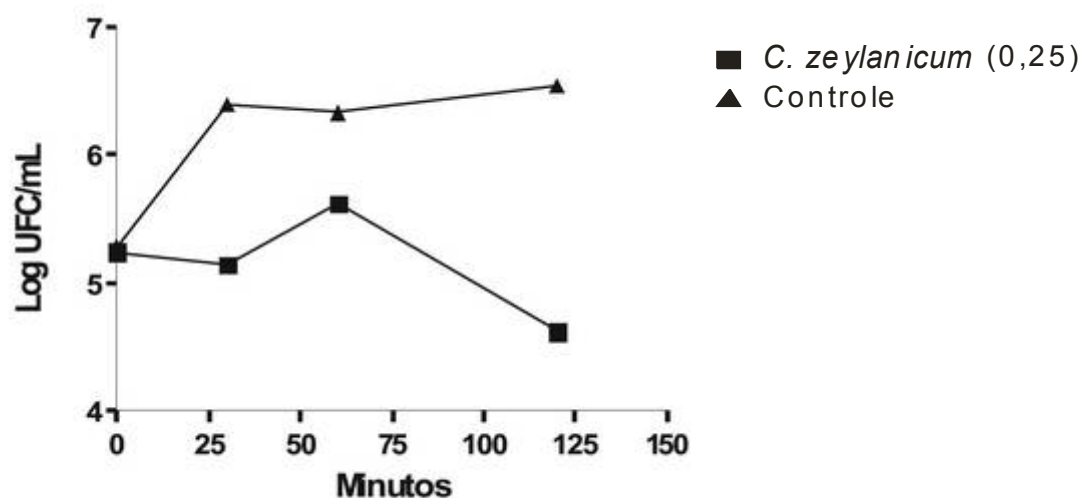


Figura 14 – Ação do óleo essencial de *C. zeylanicum* a 0,25% contra *E. faecalis* relacionado com o tempo de incubação.

Para obtenção da curva de cinética o óleo essencial de *C. zeylanicum* (0,25%) sobre *K. pneumoniae* e do grupo controle, realizou-se ensaio no qual se observou nos primeiros trinta minutos, um crescimento das UFC/mL de *K. pneumoniae*, semelhante ao do grupo controle. Após este tempo, a curva decresceu progressivamente a partir de 60 minutos até 120 minutos, quando comparado ao controle. O ensaio evidenciou a efetividade do óleo de *C. zeylanicum* após 30 minutos de ação sobre a cepa de *K. pneumoniae* evidenciando inibição de multiplicação da referida cepa.

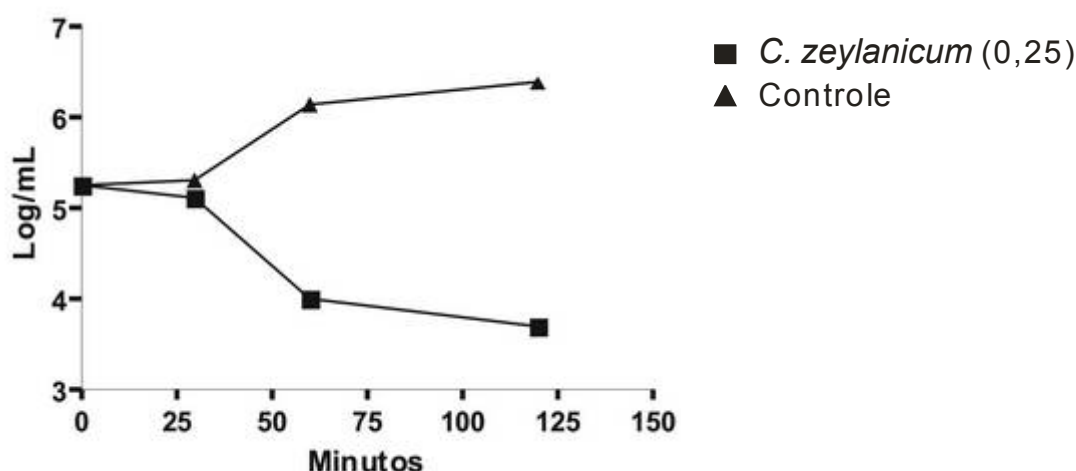


Figura 15 – Ação do óleo essencial de *C. zeylanicum* a 0,25% contra *K. pneumoniae* relacionado com o tempo de incubação

Foi feita a avaliação da viabilidade bacteriana de *P. aeruginosa* frente ao óleo essencial de *C. zeylanicum* (0,25%) e o grupo controle. Verificou-se que a partir da exposição da cepa de *P. aeruginosa* ao produto, houve no tempo de 30 minutos, uma rápida inibição na viabilidade da cepa analisada. Após este tempo a inibição foi mais lenta até 120 minutos. Com o grupo controle houve multiplicação da cepa no tempo de 60 minutos. O óleo inibiu as UFC/mL de *P. aeruginosa*, sendo efetivo como antimicrobiano.

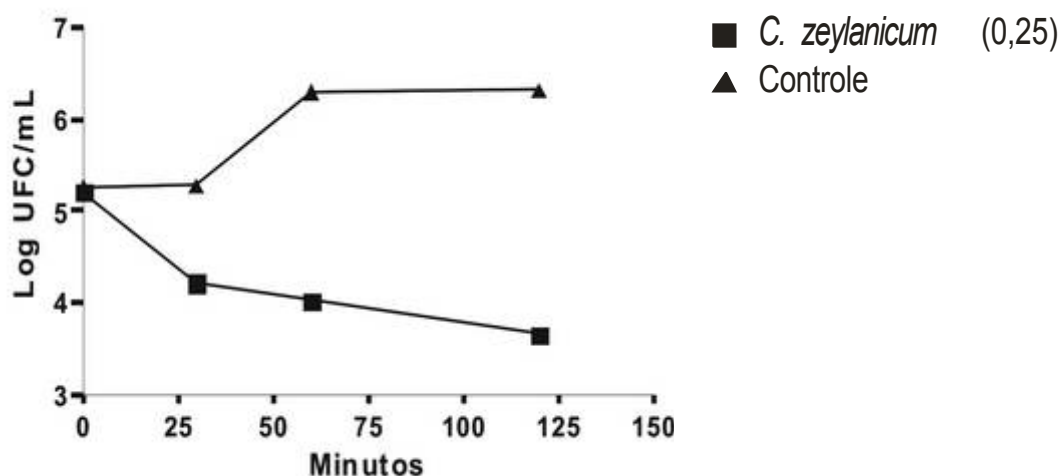


Figura 16 – Ação do óleo essencial de *C. zeylanicum* a 0,25% contra *P. aeruginosa* relacionado com o tempo de incubação.

Foi realizado teste com óleo essencial (0,25%) sobre cepas de MRSA conforme um grupo controle. Na análise da curva cinética bacteriana com MRSA frente ao óleo, verificou-se que após 30 minutos, houve uma leve inibição de UFC/mL que se acentuou após este tempo até 60 minutos, continuando a inibir progressivamente até 120 minutos. O óleo testado foi efetivo sobre o crescimento de MRSA. Houve inibição do grupo controle nos primeiros 30 minutos, mas entre 30 e 60 minutos, evidenciou o crescimento das UFC/mL como o esperado.

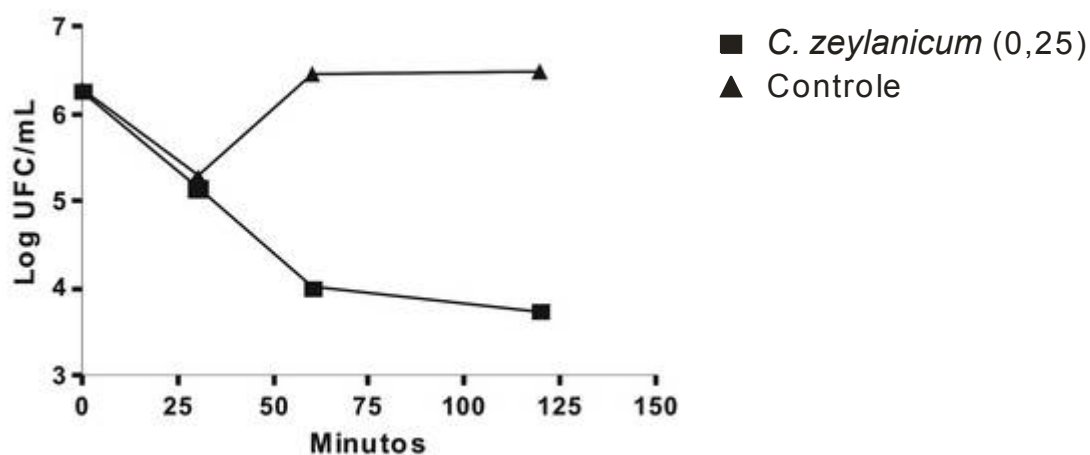


Figura 17 – Ação do óleo essencial de *C. zeylanicum* a 0,25% contra MRSA relacionado com o tempo de incubação

A Figura 18 refere-se à curva de cinética bacteriana utilizada para demonstrar a viabilidade de *A. baumannii* sobre a ação do óleo essencial de *O. vulgare* frente a um grupo controle. A análise da figura mostra a ação do óleo essencial sobre as UFCs/mL, inibindo o crescimento desta logo nos 30 minutos. A partir desse momento a cepa de *A. baumannii* tornou-se completamente inviável quando comparada com o crescimento natural do grupo controle.

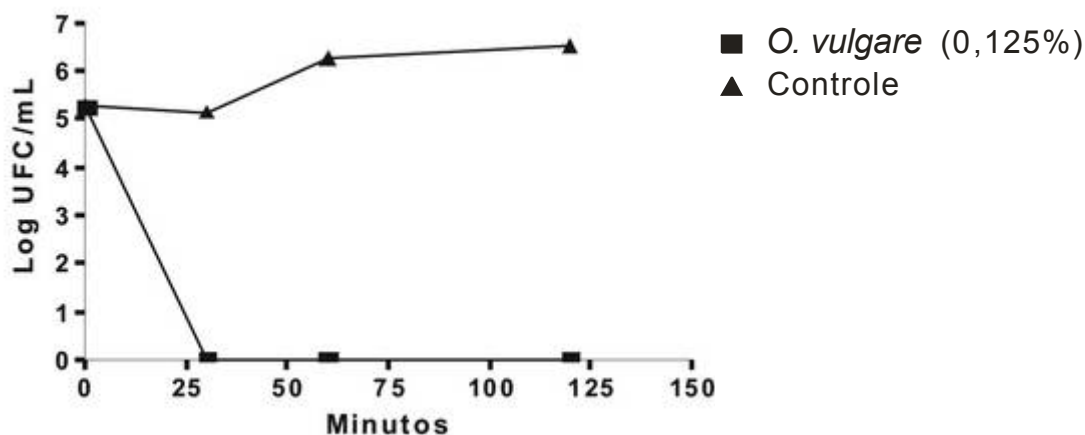


Figura 18 – Ação do óleo essencial de *O. vulgare* a 0,125% contra *A. baumannii* relacionado com o tempo de incubação

A determinação da curva cinética bacteriana do óleo essencial de *O. vulgare* sobre *E. coli* e usando paralelamente o controle, o resultado ocorreu da seguinte forma: o grupo controle mostrou crescimento das UFCs/mL a partir dos 30 minutos sendo progressivo até os 120 minutos, enquanto a cepa de *E. coli*, tratada com o óleo essencial no estudo não conseguiu crescer na concentração utilizada desde o tempo zero. Este fato mostrou que o mesmo apresentou ação antimicrobiana completa.

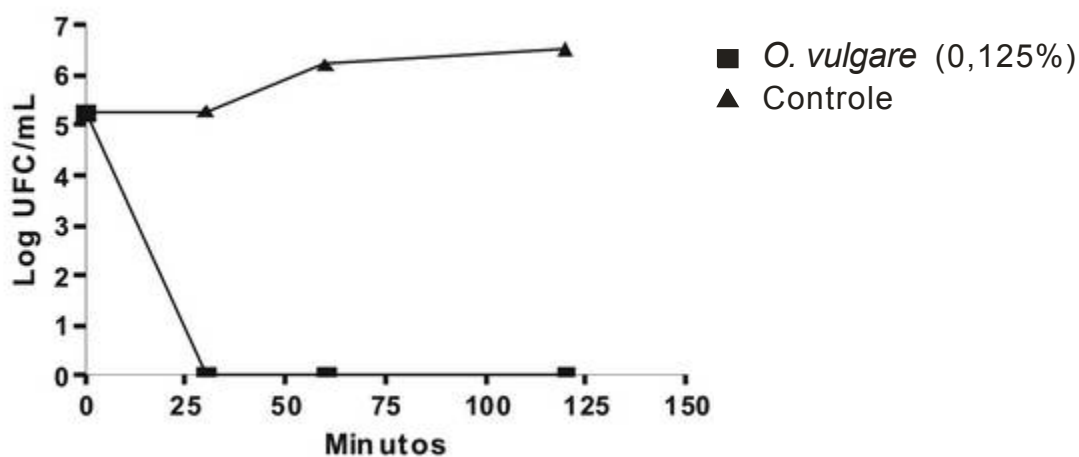


Figura 19 – Ação do óleo essencial de *O. vulgare* a 0,125% contra *E. coli* relacionado com o tempo de incubação

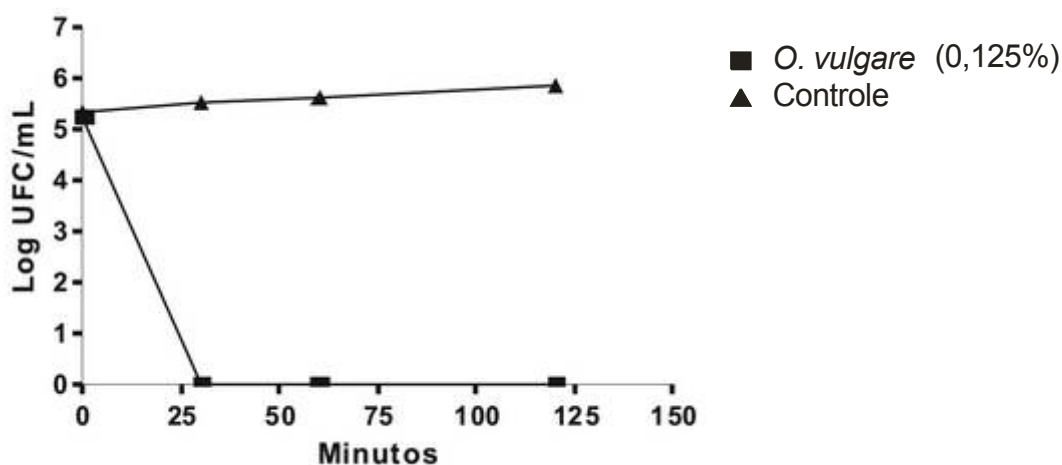


Figura 20 – Ação do óleo essencial de *O. vulgare* a 0,125% contra *E. faecalis* relacionado com o tempo de incubação.

Para determinação da viabilidade da curva de cinética da cepa de *E. faecalis*, utilizou-se o óleo essencial de *O. vulgare* frente ao grupo controle. Neste caso, obteve-se bom resultado, visto que a cepa em análise não cresceu desde o tempo zero, mostrando ação efetiva do óleo. Enquanto o controle mostrou uma curva de crescimento lentamente progressiva dos 30 aos 60 minutos.

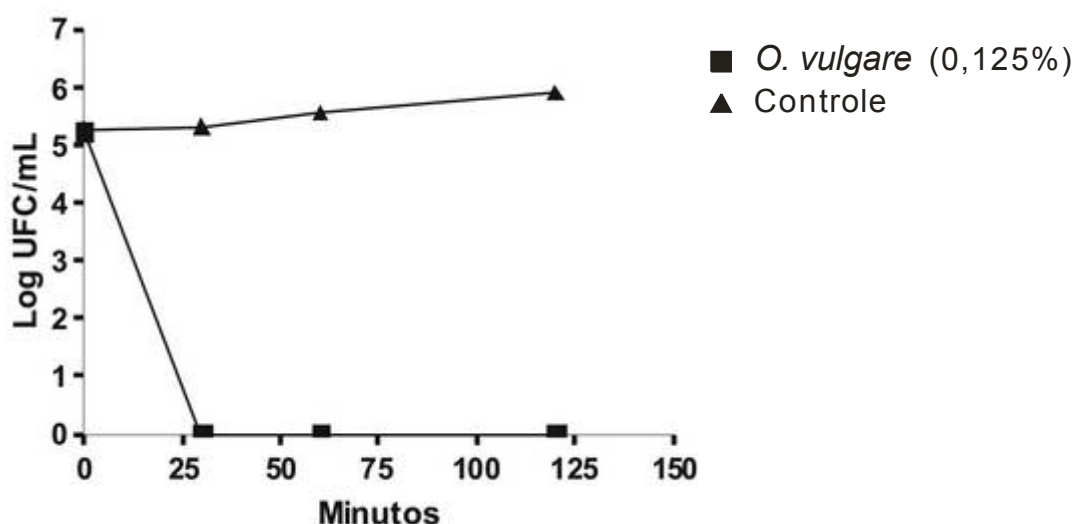


Figura 21 Ação do óleo essencial de *O. vulgare* a 0,125% contra *K. pneumoniae* relacionado com o tempo de incubação.

Foi realizado ensaio da cepa de *K. pneumoniae*, frente ao óleo essencial de *O. vulgare* e o grupo controle, para avaliação da curva de cinética de morte bacteriana. Após semeadura (tempo zero), a UFC/mL de *K. pneumoniae* não mostrou crescimento, revelando que o óleo essencial de *O. vulgare* foi efetivo na inibição do seu crescimento. A curva do grupo controle foi praticamente linear comprovado pelo crescimento até 120 minutos.

Na análise da curva de cinética bacteriana com o óleo essencial de *O. vulgare* sobre *P. aeruginosa* verificou-se, que no tempo zero a cepa em estudo teve o seu crescimento inibido. Nota-se que o óleo essencial utilizado foi potencialmente efetivo contra esta bactéria. Apesar de ter havido crescimento bacteriano no grupo controle, este se manifestou lento e progressivo dos 30 aos 120 minutos, confirmado pelo traçado da curva que se mostrou quase linear.

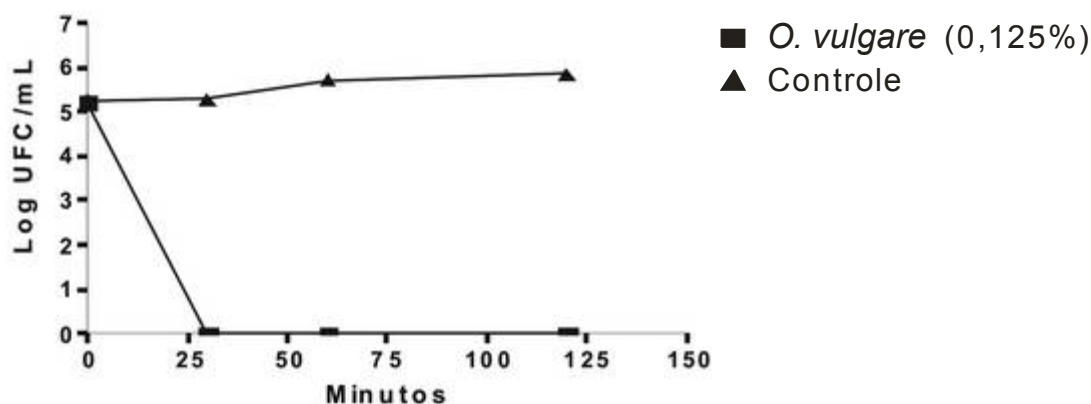


Figura 22 – Ação do óleo essencial de *O. vulgare* a 0,125% contra *P. aeruginosa* relacionado com o tempo de incubação

Observando o comportamento da viabilidade bacteriana da cepa de MRSA sobre o óleo essencial de *O. vulgare* (0,125%), observou-se o mesmo comportamento relatado nos três últimos ensaios realizados, ou seja, o crescimento da cepa utilizada foi inibido no tempo zero, permanecendo assim até os 120 minutos. Similarmente Ao mesmo tempo o grupo controle revelou um traçado retilíneo mostrando o crescimento normal do microrganismo.

De acordo com os ensaios realizados, foi evidenciada uma ação antimicrobiana mais potente do óleo essencial de *O. vulgare* sobre o óleo essencial de *C. zeylanicum*.

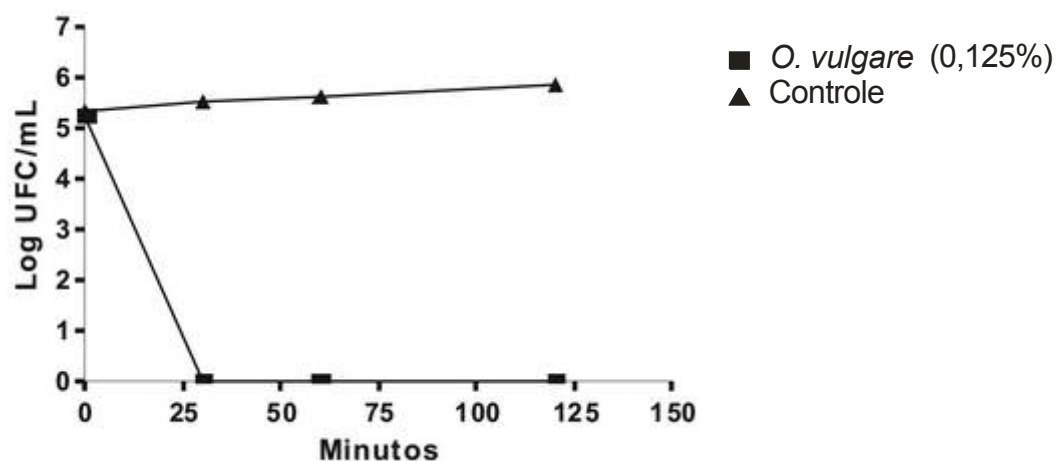


Figura 23 – Ação do óleo essencial de *O. vulgare* a 0,125% contra MRSA relacionado com o tempo de incubação

Os óleos essenciais são misturas complexas naturais às quais contém cerca de 20 - 60 componentes em concentrações diferentes. Em geral, o óleo essencial de uma determinada planta se caracteriza por possuir dois ou três fitoconstituintes em maior concentração, que pode variar entre 20 e 70%. Neste sentido, o *Origanum compactum*, por exemplo, é composto por 30% de carvacrol e 27% de timol, sendo esses os maiores componentes desse óleo essencial (PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006).

De forma geral, os óleos essenciais exibem uma diversidade de ações biológicas, entretanto, por serem constituídos de um grande número de moléculas, eles parecem não apresentar alvos celulares específicos (CARSON; MEE; RILEY, 2002). Por possuírem substâncias lipofílicas, os óleos essenciais agem atravessando a membrana plasmática das células, causando dano na mesma, sendo esta uma característica da ação citotóxica desses produtos naturais. Nas bactérias, a permeabilização das membranas está associada com a perda de íons e conseqüente perda do potencial de membrana, colapso da bomba de prótons e depleção de ATP. Essas propriedades citotóxicas são de grande importância nas aplicações não apenas de certos patógenos humanos e animais ou parasitas, mas também na preservação de produtos alimentícios (BAKKALI et al., 2008).

Santoro et al. (2007) verificaram que o óleo essencial do *O. vulgare* apresentou atividade antiparasitária frente às formas epimastígotas e tripomastígotas de *Trypanosoma cruzi*. Foi verificada a ação antibacteriana do mesmo óleo frente às cepas de *Bacillus* spp., *Proteus vulgaris*, *Clavibacter michiganense*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, além de inibir o crescimento de diversas espécies fúngicas, tais como *Candida albicans*, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Trichophyton* spp. (SAHIN et al., 2004). Ainda, os extratos etanólico e aquoso de *O. vulgare* apresentaram atividade anti – *Helicobacter pylori* pelo método de difusão em ágar (CHUN et al., 2005).

A planta *C. zeylanicum* possui diversas atividades farmacológicas. Yang et al. (2005) verificaram a ação tóxica do óleo essencial de *C. zeylanicum* contra ovos e parasitas adultos da espécie *Pediculus humanus capitis*, demonstrando a ação antiparasitária desta planta. Recentemente, Fichi et al. (2007) demonstraram a atividade antiparasitária do óleo essencial obtido das folhas de *O. vulgare* frente ao ectoparasita *Psoroptes cuniculi* de importância para a clínica veterinária.

Além da atividade antiparasitária, o óleo essencial da *C. zeylanicum* foi eficaz contra *H. pylori* (TABAK; ARMON; NEEM, 1999) e *Listeria monocytogenes* (YUST; FUNG, 2002), enquanto outros estudos relataram à atividade antifúngica desse óleo em dermatófitos (LIMA et al., 1993) e fungos envolvidos nas infecções do trato respiratório (SINGH et al., 1995).

No experimento da cinética foi analisado o comportamento do microrganismo quando em contato com o óleo essencial de *C. zeylanicum* e *O. vulgare*. No geral, os óleos essenciais reduziram significativamente a quantidade de microrganismos, sendo o óleo de *O. vulgare* mais efetivo do que o óleo de *C. zeylanicum*. O óleo de *O. vulgare* foi efetivo logo nos primeiros minutos de exposição observado pelo rápido decréscimo das UFC/mL, enquanto o óleo de *C. zeylanicum* demonstrou seu efeito dentro de um período maior. Todas as cepas testadas tiveram o mesmo perfil de resposta ao óleo essencial de *O. vulgare*, quanto ao óleo de *C. zeylanicum* houve diferença de comportamento entre as cepas. Este óleo se mostrou mais eficaz contra *A. baumannii* e *E. coli*.

Barros e colaboradores (2009) testaram o óleo essencial de *O. vulgare* contra *S. aureus*, e observaram atividade bacteriostática do mesmo em 0,6 µg/mL e bactericida em 1,2 µg/mL. No experimento de cinética o produto mostrou atividade antibacteriana com alguns minutos de exposição. Souza e colaboradores (2007) mostraram que o óleo essencial de *O. vulgare* possui atividade contra espécies de *Candida* spp. Quando foi analisado o tempo de morte, os autores verificaram duas concentrações do óleo ao longo do tempo, e quanto maior a concentração maior foi a atividade. Foi ainda demonstrado que o valor da concentração inibitória mínima pode ser alterado quando se utiliza outra metodologia para o ensaio.

Quando comparados os tempos de morte de *C. zeylanicum* e de *O. vulgare* com alguns antimicrobianos usados na rotina, percebe-se uma rápida atividade dos óleos essenciais (em alguns minutos), enquanto os antimicrobianos têm sua ação em horas, exemplo disso ocorre com a telitromicina contra *Streptococcus pneumoniae*, com levofloxacino, ciprofloxacino e gentamicina contra *P. aeruginosa*, com moxifloxacino contra *S. aureus* resistente a metilicina, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* resistente à penicilina, *S. pyogenes* e *E. faecalis* (SEGATORE et al., 2000; SPECIALE et al., 2002; DANDEKAR et al., 2005; RUKHOLM et al., 2006).

Caracterizar o tempo de morte de um microrganismo é muito importante, pois é um parâmetro que define o comportamento do microrganismo frente ao antifúngico ao longo do tempo. Isto 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*. Isto pode evitar efeitos tóxicos para o paciente em muitos casos, quando se utiliza drogas com ação bacteriostática (KOWALSKI et al. 2001; BANTAR et al. 2008).

A atividade antimicrobiana é importante, pois como demonstrado, os óleos essenciais se mostraram eficazes contra bactérias multiresistentes, o que torna estas drogas com grande potencial para o controle do crescimento de microrganismos. Outro ponto positivo apresentado pelos óleos essenciais demonstrado pelo tempo de morte foi a rápida ação que eles tiveram contra as cepas bacterianas.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* B. e *Origanum vulgare* L, frente às cepas bacterianas identificadas e isoladas, de sítios biológicos, em humanos permitiram concluir que:

- As amostras bacterianas isoladas como *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* apresentaram-se multirresistentes aos antimicrobianos testados;
- O óleo essencial de *C. zeylanicum* B. foi efetivo como bacteriostático sobre 92% das cepas bacterianas na CIM de 2%, e 4% na CIM de 0,125%;
- O óleo essencial de *C. zeylanicum* B. não revelou propriedades bactericidas, quando usado nas mesmas CIM's, sobre os microrganismos testes;
- O óleo essencial de *O. vulgare* L. apresentou atividade bactericida sobre a totalidade das bactérias Gram positivas e Gram negativas estudadas, em uma CIM de 0,5%;
- O efeito bactericida do óleo essencial do *O. vulgare* L. sobre bactérias multirresistentes observado no estudo, foi um dado muito importante, visto que, os valores encontrados assemelham-se com as drogas de última geração utilizadas na pesquisa;

- Na cinética bacteriana os óleos essenciais de *C. zeylanicum* B. e *O. vulgare* L. inibiram o crescimento dos microrganismos testados no intervalo de 0,0 - 120 minutos;
- Os valores antimicrobianos dos óleos essenciais testados encontrados nos ensaios conduzem a aplicação de novas metodologias, visando à utilização de forma racional dos mesmos na terapêutica antibacteriana.

REFERÊNCIAS

ALLEGRINI, J.; SIMEON, M. Study of essential oil antibacterial power. **Products et Problems Pharmaceutiques**, v.27, n.9, p.891-899, 1972.

ALMEIDA, E. R. DE. **Plantas Medicinais Brasileiras**. São Paulo: Hemus, 1993. 341p,

ALTHERTHUM, F. Mecanismo de Ação dos Antimicrobianos e Mecanismos de Resistência . In: TRABULSI, L. R. et al. Ed., **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. Cap. 9, p. 79 – 54.

ALVES, A. J. Atividade biológica de óleos essenciais sobre espécies de *Mycobacterium* pelo método de microdiluição. 2006. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M. et al. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memorial Instituto Osvaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, n.3, p. 367 – 73, 2000.

AMATO NETO, V.; LEVI, G. C.; LOPES, H. V.; MENDONÇA, J. et al. **Antibióticos na prática médica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 1985.

AMORIM J. A. **Fitoterapia popular e saúde da comunidade**: diagnóstico para proposta de integração nos serviços de saúde em Campina Grande, Paraíba. 1999. 206f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Faculdade em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.

AQUINO, P. M. L.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P. et al., E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre dermatófitos isoladas de *Tinea capitis*. **Rev. LAES & HAES**, ano 25. v.4. n.150, 2004.

ARAKAWA, Y.; SHIBATA, N.; SHIBAYAMA, K. et al. Convenient test for screening metallo- β -lactamase- producing Gram negative bacteria by using thiol compounds. **J. Clin. Microbiol.**, v.38. p. 40-43, 2000.

ARAÚJO, B. A. C.; OLIVEIRA, A. L.; SANTOS FILHO, L. Isolamento de amostras multirresistentes de *Staphylococcus aureus* em estetoscópios usados no ambiente hospitalar. **RBAC**, v. 32. n. 4, p. 285 – 288, 2000.

ARAÚJO, J. C. L. V.; LIMA, E. O.; CEBALLOS, B. S. O. et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Rev. de patol. Tropical**, v.33, n.1, p.55 – 64, 2004.

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.

BANTAR, C.; SCHELL, C.; POSSE, G. et al. Comparative time-kill study of doxycycline, tigecycline, sulbactam, and imipenem against several clones of *Acinetobacter baumannii*. **Diagnostic Microbiol. and Infectious Disease**, v. 61, p. 309-314, 2008.

BARROS, J. C.; CONCEIÇÃO, M. L.; NETO, N. J. G. et al. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 1139 -1143, 2009.

BARWICK, R.S.; LEVY, D.A.; CRAUN, G.F. et al. Surveillance for waterborne - disease outbreaks – United States. **MMWR CDC Surveill Summ**, v. 49. p. 1 – 21, 1997 – 1998.

BAUER, A.N., KIRBY, W.M.M., SHERRIS, J.C. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, n.4, p. 393 – 496, 1966.

BAYDON, H.; SAGDIC, O.; OZKAN, G. et al. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Saroteruja species* with commercial importance in Turkey. **Food control**, v.15, p.169 – 172, 2004.

BELÉM, L.F. **Estudo epidemiológico da Pitiríase versicolor no estado da Paraíba e avaliação química e antifúngica de produtos naturais e sintéticos contra seu agente etiológico**. 178f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2002.

BELTRAME, R.E.; SILVA FILHO, C. R.; TANAKA, I. I. et al. ***Pseudomonas aeruginosa* – antibioticoterapia e perfil de resistência de cepas isoladas das UTIs dos hospitais da Faculdade de Medicina de Marília**. Famema, 1996.

Disponível em: <<http://www.moreirajr.com.br/RBM/rbm1199/Rbmpseudo.htm>>. Acesso em: 22 abr. 2001.

BENKEBLIA, N, Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensm. – Wiss.u. – Technol.**, v. 6, p.1 – 6, 2003.

BENOUDIA, H.; HASSAR, M.; BENJILALLI, B. Lês propriétés antiseptiques dès huiles essentielles in vitro, testées contre dès germes pathogènes hospitaliers. **Fitoterapia, Milano**, v.59, n.2, p. 115 – 119, 1988.

BERGONE – BEREZIN, TOWNER, K. J. *Acinetobacter* spp as nosocomial, clinical, and epidemiological features. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.9. p. 148 – 165; 1996.

BERQUIÓ, L. S.; BARROS, A.J.D.; LIMA, R.C. et al. Introdução de antimicrobianos em uma população urbana. **Rev. Saud. Publ.**, Sao Paulo, v. 38 n.2, abr.l, 2004.

Disponívelem:<http://scielo.br/scielo.php?script=sci_arttex&pid=s0034_89102004000200013&ing=en&nrm=iso&ting=pt>. Acesso em: 06 jun. 2008.

BIENDEBACH, D.J.; MARSHALL, S. A.; JONES, R. N. et al. Accuracy of Cefepime antimicrobial susceptibility testing results for *Pseudomonas aeruginosa* tested on the MicroScan WalkAway System. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.33. p. 305 – 307, 1996.

BLACK, J. G. **Microbiologia Fundamentos e Perspectivas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 829 p.

BODEY, G. P.; BOLIVAR, R.; FAINSTEIN, V. et al. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Rev. Infect. Dis.** v. 5. p.279 – 313, 1983.

BURT, S.A.; REINDERS, R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, n.3, p.162-167, 2003.

CANTÓN, E.; PEMÁN, J. Curvas de letalidade em antifúngicos. **Rev Iberoam Micol.**, v.16, p.82 – 85,1999.

CARMO, E. S.; LIMA , E.O.; SOUZA, E.L.; et al. of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil on the growth and morphogenesis of some potentially patogenicid *Aspergillus* species. **Braz. J. of Microbiology.**, v.39. p. 91 - 97, 2008.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. **Antimicrobial Agents Chemother.**, v. 46, p. 1914-1920, 2002.

CATCHPOLE, C. R.; ANDREWS, J. M.; BRENWALD, N. et al. A reassessment of the in – vitro activity of colistina sulphomethate sodium. **J. Antimicrob. Chemother.** v.39, p .255 – 260, 1997.

CEBALLOS, B. S. O; BARBOSA, R. C. S.B. C; LIMA, E. O.; URTIGA, R. F. Atividades antimicrobianas de produtos naturais sobre *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de águas recreacionais. **Rev Bras Farm**, v. 74, p 4 -6, 1993.

CHIN Lü, Y. *In vitru* study of pyrrolnitrin Jama. **J Am Med Assoc.**, v.70, n.8, p.19 – 22, 1971.

CHIRURGI, V. A.; OSTER, S.E.; GOLDBERG, A.A. et al. Ampicillin – resistant *Enterococcus raffinosus* in an acute – care hospital: case – control study and antimicrobial susceptibilities. **J. Clin. Microbiol.**, v.29, p. 2663 – 2665, 1991.

CHUN, S. S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 809 -816, 2005.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal infection. In: LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. 3.ed. Baltimore: Williams e Wilkins., 1991, p.739 – 787.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUT – CLSI. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco – difusão.– 8. ed. M2 – A8. 2005, v.23.

COLE, M.D. Key antifungal and anti – insect assays – Critical Review. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.22, p.837 – 856, 1994.

COOKSON, B. D. MRSA: major problem or minor threat? **J. of Medical Microbiol.** v.38, p. 309 – 310, 1993.

COURVALIN, P.; GOLDSTEIN, F.; PHILIPPON, A.; SIROT, J. P. **L'antibiogramme**. Paris: Ed. MPC – Videom, 1985. 'p. 343.

COWAN M.N. Plant products as antimicrobial agents. **Rev Clin Microbiol.**, v.12, p. 564 -582, 1999.

CUNHA G. M. A. Atividade antimicrobiana de plantas popularmente usadas no Ceará. **Rev. Bras. Farm.**, v.76. p. 5 -6, 1995.

DANDEKAR, P. K.; TESSIER, P. R.; FARRELL, D. J. et al. Evaluation of telithromycin against *Streptococcus pneumoniae* with ribosomal mutations utilizing in vitro time-kill methodology. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 26, p. 331-334, 2005.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oil. **J. of Applied Microbiol.**, v. 83, p. 308 – 316, 2000.

DRUTZ, D. J. In vitro antifungal susceptibility testing and measurement of levels of antifungal agents in body fluids. **Rev. Infect. Dis.**, v.9. n.2, p. 411 – 415, 1987.

DUBOIS, V.; ARPIN, C.; MELON, M. et al. Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy of Cefepime – Amikacin therapy and analysis of Beta-lactam resistance. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, p.2072 -2078, 2001.

DUTKA – MALEN S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.33. p.24 – 37, 1995.

ELIOPOULOS, G.M. Increasing problems in the therapy of enterococcal infection. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.12. p.409 – 412, 1993;

ESPINEL-INGROFF, A.; KIHNS JUNIOR, C. W.; KERKERING, T. M. et al. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. **J. of Clin. Microbiol.**, v.30, n.12, p.3128-3145, 1992.

FARIAS, N. M. P.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica de óleos essenciais obtidos de plantas medicinais contra leveduras do gênero *Candida*: uma alternativa no controle de infecção hospitalar. In: PRÊMIO JOVEM CIENTISTA, 16, 2000, Porto Alegre: CNPq / Grupo Gerdau / Roberto Marinho, 2000. p. 91 – 120. Edição Saúde da População, Controle da Infecção Hospitalar.

FELMINGHAM D.; WILSON A. P. R.; QUINTANA A. I.; et al. *Enterococcus* species in urinary tract infection. **Clin Infect Dis**. v.15. p. 295 – 301, 1992.

FICHI, G.; FLAMINI, G.; ZARALLI, L. J.; PERRICCI, S. Efficacy of an essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* against *Psoroptes cuniculi*. **Phytomedicine**, v. 14, p. 227-231, 2007.

FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2004. 181p.

FRANZOLIN, M. R. Bacilos Gram - negativos Aeróbios e Anaeróbios Facultativos. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu. 2004. Cap. 50, p. 369 – 375.

GAYOSO, C. W.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L. et al. Ação inibitória do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume, α - pireno e β - pireno sobre fungos isolados de ornitomicoses. **J. Brás. de Fitomedic**, v.2, n.1-4, p.25-29, 2004.

GIBBONS, S.; OLUWATUYI, M.; VEITCH, N.C. et al. Bacterial resistance modifying agents from *Lycopus europaeus*. **Phytochemistry**, v.62. p.83 – 87, 2003.

GOLD, H. S. Vancomycin – resistant enterococci: mechanism and clinical observations. **Clin infect Dis**. v.33. p.210 – 219, 2001.

GOMES, J. V. **Superbactérias e resistência a antibióticos**. Curso de bioatualidades. Disponível em: www.libertaria.pro.br/antibioticos_intro.htm. Acesso em: 20 de jun. 2008.

GUENTHER, E. Oil of Cinnamon. In: **The Essential Oils**. New York: D. Van Nostrand, v. 4, p. 213 – 240, 1950.

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

HAMMER, K.A; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and plant extracts. **J. of Applied Microbiol.**, v. 86, p. 985 – 990, 1999.

HERSCH- MARTÍNEZ, P.; LEAÑOS- MICANELA, B. E.; SOLÓRZANO-SANTOS, F. Antibacterial effects of commercial essential oils over locally prevalent pathogenic strains in Mexico. **Fitoterapia**, v.76, n.5, p.453- 457, 2005.

HIGGINS, P. G.; WISPLINGHOFF, H., STEFANIK, D. et al. In vitro activities of the β – lactamase inhibitors clavulânico acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with β – lactamas against epidemiologically characterized multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* strains. **Antimicrob Agents and Chemother**, v.48. p.1586 – 1592, 2004.

HONÓRIO L.C.; SANTOS, I.B.; ASSIS, A.M.L.; et al. Análise do perfil de resistência, de enterobactérias produtoras de beta – lactamases de espectro ampliado (ESBL) isoladas em João Pessoa, PB, **RBAC**, v.33, n.4, p.179 – 182, 2001.

HOWARD, B. J. et al, **Clinical and Pathogenic Microbiology**. 2^{ed}. St. Louis: Mosby, 1993. p. 253.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. et al. *Staphylococcus*. In: **Microbiologia Médica**. 31 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 612.

JEAUROUND, E. SCHUMANN, B.; CLUNIES, M. et al. Supplementation of diets with herbal extracts enhances growth performance in newly-weaned piglets. **J. of Animal Science**, 2002. p. 394p, v.20, suppl.1.

JELLISON, T. K.; MCKINNON, P. S.; RYBAK, M. J. Epidemiology, resistance, and outcomes of *Acinetobacter baumannii* bacteremia treated with imipenem-cilastatin or ampicillin-sulbactam. **Pharmacotherapy**, v.21, p.142-148, 2001.

JIMÉNEZ – MEJÍAS, M. E. PACHÓN, J.; BECERRIL, B. et al. Treatment of multidrug – resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis with ampicilin / sulbactam. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, p. 932 – 935, 1997.

JOLY A. B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 12. ed. São Paulo. Nacional, 1998. 777p.

JOLY – GUILLOU, M. L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. **Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.11. p. 868 – 873, 2005.

JONES, R.N.; BIEDENBACH, D. J.; MARSHALL, S. A. et al. Evaluation of the Vitek System to accurately test the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates against Cefepime. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 32. p.107-110, 1998.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, p. 813 -829, 2003.

KAMEL, C. A novel look at a classic approach of plants extracts. **Feed Mix**, v.9, n. 6, p.19 – 24, 2000.

KEENE, W.E.; MARKUM, A.C.; SAMADPOUR,M. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections caused by commercial piercing of upper ear cartilage. **Jama**, v.91, p. 981 – 985; 2004.

KHARDORI, N.; KANCHANAPOOM, T. Management of infections in patients with severe burns: impact of multiresistant pathogens, **J. Burns & Surg Wound Care**. v.1, n.1, p. 1 – 7, 2002.

KIM, N.; LAZAR, I.M.; CUNHA, B.A. et al. Multi – valvular endocarditis. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 6. p.207 – 212, 2000.

KONEMAN, E. W.; WINN JÚNIOR, W. C.; ALLEN, S. D. et al. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. 1395p.

_____. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 5. ed. Editora MEDSI. Rio de Janeiro / RJ. 1465p, 2001

_____. **Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara - Koogan, 2008. 1565p.

KOWALSKI, R. P.; PANDYA, A. N.; KARENCHAK, L. M. et al. 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.

KUSUDA, R.; KAWAI K.; SALAT F et al. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. **Int. J. Syst Bacterial**, v.41. p.406 – 409, 1991.

LEITE, A. M. **Avaliação da atividade biológica de óleos essenciais sobre espécies bacterianas potencialmente causadoras de endocardite infecciosa**. 2007, 109f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Centro de Ciências da Asúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

LEME, I. L.; FERREIRA, A. J. P. Enterococcia. In: A. FERREIRA, W; ÁVILA, S. L. M. (Eds). **DIAGNÓSTICO LABORATORIAL: das Principais Doenças Infecciosas e Auto – imunes**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 11, p.134–146.

LEVIN, A. S.; BARONE, A.; PENCO, J. et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug – resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Clin. Infect. Dis.** v.8. p.144 – 153, 2002.

LEVIN, A. S. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections: a role for sulbactam combinations in overcoming na emerging worldwide problem. **Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.28. p.1008 – 1011, 1999.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 4. ed. Porto Alegre: Artes Médicas. 1998. 415p.

LIMA, E.O.; GOMPERTZ, O. F. ;GIESBRECHT, A.M. et al. *In vitro* antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses**, v.36, n.9 – 10. p.333 – 336, 1993.

LIMA E. O. *Estudo das dermatofitoses em João Pessoa-Paraíba e da atividade antifúngica de plantas medicinais da região contra alguns de seus agentes isolados*. 1996. 180f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E.O.; FARIAS, N. M. P.; SPUZA, L. S. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Rev. Bras. de Farmacog. Braz. Journ. Of Pharm**, v.16, n.2, p. 197 – 201, 2006.

LINCOPAN, N.; TRABULSI, L. R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu. 2004. Cap. 49, p.359 –368.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas cultivadas, São Paulo. Instituto Plantarum, 2002. 512p.

LONNROTH, A. **Resistência aos Antibióticos** – uma ameaça crescente. Comissão Européia – Investigação. Europa 2003. Disponível em: <http://europa.eu.int/comm/research/leaflets/antibiotics/page_29_pt.html>. Acesso em: 8 fev. 2005.

MACFADDIN, J. F. **Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica**. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2003. 850p.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **J. of Applied Microbiol.**, v.84, n.4, p.538-544, 1998.

MARTINS, M.A. **Manual de Infecção Hospitalar**, Epidemiologia Prevenção, Controle. 2 ed. Belo Horizonte: Medsi, 2001.

MAY, J.; CHAN, C.H.; FRENCH, C.G. Time – kill studies of tea tree oils on clinical isolates. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 45, n. 5, p.639 – 643, 2000.

MCGINNIS, M.R. **Laboratory handbook of medical mycology**. New York: Academic Press, 1980. 411p.

MENTEN, J.F.M. Aditivos alternativos na produção de aves: probióticos e prebióticos. In: REUNIÃO ANUAL DASOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2001, Piracicaba, **Anais...** Piracicaba: FEALQ., 2001. p.141-157.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.15. p. 316 -320, 2005.

MILTEMBERG, G. Extratos herbais como substitutos de antimicrobianos na alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: IAC. p.87-100.

MICROSCAN WALKAWAY SYSTEM. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.33. p. 305-307, 1999.

MOELLERING JÚNIOR, R. C. Novos desafios no campo das doenças infecciosas. In: Patógenos Emergentes nas Doenças Infecciosas: Relatório Especial Hospital Prátice. Euromédice. [s. l.]: Ed. Médicas, 2000. p. 5 – 7.

MOREIRA, A. C. P.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L. et al. Inhibitory effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae) essential oil and β - pirenol on the growth of dematiaceous moulds. **Braz. J. of Microbiol.**, v.38, p. 33- 38, 2007.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; et al. **Microbiologia Médica**. 5ª. ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2006. 979 p.

NAQUI, S.N.; KILIAN, M.S.Y.; VOHORA, S.B. Anti – bacterial, anti – fungal and antihelmintic investigations on Indian medicinal plants. **Fitoterapia**, v.62, n.3, p. 221 – 228, 1991.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. 2004.

NICOLAOU, K. C.; BODDY, C. N. C.; BRÄSE, S.; WINSSINGER, N. The chemistry, biology and medicine of the glycopeptide antibiotics. **Angew. Chem., Int.**, v.38, p.24, 1999.

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R. CANNATELLI, M. A. et al. Susceptibility of methicillin – resistant Staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**., v. 230, p.191 – 195, 2004.

OBER, N. Antibiotics for adult respiratory tract infections: clinical considerations and management pitfalls. **Drug. Benefit. Trends**., v. 10. p.10 – 16, 1998.

OLIVEIRA, R. A. G. de; LIMA, E. O; VIEIRA, W. L et al. Atividades antimicrobianas de produtos naturais sobre Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa isoladas de águas recreacionais. **Rev Brás Farm.**, v. 74. n.1 p. 4 – 6, 2006.

OPLUSTIL, C. P.; ZOCCOL, C. M.; ROBOUTI, N. R. et al. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2004. 340 p.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Vencendo a resistência microbiana**. 2000. Disponível em: <www.ccih.med.br/vencendoresistencia.html>. Acesso em: 08 de fev. 2005.

PALOMINO, J-C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M. et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. agents and Chemother.** 2002, v. 46; p. 2720 – 2722, 2002.

PANDEY, A.; KAPIL, A.; SOOD S. et al. In vitro activities of ampicillin – sulbactam and amoxicillin – clavulânico acid against *Acinetobacter baumannii*. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, p. 3415 – 3416, 1998.

PATTERSON, J.E.; MASECAR, B. L.; ZERVOS, M.J. Characterization and comparison of two penicillinase – producing strains of *Streptococcus (Enterococcus) faecalis*. **Antimicrob. Agents Chremother**, v. 32 p. 122 – 124, 1988.

PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLAN, M. R. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Rev. Saúde Pública.**, v.38, n.2, p. 326 – 328, 2004.

PEYRET, M.; CARRET, G.; CARRE, C.; et al. Étude mathématique de la curve de mortalité d'*Éscherichia coli* exposure aux polymyxines. **Pathologie Biologie**, v.38, p. 441 – 445, 1990.

PEZZUTO, J.M. Plant derived anticancer agents. **Biochem. Pharmacol.**, v.53, n.2, p.121 - 133, 1997.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosíntesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, p. 808 - 811, 2006.

PINILLOS, M.A., GOMEZ, J., ELIZALDE, J. et al. Intoxicación por alimentos, plantas y setas. **Anales Sis San Navarra**, v.26, p.243 – 263, 2003. Supl.1.

PINTORE, G.; USAI, M.; BRADESI, P. et al. Chemical composition and antimicrobial activity *Rosmarnus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. **J. Flavor and Fragrance**, v.17, p.15 - 19, 2002.

PONTES, Z. B. V. S.; LIMA., E. O.; BARBOSA FILHO, J. M.; BELEM, L. F. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre cepas de *Trichosporon asahi* e *Trichosporon inkin*. **Rev. Bras. de Cienc. da Saúde**, v. 8, n. 2, p.125 - 134, 2004.

PURSEGLOVE, J.W.; BROWN, E.G.; GREEN, C.L. et al. Cinnamon and cassia. In: SPICES. London: Longman, 1981. v.1, p. 100 -173. (**Tropical Agriculture Series**).

RAO, M.R.N. Prospects of nutmeg, clove and cinnamon cultivation in Andaman Nicobar Islands. **Indian Cocoa, Arecanut Spices Journal**, v.14, n.3, p.118-120, 1991.

RECIO M.C.; RIOS, J.L. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978 – 1988. **Phytotherapy Research**, v. 3, n. 4, p. 117 – 125, 1989.

REDDY, V.M.; BARANWAL, V.K.; SINGH, R.K.Arecanut (*Areca catechu* L.) based high density multispeciescropping system in West Bengal. **J. Plantation Crops**, v.21, n.1, p.15-21, 1993.

REFERENCE Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. M38-A. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, 2002a. v. 22, n. 16, p.1-50. Wayne

REHDER V. L. G.; MACHADO A. L. M; DELARMELINA C et al. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*. **Rev Bras PI Med**. v 6: p. 67 - 71, 2004.

RETHINAM, P.; EDISON, S.; SADANANDAN, A. K. et al. achievements of AICRP on spices. Indian Cocoa, **Arecanut Spices Journal**, v.18, n.1, p.16-21, 1994.

REYES, K. P.; LERNER, A. M. Current problems in the treatment of infective endocarditis due to *Pseudomonas aeruginosa*.**Rev. Infect. Dis.**, v. 5. p. 314, 1983.

ROSA, N. A resistência aos antibióticos. **Jas Farma, Comunicação**. [S.l.], 2001. Disponível em: <http://saude.sapo.ptgkBZO/115168.html>. Acesso em: 05 jun. 2008.

ROSSI F; ANDREAZZI D. B. **Resistência bacteriana**: Interpretando o antibiograma. São Paulo: Atheneu, 2005. 118 p.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. DEANS, S. G.; DORMAN, H. J. D. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. **Planta Médica**, v. 66, n. 4 p. 687 - 693, 2000.

RUOFF, K.L.; MAZA, L. de L. A.; MURTA, G. H. et al. Species identities of *Enterococci* isolated from clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, n. 3 p. 435 – 437, 1990.

RUKHOLM, G.; MUGABE, C.; AZGHANI, A. O.; OMRI, A. Antibacterial activity of liposomal gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*: a time-kill study. **Internat. J. of Antimicrob. Agents**, v. 27, p. 247 - 252, 2006.

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

SADANANDAN, A.K. Doubling our production of spices aiming through infrastructure spread and research: AICRP Spices. **Indian Horticulture**, v.39, n.3, p.10-16, 1994.

SAGDIÇ, O.; KUÇU, A.; OZCAN, M.; OZÇELIK, S. Effects of Turkish spice extracts of various concentrations on the growth of E. Coli 0157: H7. **Food Protection**. v.19. n. 3. p. 473 -480, 2003.

SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D. et al. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v.15, n.7, p.549-557, 2004.

SALVAT, A.; ANTONNACCI, L.; FORTUNATO, R. H. et al. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiol.**, v. 32, n. 5, p. 293 – 297, 2001.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L.G.L.; et al. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitology Research**, v. 100, p. 783 - 790, 2007.

SANTURIO J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATTI, P. et al. Atividade antimicrobiana de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Cienc Rural**, v. 37 n. 3, p. 803 – 808, 2007.

SANTOS FILHO, L. **Manual de Microbiologia Clínica**, 3. ed. João Pessoa: Ed. Universitária / UFPB, 2003.

SANTOS FILHO, L., SANTOS, I. B., ASSIS, A. L. M., XAVIER, D. E. Determinação da produção de metalo beta-lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. **J. BRAS. Patol. Med. Laborat.**, v. 38, p. 79 – 84, 2002.

SANTOS, M. G. dos, DIAS PINTO, A. G.; MARTINS, M. M. Conhecimento e uso da medicina alternativa entre alunos e professores de primeiro grau. **Rev. Saúde Pública**, v. 29, n. 3, p. 221-227, 1995.

SCHEFFER, M.C. Influência da adubação orgânica sobre a biomassa, o rendimento e a composição do óleo essencial de *Achillea millefolium* L. In: MING, L.C. **Plantas medicinais aromáticas e condimentares**: avanços na pesquisa agrônômica. Botucatu: UNESP, 1998. p. 1 – 22.

SEGATORE, B.; SETACCI, D.; PERILLI, M. et al. Bactericidal activity of levofloxacin and ciprofloxacin on clinical isolates of different phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa*. **Internat. J. of Antimicrob. Agents**. v. 13, p. 223 - 226, 2000.

SENANAYAKE, V. M.; LEE, T. H.; WILLS R.B.H. Volatile constituents of (*Cinnamomun zeylanicum*) oils. **J. Agric. Food Chem.**, v. 26. p. 822 -824, 1978.

SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROF, A.; GEBRAR, R.I. In vitro studies with sf 86-327, a new orally active allylamine derivatives. **J. of Medical Veterinary Micology**, v. 23, p. 125 - 132, 1985.

SIGNOR, D.; KOWALSKI, A. P.; ALVES, M. A. et al. Nota Científica Estaquia Herbácea de Orégano *Herbaceous Cutting Propagation Of Orégano*. **Rev. Scientia Agraria**, v. 8, n. 4, p. 431 - 434, 2007.

SILVA, E. C. H. P. de M.; NEUFELD, P. M.; LEITE, C. Q. F. et al. **Bacteriologia e Micologia Para o Laboratório Clínico**. Rio de Janeiro: Revinter, 2006. p. 498.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Food Microbiology**, v. 26, p. 118–122, 1998.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, L. P.; GOSMANN, G. et. al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis: UFSC, 2003. 18, p. 467 – 495.

SINGH, H. B.; SRIVASTAVA, M.; SINGH, A. B.; SRIVASTAVA, A. K. *Cinnamomum* bark oil fungitoxican against fungi causing respiratory tract mycoses. **Allergy**, v. 50, p. 995 - 999, 1995.

SOUSA, M. P. de; MATOS, M. E. O.; MATOS, F. J. de A. et al. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: UFC, Laboratório de Produtos Naturais, 1991. p. 203 – 205.

SOUZA, A. Q. de; SOUZA, A. D. L de; ASTOLFI FILHO, S. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*. **Acta Amaz.**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004,

SOUZA, E. L.; LIMA, E. O.; FREIRE, K. R. L. et al. Inhibition action of some essential oils and phytochemicals on the growth of moulds isolated from foods. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v. 2, n. 2, p. 245 – 250, 2005.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. M. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control.**, v. 18, p. 409 - 413, 2007.

SPECIALE, A.; MUSUMECI, R.; BLANDINO, G. et al. Minimal inhibitory concentrations and time-kill determination of moxifloxacin against aerobic and anaerobic isolates. **Internat. J. of Antimicrob. Agents**, v. 19, p. 111 - 118, 2002.

SWENSON, J. M.; KILLGORE G. E.; TENOVER F. C. Antimicrobial susceptibility testing of *Acinetobacter* spp. by NCCLS broth microdilution and disk diffusion methods. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42. p. 5102 – 5108, 2004.

SUSSMAN, O. MATTOS, L.; RESTREPO, A. Resistencia Bacteriana/ *Antibacterial resistance*. **Univ. med**, v. 43, n. 1, p. 91 – 96, 2002.

TABAK, M.; ARMON, R.; NEEM, I. *Cinnamomun* extracts inhibitory effect on *Helicobacter pylori*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 67, p. 269 - 277, 1999.

TAVARES, W. Resistência bacteriana. In: **Manual de antibióticos e quimioterapicos antiinfeciosos**. Atheneu p. 55 – 144, 2001

TEIXEIRA, L. M.; TRABULSI, L. R. *Enterococcus faecalis*. In: TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. cap. 26, p. 213 – 217.

TOLEDO, M. R. F. Edwardsiella – Citrobacter – Klebsiella – Enterobacter – Hafnia – Serratia – Proteus – Morganella – Providencia. In: TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. cap. 32, p. 247 – 249.

TOLEDO, M. R. F.; TRABULSI, L. R. *Pseudomonas*. In: TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. cap. 36, p. 269 – 271.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 827 p.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. Características clínicas e patológicas da cárie dentária. **Cariologia Clínica**. 2. ed. São Paulo: Santos, 1995. cap. 6, p. 45 – 69.

TOWNER, K. J. Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. **J. Méd. Microbiol.**, v. 46, n. 2, p. 721 – 746, 1997.

TRABULSI, L. R.; ORDOÑEZ, J. G.; MARTINEZ, M. B. Enterobacteriaceae. In: TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu. 2004. cap. 35, p. 269 – 276.

TSAKIS, A., POURNARAS, S., WOODFORD, N. et al. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. **J. Clin. Microbiol.** v.38: p.1290-1292, 2000.

VERLET, T.N. The world herbs and essential oils economy – analysis of the medium term development. **Acta Horticulturae**, n.306, p. 474 – 81, 1992.

VERNON, F; RICHARD, H. La canelle. In: Quelques épices et aromates et leurs huiles essentielles. Massy: CDIUPA, v.2, p.21-45, 1976. 1976. (CDIUPA. Serie Syntheses Bibliographiques, 10.

VILJOEN, A.; VAN VUUREN, S.; ERNST, E. et al. *Osmitopsis astericoides* (Asteraceae) - the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, n.2-3, p.137-143, 2003.

VILLEGAS, M. V.; HARTSTEIN, A. I. *Acinetobacter* outbreaks 1977 – 2000. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.** 24: 284 – 295; 2003.

VINCENT, J.G.; VINCENT, H.W. Filter paper disc modification of the Oxford cup *Penicillium* determination. **Proc. Soc. Exp. Biol. Méd.** New York, v.25, p.162–164, 1944.

WILKINSON, J. M; HIPWELL, M. RYAN, T.; CAVANAGH, H. M. A. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: antibacterial and antifungal activity. **J. Agric. Food Chem**, v.51, p.76 – 81, 2003.

YANG, Y.C.; LEE, H. S.; LEE, S. H.; CLARK, J. M.; AHN, Y. J. Ovicidal and adulticidal activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil compounds and related compounds against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1595-1600, 2005.

YUST, J.; FUNG, D. Y. Inactivation of *Listeria monocitogenes* Scott A 49594 in apple juice supplemented with cinnamom. **Journal Food Prot.**, v. 65, p. 1663-1666, 2002.