



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GLEILTON WEYNE PASSOS SALES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DO MECANISMO DE
AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DA CASCA DE FRUTOS DA
*HYMENAEA COURBAIL L.***

FORTALEZA

2014

GLEILTON WEYNE PASSOS SALES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DO MECANISMO DE
AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS CASCAS DE FRUTOS DA
HYMENAEA COURBAIL L.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Nádia Accioly
Pinto Nogueira

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- S155a Sales, Gleilton Weyne Passos.
Avaliação da atividade antimicrobiana e do mecanismo de ação do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbail* L. / Gleilton Weyne Passos Sales. – 2014.
138 f.: il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará; Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem; Departamento de Farmácia; Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas; Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Biologia para a saúde.
Orientação: Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira.
1. Antibacterianos. 2. Óleos Voláteis. 3. Sinergismo Farmacológico. 4. Staphylococcus Aureus I. Título.

CDD 615.329

GLEILTON WEYNE PASSOS SALES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DO MECANISMO DE
AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS CASCAS DE FRUTOS DA
HYMENAEA COURBAIL L.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em ___/___/_____.

Banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Nádia Accioly Pinto Nogueira (Orientadora)
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Romélia Pinheiro Gonçalves
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (UFC)

Dr^ª. Gisele Medeiros Bastos
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (USP)

As mulheres da minha vida Terezinha
Pauilha dos Passos, Maria Narazé
Passos e Maria Naracilda das Chagas,
pela dedicação de suas vidas em prol dos
meus estudos.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Nádia Accioly Pinto Nogueira por todos os ensinamentos, dedicação, paciência e apoio na execução deste trabalho.

À minha família, meu porto seguro que esteve presente em todos os momentos.

À excelente equipe de amigos e parceiros do LabMicro, Andressa Hellen de Moraes Batista, Larissa Queiroz Rocha, Andréa Bessa Teixeira, Adriana Carvalho de Albuquerque, Rafael de Carvalho Mendes, Fabrício César Fernandes, Luciana Siebra, Anne Caroline Duarte Moreira e Pedro Mikael Soares por toda ajuda e compreensão.

Aos amigos Nani, Lucas Cavalcante, Thyago Ribeiro, Victor Hugo, Álvaro de Castro, Carol Alcântara, Gutto Moreira, Isac Sobrinho, Washington Feitosa, Terezinha Gonçalves, Neila Gonçalves, Jéssika Gonçalves e Kévina Tharla pela amizade indispensável durante esta caminhada.

À Leto Queiroz pela valiosa ajuda na coleta das amostras na Serra da Ibiapaba.

À Técnica do Horto de Plantas Mediciniais Francisco José de Abreu Matos, Amélia Ramos Freire pela obtenção do óleo essencial de *Hymenaea courbail* L.

Ao PADETEC pela análise e caracterização do óleo essencial.

Ao Prof. Dr. Valder Nogueira Freire e sua equipe de laboratório pelas análises de microscopia de força atômica.

À Prof^ª. Dr^ª. Romélia Pinheiro Gonçalves e à Dr^ª. Gisele Medeiros Bastos por aceitarem o convite de participação da banca e pelas considerações acerca deste trabalho.

À Raimundinha Gomes, Secretária da Pós-Graduação, pela disponibilidade e atenção no decorrer do curso.

À CAPES pelo apoio financeiro.

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro” (Albert Einstein)

RESUMO

O Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) possui um amplo histórico de utilização pelos indígenas de florestas tropicais, seus frutos são compostos por óleos essenciais, taninos, substâncias amargas, matérias resinosas e pécnicas, amido e açúcares. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbaril* L. (OEHc) e o seu mecanismo de ação sobre cepas OSSA de referência de *S. aureus* (*S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* 14458). Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram determinados o potencial antimicrobiano do OEHc, as Concentrações Inibitória (CIM) e Letal Mínimas (CLM) do OEHc, o efeito do tempo de exposição ao OEHc, a OXA e as associações OEHc-OXA, o efeito modulador do OEHc na atividade de antibióticos (ATB) de uso clínico, e a ação do OEHc na fases de crescimento exponencial e estacionário e na fase de crescimento estacionário na presença de cloranfenicol. O mecanismo de ação do OEHc foi verificado por captação do cristal violeta, liberação de material genético, dosagem do efluxo de íons potássio e pela avaliação da morfologia microbiana por microscopia de força atômica. Também foi avaliada a ação de concentrações sub-inibitórias do OEHc na expressão de fatores de virulência (catalase, coagulase, hemolisina, lipase e DNase) e a estabilidade da atividade antimicrobiana do OEHc em diferentes pH. OEHc inibiu o crescimento das cepas de *S. aureus* ATCC 6538P (CIM = CLM = 2,5 mg/mL) e *S. aureus* ATCC 14458 (CIM = 2,5 mg/mL; CLM = 5 mg/mL). A CLM do OEHc foi capaz de inviabilizar as cepas OSSA testadas em 8 horas (*S. aureus* ATCC 6538P) e 24 horas (*S. aureus* ATCC 14458) e a CIM inibiu o crescimento de *S. aureus* ATCC 14458 até 48h de exposição. A ação moduladora do OEHc na atividade de antibióticos de uso clínico variou com o ATB e com a cepa testada. Para as associações OEHc-OXA testadas foi encontrada uma predominância de efeitos sinérgicos e indiferentes para as cepas OSSA testadas. O OEHc foi capaz de reduzir o número de células viáveis em todas as fases crescimento microbiano. Sua maior eficiência na presença de CLO sugere um mecanismo de ação independente do metabolismo celular. O OEHc foi capaz de promover o aumento da captação do cristal violeta, da liberação de material genético e do efluxo de íons potássio, provocando também alterações na morfologia bacteriana, sugerindo que seu alvo de ação seja o envoltório celular. No entanto, a inibição da expressão de fatores de virulência pode indicar a participação de outros alvos na ação do OEHc, como a síntese

de macromoléculas. A atividade antimicrobiana do OEHC sobre cepas OSSA é potencializada em pH alcalino. Os resultados encontrados mostram que o OEHC possui uma boa atividade antimicrobiana sobre a espécie Gram-positivo *S. aureus*, com mecanismos de ação mediados pela ocorrência de danos no envoltório microbiano com perda de material intracelular e inibição da síntese de macromoléculas, revelando seu efeito modulador sinérgico quando associados a oxacilina e outros antibióticos de uso clínico.

Palavras-chave: *Hymenaea courbaril*, óleo essencial, atividade antimicrobiana, mecanismo de ação.

ABSTRACT

Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) has an extensive history of use by natives of tropical forests, its fruits are composed of essential oils, tannins, bitter substances, resinous materials and pectic, starch and sugars. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of the essential oil extracted from the peel of fruits of *Hymenaea courbaril* L. (OEHC) and its mechanism of action on OSSA reference strains *S. aureus* (*S. aureus* ATCC 6538P and *S. aureus* 14458). For the evaluation of antimicrobial activity antimicrobial potential were determined from OEHC Inhibitory Concentrations (MIC) and Minimum Lethal (CLM) from OEHC, the effect of time of exposure to OEHC, OXA and OEHC associations-OXA, OEHC modulator effect on activity of antibiotics (ATB) for clinical use, and the OEHC action on exponential and stationary phases of growth and in growth stationary phase in the presence of chloramphenicol. The OEHC action mechanism was verified by crystal violet uptake, release of genetic material, determination of potassium ion efflux and for assessing the microbial morphology by atomic force microscopy. It was also evaluated the action of sub-inibitórias concentrations of OEHC on expression of virulence factors (catalase, coagulase, DNase, lipase, and hemolysin) and stability of antimicrobial activity of OEHC at different pH. OEHC inhibited the growth of *S. aureus* strains ATCC 6538P (CIM = CLM = 2.5 mg/mL) and *S. aureus* ATCC 14458 (CIM = 2.5 mg/mL; CLM = 5 mg/mL). The CLM from OEHC was able to derail the OSSA strains tested in 8 (*S. aureus* ATCC 6538P) and 24 hours (*S. aureus* ATCC 14458) and the CIM inhibited the growth of *S. aureus* ATCC 14458 until 48 hours of exposure. The modulatory action of the antibiotic activity of OEHC clinical use ranged with the ATB and with the strain tested. OEHC associations-OXA tested was found a predominance of synergistic effects and indifferent to the OSSA strains tested. The OEHC was able to reduce the number of viable cells at all stages microbial growth. Its greater efficiency in the presence of CLO suggests a mechanism of action independent of the cellular metabolism. The OEHC was able to promote the increased uptake of crystal violet, the release of genetic material and the efflux of potassium ions, causing also changes in bacterial morphology, suggesting that its target of action is the cell wrap. However, the inhibition of the expression of virulence factors can indicate the participation of other targets on OEHC action, as the synthesis of macromolecules. The antimicrobial activity of OEHC about strains OSSA is

potentized in alkaline pH. The results show that the OEHC has a good antimicrobial activity on the species Gram-positive *S. aureus*, with action mechanisms mediated by the occurrence of damage in microbial wrap with loss of intracellular material and inhibition of the synthesis of macromolecules, revealing its synergistic modulator effect when associated with oxacillin and other antibiotics of clinical use.

Keywords: *Hymenaea courbaril*, essential oil, antimicrobial activity, mechanism of action.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Mecanismos propostos para a ação antimicrobiana dos óleos essenciais na célula bacteriana.	8
Figura 2	- <i>Hymenaea courbaril</i> .	16
Figura 3	- Frutos da <i>Hymenaea courbaril</i> L.	17
Figura 4	- Fluxograma de preparo das diluições de OEHC.	25
Figura 5	- Fluxograma de determinação do potencial antimicrobiano do OEHC.	26
Figura 6	- Fluxograma da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OEHC e da Oxacilina (OXA).	28
Figura 7	- Fluxograma da determinação da Concentração Letal Mínima (CLM) do OEHC e da OXA.	29
Figura 8	- Fluxograma da determinação das curvas de crescimento microbiano.	30
Figura 9	- Fluxograma da determinação do efeito do tempo de exposição ao OEHC na viabilidade microbiana.	31
Figura 10	- Fluxograma da determinação do efeito do OEHC sobre cepas microbianas nas fases de crescimento exponencial e estacionário.	32
Figura 11	- Fluxograma da determinação do efeito do OEHC sobre cepas microbianas na fase exponencial de crescimento na presença de cloranfenicol.	33
Figura 12	- Fluxograma do estudo do efeito modulador do OEHC na atividade de antibióticos de uso clínico.	34
Figura 13	- Fluxograma do estudo do efeito modulador do OEHC na atividade da Oxacilina pelo método <i>Checkerboard</i>	35
Figura 14	- Fluxograma da determinação do efeito do tempo de exposição das associações de OEHC e OXA na viabilidade microbiana.	36
Figura 15	- Fluxograma do ensaio de captação do cristal violeta	38
Figura 16	- Fluxograma do ensaio de liberação de ácidos nucléicos	39
Figura 17	- Fluxograma do ensaio de efluxo de íons potássio (K ⁺)	40
Figura 18	- Fluxograma de determinação da microscopia de força atômica	41
Figura 19	- Fluxograma da avaliação do efeito de concentrações sub-inibitórias do OEHC na expressão de fatores de virulência microbiana de <i>S. aureus</i>	42
Figura 20	- Fluxograma da avaliação da estabilidade do OEHC em diferentes valores de pH	44

Figura 21	- Cromatograma do OEHc obtido por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-MS)	46
Figura 22	- Alterações na morfologia de <i>S. aureus</i> ATCC 6538P detectada por microscopia de força atômica do tipo 3D (altura)	73
Figura 23	- Alterações na morfologia de <i>S. aureus</i> ATCC 6538P detectada por microscopia de força atômica	74

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	- Atividade antimicrobiana do OEHc sobre a cepa <i>S. aureus</i> ATCC 6538P.	50
Gráfico 2	- Atividade antimicrobiana do OEHc sobre a cepa <i>S. aureus</i> ATCC	50

	14458.	
Gráfico 3	- Atividade antimicrobiana do antibiótico Oxacilina sobre a cepa <i>S. aureus</i> ATCC 6538P.	51
Gráfico 4	- Atividade antimicrobiana do antibiótico Oxacilina sobre a cepa <i>S. aureus</i> ATCC 14458.	51
Gráfico 5	- Curva de crescimento de <i>S. aureus</i> ATCC 6538P.	52
Gráfico 6	- Curva de crescimento de <i>S. aureus</i> ATCC 14458.	52
Gráfico 7	- Efeito do tempo de exposição do OEHc na viabilidade de <i>S. aureus</i> ATCC 6538P.	53
Gráfico 8	- Efeito do tempo de exposição do OEHc na viabilidade celular de <i>S. aureus</i> ATCC 14458.	53
Gráfico 9	- Efeito do OEHc sobre <i>S. aureus</i> ATCC 6538P nas fases de crescimento exponencial e estacionário.	55
Gráfico 10	- Efeito do OEHc sobre <i>S. aureus</i> ATCC 14458 nas fases de crescimento exponencial e estacionário.	56
Gráfico 11	- Efeitos do OEHc sobre a <i>S. aureus</i> ATCC 6538P na presença de cloranfenicol.	57
Gráfico 12	- Efeitos do OEHc sobre a <i>S. aureus</i> ATCC 14458 na presença de cloranfenicol.	58
Gráfico 13	- Isoblograma mostrando o efeito sinérgico da associação OEHc-OXA na inibição do crescimento do <i>S. aureus</i> ATCC 6538P.	62
Gráfico 14	- Isoblograma mostrando o efeito sinérgico da associação OEHc-OXA na inibição do crescimento do <i>S. aureus</i> ATCC 14458.	63
Gráfico 15	- Efeito do tempo de exposição a OEHc-OXA na viabilidade celular do <i>S. aureus</i> ATCC 6538P.	64
Gráfico 16	- Efeito do tempo de exposição a OEHc-OXA na viabilidade celular do <i>S. aureus</i> ATCC 6538P.	64
Gráfico 17	- Efeito do tempo de exposição a OEHc-OXA na viabilidade celular do <i>S. aureus</i> ATCC 6538P.	65
Gráfico 18	- Efeito do tempo de exposição das combinações do OEHc e Oxacilina na viabilidade celular do <i>S. aureus</i> ATCC 14458.	65
Gráfico 19	- Efeito do tempo de exposição das combinações do OEHc e Oxacilina na viabilidade celular do <i>S. aureus</i> ATCC 14458.	66
Gráfico 20	- Efeito do tempo de exposição das combinações do OEHc e Oxacilina na viabilidade celular do <i>S. aureus</i> ATCC 14458.	66
Gráfico 21	- Captação do cristal violeta por <i>S. aureus</i> ATCC 6538P exposta a OEHc.	68

Gráfico 22	- Captação do cristal violeta por <i>S. aureus</i> ATCC 14458 exposta a OEHc.	68
Gráfico 23	- Liberação de ácidos nucléicos pela cepa <i>S. aureus</i> ATCC 6538P exposta a OEHc.	69
Gráfico 24	- Liberação de ácidos nucléicos pela cepa <i>S. aureus</i> ATCC 14458 exposta a OEHc.	70
Gráfico 25	- Efluxo de íons potássio (K ⁺) pela cepa <i>S. aureus</i> ATCC 6538P.	71
Gráfico 26	- Efluxo de íons potássio (K ⁺) pela cepa <i>S. aureus</i> ATCC 14458.	71
Gráfico 27	- Atividade hemolítica de <i>S. aureus</i> ATCC 6538P após exposição a concentrações sub-inibitórias de OEHc.	77
Gráfico 28	- Atividade hemolítica de <i>S. aureus</i> ATCC 14458 após exposição a concentrações sub-inibitórias de OEHc.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Constituintes químicos do OEHc.	47
Tabela 2	- Potencial antimicrobiano do OEHc sobre cepas de <i>S. aureus</i> , determinado pela técnica de difusão em ágar.	48
Tabela 3	- CIM e CLM de OEHc e OXA para cepas padrão de <i>S. aureus</i> , determinadas pelas técnicas da microdiluição em caldo de cultura e de contagem de células viáveis, respectivamente.	49
Tabela 4	- Efeito modulador do OEHc na atividade antibacteriana de antibióticos de uso clínico sobre cepas de <i>S. aureus</i> .	60
Tabela 5	- Ação combinada de OEHc e OXA na inibição de cepas de <i>S. aureus</i> sensíveis a oxacilina.	61
Tabela 6	- Atividade catalase de cepas de <i>S. aureus</i> após exposição a	75

	concentrações sub-inibitórias de OEHC.	
Tabela 7	- Atividade coagulase de cepas de <i>S. aureus</i> após exposição a concentrações sub-inibitórias de OEHC.	76
Tabela 8	- Atividade lipolítica de cepas de <i>S. aureus</i> após exposição a concentrações sub-inibitórias de OEHC.	79
Tabela 9	- Atividade da atividade DNase de cepas de <i>S. aureus</i> após exposição a concentrações sub-inibitórias de OEHC.	80
Tabela 10	- Efeito do pH na atividade antimicrobiana do OEHC sobre cepas de <i>S. aureus</i> .	81

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AMI	Amicacina
ANOVA	Análise da Variação
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATB	Antibiótico
ATM	Antimicrobiano
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CCBH	Coleção de Culturas de Origem Hospitalar da Fiocruz
CFO	Cefoxitina
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.
CIM	Concentração inibitória mínima

CIP	Ciprofloxacina
CLA	Claritromicina
CLI	Clindamicina
CLM	Concentração letal mínima
CLO	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CNS-MS	Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde
CRX	Cefuroxima
CSI	Concentração Sub-Inibitória
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EPM	Erro padrão médio
ERT	Ertapenem
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eV	elétron Volt
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
G	Força da gravidade
Gr	Grama
GEN	Gentamicina
<i>H. courbaril</i>	<i>Hymenaea courbaril</i>
HI	Halo de inibição
Hz	Hertz
ICIF	Índices de Concentração Inibitória Fracionada
IK	Índice de retenção de Kovats.
LabMicro	Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada
logUFC/mL	Logaritmo de unidades formadoras de colônia por mililitro
m	Metro
MEM	Meropenem
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro.
mm	Milímetro
NET	Netilmicina
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros

OD	Densidade ótica
OEHc	Óleo essencial extraído da casca de frutos da <i>Hymenaea courbaril</i> L.
OEHc+ATM	Associação do óleo essencial extraído da casca de frutos da <i>Hymenaea courbaril</i> L. e antimicrobiano
OEHc-OXA	Associação do óleo essencial extraído da casca de frutos da
OEHc+OXA	<i>Hymenaea courbaril</i> L. e Oxacilina
OSSA	Oxacillin Sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>
ORSA	Oxacillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
OXA	Oxacilina
P/T	Piperacilina/Tazobactam
PADETEC	Parque de Desenvolvimento Tecnológico do Ceará
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial de hidrogênio
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
VAN	Vancomicina
Vol.	Volume
μL	Microlitros
μm	Micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
β	Beta
\geq	Maior e igual
$<$	Menor que
$>$	Maior que
*	Asterisco
α	Alfa
γ	Gama
δ	Delta
χ	Chi
ε	Épsilon
ϕ	Fi
η	Etá

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1	Óleos essenciais.....	5
2.2	Mecanismo de ação de óleos essenciais.....	8
2.3	Resistência bacteriana.....	9
2.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.5	Plantas medicinais.....	13
2.6	O gênero <i>Hymenaea</i> e a espécie <i>H. courbaril</i> L.....	16
3	OBJETIVOS.....	20
3.1	Objetivo geral.....	21
3.2	Objetivos específicos.....	21
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1	Aspectos éticos.....	23
4.2	Obtenção do Material botânico e identificação da	23

	espécie...	
4.3	Extração do óleo essencial dos frutos de <i>H. courbaril</i> L. (OEHc).....	23
4.4	Avaliação do rendimento médio do OEHc.....	24
4.5	Análise dos constituintes do OEHc.....	24
4.6	Ensaio microbiológicos.....	24
4.6.1	Preparação das diluições do OEHc.....	24
4.6.2	Cepas microbianas.....	25
4.6.3	Manutenção das cepas.....	25
4.6.4	Antimicrobianos, meios de cultura e reagentes.....	25
4.6.5	Determinação do potencial antimicrobiano do OEHc	26
4.6.6	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OEHc e da Oxacilina (OXA).....	27
4.6.7	Determinação da Concentração Letal Mínima (CLM) do OEHc e da OXA.....	28
4.6.8	Determinação das curvas de crescimento microbiano	29
4.6.9	Determinação do efeito do tempo de exposição ao OEHc na viabilidade microbiana.....	30
4.6.10	Determinação do efeito do OEHc sobre cepas microbianas nas fases de crescimento exponencial e estacionário.....	31
4.6.11	Determinação do efeito do OEHc sobre cepas microbianas na fase exponencial de crescimento, na presença de cloranfenicol.....	32
4.6.12	Estudo do efeito modulador do OEHc na atividade de antibióticos de uso clínico.....	33
4.6.13	Estudo do efeito modulador do OEHc na atividade da Oxacilina pelo método Checkerboard.....	34
4.6.14	Determinação do efeito do tempo de exposição das associações OEHc-OXA na viabilidade microbiana.....	36
4.6.15	Estudo do mecanismo de ação do OEHc.....	37
4.6.15.1	Detecção de ocorrência de alteração na permeabilidade da membrana celular.....	37
4.6.15.1.1	Captação de cristal violeta.....	37

4.6.15.1.2	Liberação de ácidos nucleicos.....	38
4.6.15.1.3	Efluxo de íons potássio (K ⁺).....	39
4.6.15.2	<i>Detecção de alterações na morfologia bacteriana.....</i>	40
4.6.15.2.1	Microscopia de força atômica.....	40
4.6.16	<i>Avaliação do efeito de concentrações sub-inibitórias do OEHc na expressão de fatores de virulência microbiana de S. aureus.....</i>	41
4.6.16.1	<i>Atividade catalase.....</i>	42
4.6.16.2	<i>Atividade coagulase.....</i>	42
4.6.16.3	<i>Atividade hemolítica.....</i>	43
4.6.16.4	<i>Atividade lipolítica.....</i>	43
4.6.16.5	<i>Atividade DNase.....</i>	43
4.6.17	<i>Determinação da influência de diferentes valores de pH na atividade antimicrobiana do OEHc.....</i>	44
4.6.18	<i>Análises estatísticas.....</i>	44
	RESULTADOS.....	45
5.1	Composição química do OEHc.....	46
5.2	Ensaio microbiológicos.....	48
5.2.1	<i>Potencial antimicrobiano do OEHc.....</i>	48
5.2.2	<i>Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Letal Mínima (CLM) do OEHc e da OXA para cepas de S. aureus.....</i>	49
5.2.3	<i>Curvas de crescimento de cepas de S. aureus.....</i>	52
5.2.4	<i>Efeito do tempo de exposição ao OEHc na viabilidade microbiana de cepas de S. aureus.....</i>	53
5.2.5	<i>Efeito do OEHc sobre cepas de S. aureus nas fases de crescimento exponencial e estacionário.....</i>	55
5.2.6	<i>Efeito do OEHc sobre cepas microbianas na fase exponencial de crescimento na presença de cloranfenicol....</i>	57
5.2.7	<i>Efeito modulador do OEHc na atividade antibacteriana de antibióticos de uso clínico.....</i>	59
5.2.8	<i>Efeito do tempo de exposição das associações OEHc-OXA na viabilidade microbiana.....</i>	63

5.2.9	<i>Mecanismos de ação do OEHc em S. aureus</i>	67
5.2.9.1	<i>Alteração na permeabilidade da membrana celular</i>	67
5.2.9.1.1	Captação de cristal violeta.....	67
5.2.9.1.2	Liberação de ácidos nucleicos.....	69
5.2.9.1.3	Efluxo de íons potássio (K ⁺).....	71
5.2.9.2	<i>Alterações na morfologia bacteriana</i>	72
5.2.9.2.1	Microscopia de força atômica.....	72
5.2.10	<i>Detecção do efeito de concentrações sub-inibitórias do OEHc na expressão de fatores de virulência microbiana do S. aureus</i>	75
5.2.10.1	<i>Atividade catalase</i>	75
5.2.10.2	<i>Atividade coagulase</i>	76
5.2.10.3	<i>Atividade hemolítica</i>	77
5.2.10.4	<i>Atividade lipolítica</i>	79
5.2.10.5	<i>Atividade DNase</i>	80
5.2.11	<i>Determinação da influência de diferentes valores de pH na atividade antimicrobiana do OEHc</i>	81
6	DISCUSSÃO	82
7	CONCLUSÃO	95
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
9	ANEXOS	114

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade no mundo. Estima-se que das espécies descritas no planeta, de 10% a 20% ocorram em território Brasileiro, bem como cerca de 30% das florestas topicais do mundo (LEWINSOHN; PRADO, 2002). Lewinsohn e Prado (2005) estimaram entre 43 e 49 mil espécies de plantas já descritas enquanto Forzza *et al.* (2010) publicaram uma lista com 40.982 espécies da flora do Brasil.

A biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão, estima-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos. Dentro dessa biodiversidade se destacam cerca de 100 mil espécies vegetais, das quais menos de 1% foi estudada sob o ponto de vista medicinal (SIMÕES *et al.*, 2004).

Esta grande reserva natural de compostos orgânicos tem assumido um papel altamente importante na descoberta e no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos com atividade antimicrobiana (COWAN, 1999; ALVES *et al.*, 2000). Dessa forma, o estudo sobre a variada flora brasileira possibilita o desenvolvimento de um mercado promissor e competitivo, promovendo um grande avanço tecnológico na produção de novos medicamentos (VILLAS BÔAS; GADELHA, 2007; AGUIAR *et al.*, 2008).

A partir do século XIX a humanidade se deparou diante do diverso arsenal terapêutico presente nas plantas medicinais, devido à descoberta de substâncias ativas, que em estado natural ou após processos de transformação química, possuem atividade biológica, muitas vezes já confirmada pelo uso popular e comprovada cientificamente (VIRTUOSO *et al.*, 2005).

Durante a evolução, os vegetais foram capazes de desenvolver diversos mecanismos para sua sobrevivência e perpetuação. Alguns destes mecanismos estão envolvidos com a capacidade em resistir a ataques de microrganismos que, potencialmente, prejudicariam, de alguma forma, seu desenvolvimento. Barreiras físicas e químicas foram surgindo a fim de manter a higidez do organismo vegetal (ELOFF; MARTINI; KATERERE, 2004).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para o conhecimento dos potenciais terapêuticos dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (MACIEL *et al.*, 2002). O fato é que muitas plantas, que ainda não possuem sua eficácia terapêutica comprovada, já se

tornaram parte integrante da prática médica popular devido ao conhecimento tradicional, sendo utilizadas por até 90% da população economicamente carente do Nordeste para a solução de problemas de saúde (SILVA *et al.*, 2003).

Através de vários mecanismos de resistência os microrganismos podem resistir total ou parcialmente à ação de um ou mais antimicrobianos. O surgimento e a disseminação de resistência bacteriana podem ocorrer por diferentes vias, e normalmente são determinados pela pressão seletiva e o uso incorreto de antibióticos. Dessa forma, é preocupante o quadro de resistência microbiana aos atuais antibióticos, ressaltando a importância de pesquisas e uso de formas terapêuticas alternativas (OTAÍZA O'R, 2002; MARTINEZ *et al.*, 2009; TEXEIRA, 2009).

Neste contexto, o Jatobá (*Hymenaea courbaril L.*) desponta como uma planta medicinal bastante utilizada na medicina popular do país, sob a forma de preparações como extratos, pastas, suspensões e pós. Os usos medicinais registrados, na literatura científica para o jatobá, são para o tratamento de problemas respiratórios, como expectorante; no estímulo do apetite; no combate de problemas das vias urinárias e hepática; como analgésico; antimicrobiano; antiparasitário e cicatrizante e apresenta ainda ação carminativa, sedativa e adstringente (MARSAIOLI; FILHO; CAMPELLO, 1975; LORENZI; MATOS, 2002).

As folhas e a casca da *H. courbaril* possuem compostos terpênicos e fenólicos que agem como antimicrobianos, antifúngicos e moluscocidas, sendo estas atividades comprovados em vários estudos, o que valida sua longa história de uso medicinal (STUBBLEBINE; LANGENHEIM, 1980; LORENZI; MATOS, 2002).

Segundo Martins *et al.* (2010), o extrato da polpa farinácea do fruto do jatobá demonstrou atividade antibacteriana principalmente para bactérias Gram-positivo. Em outro estudo o extrato da casca do tronco da *H. courbaril L.* a 10% foi capaz de inibir a cepa Gram-negativo *Escherichia coli* enteropatogênica (GONÇALVES; ALVES FILHO; MENEZES, 2011). Pereira *et al.* (2007) constataram a atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído da resina do jatobá sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

A pesquisa de novas substâncias potencialmente ativas e com relevância farmacológica é de grande importância. Esse tipo de investigação pode possibilitar a incorporação de novas substâncias na terapêutica e, quando se trata da pesquisa de atividade antimicrobiana, esse fato é ainda mais relevante devido ao desenvolvimento de resistência microbiana aos fármacos comumente utilizados. Assim, a *H. courbaril L.*,

alvo de estudo do presente trabalho, é usada popularmente em diversas preparações medicinais, onde suas folhas, cascas, resina e a polpa farinácea do fruto possuem compostos que agem como antimicrobianos, antifúngicos e moluscocidas. Dessa forma, essa pesquisa se faz importante para esclarecer cientificamente o uso popular da planta e fornecer dados para o desenvolvimento de um novo fármaco com atividade antimicrobiana.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Uma planta é denominada como medicinal quando possui substâncias com atividade farmacológica, onde, na maioria das vezes, os constituintes com atividades biológicas necessitam do conhecimento sobre sua atuação na terapêutica (ROCHA; ROCHA, 2009). Dentre os componentes com atividade provenientes de plantas de uso medicinal popular e científico, destacam-se os óleos essenciais.

O termo óleo essencial foi definido no século XVI por Paracelso, médico e alquimista suíço, e também podem ser chamados de óleos voláteis, essências, azeites etéreos ou azeites voláteis, caracterizados quimicamente como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, alguns altamente voláteis, capazes de gerar sabores e aromas. Grande parte das propriedades farmacêuticas descritas para plantas medicinais são creditadas aos óleos essenciais (MATOS; MATOS, 1989; TROMBETTA *et al.*, 2005; EDRIS, 2007), que em geral, apresentam baixa estabilidade, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais.

São raramente encontrados em gimnospermas, no entanto, são abundantes em angiospermas dicotiledôneas (SIMÕES *et al.*, 2004). Seu armazenamento e secreção dependem da família de plantas, e para tal fim existem estruturas especializadas, tais como pêlos glandulares (*Lamiaceae*), células parenquimáticas diferenciadas (*Lauraceae*, *Piperaceae*, *Poaceae*), canais oleíferos (*Apiaceae*), bolsas lisígenas e esquizolisígenas (*Pinaceae*, *Rutaceae*) (MARQUES *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais se originam do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química de enorme complexidade, destacando-se principalmente a presença de terpenos e fenilpropanoides. Sua produção está integrada a fisiologia de todo o vegetal, por isso sua composição fitoquímica e quantidade dependem de enzimas específicas que catalisam a produção de compostos voláteis em um órgão, do estágio de desenvolvimento e de estresses abióticos como a salinidade do solo, umidade e temperatura (GONÇALVES *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003)

Estudos realizados comprovam que o meio ambiente no qual a espécie vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo, influenciam diretamente a composição

química dos óleos essenciais. Outros fatores como temperatura, a umidade relativa, a exposição ao sol e o regime de ventos também exercem influência na composição, principalmente em espécies que possuem estruturas de estocagem superficiais (DE MORAIS *et al.*, 2006).

Quanto aos métodos de extração dos óleos essenciais, estes variam conforme sua localização na planta e principalmente com a utilização do mesmo após a extração. Os métodos mais comuns são:

- “Enfleurage”: empregado para extrair óleos essenciais de pétalas de flores. As pétalas são depositadas sobre uma camada de gordura e ficam em contato durante certo período de tempo. Em seguida essas pétalas são substituídas por novas até a saturação total da gordura que é tratada com álcool. Para se obter o óleo essencial, a mistura de gordura e álcool é destilada a baixa temperatura.
- Arraste por vapor d’água: os constituintes do material vegetal que possuem pressão de vapor mais elevada que a água serão arrastados pelo vapor d’água. Em pequena escala, emprega-se o aparelho de Clevenger. O óleo essencial obtido, após separar-se da água, deve ser seco com Na_2SO_4 anidro. Esse método é geralmente utilizado para extrair óleos de plantas frescas.
- Extração com solventes orgânicos: os óleos essenciais são extraídos com solventes apolares.
- Prensagem: é empregado para extração de óleos essenciais de frutos cítricos. Os pericarpos são prensados e a camada que contém o óleo essencial é, então, separada. Posteriormente, o óleo é separado da emulsão formada com água através de decantação, centrifugação ou destilação fracionada.
- Extração por CO_2 super crítico: o CO_2 é primeiramente liquefeito através de compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a $31\text{ }^\circ\text{C}$. Nessa temperatura, o CO_2 atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga à de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO_2 retornar ao estado gasoso, resultando na sua eliminação (SIMÕES *et al.*, 2004).

Devido a sua composição complexa, os óleos essenciais demonstram uma variedade de ações farmacológicas, tornando-os potenciais fontes para o desenvolvimento de novos medicamentos (AMARAL, 2004). Diversos estudos farmacológicos comprovam suas ações terapêuticas, como estimular, deprimir ou causar convulsões através da ação no Sistema Nervoso Central; atividades anestésica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica; e ação em nível de sistema digestivo, respiratório, cardiovascular e dermatológico (GIRÓN *et al.*, 1991; FRANCO; BARROS, 2006; RODRIGUES; GUEDES, 2006; TOSCANO-GONZALEZ, 2006; TEXEIRA, 2009; FRATERNALE; GENOVESE; RICCI, 2013; WEI; WEE, 2013). É importante ressaltar que as substâncias majoritárias encontradas nos óleos essenciais nem sempre são os componentes responsáveis pelas propriedades que estes demonstram (BANDONI; CZEPACK, 2008).

Seu uso como agentes antimicrobianos, oferece um baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana, pois apresentam uma complexa composição e sua atividade antimicrobiana pode estar relacionada a diferentes mecanismos de ação, o que dificulta a adaptações microbianas (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003). Por esse motivo, os óleos essenciais assumem importante papel na prevenção ao desenvolvimento de resistência microbiana, que vem sendo motivo de preocupação constante no tratamento das doenças infecciosas.

Vários trabalhos demonstram o valor dos óleos essenciais como agentes biológicos com atividade antimicrobiana. Guinoiseau *et al.* (2010) testaram óleos essenciais de *Inula graveolens* L. e *Santolina corsica* Jordan et Fourr. sobre *Staphylococcus aureus* e observaram que ambos possuíam atividade bactericida. O óleo de coentro (*Coriandrum sativum* L.) exerceu efeitos sobre a membrana de bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, eliminando a maioria das linhagens testadas (SILVA *et al.*, 2011). O óleo de essencial de *Rosmarinus officinalis* L. inibiu o crescimento de bactérias Gram-positivo (*Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* e *Bacillus subtilis*), bactérias Gram-negativo (*Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*) e fungos (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*) (JIANG *et al.*, 2011).

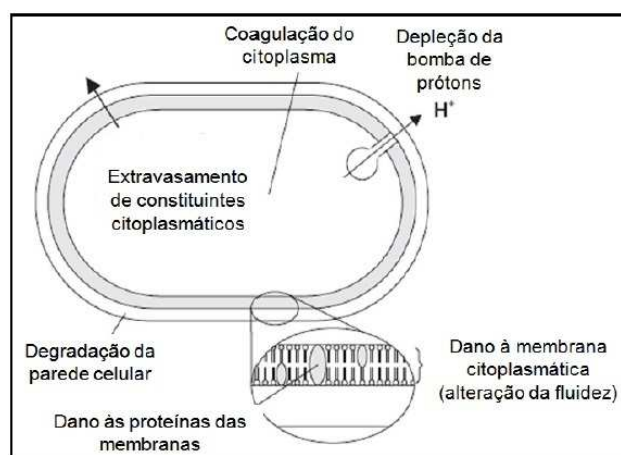
Em outro estudo foi avaliada a atividade antimicrobiana de dez óleos essenciais, sendo constatada a melhor atividade para os óleos essenciais de orégano e manjeriço (LV *et al.*, 2011). Os óleos voláteis de *Satureja montana* e *Citrus limonia*

apresentaram ação antibacteriana *in vitro* sobre cepas de *S. aureus* e *E. coli*, sugerindo o uso potencial destes óleos como uma alternativa aos antimicrobianos e conservantes sintéticos (MILLEZI *et al.*, 2013).

2.2 MECANISMO DE AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Os alvos e mecanismos de ação dos óleos essenciais sobre uma célula bacteriana estão exemplificados na Figura 1. Os mecanismos estão em sua maioria associados a membrana celular, como o transporte de elétrons e gradiente de íons, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações dependentes de enzimas (DORMAN; DEANS, 2000).

Figura 1 – Mecanismos propostos para a ação antimicrobiana dos óleos essenciais na célula bacteriana.



(Fonte: ARAUJO, 2010)

Os mecanismos de ação dos óleos essenciais ainda não são bem compreendidos. Considerando o grande número de constituintes químicos presentes em sua composição, é natural que sua ação antimicrobiana não seja mediada por única via específica, podendo haver a participação de mais de um componente de diferentes formas (BURT, 2004).

O principal mecanismo de ação bactericida descrito para o fenilpropeno eugenol pode ser atribuído a sua alta penetrabilidade na membrana citoplasmática, promovendo seu rompimento e aumentando sua permeabilidade não específica, desta forma gerando um extravasamento do conteúdo celular e posterior morte da bactéria (DEVI *et al.*, 2010). Segundo Carson *et al.* (1995), o mecanismo de ação do óleo

essencial da *Melaleuca alternifolia* consiste no comprometimento da integridade da membrana celular, com consequente perda de material intracelular, incapacidade de manter a homeostase e inibição da respiração. Cox *et al.* (2000) observaram a eficácia do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* e confirmaram que a atividade antimicrobiana se deve à sua capacidade de romper a barreira de permeabilidade da membrana dos microrganismos, inibindo a respiração.

Os resultados de Hammer, Carson e Riley (1998) corroboram com os dos demais autores, ao afirmarem que os óleos essenciais apresentam propriedade antimicrobiana sobre a fungos e bactérias, sendo que normalmente as bactérias Gram positivo são mais susceptíveis que as Gram negativo e que baixos valores de concentração inibitória mínima (CIM) inibem o crescimento desses organismos.

Desta forma a descoberta das centenas de componentes dos óleos essenciais nas últimas décadas, a complexidade e a enorme diversidade que existe neste grupo de produtos naturais, levou a compreensão parcial das suas atividades biológicas. Os óleos essenciais consistem normalmente de compostos terpênicos como os monoterpenos (C10), que estão presentes em cerca de 90% dos óleos voláteis, e sesquiterpenos (C15), fenilpropenos e outros componentes voláteis. Já os diterpenos (C20) são encontrados apenas em óleos essenciais extraídos com solventes orgânicos devido à alta temperatura de volatilização desses compostos (SIMÕES *et al.*, 2004; FRANZ, 2010)

Os terpenos são substâncias presentes tanto em plantas como em animais, descritos como possuidores de uma diversidade considerável de propriedades biológicas incluindo a ação antimicrobiana, fungicida, antiviral, anti-hiperglicêmica, anti-inflamatória e atividade antiparasitária (PADUCH *et al.*, 2007). Os monoterpenos, são importantes constituintes dos óleos essenciais, são altamente voláteis, sendo arrastados pelo vapor de água livres de outros componentes e utilizados por suas características organolépticas marcantes. Biogeneticamente, terpenóides e fenilpropanóides originam-se de metabolismos precursores diferentes e são gerados por rotas biossintéticas completamente distintas (SANGWAN *et al.*, 2001).

2.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA

As primeiras descrições sobre o uso de antimicrobianos datam de 3.000 anos atrás. Médicos chineses utilizavam bolores no tratamento de inflamações e

infecções, enquanto os sumérios recomendavam emplastos a base de bebidas e ervas (TAVARES, 2001).

A descoberta da penicilina por Alexander Fleming e o seu uso a partir da década de 40 caracterizam um marco no controle das doenças infecciosas de origem bacteriana, principalmente num mundo acometido pela Segunda Guerra Mundial, salvando milhares de combatentes. Durante muitos anos foi usada como antimicrobiano de primeira escolha para infecções por bactérias Gram-positivo. Entretanto, o uso indiscriminado provocou a partir da década de 70, um processo de aceleração no aparecimento e seleção de cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos, especialmente em ambientes hospitalares (LINARES-RODRIGUEZ; MARTINEZ-MENENDEZ, 2005; WAGENLEHNER; WEIDNER; NABER, 2005).

Atualmente o mau e excessivo uso dos antibióticos, o uso de doses inferiores a que é sugerida em manuais terapêuticos, assim como condições de higiene precárias, o aumento de pacientes imuno comprometidos e a lentidão para o diagnóstico das infecções bacterianas têm favorecido o aumento da resistência microbiana não só nos hospitais, como também na comunidade, podendo atingir inclusive indivíduos saudáveis (FERREIRA; PAES; LICHTENSTEIN, 2008).

A resistência microbiana pode ser definida como a capacidade de uma cepa microbiana crescer, *in vitro*, na presença das concentrações que a droga atinge no sangue, podendo ser de dois tipos: natural ou intrínseca e a adquirida. A resistência natural ou intrínseca faz parte das características genéticas primitivas dos microrganismos e é observada regularmente em uma determinada espécie bacteriana, resultado de genes cromossômicos que codificam a existência, na célula, de estruturas ou mecanismos que impedem o antibiótico de atuar em seu receptor específico ou que codificam a falta do sítio de ação do fármaco ou que determinam a existência de receptores inadequados para a ligação com uma substância específica. A resistência adquirida é aquela que surge em uma bactéria primitivamente sensível ao antimicrobiano e que devido a mutações ou por meio de transferências do material genético, pelos mecanismos de transdução, transformação e conjugação adquire resistência. Geralmente, envolvem genes situados em plasmídeos e transposons (KONEMAN *et al.*, 2001; TAVARES, 2001; TORTORA; FUNKE; CASE, 2003).

A resistência das diversas espécies de microrganismos aos antimicrobianos é extremamente variável entre os países e suas regiões e origem hospitalar ou

comunitária das cepas, no entanto algumas espécies apresentam resistência amplamente difundida em todo o mundo, como é o caso do *S. aureus* (CARSON *et al.*, 1995).

Dentre os diferentes mecanismos de resistência apresentado pelos microrganismos, os mais importantes para bactérias Gram-positivo podem ser classificados (WALSH, 2000; HANCOCK, 2005) em três grupos distintos:

- *Destruição do antibiótico* - enzimas catalisam a degradação do antibiótico ou modificam grupos funcionais farmacologicamente importantes presentes em sua estrutura, como no caso das penicilinas;
- *Efluxo contínuo do antibiótico* – genes mutantes superexpressam proteínas transportadoras de membrana responsáveis pela entrada e saída de substâncias no meio citoplasmático, fazendo com que a retirada do antibiótico para o meio extracelular seja mais rápida que a sua difusão pela membrana bacteriana, mantendo uma concentração insuficiente para atuar como bloqueador de funções celulares, como no caso da resistência a tetraciclina;
- *Reprogramação e modificação da estrutura-alvo* – os alvos macromoleculares do antibiótico, como ribossomos, proteínas e constituintes da parede celular, são estruturalmente modificados a partir de genes que os expressam, afetando o reconhecimento do fármaco pelo alvo e diminuindo sua potência, como no caso da vancomicina.

Em relação as bactérias Gram-negativo, a produção de beta-lactamases é o mecanismo mais importante e prevalente mecanismo de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos (SADER *et al.*, 1998). Em bactérias do tipo Gram-negativo, existe uma membrana externa, que engloba a membrana e a parede celular, composta por uma bicamada lipossacarídeo-fosfolipídica assimétrica que promove uma barreira física efetiva para a entrada de moléculas no interior da célula bacteriana (CAUMO *et al.*, 2010).

Através de vários mecanismos de resistência o microrganismo pode resistir total ou parcialmente à ação de um ou mais antimicrobianos pertencentes a mesma ou a diferentes classes terapêuticas (OTAÍZA O'R, 2002). Nos Estados Unidos, o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) estimou que anualmente cerca de 2 milhões de indivíduos adquirem uma infecção enquanto internados, resultando em 90000 mortes (KLEVENS *et al.*, 2007)

O desenvolvimento de resistência por um número crescente de patógenos a um número também cada vez maior de antibióticos é um problema de saúde pública que vem aumentando ao longo de várias décadas. Este fato alcançou uma escala e distribuição tamanhas que levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a reconhecer tal fato como uma crise de saúde pública global (OMS, 2012).

Dessa forma é preocupante o atual quadro de falta de sensibilidade microbiana aos antibióticos disponíveis, por isso surge a importância de formas terapêuticas alternativas eficientes (TEXEIRA, 2009). Esse problema torna-se mais grave ainda devido às dificuldades para a elaboração de novos antimicrobianos, já que são necessários muitos anos e elevados custos para que um novo medicamento esteja a disposição para o uso clínico.

2.4 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Staphylococcus aureus se apresenta morfológicamente como coco Gram-positivo (família *Microcaceae*), com cerca de 0,5 à 1µm de diâmetro. Crescem bem em meio de ágar-sangue, de 18 à 24 horas, formando colônias de 1 a 3 mm de diâmetro, circulares, lisas, e de consistência butirosa (amanteigada) (MARTINS JÚNIOR *et al.*, 2009).

Todas as cepas de *S. aureus* são catalase-positiva. São encontradas no solo, na água e em produtos derivados de animais, como queijo, ovos, carne e leite. Contudo, estão presentes na pele, glândulas epiteliais e regiões membranosas de mamíferos e pássaros, sendo também inúmeras vezes isoladas na boca, nas glândulas mamárias e nos tratos gastrointestinais, urinário e respiratório alto. São resistentes ao meio ambiente e podem após meses, ser isoladas em secreções orgânicas ressecadas. São mortas muito rapidamente pela exposição a desinfetantes como clorexidina e fenóis sintéticos, e pelo calor à 60°C por 30 minutos (MARTINS JÚNIOR *et al.*, 2009).

Produzem uma serie de enzimas ou toxinas extracelulares: as hemolisinas causam hemólise, que pode ser observado pela formação de um halo claro ao redor de colônias crescidas em ágar sangue; a coagulase, estreitamente ligada a patogenicidade das cepas de *S. aureus*, é uma enzima capaz de coagular a fibrina, ocasionando a formação de uma rede de coágulos ao redor das bactérias, tornando difícil o contato entre as células do sistema imunológico e as células bacterianas, impossibilitando a fagocitose por macrófagos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

A espécie *S. aureus* é capaz de causar desde pequenos furúnculos até sepsis grave, sendo a principal bactéria causadora de doenças comunitárias e infecções hospitalares (CRUVINEL; SILVEIRA; SOARES, 2011). As infecções causadas por estafilococos podem ser classificadas de acordo com dois diferentes mecanismos: 1) processo infeccioso agudo; e 2) doenças causadas por toxinas. As infecções agudas podem ser apresentadas na forma de pústulas, furúnculos, impetigos ou processos mais extensos e graves, como infecção cirúrgica, osteomielite, pneumonia, endocardite, meningite, entre outros, ou disseminadas, como bacteremia e septicemia. Doenças causadas por toxinas de estafilococos apresentam, um largo espectro de manifestações clínicas, dentre as quais: celulite, síndrome da pele escaldada, síndrome do choque tóxico e intoxicação alimentar (LUZ, 2008).

A resistência de cepas de *S. aureus* à penicilina foi detectada já após o início de seu uso na década de 40, sendo mediada pela obtenção de genes que codificavam enzimas, inicialmente denominadas penicilinasas, e agora chamadas β -lactamases. Na década de 1950, a produção de β -lactamases pelos *S. aureus* passou a prevalecer nas cepas isoladas de pacientes hospitalizados. Em 1960, a meticilina foi lançada no mercado como alternativa terapêutica para cepas produtoras de β -lactamases, uma vez que esse antibiótico não sofre ação dessa enzima. Contudo, em 1961, cepas resistentes à meticilina (MRSA) foram isoladas (BRADFORD, 2001). *S. aureus* tornou-se então a espécie bacteriana de maior importância entre os estafilococos, por sua importância e prevalência como agente etiológico de infecções hospitalares, e especificamente em função das cepas resistentes à penicilina (FARIA, 2008).

Dessa forma, graves problemas relacionados à resistência microbiana podem surgir em um futuro não muito distante, ressaltando a importância da realização de pesquisas de novos antimicrobianos ou terapias alternativas. Nesse contexto, os produtos naturais compõem uma importante fonte de pesquisa para novas moléculas com potencial antimicrobiano ainda não explorado.

2.5 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais são a mais antiga fonte de compostos farmacologicamente ativos e praticamente a única fonte de compostos medicinais por séculos (SOUSA *et al.*, 2007). Os mais antigos textos sobre o uso de produtos naturais encontram-se presentes nos manuscritos hindus Ayurvedas (2.000 a.C.), que falam

sobre o uso de óleos, perfumes e incensos, a base de plantas e outros produtos naturais, no culto aos deuses (SANTOS, 2000). Na mesopotâmia e no antigo Egito o uso de extratos e óleos a base de plantas medicinais iam além do culto devocional a deuses, a utilização de elementos como pastas, pós e óleos a base de plantas eram utilizados com certos aspectos cosméticos (LOMAZZI, 2006).

No século XII, durante o período das Cruzadas, o conhecimento sobre espécies vegetais, especiarias e perfumes difundiu-se do Oriente para a Europa, mediado pelos árabes, conhecedores do uso terapêutico de ervas e plantas medicinais, além de serem os primeiros a aprimorar a destilação de óleos essenciais a partir de plantas (MARQUES, 2007).

Nas Américas, o primeiro compendio sobre uso de plantas medicinais foi o *Badanius*, asteca, do século XVI, escrito em nahuatl (TEIXEIRA, 1999). No Brasil, o primeiro levantamento das plantas medicinais mais populares, foi elaborado pela expedição trazida por Maurício de Nassau ao nordeste do país, no período da ocupação holandesa (1630-1654). Nesta expedição o médico Guilherme Piso descreveu no livro “*Historia naturalis brasiliae*”, as principais plantas usadas pelos índios (RODRIGUES, 1949).

No período das missões religiosas, os jesuítas desempenharam um papel importante na difusão do conhecimento, dentre elas se destacou as missões da Companhia de Jesus (1540). Os missionários foram exímios observadores da fauna e da flora, catalogando e identificando várias espécies e seus usos medicinais, durante o período de contato com os mais diversos povos indígenas (CALAINHO, 2005).

Em 1803 o isolamento da morfina da *Papaver somniferum* pelo farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Sertürner, marcou o início do processo de extração de princípios ativos a partir de plantas. Com isso, outras substâncias foram isoladas, como por exemplo, a quinina e a quinidina a partir da *Cinchona* spp, em 1819, e a atropina da *Atropa belladonna*, em 1831 (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1996; SCHULZ, HÄNSEL; TYLER, 2001).

Entretanto, a produção de fármacos por síntese química, o crescimento do poder das indústrias farmacêuticas e a carência de comprovações científicas dos efeitos das substâncias de origem vegetal somado às dificuldades na padronização do controle químico, físico-químico, farmacológico e toxicológico dos extratos vegetais até então utilizados, impulsionaram a substituição destes por fármacos alopáticos e sintéticos (RATES, 2001).

Contudo, com o início dos anos 80, os avanços técnicos e o desenvolvimento de métodos de isolamento de substâncias ativas, permitiram uma maior rapidez na identificação de substâncias em amostras complexas, como os extratos e óleos vegetais, ressurgindo assim o interesse pela pesquisa destas substâncias como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). No final da década de 90, observou-se um aumento na utilização de fitofármacos pela população brasileira. Alguns fatores foram utilizados para explicar tal crescimento, como o avanços na área científica que permitiu a elaboração de fitoterápicos seguros e eficazes, como também uma tendência da população por terapias naturais que possuíssem um menor número de efeitos adversos (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

Portanto, o conhecimento das propriedades farmacológicas das plantas medicinais é resultado do grande volume da biodiversidade brasileira, que por transferência entre diferentes gerações foi-se constituindo como um extraordinário arsenal terapêutico (ELISABETSKY; SHANLEY, 1994).

É sabido que a atividade biológica das substâncias de origem vegetal pode se manifestar por meio de propriedades herbicidas, inseticidas, microbicidas ou farmacológicas, de um modo geral. Esse tipo de atividade biológica está relacionado com a capacidade de um ser vivo liberar substâncias químicas, denominadas aleloquímicos, que atuam de forma favorável ou desfavorável sobre outro ser vivo (HERNÁNDEZ-TERRONES *et al.*, 2007).

Considerando a diversidade de plantas existentes, a importância reconhecida de algumas no tratamento de doenças e os relatos do aumento da resistência aos antimicrobianos, principalmente de origem hospitalar, fica notória a necessidade da busca de novas substâncias para serem utilizadas no combate a esses microrganismos (OKEKE; LAMIKANRA; EDELMAN, 1999).

Assim as plantas medicinais exercem um papel importante na medicina atual, pois, podem fornecer princípios ativos complexos, os quais seriam obtidos de maneira muito laboriosa via síntese química. Também podem fornecer compostos químicos que após modificações, podem ter aumentada sua eficácia e diminuição da sua toxicidade. Os produtos naturais podem também ser utilizados como modelos para obtenção de fármacos com atividades terapêuticas análogas a dos compostos originais. Entre os medicamentos obtidos a partir de plantas podemos citar os alcalóides da *Papaver somniferum*, os glicosídeos cardiotônicos da *Digitalis* spp., o ácido

acetilsalicílico (Aspirina®), a quinina (antimalárico), Taxol®, a vincristina e a vimblastina (quimioterápicos) e a digoxina (cardiotônico). (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1996; PROBST, 2012).

2.6 O GÊNERO *HYMENAEA* E A ESPÉCIE *H. COURBARIL* L.

O gênero *Hymenaea* possui 14 espécies, 13 das quais se encontram distribuídas pela América Central, América do Sul e oeste das Índias e uma das espécies é de ocorrência no leste da África (LEE; LANGENHEIM, 1975). No Brasil, a *H. courbaril* L. possui uma distribuição ampla, ocorrendo desde a floresta amazônica até a floresta estacional semidecidual no sudeste do país, sob a forma de diversas variedades, sendo *H. courbaril* var. *altíssima*, *H. courbaril* var. *courbaril*., *H. courbaril* var. *longifolia*, *H. courbaril* var. *stilbocarpa*, *H. courbaril* var. *subsessilis*, *H. courbaril* var. *villosa* as mais comuns (LEE; LANGENHEIM, 1975; CASTELLEN, 2005).

A espécie *H. courbaril* está presente desde o México até a América do Sul e é encontrada de forma abundante na Amazônia brasileira, com distribuição até São Paulo (Figura 2). Aparece nas matas de terra firme, sobre solos argilosos e em certas várzeas altas, sendo rara no campo e nas capoeiras (LEE; LANGENHEIM, 1975; CAMPOS; UCHIDA, 2002).

Figura 2 – *Hymenaea courbaril*.



Fonte: http://www.vivaterra.org.br/jatoba_1.1.jpg, acessada em 22/01/2014.

É uma árvore de grande porte, podendo ultrapassar os 30 metros de altura, possuindo folhas compostas, inflorescência em panículas terminais e frutos em forma de vagens indeiscentes, duros e pardo-escuros, apresentando de duas a seis sementes envoltas por uma farinha comestível de grande valor nutritivo (Figura 3), consumida como alimento pelo homem e por animais, principalmente roedores (PRANCE; DA SILVA, 1975; CARVALHO FILHO *et al.*, 2003; GORCHOV; PALMEIRIM; ASCORRA, 2004).

Figura 3 – Frutos da *Hymenaea courbaril* L.



Fonte: <http://arvoresdesaopaulo.files.wordpress.com/2009/01/sementes-de-jatoba-hymenaea-courbaril-var-altissima-foto-de-ricardo-cardim-amigos-das-arvores-de-sp.jpg?w=448&h=303>, acessada em 28/12/2013.

H. courbaril, possui um amplo histórico de utilização pelos indígenas da floresta tropical e é popularmente conhecido como jatobá, burandã, farinheira, jataí, jutaí, jataíba, jataiba-peba, jataíba-uva, jataúba, juteí, jataí-amarelo, jataí-vermelho, jatal, jati, jassaí, jatobá de anta, jatobá de porco, jatabá trapuca, jetaí, jetaíba, jupiti, jutaí-açu, árvore-copal-do-Brasil, abotii-timbaí e jataici (LORENZI, 2002; LORENZI; MATOS, 2002; PINTO; MADURO, 2003).

O Jatobá é uma planta medicinal, tradicionalmente utilizada na Amazônia brasileira (GUARIM NETO, 1997). Sua resina é conhecida como “jutaica” pelos índios ou “copal da América”, possuindo tanto utilização medicinal, como sendo utilizada na forma de incenso em rituais (CASTELLEN, 2005). Além do uso medicinal, o jatobá pode ser utilizado como fonte de alimento, madeira, sombra, adubo e lenha. Na medicina tradicional é utilizada da mesma forma como no passado (LORENZI; MATOS, 2002).

A espécie *H. courbaril* vem sendo foco de várias pesquisas, grande parte delas associadas a estudos agrônômicos e fitoquímicos, pois além de sua madeira de qualidade, seus frutos apresentam substâncias com propriedades biológicas, como os taninos (NOGUEIRA *et al.*, 2001). Ishibashi *et al.* (1999) isolaram de uma espécie do mesmo gênero (*H. parvifolia*), um flavonoide glicosilado (astilbina), sendo o mesmo utilizado como de protótipo para um potente analgésico, demonstrando assim a variedade de atividade farmacológicas que este gênero apresenta.

Do jatobá podem ser isolados óleos essenciais de seus frutos, folhas e resina; taninos, substâncias amargas, matérias resinosas e pécticas, amido e açúcares podem ser obtidos a partir da casca do tronco, resina e dos frutos (PANIZZA, 1997; PINTO, SANTIAGO; LAMEIRA, 2000).

Estudos *in vitro* para a indústria de alimentos demonstraram que a fibra do fruto do Jatobá pode efetivamente neutralizar radicais livres e outras substâncias reativas, apresentando assim uma atividade antioxidante que só poderia ser demonstrada de forma limitada em outras fontes de fibra alimentar (HABER, 2003; PEDAUYÉ, 2007).

Assim as folhas, a casca, a resina e os frutos possuem compostos que agem como antimicrobianos, antifúngicos, antioxidantes, anti-inflamatórios, antiplasmódicos, larvicidas e moluscocidas, sendo estas atividades comprovados em vários estudos, o que valida sua longa história de uso medicinal (STUBBLEBINE E LANGENHEIM, 1980; BRAGA *et al.*, 2000; KÖHLER *et al.*, 2002; LORENZI; MATOS, 2002; FERNANDES; SANTOS; PIMENTA, 2007; JAYAPRAKASAM *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2007; IMAI *et al.*, 2008; SUZUKI *et al.*, 2008; AGUIAR *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2010; BASTOS *et al.*, 2011; DO ROSARIO *et al.*, 2011; GONÇALVES; ALVES FILHO; MENEZES, 2011; CECILIO *et al.*, 2012).

Também são relatados estudos sobre o uso de galactomananas presentes em suas sementes na fabricação de sorvetes, já que essa substância apresenta um efeito espessante similar ao da goma guar (TAMAYO; GONZÁLEZ; GARCÉS, 2008). Componentes presentes na farinha contida nos frutos do Jatobá possuem propriedades terapêuticas e profiláticas, sendo algumas destas de grande valor para a indústria de alimentos, principalmente devido a sua atividade antioxidante (TAMAYO; GONZÁLEZ; GARCÉS, 2011).

Compostos vegetais farmacologicamente ativos extraídos de cascas, folhas, raízes e frutos veem sendo estudados há décadas para a elaboração de novas

moléculas para os mais diversos fins terapêuticos. Muitas vezes os estudos de atividade biológica são guiados pela tradicional medicina popular e muitos deles contribuem para a constatação científica das propriedades biológicas exploradas no uso de diversos óleos essenciais e extratos vegetais. Portanto, a busca por matérias-primas vegetais é continua em estudos de pesquisas farmacológicas desses produtos, de modo a servir de suporte ao seu possível uso terapêutico.

Devido a carência de estudos, o presente trabalho se propôs a investigar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *H. courbaril* L., seu mecanismo de ação, seu efeito modulador na atividade de antibióticos de uso clínico e sua ação sobre a expressão de fatores de virulência microbiana. E dessa forma, esclarecer cientificamente seu uso popular e fornecer subsídios para o desenvolvimento de um novo fármaco.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e o mecanismo de ação do óleo essencial da casca dos frutos de *Hymenaea courbaril* L.(OEHc).

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial antimicrobiano do OEHc, *in vitro*, sobre cepas microbianas de referência;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Letal Mínima (CLM) do OEHc, *in vitro*, sobre cepas microbianas de referência;
- Avaliar o efeito do tempo de exposição ao OEHc na viabilidade microbiana;
- Avaliar o efeito modulador do OEHc na atividade de antibióticos de uso clínico;
- Conhecer o mecanismo de ação do OEHc pelos ensaios da captação do cristal violeta, liberação de ácidos nucleicos, efluxo de íons potássio e detecção de alterações na morfologia bacteriana;
- Determinar o efeito de concentrações sub-inibitórias do OEHc na expressão de fatores de virulência microbiana de *S. aureus*;
- Determinar a influência de diferentes valores de pH na atividade antimicrobiana do OEHc.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

De acordo com a Resolução 196/96 da CNS-MS, o presente projeto não necessita de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (Anexo 1).

4.2 Obtenção do material botânico e identificação da espécie

O material botânico, frutos maduros de *H. courbaril L.*, conhecida popularmente como jatobá, foi obtido na Chapada da Ibiapaba, município de Ubajara (CE) (-3° 50' 24.777", -40° 54' 35.3406"). A identificação da espécie foi realizada no Departamento de Biologia Universidade Federal do Ceará, e a exsicata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra (UFC), com número 53048.

4.3 Extração do óleo essencial dos frutos de *H. courbaril L.* (OEHc)

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação (arraste de vapor), a partir das cascas secas e trituradas dos frutos maduros de *H. courbaril L.* As amostras foram colocadas em frasco de Mariotte ligado a uma fonte de vapor, sendo o mesmo acoplado a um extrator tipo Clevenger e um condensador (CRAVEIRO, 1981). Após duas horas de extração, foram separadas as fases óleo/água no doseador. A fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro e filtrada.

4.4 Avaliação do rendimento médio do OEHc

O rendimento do OEHc extraído foi medido por peso de casca secas, utilizando a seguinte fórmula: Porcentagem de rendimento: volume de óleo (mL) / (Peso das cascas (g) – Umidade (g)) x 100 (SOCIETY; FIRESTONE, 1989).

O OEHC obtido a partir da técnica de hidrodestilação (arraste de vapor) apresentou baixa viscosidade, cor verde claro, um forte odor amadeirado e seu rendimento médio foi de 0,052%.

4.5 Análise dos constituintes do OEHC

O estudo da composição química do óleo essencial das cascas dos frutos maduros foi realizado no Parque Tecnológico da Universidade Federal do Ceará por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM), em aparelho do tipo Shimadzu modelo GC/MS QP 5050^a, sob as seguintes condições: coluna capilar DB-%-dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,30 mm), fluxo de 1 mL/min de Hélio como gás de arraste, e gradiente de temperatura, de 10°C/min (40-180°C) e de 40°C/min (180-300°C), com a temperatura do injetor de 250°C; modo de injeção 0,1 µL (solução 10%), split 1:20, 500 ng na coluna (ADAMS, 2007). Os espectros de massa foram produzidos por impacto eletrônico (70 eV).

Os componentes do OEHC foram identificados através da comparação de seus espectros de massa com espectros existentes na literatura, com espectros do bancos de dados (NIS21 e NIS107) do equipamento e, também, pela comparação dos índices de retenção com aqueles da literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção de Kovats (IK) foram determinados utilizando uma série homóloga de n-alcenos injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras, utilizando a equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL; DEC KRATZ, 1963).

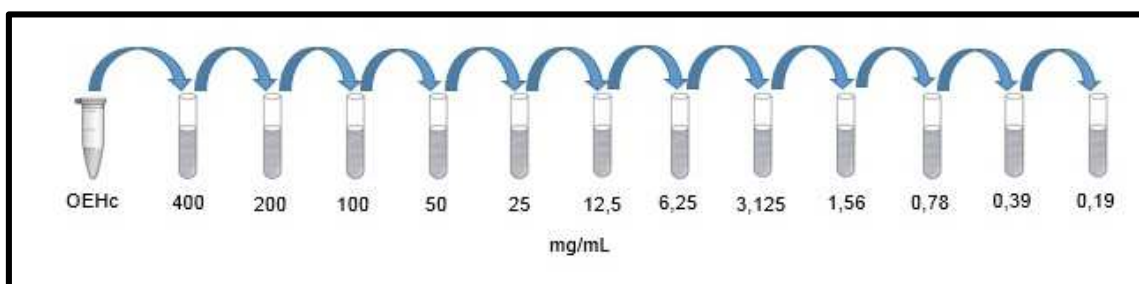
4.6 Ensaios microbiológicos

Todos os ensaios microbiológicos foram realizados, em triplicata, no LabMicro do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (UFC).

4.6.1 Preparação das diluições do OEHC

Foram preparadas diluições seriadas do OEHC utilizando como solvente o Tween 80 a 1%. As concentrações de trabalho do OEHC foram (400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,39, 0,19 mg/mL) (Figura 4).

Figura 4: Fluxograma de preparo das diluições de OEHc.



Fonte: O autor (2013).

4.6.2 Cepas microbianas

Foram utilizadas oito cepas microbianas de referência provenientes da American Type Culture Collection (ATCC) e uma cepa proveniente da Coleção de Culturas de Origem Hospitalar – Fiocruz (CCBH): *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458 (Oxacilina-sensíveis), *S. aureus* ATCC 33591 e *S. aureus* CCBH 5330 (Oxacilina-resistentes), *S. epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella cholerae-suis* subespécie *cholerae-suis* ATCC 10708 e *Candida albicans* ATCC 10231.

4.6.3 Manutenção das cepas

Todas as cepas utilizadas fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LabMicro) e foram mantidas em ágar estoque sob refrigeração, de forma a conservarem inalteradas suas características bioquímicas e perfil de sensibilidade a antimicrobianos. Periodicamente foram realizados repiques para meios de cultura estéreis e a pureza de cada cultura foi confirmada por microscopia, provas bioquímicas e antibiogramas.

4.6.4 Antimicrobianos, meios de cultura e reagentes

Os antimicrobianos foram obtidas da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Os meios de cultura e reagentes foram obtidos da Merck e da Laborclin LTDA, respectivamente.

4.6.5 Determinação do potencial antimicrobiano do OEHc

A determinação do potencial antimicrobiano do OEHc foi realizada segundo o método de difusão em ágar (CLSI, 2003a), modificado (Figura 5). Culturas microbianas puras mantidas em ágar estoque sob refrigeração, foram repicadas para caldo infusão de cérebro e coração (caldo BHI), e após ativação *overnight* foram incubadas a 35°C até atingirem fase exponencial de crescimento (2h). Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em solução salina 0,85% estéril, de modo a se obter uma turbidez compatível com a do tubo 0,5 da escala de McFarland, o que resulta em uma suspensão microbiana contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

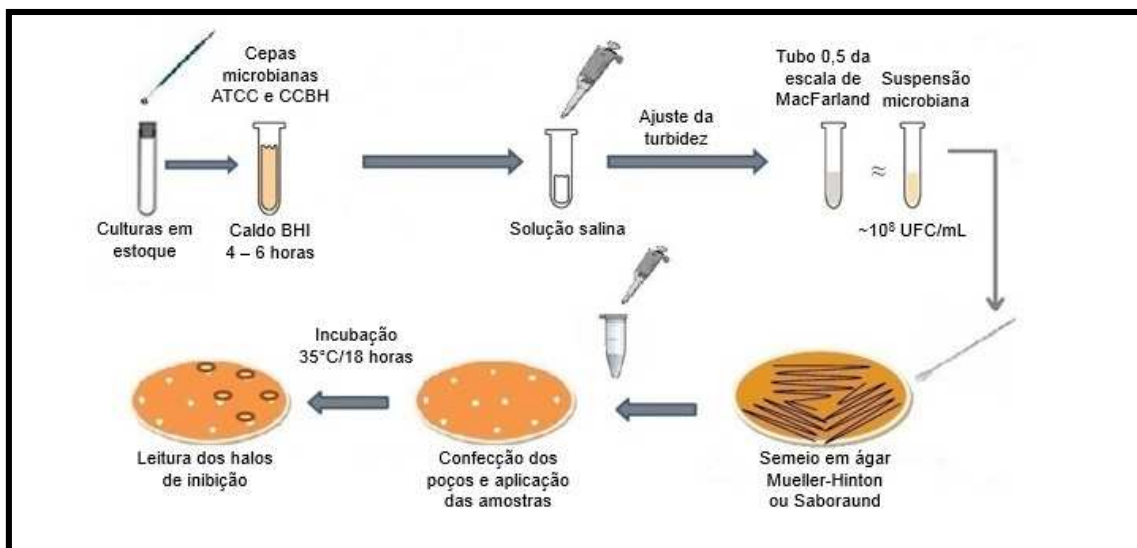


Figura 5: Fluxograma de determinação do potencial antimicrobiano do OEHc.

Fonte: Adaptado de TEIXEIRA (2009).

Com auxílio de *swabs* estéreis, essas suspensões foram semeadas na superfície do ágar Mueller-Hinton (bactérias) e ágar Sabouraud dextrose (levedura), em três direções, para que fosse obtido um crescimento confluyente e homogêneo. Após 5

minutos, foram confeccionados poços de 6 mm de diâmetro externo no ágar, utilizando-se para isso um perfurador estéril. Nesses poços foram aplicados volumes de 25 µL de diferentes concentrações do OEHC (400; 200; 100; 50; 25; 12,5 mg/mL). Como controles foram utilizados amicacina (bactérias) ou nistatina (levedura) (inibição do crescimento microbiano) e solução aquosa de Tween 80 a 1% (não inibição do crescimento microbiano). Após 18h de incubação a 35°C, foi realizada a medida dos halos de inibição de crescimento, como auxílio de um paquímetro. Neste ensaio foram utilizadas todas as cepas microbianas, pois este tipo de experimento é utilizado como *screening* de atividade antimicrobiana.

4.6.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OEHC e da Oxacilina (OXA)

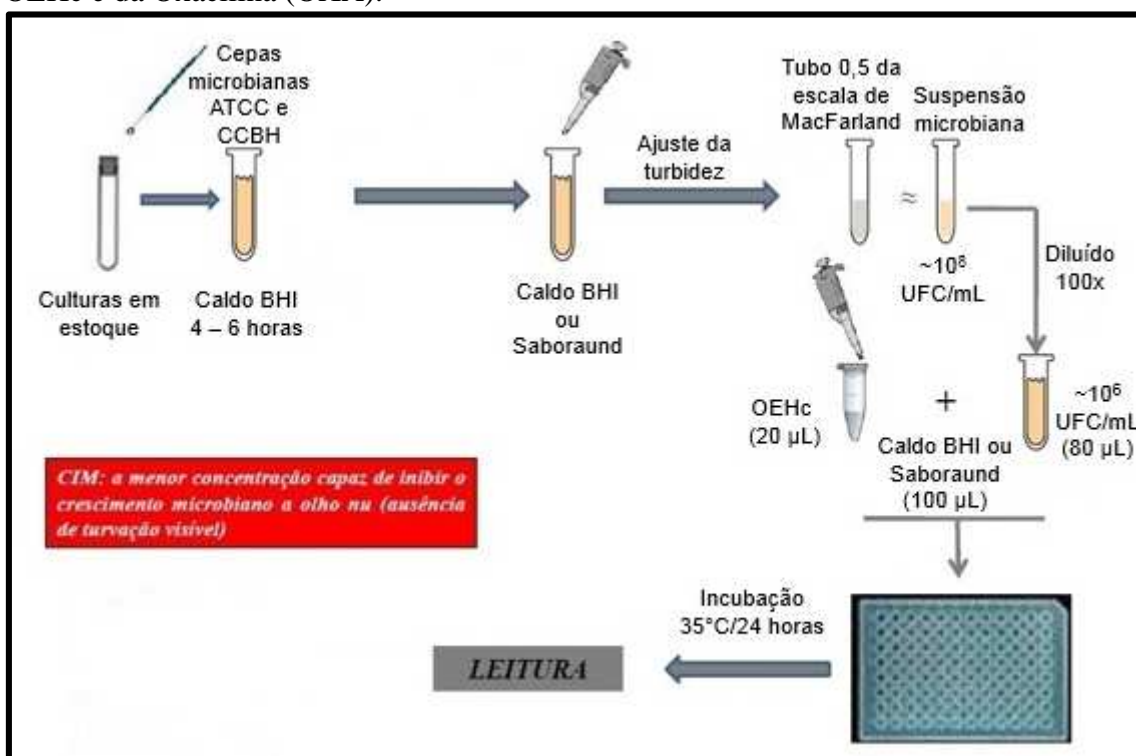
A determinação da CIM foi realizada pelo método de microdiluição em caldo de cultura de acordo com a Norma M7-A6, Vol. 23 N° 2 (CLSI, 2003b), em microplacas estéreis com 96 poços. Esse método envolve o uso de pequenos volumes de reagentes e a avaliação de grande número de cepas microbianas, fornecendo informações quantitativas indisponíveis quando utilizado o método de difusão em ágar.

As suspensões microbianas das cepas *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458 foram obtidas com descrito no item 4.6.5, e diluídas 100 vezes para obter um inóculo com cerca de 10^6 UFC/mL. Uma alíquota dessa suspensão foi diluída 100 vezes para a obtenção de outra contendo 10^4 UFC/mL, que foi utilizada posteriormente na determinação do tamanho do inóculo microbiano inicial. Em cada poço da placa, foram adicionados 100 µL de caldo BHI, 20 µL das diferentes concentrações de OEHC ou da OXA e 80 µL de suspensão microbiana (10^6 UFC/mL). As concentrações finais de OEHC e de OXA utilizadas variaram de 40 a 0,019 mg/mL e de 100 a 0,048 µg/mL, respectivamente. Neste ensaio foram utilizadas as cepas susceptíveis a ação do OEHC no ensaio de difusão em ágar.

Aos poços-controle foram adicionados: meio de cultura, agente antimicrobiano e inóculo do microrganismo (inibição do crescimento microbiano), ou meio de cultura, Tween 80 a 1% e inóculo do microrganismo (não-inibição do crescimento microbiano).

As placas foram incubadas a 35°C/24h, e após inspeção visual da ocorrência de turvação, foram submetidas à leitura de absorbância a 620nm, em leitor de Elisa. A CIM foi considerada a menor concentração do OEHc ou da OXA capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, constata pela ausência de turvação visível (Figura 6).

Figura 6: Fluxograma da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OEHc e da Oxacilina (OXA).



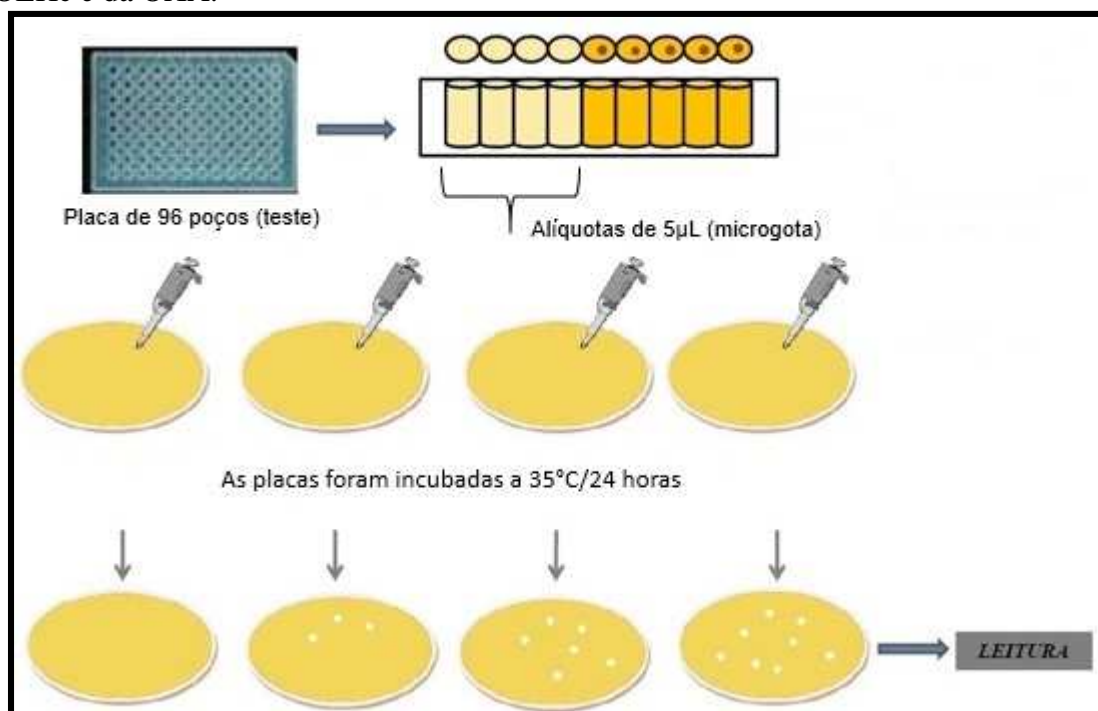
Fonte: Adaptado de TEIXEIRA (2009).

4.6.7 Determinação da Concentração Letal Mínima (CLM) do OEHc e da OXA

Em condições assépticas, inóculos de 5 µL obtidos a partir dos poços das placas de microdiluição usadas para a determinação da CIM (item 4.6.6), sem turvação visível, foram semeados na superfície do ágar *Plate-Count*. Em seguida, as placas foram incubadas a 35°C e após 24h as colônias crescidas na superfície do ágar foram contadas (Figura 7). A menor concentração do OEHc e da OXA capaz de determinar a morte de 99,9% das células microbianas (crescimento microbiano na superfície do ágar < 0,1%

do inóculo inicial) foi considerada a CLM (BARON; PETERSON; FINEGOLD, 1994).

Figura 7: Fluxograma da determinação da Concentração Letal Mínima (CLM) do OEHc e da OXA.



Fonte: Adaptado de TEIXEIRA (2009).

4.6.8 Determinação das curvas de crescimento microbiano

Suspensões microbianas das cepas susceptíveis a ação do OEHc (*S. aureus* ATCC 6538P, *S. aureus* ATCC 14458) foram obtidas após incubação *overnight* a 35°C e tiveram sua densidade ajustada pela turbidez do tubo 0,5 da escala de MacFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). As culturas foram diluídas 100x para obtenção de suspensões com 10^6 UFC/mL e distribuídas em microplacas estéreis de 96 poços que

foram incubada em estufa bacteriológica a 35°C. O crescimento microbiano foi acompanhado pela leitura de absorvância a 620 nm e contagem de colônias em meio sólido utilizando a técnica da microgota (ROMEIRO, 2007), após 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24h (Figura 8).

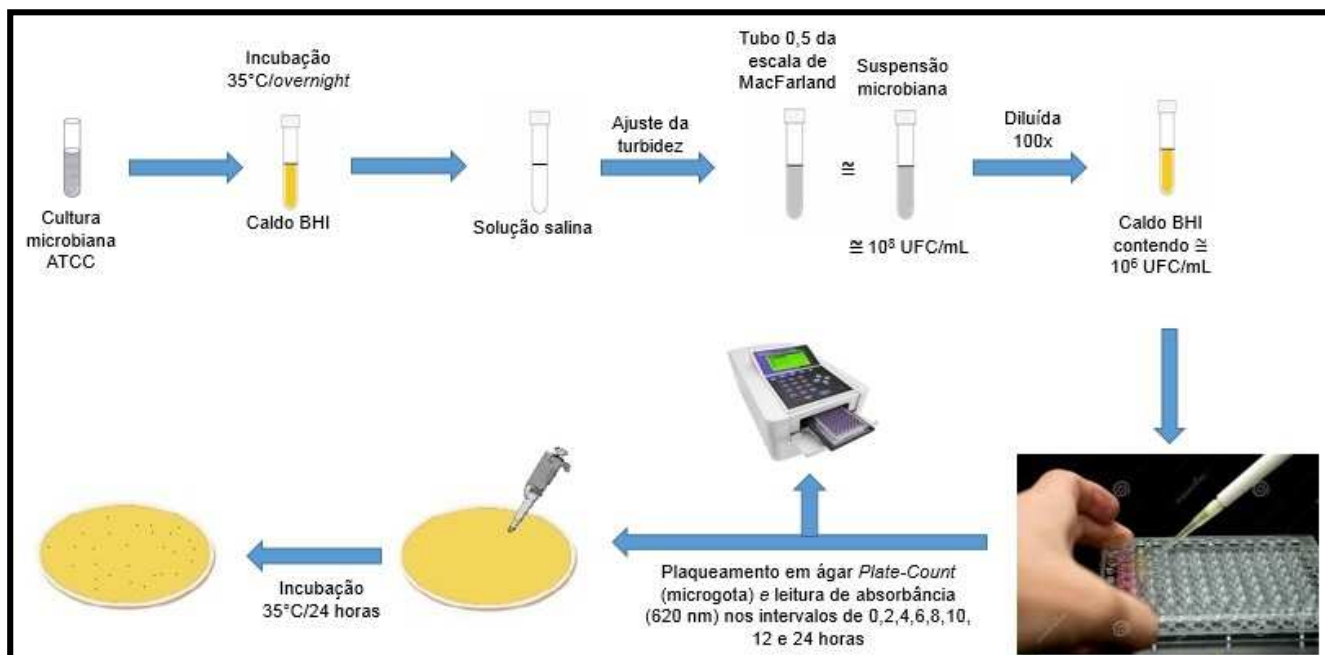


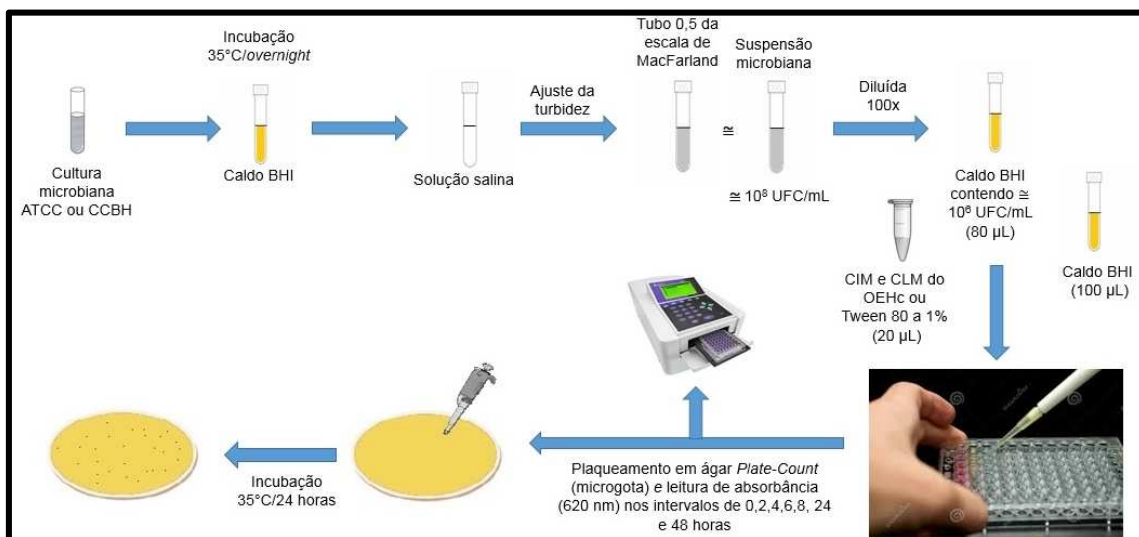
Figura 8: Fluxograma da determinação das curvas de crescimento microbiano.

Fonte: O autor (2013).

4.6.9 Determinação do efeito do tempo de exposição ao OEHC na viabilidade microbiana

Alíquotas de 20µL de OEHC, em concentrações iguais a CIM e CLM previamente determinadas, foram adicionadas a poços de microplacas de 96 poços contendo 100 µL de caldo BHI e 80 µL de uma suspensão microbiana (*S. aureus* ATCC 6538P, *S. aureus* ATCC 14458), com aproximadamente 10⁶ UFC/mL, obtida conforme descrito no item 4.6.6. As microplacas foram incubadas a 35 °C e alíquotas de 10µL foram retiradas e diluídas em solução salina 0,85% estéril, sendo estas semeadas em ágar *Plate-Count* pela técnica da microgota (ROMEIRO, 2007), em intervalos de tempo predefinidos (0, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas) (Figura 9). A contagem das colônias crescidas nas placas foi realizada após 24 horas de incubação a 35 °C. Como controle do experimento foi utilizado o Tween 80 1% (sem tratamento).

Figura 9: Fluxograma da determinação do efeito do tempo de exposição ao OEHC na viabilidade microbiana.

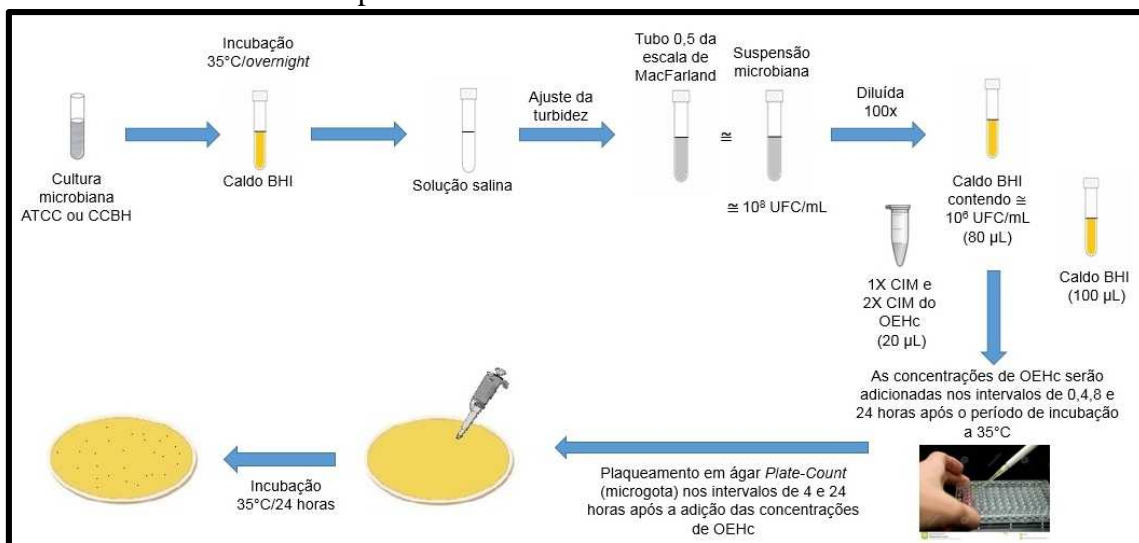


Fonte: O autor (2013).

4.6.10 Determinação do efeito do OEHC sobre cepas microbianas nas fases de crescimento exponencial e estacionário

Culturas microbianas de *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458, contendo aproximadamente 10^6 UFC/mL foram obtidas de acordo com o item 4.6.6. A cada uma delas foi adicionado OEHC em concentrações correspondentes à 1X e 2X CIM, nos tempos 0, 4, 8 e 24 horas após o início do período de incubação a 35°C (MUROI; KUBO, 1996). A contagem das células viáveis foi realizada após 4 e 24 horas de cada adição de OEHC, pela técnica da microgota (ROMEIRO, 2007) (Figura 10).

Figura 10: Fluxograma da determinação do efeito do OEHc sobre cepas microbianas nas fases de crescimento exponencial e estacionário.

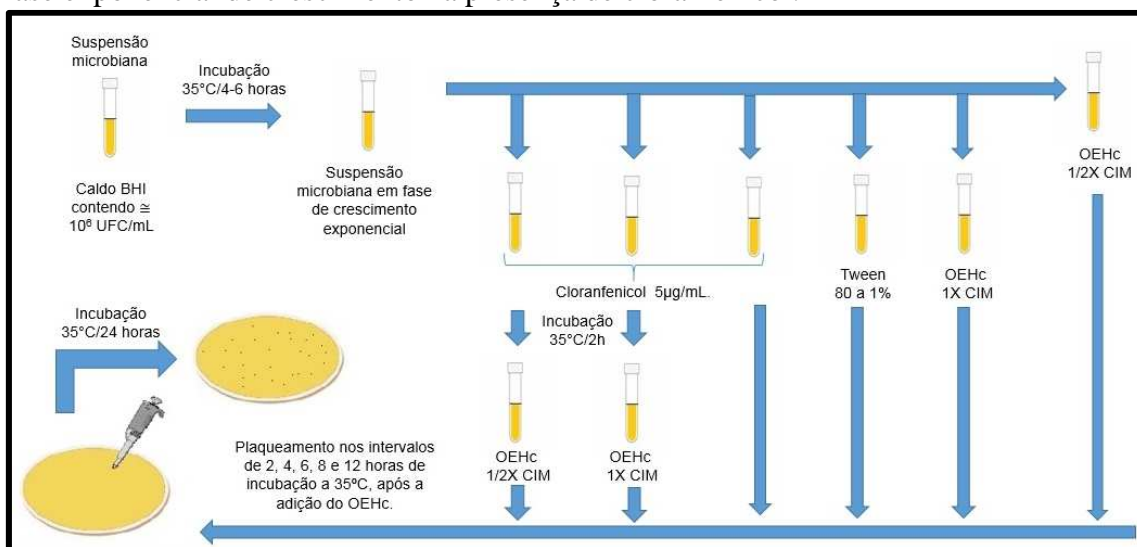


Fonte: O autor (2013).

4.6.11 Determinação do efeito do OEHc sobre cepas microbianas na fase exponencial de crescimento, na presença de cloranfenicol

Alíquotas de suspensão microbiana (80 µL) de *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458, em fase de crescimento exponencial, foram adicionadas a placas com 96 poços contendo 100 µL de caldo BHI em cada poço. Após incubação por 4 horas a 35°C, as culturas foram fracionadas em seis grupos. A dois desses grupos foram adicionados 20 µL de OEHc em concentração final de 1/2X e 1X CIM. Um grupo foi adicionado de 25 µL de Tween 80 1%, como controle do experimento. Os outros três grupos foram tratados com 20 µL de cloranfenicol na concentração final de 5 µg/mL. Um grupo tratado com cloranfenicol não recebeu a adição de OEHc, servindo para controle da inibição de divisão celular. Os outros dois grupos foram incubados por mais um período de 2h, para que ocorresse a inibição da divisão celular, e então foi adicionado OEHc (20 µL) em concentração final de 1/2X e 1X CIM. A contagem das células viáveis foi realizada após 2, 4, 6, 8 e 12h de incubação, e os resultados expressos em UFC/mL (MUROI; KUBO, 1996) (Figura 11).

Figura 11: Fluxograma da determinação do efeito do OEHc sobre cepas microbianas na fase exponencial de crescimento na presença de cloranfenicol.



Fonte: O autor (2013).

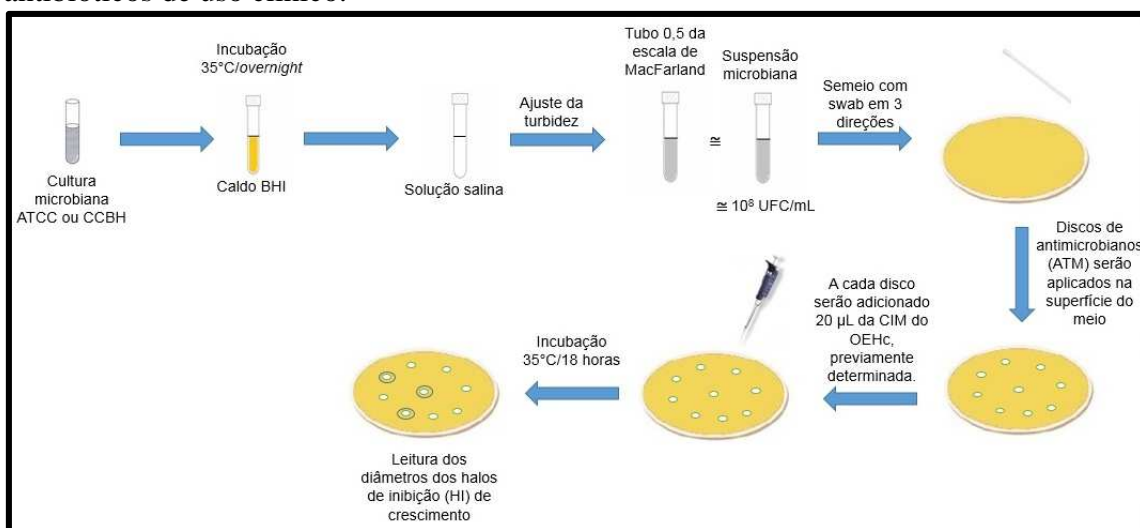
4.6.12 Estudo do efeito modulador do OEHc na atividade de antibióticos de uso clínico

A ação moduladora do OEHc na atividade antimicrobiana de antibióticos de uso clínico (OXA – Oxacilina 1µg, AMI – Amicacina 30µg, GEN – Gentamicina 30µg, CRX – Cefuroxima 30µg, CFO – Cefoxitina 30µg, CLO – Cloranfenicol 10µg, NET – Netilmicina 30µg, P/T – Piperacilina/Tazobactam 110µg, ERT – Ertapenem 10µg, MEM – Meropenem 10µg, VAN – Vancomicina 30µg, CLA – Claritromicina 15µg, CIP – Ciprofloxacina 5µg, CLI – Clindamicina 2µg) sobre cepas padrão de *S. aureus* Oxacilina sensíveis (*S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458) foi determinada pelo método de disco-difusão (BAUER *et al.*, 1966), modificado (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Culturas contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL foram semeadas na superfície de ágar Mueller Hinton. Discos comerciais de agentes antimicrobianos (ATM) foram aplicados na superfície do meio e a cada disco foram adicionados 20 µL da CIM do OEHc, previamente determinada. Para avaliar o efeito da combinação OEHc+ATM, discos de ATM, sem adição de OEHc foram testados para cada cepa.

Após incubação das placas a 37°C/18h, foi realizada a leitura dos diâmetros dos halos de inibição (HI) de crescimento microbiano (Figura 12).

Os diâmetros dos HI de crescimento microbiano determinados por cada associação OEHC+ATM foram comparados aos determinados pelo ATM isoladamente. Foi considerado *efeito sinérgico* quando a combinação determinou um aumento do diâmetro de HI \geq 2mm; *efeito antagônico* quando o diâmetro do HI determinado pela combinação foi menor que o do ATM isolado; e, efeito indiferente, quando a combinação determinou um aumento no diâmetro do HI do ATM $<$ 2mm. (CLEELAND; SQUIRES, 1991).

Figura 12: Fluxograma do estudo do efeito modulador do OEHC na atividade de antibióticos de uso clínico.



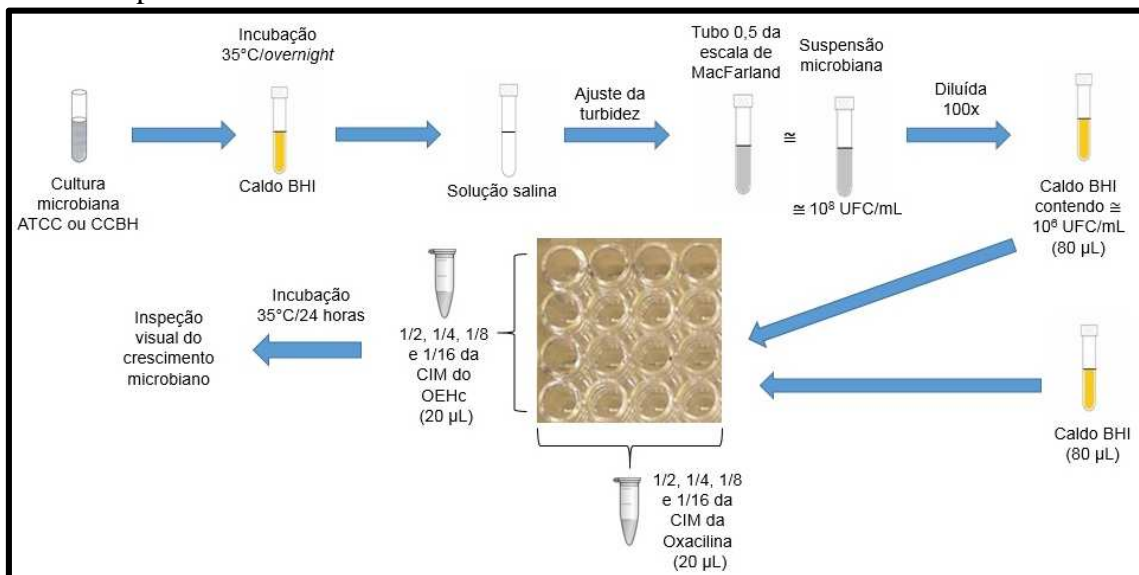
Fonte: O autor (2013).

4.6.13 Estudo do efeito modulador do OEHC na atividade da Oxacilina pelo método Checkerboard

O efeito do OEHC na atividade antimicrobiana da OXA também foi avaliado pelo Método de *Checkerboard*, como descrito por Cleeland e Squires (1991), utilizando-se, para isso, microplacas com 96 poços, de fundo chato, estéreis. Aos poços das microplacas foram adicionadas alíquotas de 80 µL de culturas microbianas (*S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458), contendo aproximadamente 10^6 UFC/mL, obtidas conforme descrito no item 4.6.6, 80 µL de caldo BHI, 20 µL de OEHC e 20 µL de Oxacilina (OXA). Os valores de CIM de OEHC e de OXA foram previamente determinados e utilizados para obtenção das diferentes associações de OEHC-OXA. Foram usadas concentrações finais iguais a 1/2, 1/4, 1/8, e 1/16 x CIM de

OEHc e de OXA. As microplacas, fechadas por tampas apropriadas, foram incubadas durante 24 horas em estufa bacteriológica a 35°C. Após o período de incubação foi realizada a inspeção visual do crescimento microbiano (Figura 13).

Figura 13: Fluxograma do estudo do efeito modulador do OEHc na atividade da Oxacilina pelo método *Checkerboard*



Fonte: O autor (2013).

Para analisar o efeito das associações foram calculados os Índices de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), como descrito por (SHIN; LIM, 2004):

$$\text{ICIF} = \text{CIF}_{\text{OEHc}} + \text{CIF}_{\text{OXA}} = [\text{OEHc}]/\text{CIM}_{\text{OEHc}} + [\text{OXA}]/\text{CIM}_{\text{OXA}}.$$

Onde: [OEHc] é a menor concentração do OEHc na associação com atividade antimicrobiana, CIM_{OEHc} é a CIM de OEHc, CIF_{OEHc} é a Concentração inibitória fracionada do OEHc, [OXA] é a menor concentração de OXA na associação com atividade antimicrobiana, CIM_{OXA} é a CIM de OXA, CIF_{OXA} é a Concentração inibitória fracionada da OXA.

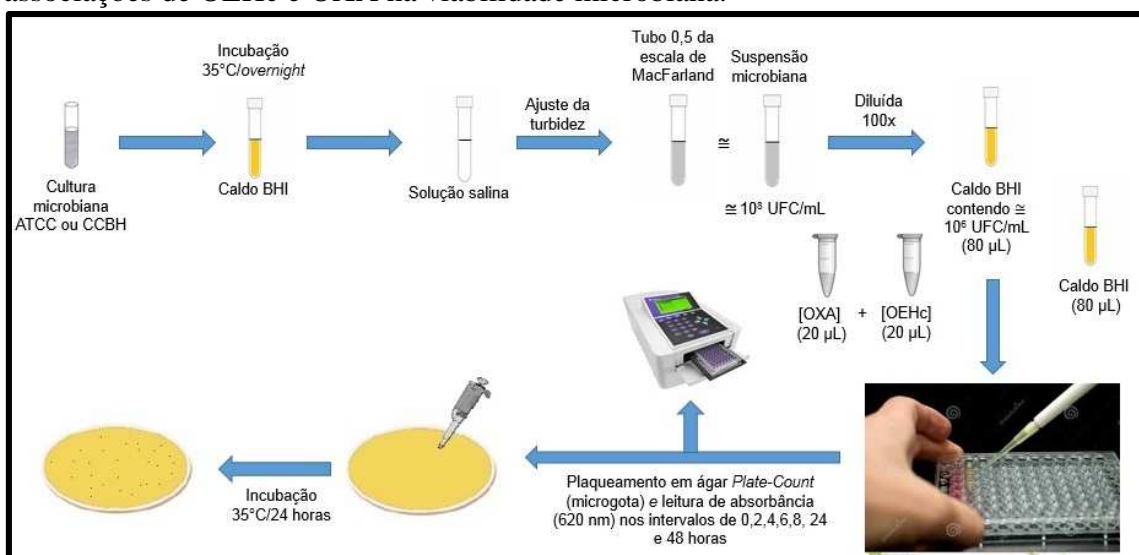
O Índice CIF (ICIF) foi interpretado como: efeito sinérgico para $\text{ICIF} \leq 0,5$, efeito aditivo ou indiferente para $\text{ICIF} > 0,5$ e $< 1,0$, e efeito antagônico para $\text{ICIF} > 1,0$ (EUCAST, 2003).

Os resultados obtidos para as associações OEHc+OXA foram representados graficamente pela aplicação de método isoblograma (HALL; MIDDLETON; WESTMACOTT, 1983; KROGSTAD; MOELLERING, 1986).

4.6.14 Determinação do efeito do tempo de exposição das associações OEHc-OXA na viabilidade microbiana

Alíquotas de 20 μ L de OEHc e 20 μ L de OXA nas concentrações previamente determinadas no método de *Chekerboard*, foram adicionadas a poços de microplacas de 96 poços contendo 80 μ L de caldo BHI e 80 μ L de uma suspensão microbiana (*S. aureus* ATCC 6538P, *S. aureus* ATCC 14458), com aproximadamente 10⁶ UFC/mL, obtida conforme descrito no item 4.6.6. As microplacas foram incubadas a 35 °C e alíquotas de 10 μ L foram retiradas e diluídas em solução salina 0,85% estéril, sendo estas semeadas em ágar *Plate-Count* pela técnica da microgota (ROMEIRO, 2007), em intervalos de tempo predefinidos (0, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas) (Figura 14). A contagem das colônias crescidas nas placas foi realizada após 24 horas de incubação a 35 °C. Como controle do experimento foi utilizado o Tween 80 1% (sem tratamento).

Figura 14: Fluxograma da determinação do efeito do tempo de exposição das associações de OEHc e OXA na viabilidade microbiana.



Fonte: O autor (2013).

4.6.15 Estudo do mecanismo de ação do OEHc

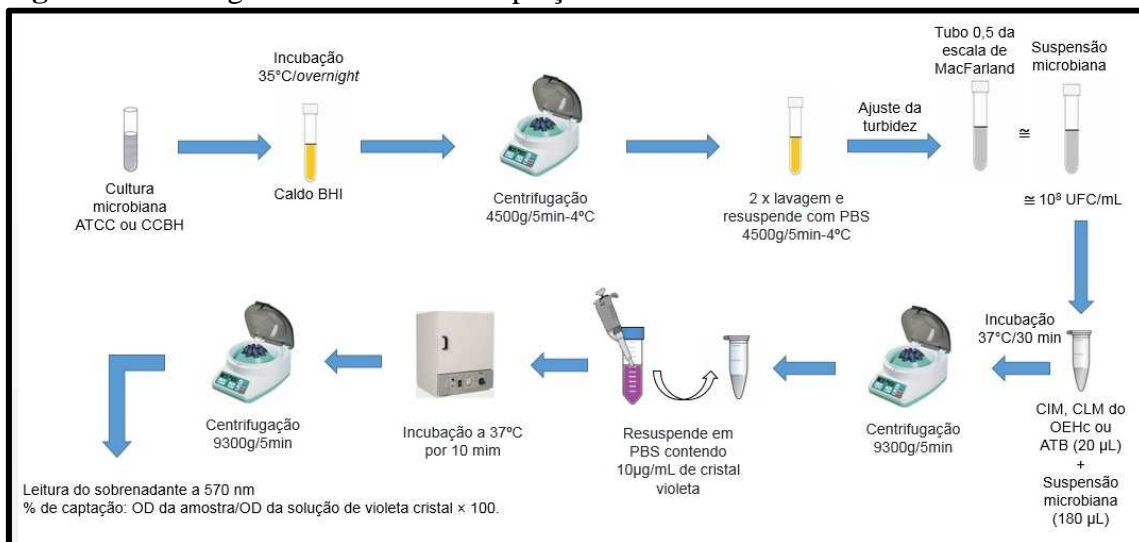
4.6.15.1 Detecção de ocorrência de alteração na permeabilidade da membrana celular

4.6.15.1.1 Captação de cristal violeta

A alteração na permeabilidade da membrana foi detectada pelo ensaio do cristal violeta (VAARA; VAARA, 1981). Suspensões microbianas (5 mL) do *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458 foram incubadas *overnight* em caldo BHI e tiveram suas células coletadas a $4500 \times g$ durante 5 minutos a 4°C . O *pellet* bacteriano foi lavado duas vezes, ressuspensão em PBS (pH 7,4) e ajustado de forma a se obter 10^8 UFC/mL conforme item 4.6.5. Aliquotas de 20 μL da CIM e CLM do OEHc e de um antimicrobiano (Amicacina 1,2 mg/ml) foram adicionadas aos poços de uma microplaca contendo 180 μL das suspensões celulares. Os controles foram preparados de forma semelhante, mas sem adição de OEHc ou amicacina, sendo utilizado caldo BHI com a suspensão microbiana. Após incubação a 37°C durante 30 min, as células foram coletadas por centrifugação a $9300 \times g$ durante 5 min, ressuspensas em 180 μL de PBS contendo 10 $\mu\text{g/mL}$ de cristal de violeta e incubadas durante 10 min a 37°C .

A suspensão foi então centrifugada a $13400 \times g$ durante 15 minutos, sendo as células descartadas. O sobrenadante foi coletado e a leitura de sua densidade ótica (OD) a 570 nm foi realizada em leitora de Elisa (Bio-Tek) da série Expert Plus. O valor de OD_{570} nm da solução de cristal violeta (10 $\mu\text{g/mL}$), utilizada no ensaio, foi considerado como 100% de absorção (Figura 15). O valor da captação do cristal pelas culturas foi calculado usando a seguinte fórmula: $\text{OD da amostra} / \text{OD da solução de violeta cristal} \times 100$.

Figura 15: Fluxograma do ensaio de captação do cristal violeta.

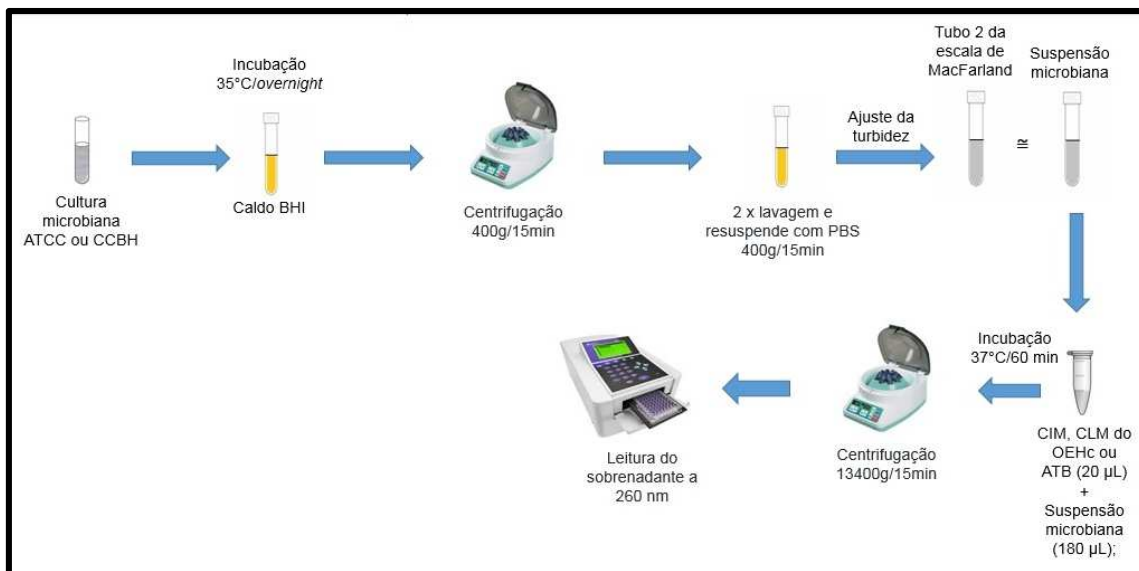


Fonte: O autor (2013).

4.6.15.1.2 Liberação de ácidos nucleicos

A perda de ácidos nucleicos (DNA e RNA) foi mensurada pela leitura de OD_{260nm} (ZHOU *et al.*, 2008). Cerca de 5 mL de culturas microbianas (*S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458), em caldo BHI, foram incubadas *overnight* e tiveram sua densidade celular ajustada com PBS (pH 7,4) para uma OD_{620nm} de 2. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 400 x g durante 15 min, o sobrenadante descartado, e o *pellet* lavado duas vezes e ressuspenso em PBS (pH 7,4). As suspensões celulares (180 µL) foram adicionadas de 20 µL da CIM ou CLM do OEHC ou de antimicrobiano (Amicacina 1,2 mg/mL). Culturas microbianas sem tratamento foram utilizadas como controle. Após incubação a 37°C por 60 min e centrifugação a 13400 x g por 15 min, as células foram descartadas e realizada a leitura da OD_{260nm} do sobrenadante em leitora de Elisa (Bio-Tek) da série Expert Plus (Figura 16).

Figura 16: Fluxograma do ensaio de liberação de ácidos nucleicos.

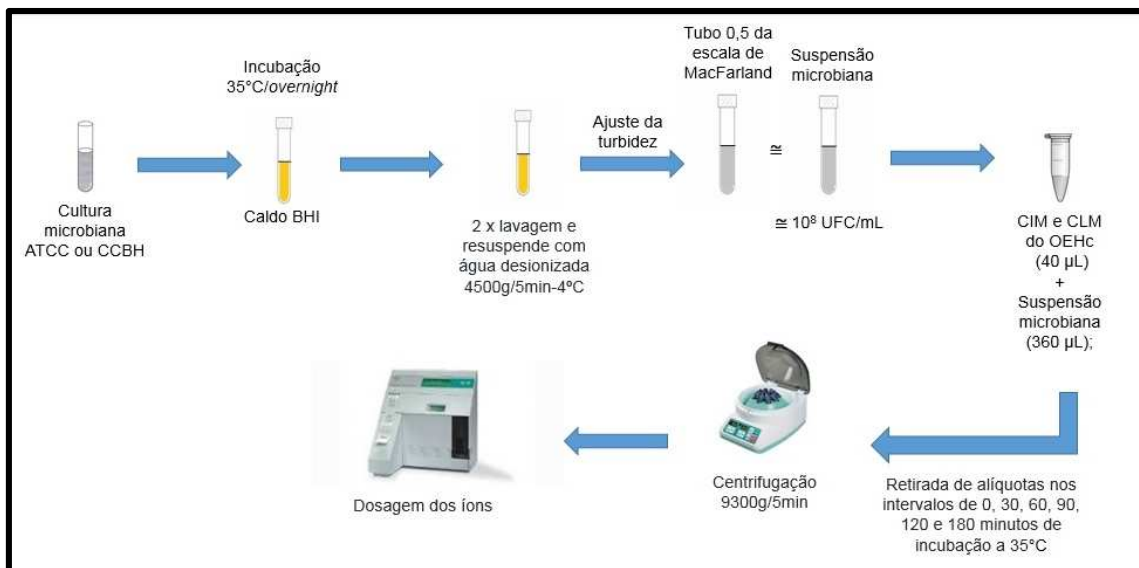


Fonte: O autor (2013).

4.6.15.1.3 Efluxo de íons potássio (K⁺)

Células bacterianas (*S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458) cultivadas em caldo BHI (5 mL), *overnight*, foram coletadas por centrifugação e lavadas duas vezes em água deionizada. As células foram ressuspensas (10^8 UFC/mL) de acordo com o item 4.6.5 e alíquotas (360 µL) foram tratadas com 40 µL da CIM e CLM do OEHC. Nos intervalos de 0, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos foram retiradas alíquotas, que foram centrifugadas e o *pellet* bacteriano descartado. A dosagem de íons potássio foi realizada no sobrenadante, utilizando um analisador de íons seletivo do tipo MH-ISE (Figura 17). As culturas usadas como controle foram preparadas de forma semelhante, sem tratamento com o OEHC.

Figura 17: Fluxograma do ensaio de efluxo de íons potássio (K^+).



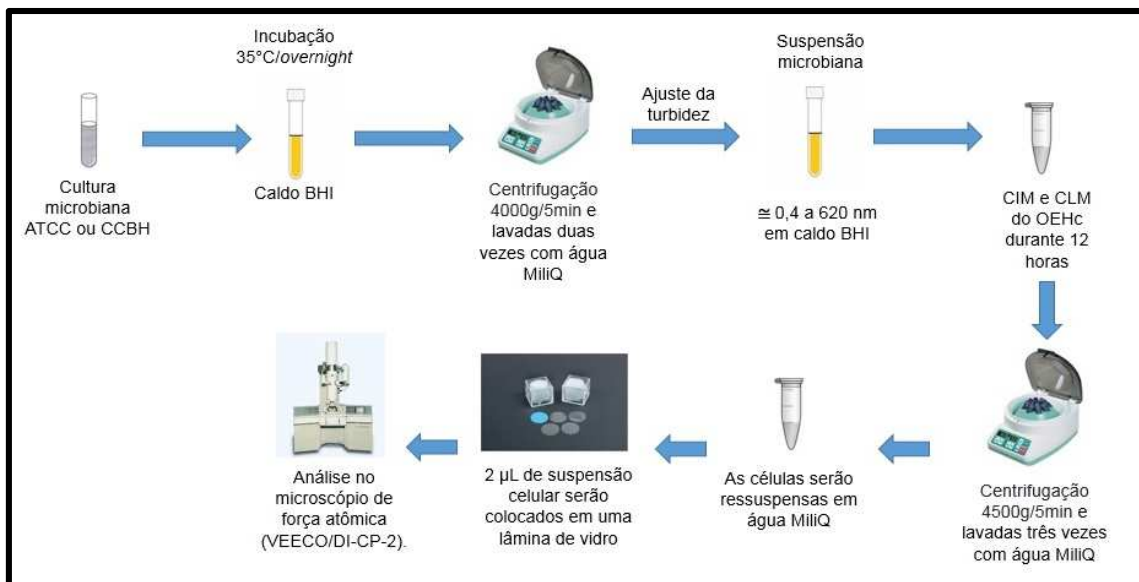
Fonte: O autor (2013).

4.6.15.2 Detecção de alterações na morfologia bacteriana

4.6.15.2.1 Microscopia de força atômica

A suspensão microbiana (*S. aureus* ATCC 6538P) foi incubada *overnight* em caldo BHI, e as células foram coletadas por centrifugação a 4000 x g e lavadas duas vezes com água Milli-Q. O *pellet* bacteriano foi ressuspenso em BHI de forma a se obter uma suspensão com OD_{620} nm de 0,4. A suspensão celular (180 μ L) foi tratada com 20 μ L do OEHC (CIM e CLM), durante o intervalo de 12h. As células foram coletadas por centrifugação a 4000 \times g durante 5 minutos e lavadas três vezes com água Milli-Q. Cerca de 5 μ L da suspensão celular foram colocados em uma lâmina de vidro circular limpa e examinados em microscópio de força atômica (VEECO/DI-CP-2) (Figura 18). As culturas-controle foram preparadas de forma semelhante, sem tratamento do OEHC (BRAGA; RICCI, 1998).

Figura 18: Fluxograma de determinação da microscopia de força atômica

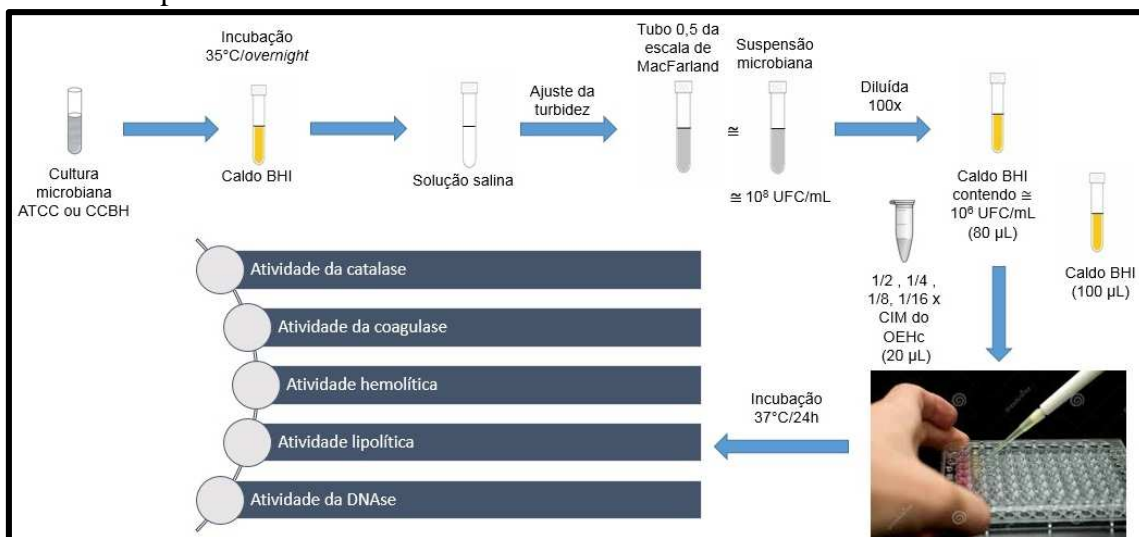


Fonte: O autor (2013).

4.6.16 Avaliação do efeito de concentrações sub-inibitórias do OEHC na expressão de fatores de virulência microbiana de *S. aureus*

Para avaliação da alteração na expressão de fatores de virulência de *S. aureus* pela ação de Concentrações Sub-Inibitória (CSI), inóculos microbianos (*S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458) tiveram sua densidade celular ajustada em 10^6 UFC/mL, em caldo BHI (180 µL), conforme item 4.6.6. As suspensões celulares foram postas em contato com 20 µL de CSI (1/2X, 1/4X, 1/8X e 1/16X CIM) de OEHC e incubado por 24h a 37°C (LINHARES; XIMENES, 2011) (Figura 19).

Figura 19: Fluxograma da avaliação do efeito de concentrações sub-inibitórias do OEHC na expressão de fatores de virulência microbiana de *S. aureus*.



Fonte: O autor (2013).

4.6.16.1 Atividade catalase

A atividade da enzima extracelular catalase foi avaliada pela intensidade de degradação de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. As alíquotas de cultura microbiana (100 µL) previamente tratadas com CSI de OEHC foram transferidas para poços de uma microplaca, aos quais foram adicionados a mesma quantidade de peróxido de hidrogênio 3% (100 µL). A formação de bolhas foi avaliada atribuindo escores a sua intensidade. As culturas-controle foram preparadas de forma semelhante, sem tratamento com CSI do OEHC.

4.6.16.2 Atividade coagulase

A ocorrência de aglutinação foi avaliada, após 45 segundos, utilizando o kit Staphclin Látex (Laborclin), que detecta a capacidade de formação de coágulos, pela ação simultânea da coagulase (fator *clumping*) e da proteína A. Para isso, uma alíquota de 20 µL de cultura microbiana previamente tratada com CSI de OEHC foi adicionado ao cartão teste do Kit juntamente com 20 µL de látex contendo partículas sensibilizadas.

Como controle negativo da atividade coagulase foi utilizada uma cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228. As culturas-controle de *S. aureus* foram preparadas de forma semelhante, sem o tratamento prévio com CSI de OEHC.

4.6.16.3 *Atividade hemolítica*

O teste da atividade hemolítica detecta a ação das hemolisinas sobre eritrócitos de carneiro. As culturas expostas previamente as CSI do OEHC foram avaliadas quanto a atividade hemolítica do *S. aureus*. Após a exposição a CSI as culturas foram centrifugadas e filtradas em membrana (0,45µm). Em seguida uma alíquota de 20µL do sobrenadante foi posta em contato com 180 µL de uma suspensão de hemácias de carneiro a 2% e incubada por 45min a 37°C. Após esse período, a suspensão de eritrócitos foi centrifugada e o sobrenadante transferido para microplaca de 96 poços para leitura das absorbâncias em 570nm em leitora de Elisa (Bio-Tek) da série Expert Plus. As culturas-controle foram preparadas de forma semelhante, sem o tratamento prévio com CSI de OEHC.

4.6.16.4 *Atividade lipolítica*

O teste de atividade lipolítica detecta a degradação de lipídeos contidos no meio de cultura, por uma enzima extracelular, a lipase. Na avaliação da atividade lipolítica, alíquotas da cultura (25 µL) previamente exposta as CSI foram adicionadas a poços confeccionados na superfície de ágar Mueller-Hinton (HIMEDIA) adicionado de uma emulsão lipídica (gema de ovo a 50%). Após incubação de 24h a 37°C, os halos de lipólise foram medidos com auxílio de paquímetro. As culturas-controle foram preparadas de forma semelhante, sem tratamento com CSI.

4.6.16.5 *Atividade DNase*

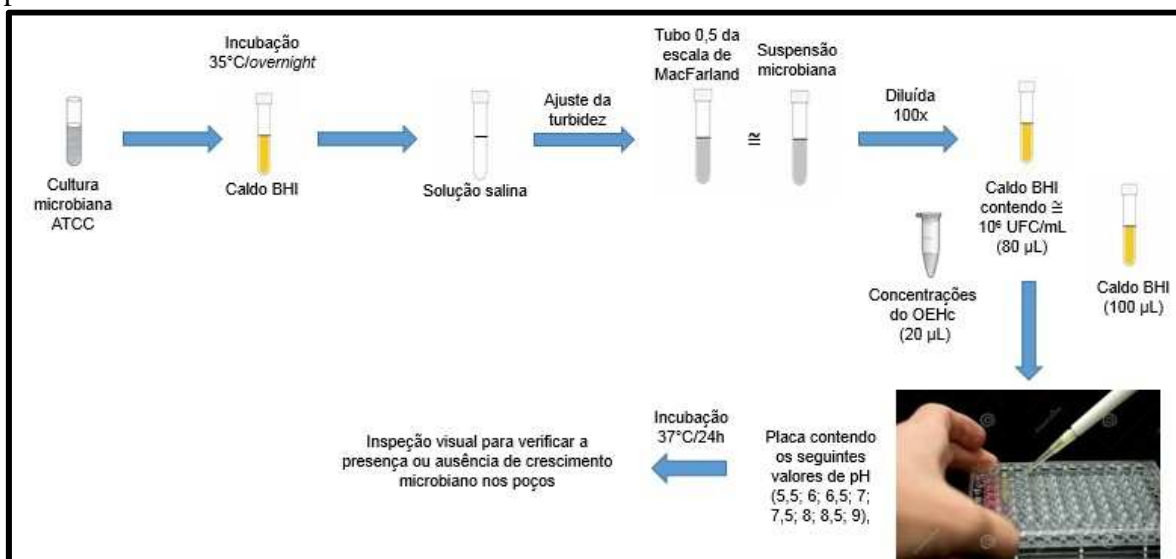
O teste de DNase detecta a degradação do Ácido Desoxirribonucleico (DNA), contido no meio de cultura, por uma enzima extracelular, a desoxirribonuclease. Na avaliação da atividade da DNase, alíquotas de 5 µL da cultura previamente exposta as CSI, foram semeadas na superfície de ágar DNase Teste Base (HIMEDIA). Após incubação por 24h a 37°C, a superfície do ágar foi recoberta com uma solução de HCl 1N, para visualização da atividade enzimática da DNase, através da formação de zonas

opacas. As culturas-controle foram preparadas de forma semelhante, sem o tratamento prévio das CSI de OEHc.

4.6.17 Determinação da influência de diferentes valores de pH na atividade antimicrobiana do OEHc.

Através desse ensaio foi verificada a influência do pH na atividade antimicrobiana do OEHc. Para isso, culturas bacterianas, em caldo BHI, foram incubadas *overnight* e sua turvação ajustada, para que fossem obtidas suspensões celulares com cerca de 10^6 UFC/mL. Em cada poço de uma microplaca, foram adicionados: 100 μ L de caldo BHI com pH ajustado em 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5 e 9, 20 μ L de diferentes concentrações de OEHc (40 a 0,019 mg/mL) e 80 μ L de suspensão microbiana. Foram utilizadas soluções de HCl 0,1N e NaOH 5M para o ajuste de pH (Figura 20). As microplacas foram incubadas a 35°C/24h e inspecionadas visualmente para verificar o crescimento microbiano nos poços (GUOQUIU *et al.*, 2008).

Figura 20: Fluxograma da avaliação da estabilidade do OEHc em diferentes valores de pH.



Fonte: O autor (2013).

4.6.18 Análise estatística

Os resultados foram apresentados na forma de média \pm erro padrão médio (E.P.M.). As diferenças entre os grupos foram comparadas utilizando a Análise de

Variância (ANOVA) seguida dos testes de Tukey e Bonferroni, utilizando como critério $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

O óleo essencial extraído da casca de frutos de *Hymenaea courbaril* L. (OEHc) apresentou um estreito espectro de ação antimicrobiana, sendo capaz de inibir apenas as cepas bacterianas Gram-positivo, *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458. De forma que essas cepas foram utilizadas para os demais ensaios microbianos: avaliação da influência do tempo exposição ao OEHc e as associações OEHc-OXA na viabilidade microbiana; efeito do OEHc nas fases de crescimento exponencial e estacionário; efeito do OEHc na fase de crescimento exponencial, na presença de cloranfenicol; ação moduladora do OEHc na atividade de antibióticos de uso clínico; mecanismo de ação do OEHc; efeito de concentrações sub-inibitória de OEHc na expressão de fatores de virulência microbianos e efeito do pH na atividade antimicrobiana do OEHc.

5.1 Composição química do OEHc

As análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) do OEHc levaram a identificação de 23 diferentes componentes, representando 94,73% do total identificado. Os componentes majoritários foram germacreno-D (17,61%), (Z)- β -cariofileno (17,56%), óxido de cariofileno (14,65%) (Figura 21; Tabela 1) e todos os compostos identificados pertencem à classe dos sesquiterpenos.

Figura 21– Cromatograma do OEHc obtido por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-MS)

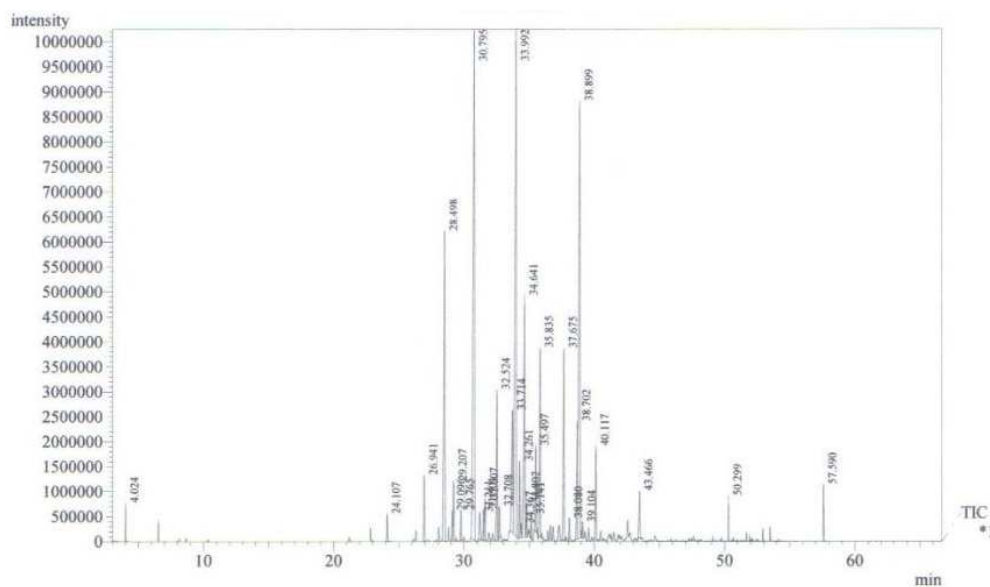


Tabela 1: Constituintes químicos do OEHC.

Constituinte	I.K	I.K _E	% Total
α -cubebeno	1351	1343	1,24
α -copaeno	1376	1376	8,46
β -cubebeno	1388	1387	0,57
β -elemeno	1390	1389	1,29
α -gurjeno	1409	1400	0,54
(Z)- β -cariofileno	1421	1421	17,56
β -copaeno	1432	1429	0,64
α -trans-bergamoteno	1434	1435	0,60
Aromadendreno	1441	1437	0,83
α -humuleno	1454	1456	3,26
Allo-aromadendreno	1460	1459	0,60
γ -muuruleno	1479	1479	4,01
Germacreno-D	1481	1481	17,61
Trans-Muurolo 4-(14)5, dieno	1493	1493	0,25
Biciclogermacreno	1500	1498	6,46
α -muurolo	1500	1501	0,67
Germacreno A	1509	1508	0,39
γ -cadideno	1515	1513	1,67
δ -cadideno	1522	1522	4,43
Germacreno B	1561	1559	4,46
Espatulol	1578	1580	2,63
Óxido de cariofileno	1583	1584	14,65
1,2-epóxido Humuleno	1608	1608	1,91
Total identificado			94,73%

I.K: Índice de Kovats da literatura. I.K_E: Índice de Kovats experimental.

5.2 Ensaio microbiológicos

5.2.1 Potencial antimicrobiano do OEHc

O potencial antimicrobiano do OEHc foi determinado pela técnica de difusão em ágar, modificada. Foi constatada a inibição do crescimento das duas cepas de *S. aureus* sensíveis a oxacilina (cepas OSSA). *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458 foram sensíveis quando expostas ao óleo essencial (OE) até nas concentrações de 50 e 100 mg/mL, respectivamente. Os diâmetros dos halos de inibição (HI) determinados pela ação do OEHc, nas concentrações testadas, variaram de 9 a 7 mm e de 10 a 9 mm, para as cepas *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458, respectivamente (Tabela 2). Nenhuma das cepas microbianas testadas foi inibida pela ação do Tween 80 1%.

Tabela 2: Potencial antimicrobiano do OEHc sobre cepas de *S. aureus*, determinado pela técnica de difusão em ágar.

Microrganismos		
Concentração (mg/mL)	Halo de inibição (mm)*	
	<i>S.aureus</i> ATCC 6538P**	<i>S.aureus</i> ATCC 14458 **
400	9 ± 0,0	9 ± 0,0
200	8,2 ± 0,17	10 ± 0,0
100	7,2 ± 0,17	9 ± 0,0
50	7 ± 0,0	-

25	-	-
12,5	-	-
Amicacina (1,2mg/mL)	31,75±1,24	26,2 ± 0,17

(*): Média \pm EMP dos halos de inibição do crescimento (mm) de três ensaios; Volume de OEHC aplicado em cada poço: 25uL; (-): Sem atividade; Controles: Amicacina 1,2mg/mL e Tween 80 1% (sem atividade); Diâmetro do poço: 6 mm. ** cepas OSSA.

As CIM e CLM de OEHC foram determinadas para as duas cepas de *S. aureus* sensíveis ao OEHC pelo teste de difusão em ágar.

5.2.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Letal Mínima (CLM) do OEHC e da OXA para cepas de *S. aureus*

Para a determinação de CIM e CLM de OEHC e da OXA (Tabela 3) foram utilizados os métodos de microdiluição em caldo de cultura, em microplacas de 96 poços, e de contagem de células viáveis, respectivamente (BARON; PETERSON; FINEGOLD, 1994). O OEHC foi testado nas concentrações de 40 a 0,019 mg/mL e a OXA nas concentrações de 100 a 0,048 µg/mL para as cepas OSSA. A CIM de OEHC foi de 2,5 mg/mL para as duas cepas testadas, e as CLM foram iguais a 2,5 mg/mL e 5 mg/mL para *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458, respectivamente.

Tabela 3: CIM e CLM de OEHC e OXA para cepas padrão de *S. aureus*, determinadas pelas técnicas da microdiluição em caldo de cultura e de contagem de células viáveis, respectivamente

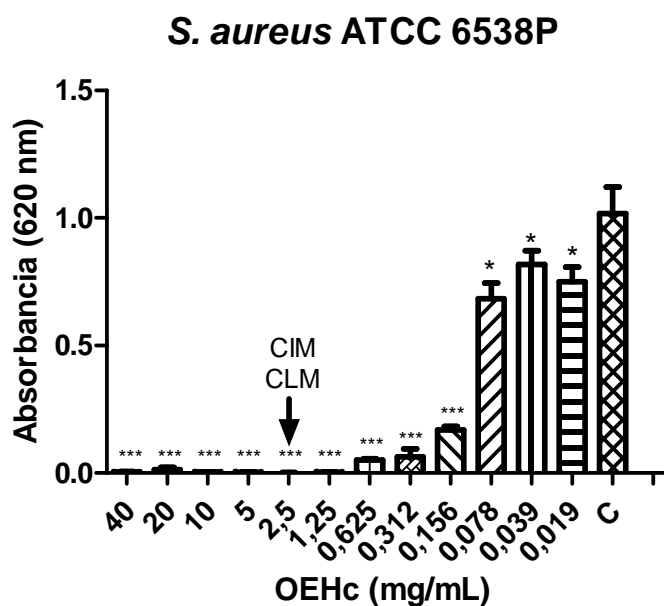
MICROORGANISMOS	OEHC (mg/mL)		Oxacilina (µg/mL)	
	CIM	CLM	CIM	CLM
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	2,5	2,5	0,39	1,56
<i>S. aureus</i> ATCC 14458	2,5	5,0	3,125	12,5

Controle: Tween 80 a 1%. Volume de OEHC ou OXA em cada poço: 20 uL. A CIM foi considerada a menor concentração de OEHC ou de OXA, capaz de inibir o crescimento das cepas de *S. aureus*, com ausência de turvação visível e a CLM foi considerada a menor concentração de OEHC ou de OXA, capaz de eliminar em 99,9% do crescimento celular.

Os valores de CIM foram obtidos por observação a “olho nu” (ausência de turvação visível) e por medida de absorbância a 620 nm em leitora de Elisa (Bio-Tek)

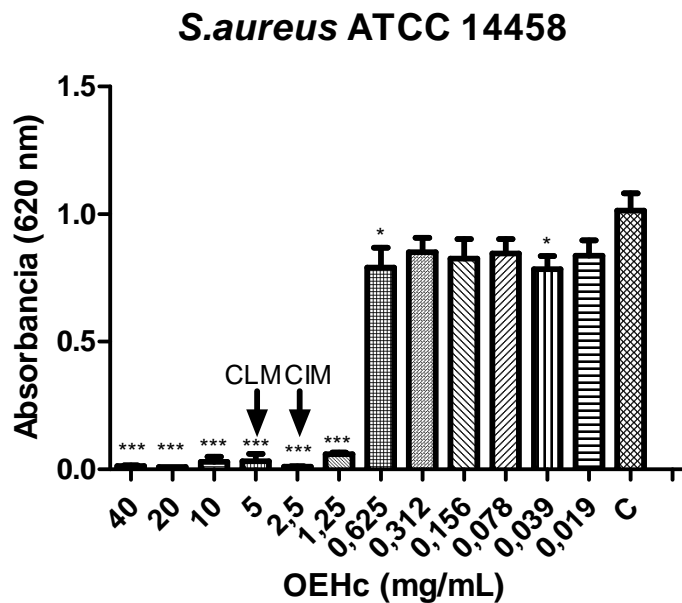
da série Expert Plus (Gráficos 1 a 4). As leituras de densidade ótica das microplacas mostram que não existe diferença significativa ($p < 0,05$) na inibição do crescimento microbiano determinado pela CIM de OEHC e concentrações inferiores (0,156mg/mL para *S. aureus* ATCC 6538P e 1,25 mg/mL para *S. aureus* ATCC 14458). No entanto, nesse trabalho utilizamos os valores de CIM obtidos por inspeção visual, como preconizado pelo Clsi (2003b).

Gráfico 1: Atividade antimicrobiana do OEHC sobre a cepa *S. aureus* ATCC 6538P.



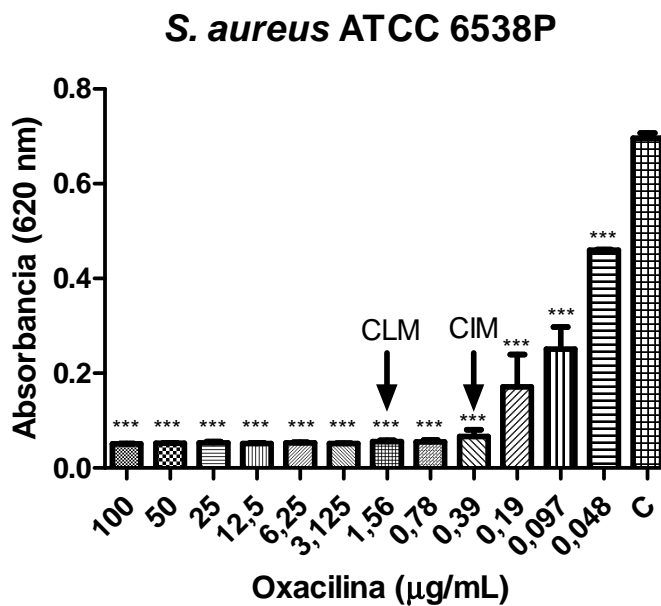
Os valores representam a média \pm EPM de três ensaios. * $p < 0.05$ comparado com o controle de não inibição do crescimento (C = BHI + inoculo microbiano).

Gráfico 2: Atividade antimicrobiana do OEHC sobre a cepa *S. aureus* ATCC 14458.



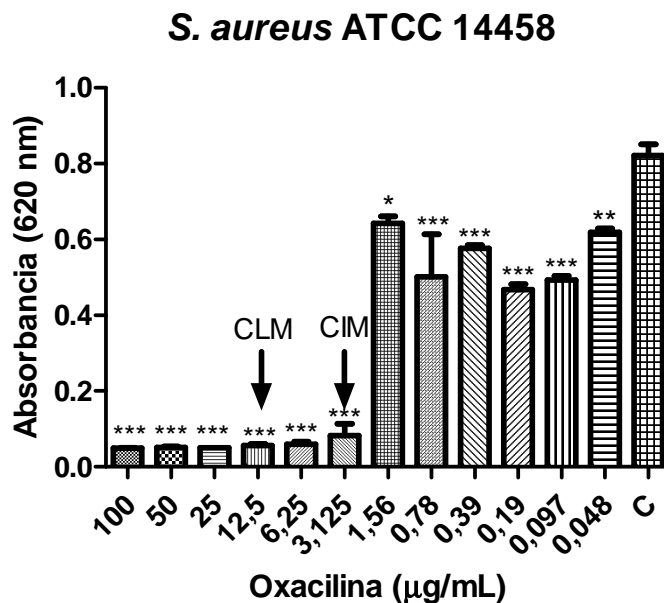
Os valores representam a média \pm EPM de três ensaios. * $p < 0.05$ comparado com o controle de não inibição do crescimento (C = BHI + inoculo microbiano).

Gráfico 3: Atividade antimicrobiana do antibiótico Oxacilina sobre a cepa *S. aureus* ATCC 6538P.



Os valores representam a média \pm EPM de três ensaios. * $p < 0.05$ comparado com o controle de não inibição do crescimento (C = BHI + inoculo microbiano).

Gráfico 4: Atividade antimicrobiana do antibiótico Oxacilina sobre a cepa *S. aureus* ATCC 14458

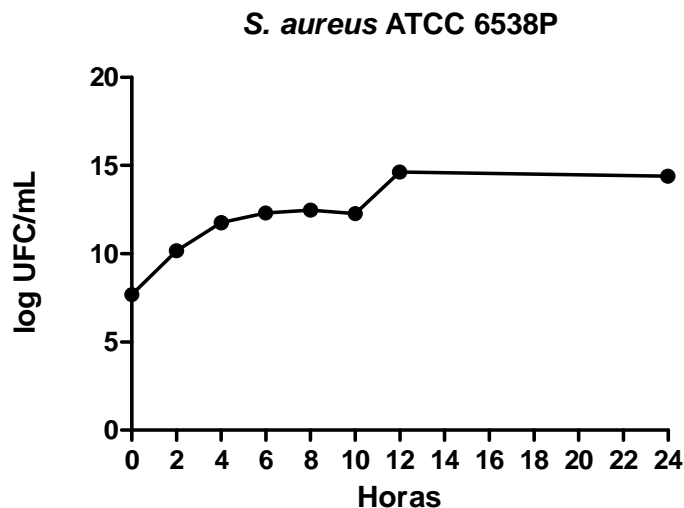


Os valores representam a média \pm EPM de três ensaios. * $p < 0.05$ comparado com o controle de não inibição do crescimento (C = BHI + inoculo microbiano).

5.2.3 *Curvas de crescimento de cepas de S. aureus*

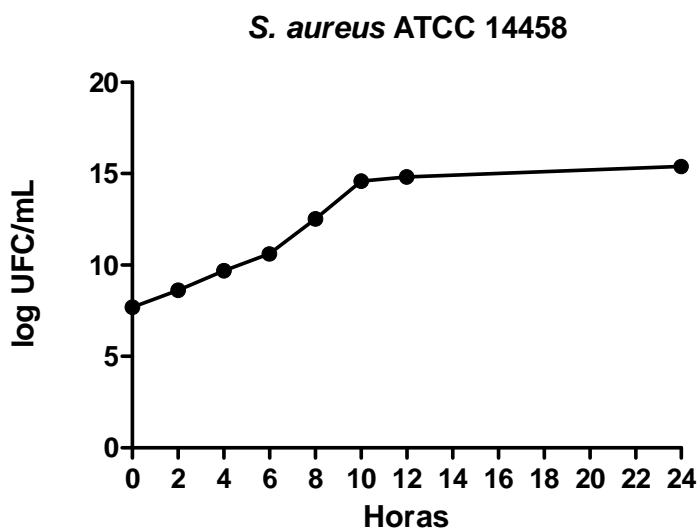
Os gráficos 5 e 6 representam as curvas de crescimento microbiano das cepas de *S. aureus* OSSA, sendo os valores expressos em logaritmo de unidades formadoras de colônias por mililitro (log UFC/mL), em função do tempo. As cepas de *S. aureus* testadas, quando ativadas *overnight*, atingem as fases de crescimento exponencial e estacionário após 2 horas e 12 horas de incubação, respectivamente.

Gráfico 5: Curva de crescimento de *S. aureus* ATCC 6538P.



Os valores representam a média \pm EPM de três experimentos.

Gráfico 6: Curva de crescimento de *S. aureus* ATCC 14458.

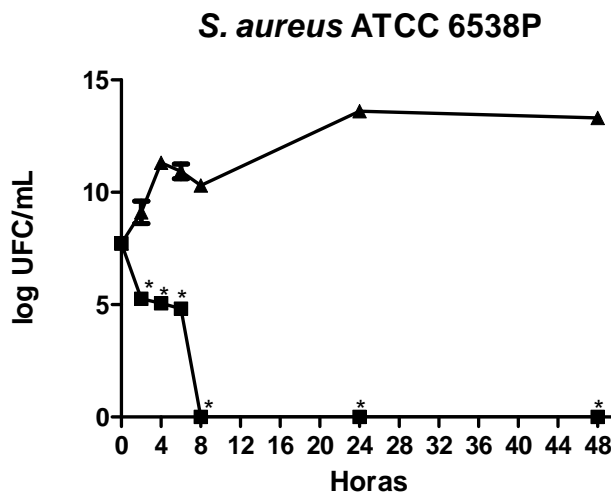


Os valores representam a média \pm EPM de três experimentos.

5.2.4 Efeito do tempo de exposição ao OEHC na viabilidade microbiana de cepas de *S. aureus*

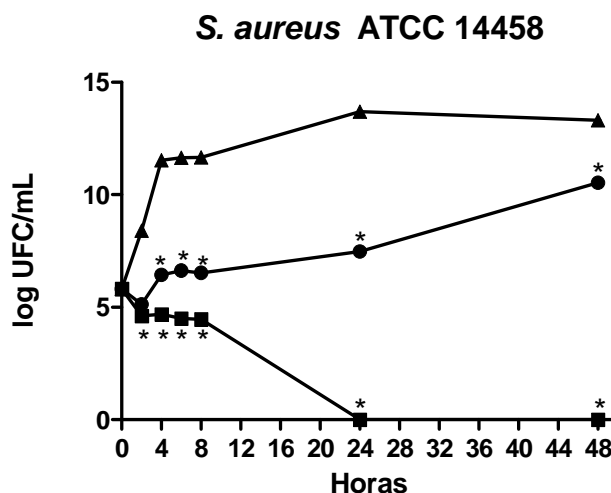
Os gráficos 7 e 8 apresentam a influência do tempo de exposição ao OEHC na viabilidade das cepas OSSA (*S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458), sendo os valores expressos em log UFC/mL em função do tempo.

Gráfico 7: Efeito do tempo de exposição do OEHC na viabilidade de *S. aureus* ATCC 6538P.



■ (CIM = CLM: 2,5 mg/mL), ▲ (sem tratamento). Os valores estão expressos pela média \pm EPM de três experimentos. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.

Gráfico 8: Efeito do tempo de exposição do OEHC na viabilidade celular de *S. aureus* ATCC 14458.



● (CIM: 2,5 mg/mL), ■ (CLM: 5 mg/mL), ▲ (sem tratamento). Os valores estão expressos pela média \pm EPM de três experimentos. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.

O crescimento celular de *S. aureus* ATCC 6538P foi totalmente inviabilizado após exposição por um período de 8 horas a uma concentração igual a 2,5mg/mL de OEHC, o que corresponde a CIM e CLM para essa cepa. Sendo que nas duas primeiras horas, o OEHC foi capaz de reduzir em 31,91% o crescimento celular.

O OEHC, quando em CIM (2,5 mg/mL), inibiu em 11,61% o crescimento da cepa *S. aureus* ATCC 14458, nas duas primeira horas de contato, após o que a população microbiana voltou a aumentar, e com 48h de exposição foi constatado um aumento celular de 55,17% em relação ao inóculo inicial. No entanto, quando a cepa foi

exposta a CLM (5 mg/mL) de OEHc, foi evidenciado uma redução 20,56% no crescimento microbiano nas duas primeiras horas, o que foi mantido por 8 horas, e a perda total de viabilidade celular ocorreu após 24h de contato.

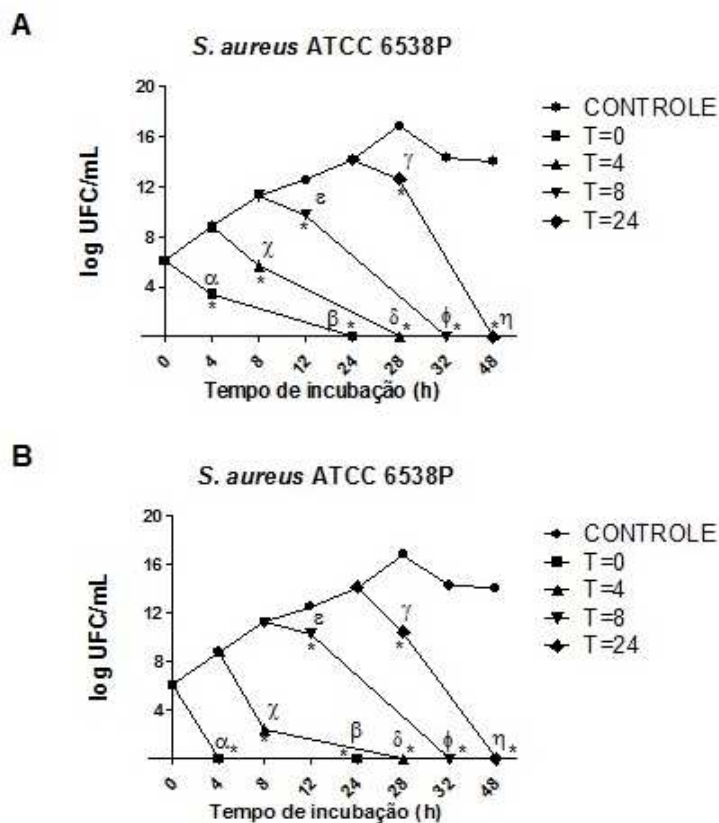
5.2.5 Efeito do OEHc sobre cepas de S. aureus nas fases de crescimento exponencial e estacionário

Os gráficos 9 e 10 representam, o efeito de concentrações iguais a 1X e 2X CIM do OEHc sobre as cepas de OSSA nas fases de crescimento exponencial e estacionário, sendo os valores expressos em logUFC/mL em função do tempo.

O OEHc foi adicionado às culturas em fase exponencial de crescimento (0, 4 e 8h) e em fase de crescimento estacionário (24h) e foi capaz de reduzir o número de células viáveis em todas as fases, sendo mais eficaz no início da fase de crescimento

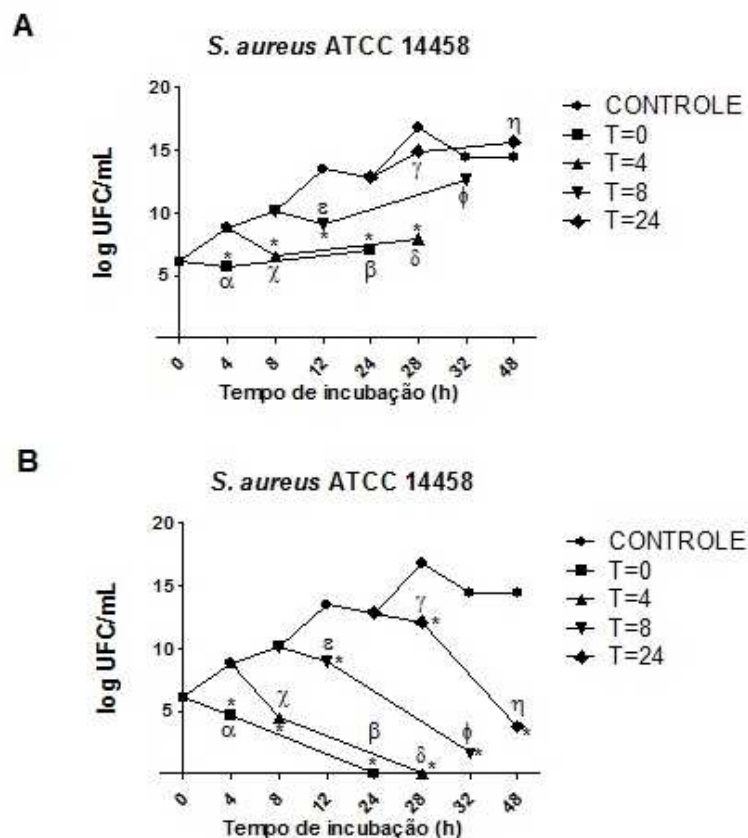
exponencial, quando utilizado em concentração letal. A ação antimicrobiana do OEHC sobre as cepas de *S. aureus* foi dependente da concentração.

Gráfico 9: Efeito do OEHC sobre *S. aureus* ATCC 6538P nas fases de crescimento exponencial e estacionário.



O OEHC foi adicionado nos tempos 0h (■), 4h (▲), 8h (▼) e 24h (◆) após o início da incubação. A contagem de células viáveis foi determinada após 4 e 24 horas da adição do OEHC. Controle (●) sem tratamento. (A): 1X CIM (2,5 mg/mL); (B): 2X CIM (5 mg/mL). A análise estatística foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$. α e β = comparação entre o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 0; χ e δ = comparação entre o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 4h; ε e ϕ = comparação entre o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 8h; γ e η = comparação entre o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 24h.

Gráfico 10: Efeito do OEHC sobre *S. aureus* ATCC 14458 nas fases de crescimento exponencial e estacionário.



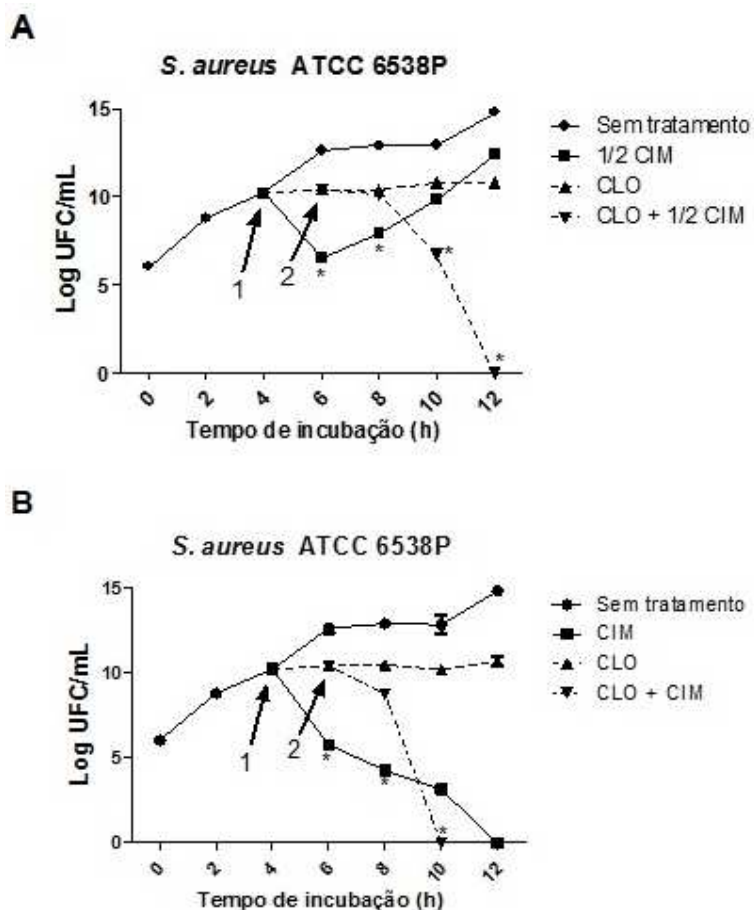
O OEHC foi adicionado nos tempos 0h (■), 4h (▲), 8h (▼) e 24h (◆) após o início da incubação. A contagem de células viáveis foi determinada após 4 e 24 horas da adição do OEHC. Controle (●) sem tratamento. (A): 1X CIM (2,5 mg/mL); (B): 2X CIM (5 mg/mL). A análise estatística foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$. α e β = comparação entre o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 0h; χ e δ = comparação entre o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 4h; ε e ϕ = comparação entre o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 8h; γ e η = comparação entre o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 24h.

5.2.6 Efeito do OEHC sobre cepas microbianas na fase exponencial de crescimento na presença de cloranfenicol

Os gráficos 11 e 12 representam, o efeito das concentrações iguais a 1/2 X e 1 X a CIM do OEHc sobre as cepas OSSA na fase de exponencial de crescimento, na presença do cloranfenicol (CLO), sendo os valores expressos em logUFC/mL em função do tempo.

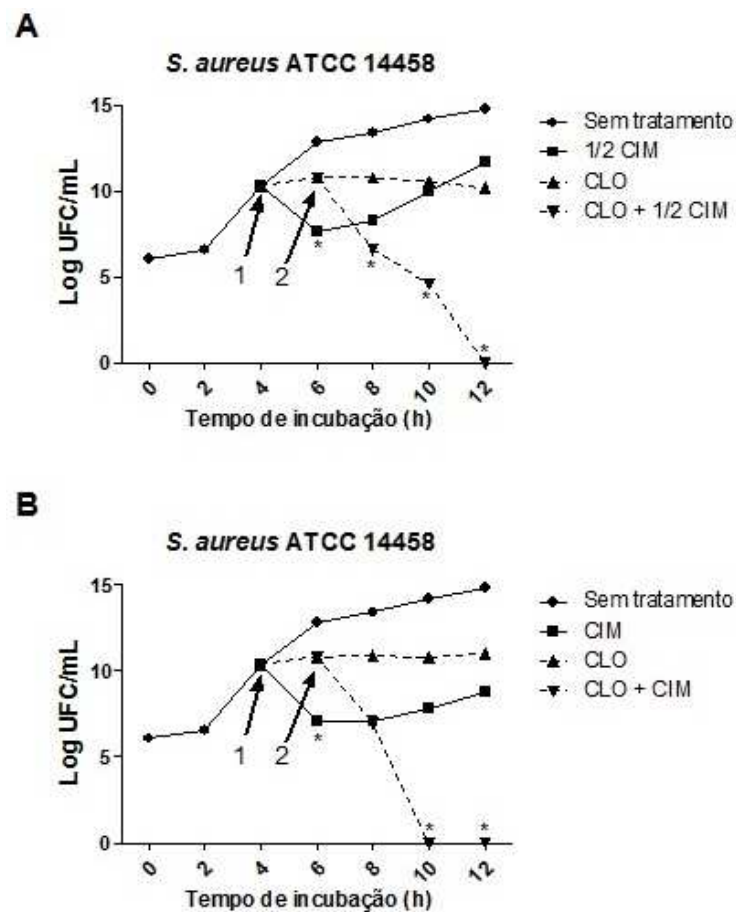
Em concentração sub-inibitória (1/2X CIM), o OEHc, na presença de CLO, inviabilizou o crescimento celular após 12h e em concentração igual a CIM, o tempo de morte celular foi de 10h, para ambas as cepas de *S. aureus*. A melhor atividade do OEHc na presença de CLO sugere um mecanismo de ação independente do metabolismo celular, que parece não estar ligado aos processos de síntese protéica.

Gráfico 11: Efeitos do OEHc sobre a *S. aureus* ATCC 6538P na presença de cloranfenicol.



A seta 1 (T=4h) indica o momento de adição de OEHc (■) e CLO (▲). A seta 2 (T=6h) indica o momento de adição de OEHc após 2h da adição de CLO (▼). Controle (●) sem tratamento. (A): 1/2X CIM; (B): 1X CIM. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni com $p < 0,05$. Comparação entre os grupos CLO-OEHc e OEHc, após 6, 8, 10 e 12 horas.

Gráfico 12: Efeitos do OEHc sobre a *S. aureus* ATCC 14458 na presença de cloranfenicol.



A seta 1 (T=4h) indica o momento de adição de OEHC (■) e CLO (▲). A seta 2 (T=6h) indica o momento de adição de OEHC após 2h da adição de CLO (▼). Controle (●) sem tratamento. (A): 1/2X CIM; (B): 1X CIM. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni com $p < 0,05$. Comparação entre os grupos CLO-OEHc e OEHC, após 6, 8, 10 e 12 horas.

5.2.7 Efeito modulador do OEHC na atividade antibacteriana de antibióticos de uso clínico

Entre as várias classes de antibióticos testadas estão β -lactâmicos (penicilinas: oxacilina e piperacilina/tazobactam; cefalosporinas: cefuroxima e cefoxitina; carbapenens: ertapenem e meropenem); glicopeptídeo (vancomicina), aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina e netilmicina), macrolídeo (claritromicina), quinolona (ciprofloxacina), lincosamídeo (clindamicina) e cloranfenicol. A cepa *S. aureus* ATCC 6538P foi sensível a todos os antibióticos testados e a cepa *S. aureus* ATCC 14458 foi resistente somente ao CLO (Tabela 4).

Tabela 4: Efeito modulador do OEHc na atividade antibacteriana de antibióticos de uso clínico sobre cepas de *S. aureus*

Antibióticos	Microrganismos		
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	<i>S. aureus</i> ATCC 14458	
OXA	HI _{ATM}	27 (S)	14 (S)
	HI _{OEHc-ATM}	27 *	18,5 ↑
AMI	HI _{ATM}	24 (S)	19,5 (S)
	HI _{OEHc-ATM}	26 ↑	22,5 ↑
GEN	HI _{ATM}	20 (S)	21,5 (S)
	HI _{OEHc-ATM}	20,5 *	22 *
CRX	HI _{ATM}	29,5 (S)	24,5 (S)
	HI _{OEHc-ATM}	29,5 *	26,5 ↑
CFO	HI _{ATM}	31 (S)	26,5 (S)
	HI _{OEHc-ATM}	29 ↓	25 ↓
CLO	HI _{ATM}	24,5 (S)	9 (R)
	HI _{OEHc-ATM}	24,5 *	11 ↑
NET	HI _{ATM}	22,5 (S)	19 (S)
	HI _{OEHc-ATM}	25,5 ↑	22,5 ↑
P/T	HI _{ATM}	37 (S)	23 (S)
	HI _{OEHc-ATM}	35,5 *	23 *
ERT	HI _{ATM}	30,5 (S)	28 (S)
	HI _{OEHc-ATM}	31,5 *	28,5 *
MEM	HI _{ATM}	42 (S)	38 (S)
	HI _{OEHc-ATM}	40,5 ↓	40 ↑
CLA	HI _{ATM}	34,5 (S)	28 (S)
	HI _{OEHc-ATM}	37,5 ↑	32,5 ↑
CIP	HI _{ATM}	28,5 (S)	30,5 (S)
	HI _{OEHc-ATM}	28,5 *	30,5 *
CLI	HI _{ATM}	27 (S)	33 (S)
	HI _{OEHc-ATM}	26,5 ↓	33 *
VAN	HI _{ATM}	18,5 (S)	16 (S)
	HI _{OEHc-ATM}	18,5 *	18 ↑

Média de três experimentos. (S) Sensível, (R) Resistente. OXA – Oxacilina (1µg), AMI – Amicacina (30µg), GEN – Gentamicina (30µg), CRX – Cefuroxima (30µg), CFO – Cefoxitina (30µg), CLO – Cloranfenicol (10µg), NET – Netilmicina (30µg), P/T – Piperacilina/Tazobactam (110µg), ERT – Ertapenem (10µg), MEM – Meropenem (10µg), CLA – Claritromicina (15µg), CIP – Ciprofloxacina

(5µg), CLI – Clindamicina (2µg), VAN – Vancomicina (30µg). Discos de ATM foram impregnados com 20µL da CIM do OEHC para cada cepa testada. HI: diâmetro do halo de inibição de crescimento em mm. $HI_{OEHC-ATM}$: diâmetro do halo de inibição de crescimento determinado pela associação OEHC-ATM. HI_{ATM} : diâmetro do halo de inibição de crescimento determinado pelo antibiótico isolado. Efeito sinérgico (\uparrow): $HI_{OEHC-ATM} \geq HI_{ATM} + 2\text{mm}$; Efeito antagônico (\downarrow): $HI_{OEHC-ATM} < HI_{ATM}$; Efeito indiferente ou aditivo (*): $HI_{OEHC-ATM} < HI_{ATM} + 2$ (CLEELAND; SQUIRES, 1991).

A comparação entre os halos de inibição de crescimento (HI) determinados pelos ATM isolados com os HI determinados pela associação OEHC-ATM permitiu comparar o efeito modulador do OEHC na atividade antimicrobiana de diferentes antibióticos de uso clínico. Os resultados obtidos mostram que a modulação do OEHC na eficiência do ATM sobre as cepas OSSA testadas, variou para os diferentes ATM utilizados.

Situações de sinergismo, antagonismo e indiferença foram constatadas para 21,44 e 57,14; 21,42 e 7,14; 57,14 e 35,72 % das associações OEHC-ATM, sobre as cepas *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458, respectivamente.

As associações de OEHC com AMI, NET e CLA apresentaram efeito sinérgico para ambas as cepas testadas. O efeito do OEHC na ação de GEN, P/T e ERT foi indiferente e a associação OEHC-CFO foi a única que exerceu ação antagônica.

A interferência do OEHC na atividade antimicrobiana da Oxacilina também foi avaliada pelo Método de *Checkerboard*. Para o cálculo dos índices de CIF (ICIF) foram utilizados as menores concentrações de OEHC e de OXA contidas nas associações capazes de inibir o crescimento visual das cepas testadas (Tabela 5).

Tabela 5 - Ação combinada de OEHC e OXA na inibição de cepas de *S. aureus* sensíveis a oxacilina

Microrganismo	CIM _{OEHC}		CIF _{OEHC}	CIM _{Oxa}		CIF _{Oxa}	ICIF
	I	A		I	A		
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	2,5	1,25	0,5	0,39	0,097	0,25	0,75
	2,5	0,625	0,25	0,39	0,097	0,25	0,5
	2,5	0,312	0,125	0,39	0,097	0,25	0,375
	2,5	0,156	0,0625	0,39	0,19	0,5	0,562
<i>S. aureus</i> ATCC 14458	2,5	1,25	0,5	3,125	0,19	0,06	0,56
	2,5	0,625	0,25	3,125	0,19	0,06	0,31
	2,5	0,312	0,125	3,125	0,19	0,06	0,185
	2,5	0,156	0,062	3,125	0,19	0,06	0,122

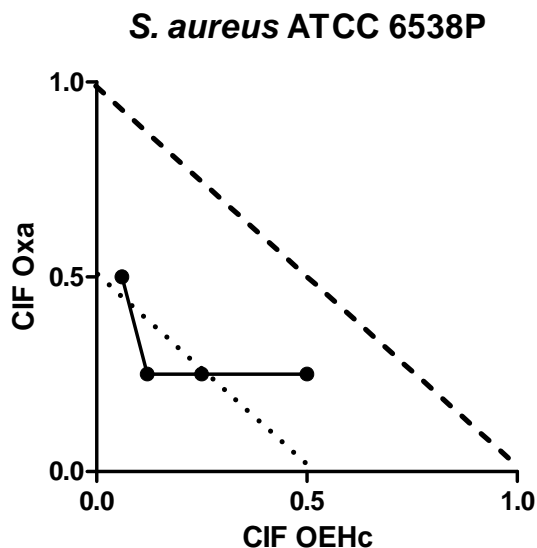
CIM_{OEHC}: CIM do OEHC (mg/mL); CIM_{OXA}: CIM da OXA (µg/mL). I: OEHC ou OXA isolados; A: associação OEHC-OXA. $CIF_{OEHC} = CIM_{OEHC} / CIM_{OEHC \text{ isolado}}$. $CIF_{OXA} = CIM_{OXA} / CIM_{OXA \text{ isolada}}$. Índice CIF = $CIF_{OEHC} + CIF_{OXA}$. ICIF $\leq 0,5$: sinergismo; ICIF $>0,5$ e $< 1,0$: aditivo ou indiferente; ICIF $\geq 1,0$: antagonismo (Eucast, 2003).

Ao avaliar o efeito modulador das associações OEHc-OXA, foi constatado ações sinérgicas (40,63%), aditivas (50%) e antagônicas (9,37%). Para a cepa *S. aureus* 14458 não foi constatada nenhuma associação antagonista, para as concentrações testadas.

Para as menores concentrações de OE ou OXA, capazes de determinar associações aditivas e sinérgicas, os valores de ICIF variaram entre 0,122 a 0,75, para as cepas OSSA testadas, com redução de até 16 vezes da CIM de OXA ou da OEHc.

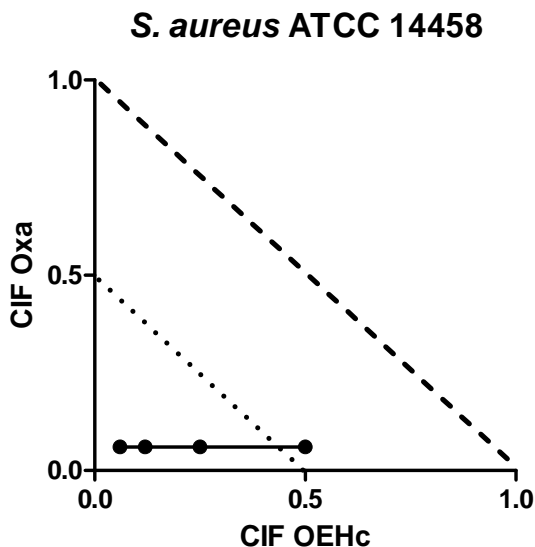
O tipo de interação das associações de OEHc-OXA pode ser visualizado graficamente na forma de isobogramas (Gráficos 13 e 14). Para construção desses gráficos, foram utilizados os valores de FIC do OEHc e da OXA. As associações nas quais ocorre interação indiferente ou aditiva podem ser vistas como pontos entre as duas linhas tracejadas CIF (0,5; 0,5) e CIF (1;1), as situações de sinergismo são visualizadas como pontos abaixo da linha tracejada CIF (0,5; 0,5). O efeito é antagônico é determinado pelos pontos situados acima da linha tracejada CIF (1;1).

Gráfico 13 - Isobograma mostrando o efeito sinérgico da associação OEHc-OXA na inibição do crescimento do *S. aureus* ATCC 6538P.



Os pontos representam os valores de CIF de associações em que o crescimento microbiano foi inibido.

Gráfico 14 - Isoblograma mostrando o efeito sinérgico da associação OEHc-OXA na inibição do crescimento do *S. aureus* ATCC 14458.



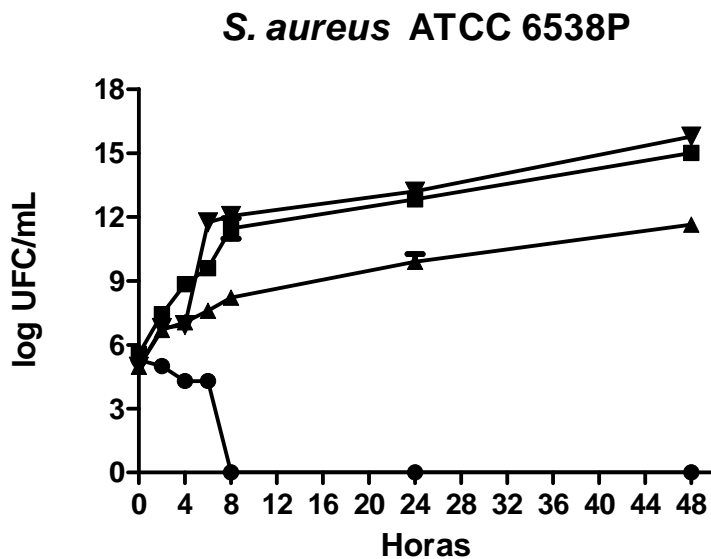
Os pontos representam os valores de CIF de associações em que o crescimento microbiano foi inibido.

As representações gráficas em isoblogramas confirmam os resultados de ICIF, onde, para a cepa *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458 foi constatado sinergismo para uma e três das associações, respectivamente.

5.2.8 *Efeito do tempo de exposição das associações OEHc-OXA na viabilidade microbiana*

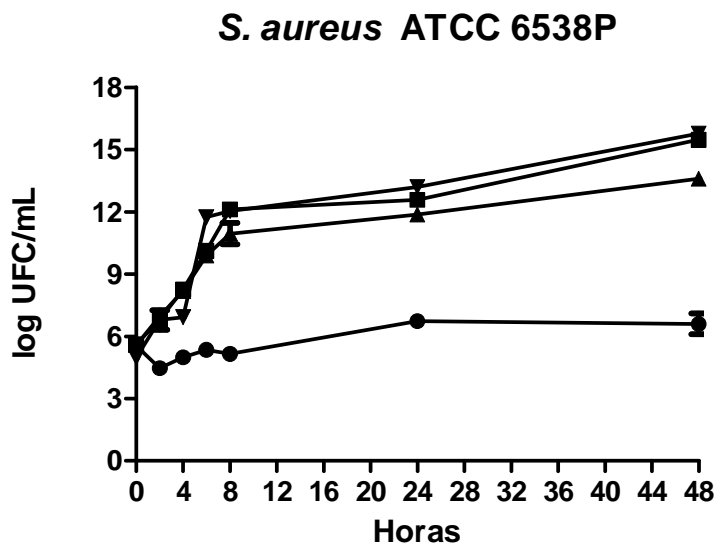
Os gráficos 15 a 20 representam, a influência do tempo de exposição a associações de concentrações sub-inibitórias do OEHc e da oxacilina sobre o crescimento microbiano das cepas de OSSA, sendo os valores expressos em logUFC/mL em função do tempo. Todas as associações OEHc-OXA, que apresentaram efeito sinérgico ou aditivo ($ICIF < 1,0$) reduziram a viabilidade microbiana 100 x ou mais, o que pode ser considerado sinergismo.

Gráfico 15: Efeito do tempo de exposição a OEHc-OXA na viabilidade celular do *S. aureus* ATCC 6538P.



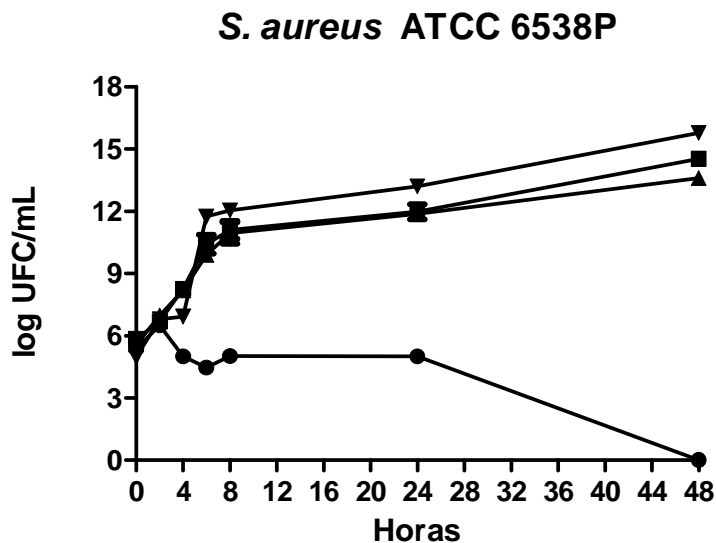
● (OEHc - 0,156 mg/mL + OXA - 0,19 µg/mL), ▲ (OXA - 0,19 µg/mL), ■ (OEHc - 0,156 mg/mL), ▼ (sem tratamento). Os valores estão expressos pela média \pm EPM de três experimentos. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.

Gráfico 16: Efeito do tempo de exposição a OEHc-OXA na viabilidade celular do *S. aureus* ATCC 6538P.



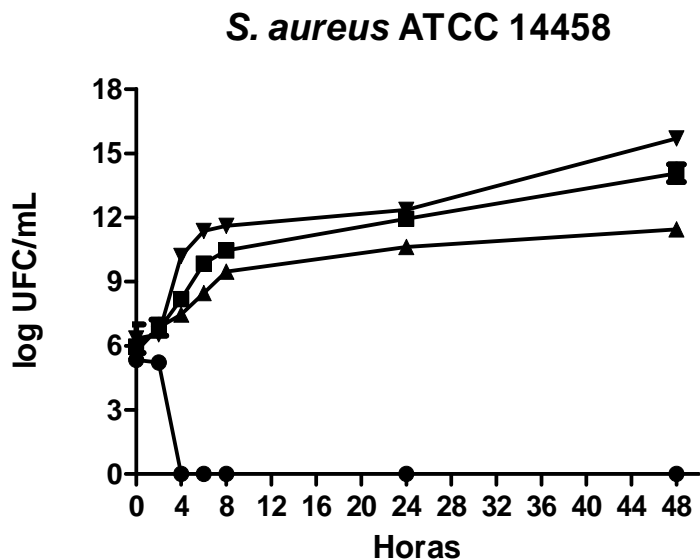
● (OEHc - 0,312 mg/mL + OXA - 0,097 µg/mL), ▲ (OXA - 0,097 µg/mL), ■ (OEHc - 0,312 mg/mL), ▼ (sem tratamento). Os valores estão expressos pela média \pm EPM de três experimentos. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.

Gráfico 17: Efeito do tempo de exposição a OEHc-OXA na viabilidade celular do *S. aureus* ATCC 6538P.



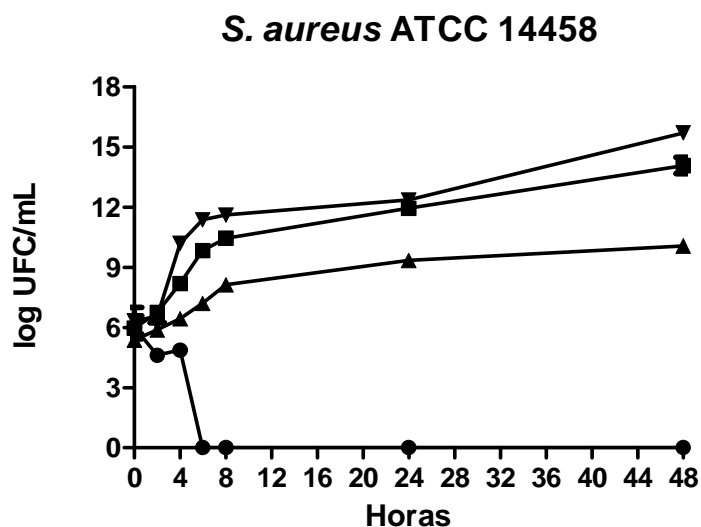
● (OEHc - 0,625 mg/mL + OXA - 0,097 µg/mL), ▲ (OXA - 0,097 µg/mL), ■ (OEHc - 0,625 mg/mL), ▼ (sem tratamento). Os valores estão expressos pela média \pm EPM de três experimentos. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.

Gráfico 18: Efeito do tempo de exposição das combinações do OEHc e Oxacilina na viabilidade celular do *S. aureus* ATCC 14458.



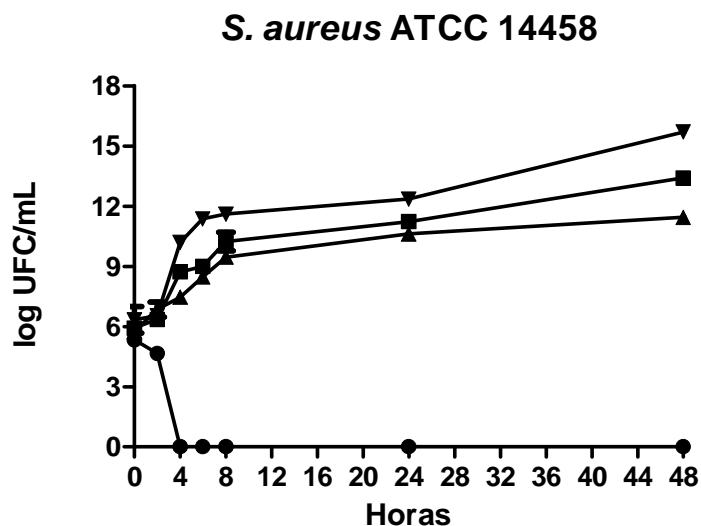
● (OEHc - 0,156 mg/mL + OXA - 0,19 µg/mL), ▲ (OXA - 0,19 µg/mL), ■ (OEHc - 0,156 mg/mL), ▼ (sem tratamento). Os valores estão expressos pela média \pm EPM dois experimentos. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.

Gráfico 19: Efeito do tempo de exposição das combinações do OEHc e Oxacilina na viabilidade celular do *S. aureus* ATCC 14458.



● (OEHc - 0,156 mg/mL + OXA - 0,19 µg/mL), ▲ (OXA - 0,39 µg/mL) ■ (OEHc - 0,156 mg/mL), ▼ (sem tratamento). Os valores estão expressos pela média \pm EPM dois experimentos. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.

Gráfico 20: Efeito do tempo de exposição das combinações do OEHc e Oxacilina na viabilidade celular do *S. aureus* ATCC 14458.



● (OEHc - 0,312 mg/mL + OXA - 0,19 µg/mL), ▲ (OXA - 0,19 µg/mL) ■ (OEHc - 0,312 mg/mL), ▼ (sem tratamento). Os valores estão expressos pela média \pm EPM dois experimentos. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.

Todas as associações OEHc-OXA testadas foram capazes de manter de maneira significativa o número de células viáveis de *S. aureus* abaixo da contagem observada para o OEHc e a OXA isoladamente.

Entre as associações testadas para *S. aureus* ATCC 6538P, a maior eficiência foi constatada para 0,156 mg/mL de OEHc + 0,19 µg/mL de OXA, capaz de inviabilizar o crescimento desta cepa após 8 horas de exposição (Gráfico 15). A associação (0,625 mg/mL de OEHc + 0,097 µg/mL de OXA) também foi capaz de eliminar o *S. aureus* ATCC 6538P, porém necessitou de 48 horas de contato (Gráfico 17). A associação 0,312 mg/mL de OEHc + 0,097 µg/mL de OXA reduziu ligeiramente o número de células viáveis nas duas primeiras horas de exposição, mantendo o crescimento microbiano ao nível do inoculo inicial nas 48h de exposição (Gráfico 16).

Todas as associações testadas apresentaram excelente efeito bactericida sobre a cepa *S. aureus* ATCC 14458. As associações 0,156 mg/mL de OEHc + 0,19 µg/mL de OXA (Gráfico 18) e 0,312 mg/mL de OEHc + 0,19 µg/mL de OXA (Gráfico 20), inibiram o crescimento celular nas duas primeiras horas de contato e inviabilizaram a sobrevivência bacteriana após 4 horas. A associação 0,156 mg/mL de OEHc + 0,19 µg/mL de OXA reduziu e inviabilizou o crescimento celular em 2 horas e 6 horas de exposição, respectivamente (Gráfico 19).

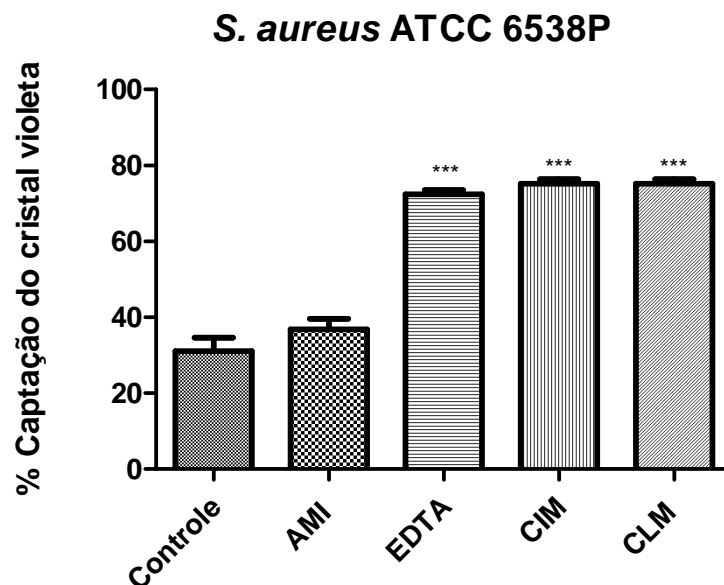
5.2.9 Mecanismos de ação do OEHc em *S. aureus*

5.2.9.1 Alteração na permeabilidade da membrana celular

5.2.9.1.1 Captação de cristal violeta

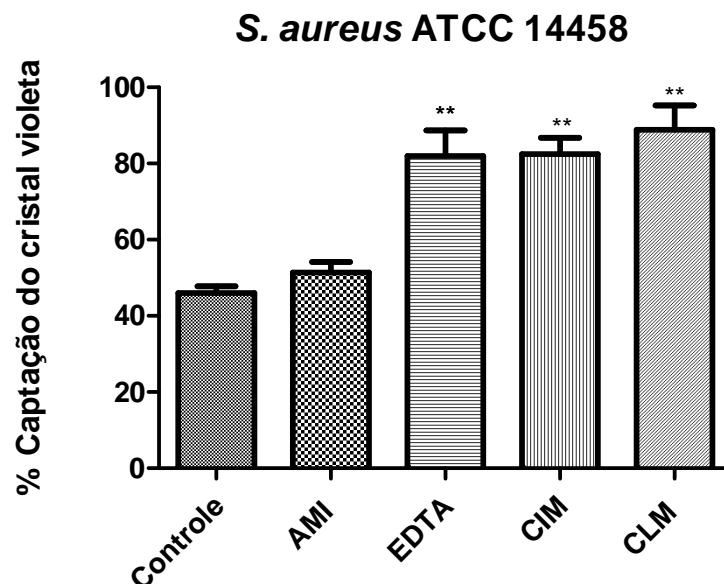
Os gráficos 21 e 22 representam, a captação de cristal violeta por cepas padrão de *S. aureus* expostas a CIM e CLM de OEHc e os valores são expressos em porcentagem de captação de cristal violeta. A CIM de OEHc foi capaz de promover um aumento na captação do cristal violeta em 44,17 e 41,39% pelas cepas *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458, respectivamente, indicando a ocorrência de alteração dos envoltórios celulares.

Gráfico 21: Captação do cristal violeta por *S. aureus* ATCC 6538P exposta a OEHc.



Os valores representam a média \pm EPM de três ensaios. * $p < 0.05$ comparado com o controle (sem tratamento). AMI (Amicacina 1,2 mg/mL). EDTA – ácido etilenodiaminotetracético (controle positivo da captação do cristal violeta). CIM (2,5 mg/mL). CLM (2,5 mg/mL).

Gráfico 22: Captação do cristal violeta por *S. aureus* ATCC 14458 exposta a OEHc.

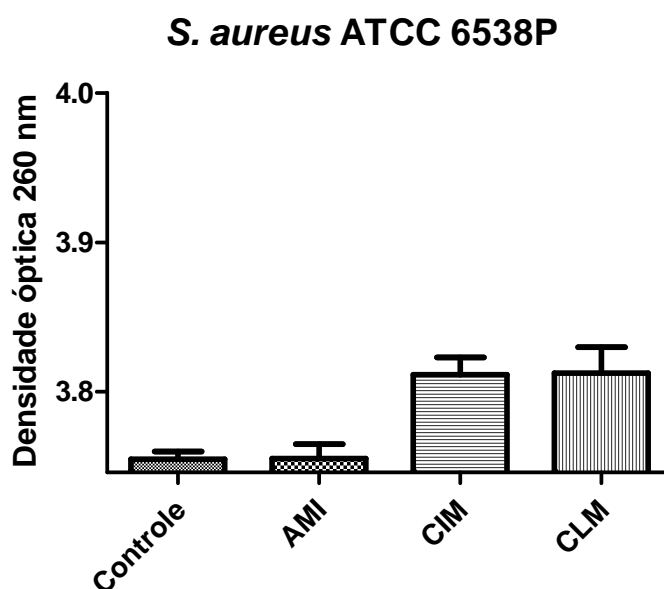


Os valores representam a média \pm EPM de três ensaios. * $p < 0.05$ comparado com o controle (sem tratamento). AMI (Amicacina 1,2 mg/mL). EDTA – ácido etilenodiaminotetracético (controle positivo da captação do cristal violeta). CIM (2,5 mg/mL). CLM (5 mg/mL).

5.2.9.1.2 Liberação de ácidos nucleicos

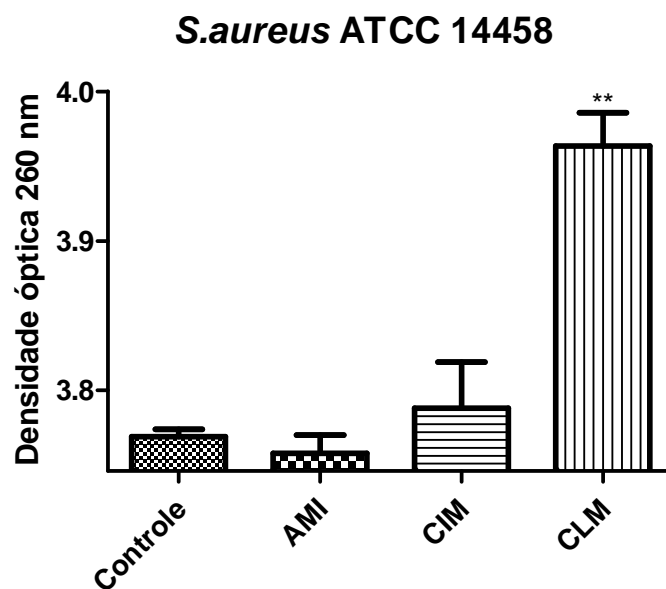
A liberação de ácidos nucleicos pelas cepas padrão de *S. aureus* expostas a CIM e CLM de OEHc podem ser visualizadas nos gráficos 23 e 24, onde os valores são expressos em densidade óptica (DO) a 260 nm. A CIM de OEHc foi capaz de promover aumento de perda de material intracelular em 57,5% e 50% pelas cepas *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458, respectivamente.

Gráfico 23: Liberação de ácidos nucleicos pela cepa *S. aureus* ATCC 6538P exposta a OEHc.



Os valores representam a média \pm EPM de três ensaios. * $p < 0.05$ comparado com o controle (sem tratamento). AMI (Amicacina 1,2 mg/mL). CIM (2,5 mg/mL). CLM (2,5 mg/mL).

Gráfico 24: Liberação de ácidos nucleicos pela cepa *S. aureus* ATCC 14458 exposta a OEHc.

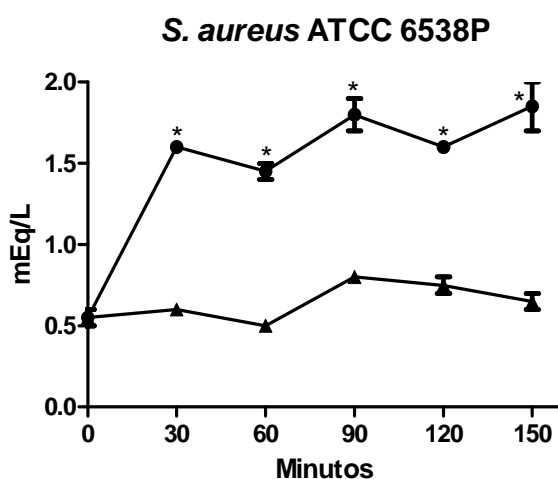


Os valores representam a média \pm EPM de três ensaios. * $p < 0.05$ comparado com o controle (sem tratamento). AMI (Amicacina 1,2 mg/mL). CIM (2,5 mg/mL). CLM (5 mg/mL).

5.2.9.1.3 Efluxo de íons potássio (K^+)

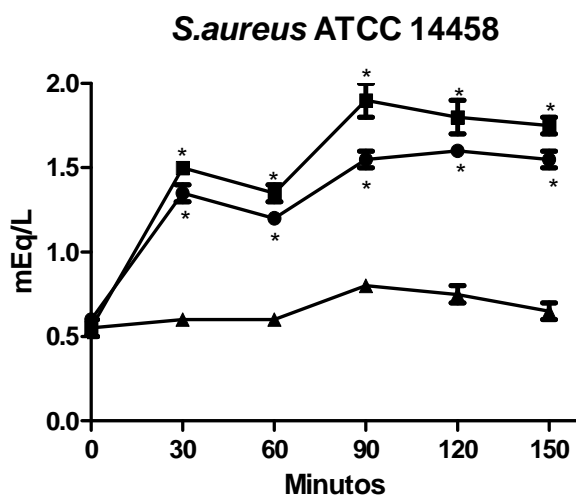
O OEHc, em CIM e CLM, foi capaz de determinar aumento, estatisticamente significativo, no efluxo de íons potássio pelas cepas *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458 (Gráfico 25 e 26), o que indica a ocorrência de alteração na permeabilidade da membrana celular.

Gráfico 25: Efluxo de íons potássio (K^+) pela cepa *S. aureus* ATCC 6538P.



Os valores representam a média \pm EPM de três ensaios. * $p < 0.05$ comparado com o controle sem tratamento (▲). (CIM = CLM = 2,5 mg/mL) (●). mEq/L (miliequivalente por litro).

Gráfico 26: Efluxo de íons potássio (K^+) pela cepa *S. aureus* ATCC 14458.



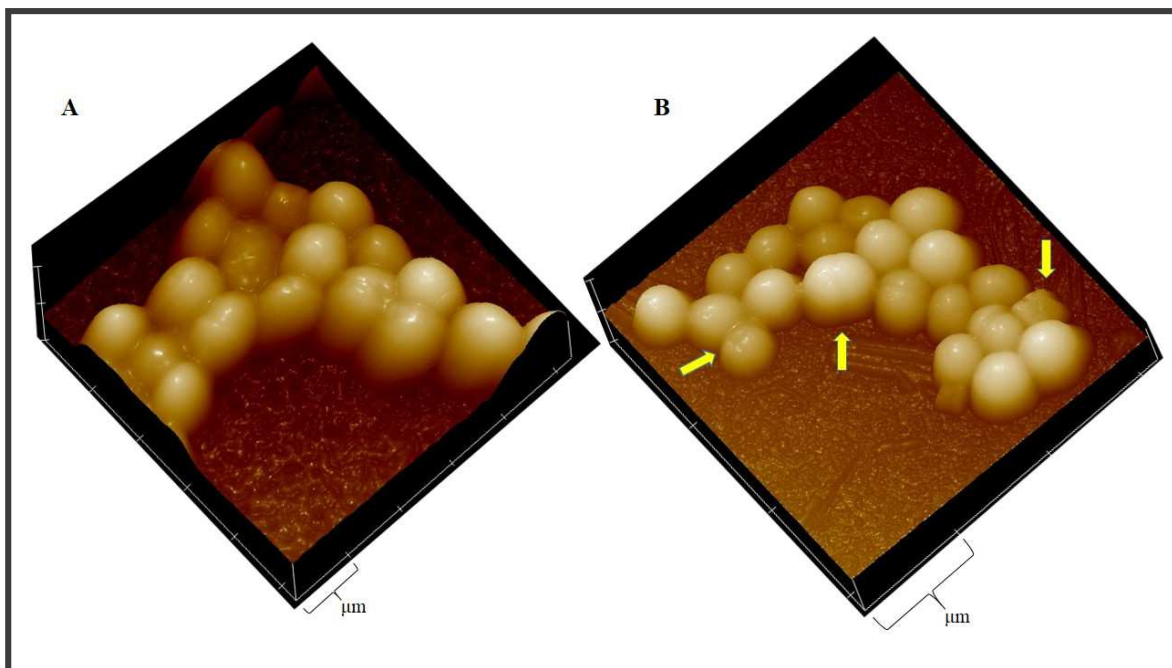
Os valores representam a média \pm EPM de três ensaios. * $p < 0.05$ comparado com o controle sem tratamento (▲). CIM (2,5 mg/mL) (●). CLM (2,5 mg/mL) (■). mEq/L (miliequivalente por litro).

5.2.9.2 Alterações na morfologia bacteriana

5.2.9.2.1 Microscopia de força atômica

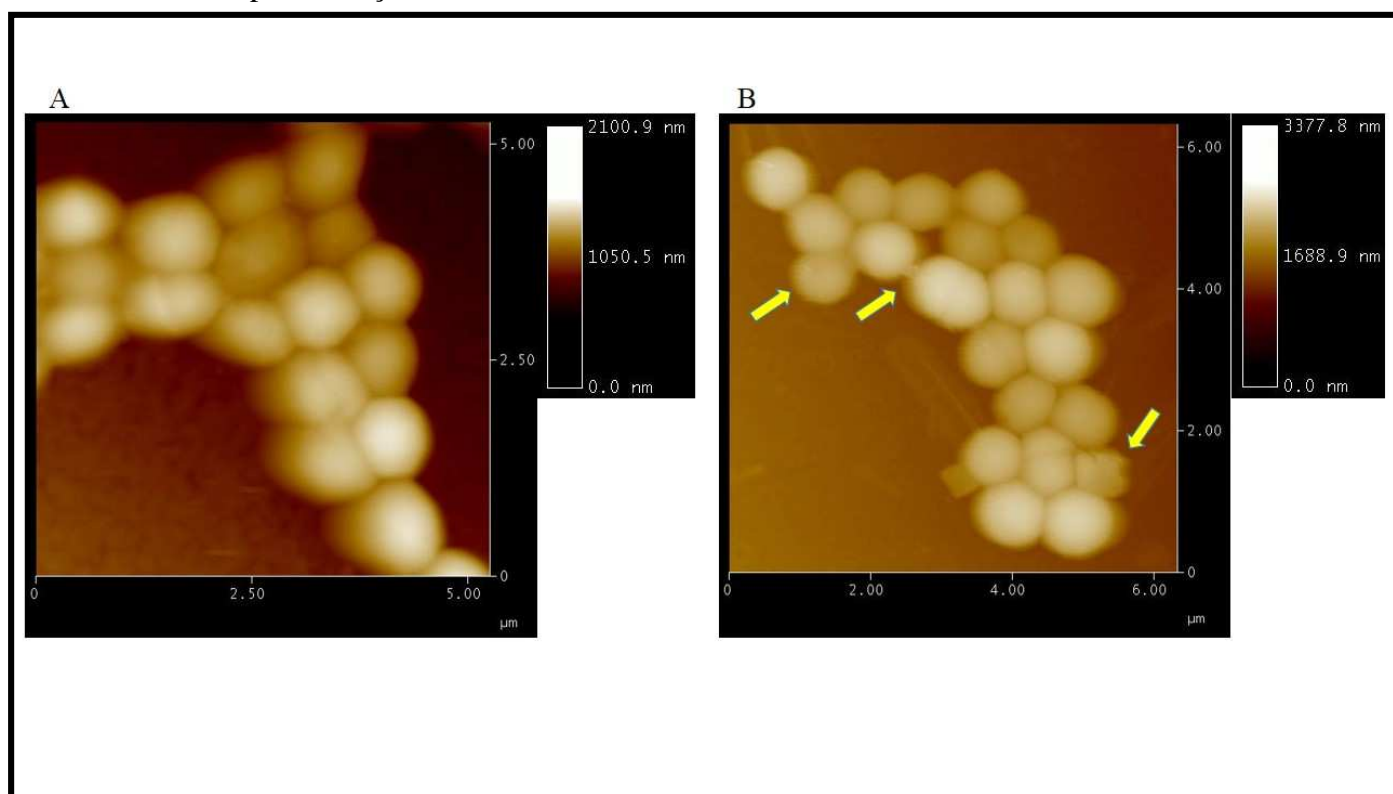
Uma cultura de *S. aureus* ATCC 6538P tratada com o OEHC em concentração igual a CIM e CLM (2,5 mg/ml) e uma cultura-controle preparada de forma semelhante, sem tratamento foram examinadas em microscópio de força atômica (VEECO/DI-CP-2) (Figura 22 e 23). Nessa concentração o OEHC é capaz de causar danos no envoltório celular de *S. aureus* ATCC 6538P (setas amarelas), com pode ser visualizado pela presença de sulcos na superfície, além de uma variação na altura e na rugosidade das células quando comparado ao controle sem tratamento, o que sugere a ocorrência de perda de material citoplasmático. A escolha da cepa de *S. aureus* ATCC 6538P para o experimento de microscopia de força atômica se deve ao fato da mesma apresentar maior sensibilidade ao OEHC, facilitando uma melhor visualização de possíveis alterações em sua morfologia.

Figura 22 – Alterações na morfologia de *S. aureus* ATCC 6538P detectada por microscopia de força atômica do tipo 3D (altura).



A – Controle não exposto ao OEHC (tamanho da digitalização: 5,254 µm; taxa de varredura: 1,001 Hz; escala de dados: 708,0 nm). B - *S. aureus* ATCC 6538P exposto a 2,5 mg/mL de OEHC (tamanho da digitalização: 6,333 µm; taxa de varredura: 1,001 Hz; escala de dados: 1.187 nm).

Figura 23 – Alterações na morfologia de *S. aureus* ATCC 6538P detectada por microscopia de força atômica.



A – Controle não exposto ao OEHC (tamanho da digitalização: 5,254 μm; taxa de varredura: 1,001 Hz; escala de dados: 2.101 nm). B - *S. aureus* ATCC 6538P exposto ao OEHC (2,5 mg/mL) (tamanho da digitalização: 6,333 μm; taxa de varredura: 1,001 Hz; escala de dados: 3.378 nm).

5.2.10 Detecção do efeito de concentrações sub-inibitórias do OEHc na expressão de fatores de virulência microbiana do *S. aureus*

5.2.10.1 Atividade da catalase

A tabela 6 apresenta o efeito da exposição a concentrações sub-inibitórias de OEHc sobre a expressão de catalase por cepas OSSA, sendo os valores expressos em escores de intensidade de reação. A exposição ao OEHc determinou uma redução na atividade catalase das cepas *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458.

Tabela 6 - Atividade catalase de cepas de *S. aureus* após exposição a concentrações sub-inibitórias de OEHc.

	Intensidade da atividade catalase					
	OEHc (mg/mL)				Controles	
	1,25	0,625	0,312	0,156	C+	C-
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	+	+	+++	+++	+++	-
<i>S. aureus</i> ATCC 14458	+	++	++	+++	+++	-

Volume de cultura utilizado: 100µL; Volume de peróxido de hidrogênio 3% utilizado: 100µL; Intensidade da reação: (+) Fraca; (++) Moderada; (+++) Intensa; (-) Sem atividade; C+ (Cultura sem tratamento prévio com OEHc); C- (*Escherichia coli* ATCC 10536).

5.2.10.2 Atividade da coagulase

A tabela 7 apresenta o efeito da exposição a concentrações sub-inibitórias de OEHC sobre a expressão de coagulase pelas cepas *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458. A expressão da atividade coagulase das cepas testadas não foi inibida pela exposição a concentrações sub-inibitórias do OEHC.

Tabela 7 - Atividade coagulase de cepas de *S. aureus* após exposição a concentrações sub-inibitórias de OEHC.

	Atividade coagulase					
	OEHC (mg/mL)				Controles	
	1,25	0,625	0,312	0,156	C+	C-
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	+	+	+	+	+	-
<i>S. aureus</i> ATCC 14458	+	+	+	+	+	-

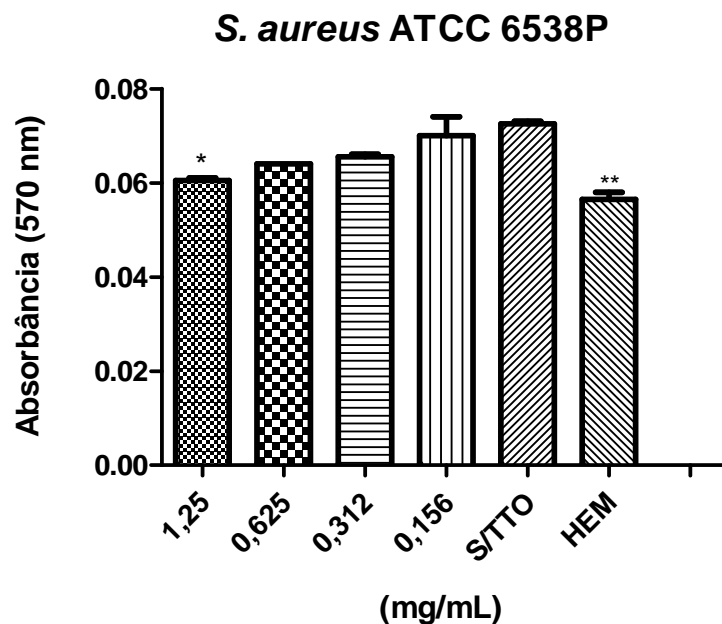
Volume de cultura utilizado: 20uL; Reação da coagulase: (+) positiva; (-) negativa; C+ (Cultura sem tratamento prévio com OEHC); C- (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228).

5.2.10.3 Atividade hemolítica

Os gráficos abaixo mostram o efeito da exposição a concentrações sub-inibitórias de OEHc sobre a expressão de hemolisinas pelas cepas *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458. Os valores são expressos em absorbância a 570 nm.

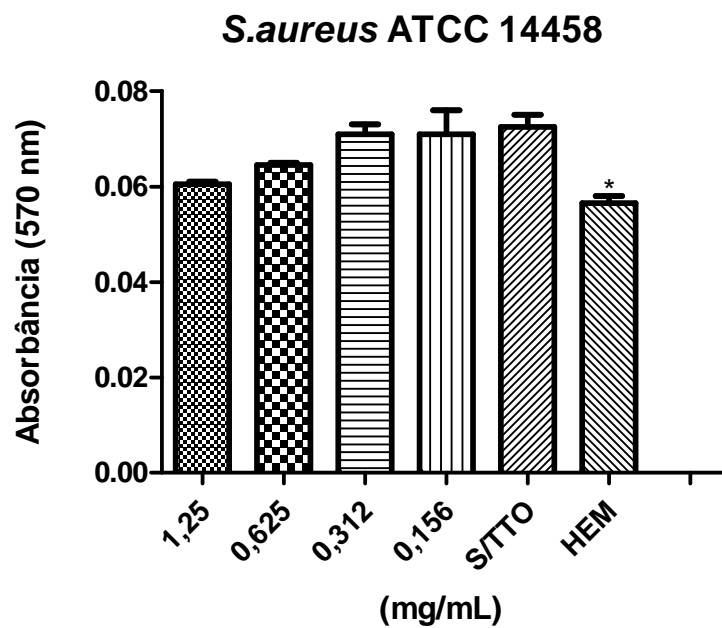
Uma concentração sub-inibitória igual a 1/2X CIM de OEHc foi capaz de reduzir significativamente a atividade hemolítica da cepa *S. aureus* ATCC 6538P (Gráfico 27). Para o *S. aureus* ATCC 14458 não foi constatada redução nessa atividade em nenhuma das concentrações testadas (Gráfico 28).

Gráfico 27: Atividade hemolítica de *S. aureus* ATCC 6538P após exposição a concentrações sub-inibitórias de OEHc.



Os valores representam a média \pm EPM de três ensaios. * $p < 0.05$ comparado com o controle sem tratamento (S/TTO). S/TTO (Cultura não exposta as concentrações sub-inibitórias do OEHc). HEM (Suspensão de hemácias não exposta as culturas tratadas).

Gráfico 28: Atividade hemolítica de *S. aureus* ATCC 14458 após exposição a concentrações sub-inibitórias de OEHC.



Os valores representam a média \pm EPM de três ensaios. * $p < 0.05$ comparado com o controle sem tratamento (S/TTO). S/TTO (Cultura não exposta as concentrações sub-inibitórias do OEHC). HEM (Suspensão de hemácias não exposta as culturas tratadas).

5.2.10.4 Atividade lipolítica

A tabela 8 apresenta o efeito da exposição a concentrações sub-inibitórias de OEHC sobre a expressão de enzimas lipolíticas pelas cepas *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458, sendo os valores expressos em milímetros. Essa exposição inibiu a expressão da atividade lipolítica (ausência de formação dos halos de lipólise) por *S. aureus* ATCC 6538P, mas não determinou qualquer inibição na atividade da cepa *S. aureus* ATCC 14458.

Tabela 8 - Atividade lipolítica de cepas de *S. aureus* após exposição a concentrações sub-inibitórias de OEHC.

	Diâmetro do halo de lipólise (mm)*				
	1,25	0,625	0,312	0,156	Controle
					C+
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	-	-	-	-	10
<i>S. aureus</i> ATCC 14458	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5

Volume de cultura aplicado em cada poço: 25uL; Tamanho do poço: 6mm; (*) Média dos halos de lipólise (mm) de três ensaios; (-) Sem atividade; C + (Cultura sem tratamento prévio com OEHC).

5.2.10.5 Atividade da DNase

A tabela 9 apresenta o efeito da exposição a concentrações sub-inibitórias de OEHC sobre a expressão de DNase por cepas OSSA. Nenhuma das concentrações utilizadas foi capaz de inibir a ação dessa enzima.

Tabela 9 - Atividade da DNase de cepas de *S. aureus* após exposição a concentrações sub-inibitórias de OEHC.

	Atividade DNase				Controle
	OEHC (mg/mL)				
	1,25	0,625	0,312	0,156	C+
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> ATCC 14458	+	+	+	+	+

(+) presença de atividade DNase - halo opaco ao redor das do crescimento bacteriano, após a adição de HCl 1%. (-) Ausência de atividade; C+ (Cultura sem tratamento prévio com OEHC).

5.2.11 Ensaio da influência de diferentes valores de pH na atividade antimicrobiana do OEHC.

Os resultados obtidos para o efeito do pH na atividade antimicrobiana do OEHC sobre cepas OSSA são apresentados na tabela 10. Podemos constatar que a ação antimicrobiana do OEHC não é influenciada por pH menor que 7, no entanto valores de pH maiores que 7 são capazes de potencializar a eficiência do OEHC.

Tabela 10 – Efeito do pH na atividade antimicrobiana do OEHC sobre cepas de *S. aureus*.

Ph	Microrganismo	
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	<i>S. aureus</i> ATCC 14458
	Concentração inibitória mínima (mg/mL)*	
5,5	2,5	2,5
6,0	2,5	2,5
6,5	2,5	2,5
7,0	2,5	2,5
7,5	1,25	2,5
8,0	1,25	1,25
8,5	1,25	1,25
9,0	1,25	1,25

*Menor concentração do OEHC capaz de inibir completamente o crescimento microbiano determinado através da inspeção visual. Volume de OEHC aplicado em cada poço da microplaca: 20 µL.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliada a atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído das cascas de frutos de *H. courbaril* L. (OEHc) com determinação da CIM, da CLM, do efeito do tempo de exposição na viabilidade microbiana, do efeito modulador na eficiência de antibióticos de uso clínico, do efeito do tempo de exposição a associações OEHc-Oxacilina na viabilidade microbiana e da interferência na expressão de fatores de virulência microbianos. Foi estudado também o mecanismo de ação antimicrobiano do OEHc.

O OEHc obtido por hidrodestilação (CRAVEIRO, 1981) apresentou-se como um óleo fino de cor verde claro e um forte odor amadeirado. O rendimento da extração foi de 0,052%. Aguiar *et al.* (2010) utilizando um aparelho de Clevenger modificado por Gottlieb, obtiveram um rendimento de cerca de 0,041% em extrações de óleo essencial da casca de frutos da *Hymenaea courbaril* L, este dado reforça o baixo rendimento encontrado no presente estudo e comprova que algumas cascas e materiais mais lenhosos apresentam pequenas quantidades de óleos essenciais.

Em estudo envolvendo a extração de óleos essenciais a partir de cascas e de folhas de canela do Ceilão (*Cinnamomum verum* Presl, sin. *C. zeylanicum* Bl.), também foi evidenciado um baixo rendimento médio para o OE de casca (0,2%), quando comparado ao OE de folhas (2,0%) (KOKETSU *et al.*, 1997).

A caracterização química do OEHc identificou 23 diferentes constituintes, todos da classe dos sesquiterpenos, sendo o germacreno-D (17,61%), o (Z)- β -cariofileno (17,56%) e o óxido de cariofileno (14,65%) os constituintes majoritários.

O odor característico amadeirado do OEHc pode ser atribuído a seus constituintes majoritários. O cariofileno é um constituinte presente em outras espécies e apresenta odor característico amadeirado e picante. É encontrado na natureza como uma mistura de isômeros (o isocariofileno, alfa-cariofileno (humuleno) e beta cariofileno), sendo descrito na literatura suas atividades espasmolítica, anestésica, antiinflamatória, citoprotetor gástrico e anticarcinogênica (CABO *et al.*, 1986; ZHENG, KENNEY; LAM, 1992; MARTIN *et al.*, 1993; TAMBE *et al.*, 1996; GHELARDINI *et al.*, 2001; GRAMOSA, 2001).

O sesquiterpeno germacreno D, outro constituinte majoritário do OEHc está presente em diversas espécies vegetais e funciona como sinalizador fundamental no relacionamento de plantas e insetos, além de possuir atividade antimicrobiana

(BIAVATTI *et al.*, 2001; DEUSCHLE, 2003; PETRAKIS *et al.*, 2005; DEUSCHLE *et al.*, 2007). O óxido de cariofileno apresenta atividades anticarcinogênica, antimicrobiana para o *S. aureus* e inibidora da germinação e crescimento de *Lactuca sativa*, entre outras (ULUBELEN *et al.*, 2000; SOUSA; CITÓ; LOPES, 2006; DIAS; MIGUEL; MIGUEL, 2009).

Aguiar *et al.* (2010) isolaram do óleo essencial extraído dos frutos da *H. courbaril*, somente compostos sesquiterpenóides, sugerindo que os compostos monoterpênicos podem ser volatilizados durante o amadurecimento dos frutos. Khoo, Oehlschlager e Ourisson (1973) isolaram hidrocarbonetos sesquiterpênicos da resina presente nas frutos da *H. courbaril* L. Na resina bruta foram identificados o ciclosativeno, cariofileno, α -himachaleno, selina-4(14),7(II)-dieno como componentes majoritários e β -bourboneno, calareno, selina-4(14),7-dieno, humuleno, δ -cadineno, α -calacoreno e α -muuroleno como componentes minoritários.

Na resina da folha da *H. courbaril* variação *stilbocarpa* (Hayne) Lee e Langenheim encontrada no México e no Brasil foram encontrados sesquiterpenos como (0,4-1,4%) α -cubebeno, (2,8-6,8%) α -copaeno, (1,5-7,5%) cipereno, (2,6-8,2%) β -copaeno, (15,8-68,1%) cariofileno, (4,0-12,0%) β -humuleno, (1,9-3,7%) γ -muuroleno, (8,4-17,2%) α - e β -selineno, traços de γ -cadineno, (2,1-3,4%) δ -cadineno e (0,1-30,7%) óxido de cariofileno (MARTIN; LANGENHEIM; ZAVARIN, 1972; MARTIN; LANGENHEIM; ZAVARIN, 1974; ARRHENIUS; LANGENHEIM, 1983).

A atividade antimicrobiana de compostos terpênicos, ainda não possui um mecanismo de ação totalmente elucidado, mas parece estar associado ao seu caráter lipofílico, determinando seu acúmulo nas membranas microbianas e consequente perda de energia pelas células (CONNER, 1993; SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995).

O teste de disco-difusão pode ser utilizado como um ensaio de triagem para o potencial antimicrobiano de OE. A partir dos resultados iniciais obtidos é que será executada uma sequência de ensaios microbiológicos que permitem a obtenção de maiores informações (HSIEH; MAU; HUANG, 2001; LIMA; YUNES; CALIXTO, 2001; GAYOSO *et al.*, 2004).

Na avaliação do potencial antimicrobiano pelo teste de disco-difusão, o OEHC foi capaz de inibir, com a formação de halo de inibição de crescimento microbiano, as duas cepas de *S. aureus* sensíveis a oxacilina (cepas OSSA) testadas (*S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458), mas não apresentou qualquer inibição sobre o crescimento das cepas ORSA (oxacilina resistentes), das cepas Gram negativo e

da cepa de levedura testadas. A discreta diferença apresentada para a sensibilidade das cepas OSSA pode estar relacionada as suas características genéticas.

Fernandes, Santos e Pimenta (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana da seiva liofilizada e de extratos hidroalcoólico e aquoso da *H. courbaril* sobre cepas de referência e cepas isoladas da saliva de crianças, e constataram uma inibição de 36,6 %, 63,3% e 25% das cepas Gram-positivo testadas, respectivamente.

Da mesma forma, Gonçalves, Alves Filho e Menezes (2011) avaliaram o extrato hidroalcoólico da casca do tronco da *H. courbaril* e evidenciaram atividade inibitória apenas para a cepa *Escherichia coli* enteropatogênica. Em contrapartida, uma análise de extratos brutos etanólicos da casca e da polpa farinácea da *H. courbaril* conduzida por Martins *et al.* (2010), mostrou que o extrato da polpa farinácea apresenta atividade antibacteriana principalmente sobre bactérias Gram-positivo. Entretanto, o extrato da casca não foi capaz de inibir o crescimento de nenhum dos patógenos testados.

A maioria dos estudos que investigam a ação dos óleos essenciais sobre bactérias demonstra que os óleos essenciais são mais ativos sobre as cepas Gram-positivo do que sobre as Gram-negativo. A menor sensibilidade das espécies Gram-negativo pode ser atribuída a presença da membrana externa, restringido a entrada de compostos hidrofóbicos (BURT, 2004).

A técnica de difusão em meio sólido são descritas para avaliar a sensibilidade bacteriana a antimicrobianos, levando em conta que o tamanho da zona de inibição é determinado pela sensibilidade microbiana e solubilidade e estrutura molecular do antimicrobiano. É uma técnica qualitativa, enquanto que as técnicas para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) são quantitativas, possibilitando conhecer qual a menor concentração necessária para inibir o crescimento bacteriano (MARTINS *et al.*, 2010).

Os dados obtidos para a CIM e CLM do OEHC apresentaram o mesmo perfil de inibição observado na avaliação do potencial antimicrobiano, utilizando a técnica de difusão em ágar, onde houve apenas a inibição de *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458. Os valores de CIM do OEHC foram de 2,5 mg/mL para ambas as cepas. Em relação a CLM, o OEHC foi capaz de inviabilizar *S. aureus* ATCC 6538P na mesma concentração encontrada para a CIM (2,5 mg/mL) e *S. aureus* ATCC 14458 em uma concentração igual a 2X CIM (5 mg/mL). Não foram constatadas diferenças entre os

valores de CIM obtidos visualmente (ausência de turvação), com aqueles obtidos por medida de absorbância a 620 nm.

Os valores de CIM da Oxacilina (OXA) foram determinados no presente estudo, pelo método de microdiluição em caldo de cultura, para as cepas OSSA, *S. aureus* ATCC 6538P (0,39 µg/mL) e *S. aureus* ATCC 14458 (3,125 µg/mL). De acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute – Clsi* (2003b) valores de CIM $\geq 4,0$ µg/mL são característicos de cepas ORSA, o que indica que as cepas *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458 se tratam de cepas OSSA. Os valores de CIM da OXA foram determinados para posterior uso em estudos da ação moduladora do OEHC sobre a atividade de antibióticos de uso clínico.

O conhecimento da cinética de crescimento microbiano fornece informações importantes para a realização de experimentos microbiológicos e de determinação do mecanismo de ação, pois avaliam a taxa de crescimento bacteriano e estabelecem os tempos de incubação necessários para cada ensaio (SILVA, 2010).

Culturas de *S. aureus* ativadas *overnight* atingem as fases de crescimento exponencial e estacionário após 2 horas e 12 horas de incubação, respectivamente.

A atividade bactericida de produtos naturais também podem ser avaliada através da realização de ensaios *in vitro* de tempo de morte. Este método, diferente dos ensaios de CIM e CLM, permite a determinação da cinética de morte microbiana (AIYEGORO; AFOLAYAN; OKOH, 2009).

A CIM (=CLM) do OEHC foi capaz de inviabilizar a cepa *S. aureus* ATCC 6538P após 8 horas de contato, sendo que nas duas primeiras horas, reduziu em 31,91% o crescimento celular. A CLM do OEHC para o *S. aureus* ATCC 14458 foi capaz de reduzir 20,56% do crescimento microbiano nas duas primeiras horas de exposição, eliminando as células viáveis após 24 horas. Quando em CIM, o OEHC manteve o crescimento de *S. aureus* ATCC 14458 inferior ao da cultura controle não tratada, por 48h, inibiu em 11,61% o crescimento nas duas primeira horas de contato, manteve estável por 6 horas e em seguida permitiu um aumento progressivo, de até 55,17%, em relação ao inóculo inicial, ao final do período de exposição

Os resultados do estudo de cinética de morte bacteriana apresentados por Leite (2007) demonstram que a exposição por longos intervalos de tempos aos óleos essenciais promove uma acentuada taxa da morte microbiana.

Para o estudo do efeito do OEHC nas diferentes fases de crescimento (exponencial e estacionários) das cepas OSSA testadas foram utilizadas concentrações iguais a 1X e 2X a CIM do OEHC.

Células microbianas em fase logarítmica são mais sensíveis a fatores de estresse que aquelas em fase estacionária (PHILLIPS; DUGGAN, 2002; KHEADR *et al.*, 2004; SONG; HU; ZHOU, 2010). Em nosso estudo, constatamos que as cepas OSSA testadas são mais sensíveis a concentrações inibitórias (CIM) e letais (CLM) de OEHC no início da fase de crescimento exponencial, em metabolismo ativo, e que essa suscetibilidade é dependente da concentração. Nossos resultados sugerem que a atividade antimicrobiana do OEHC pode ser determinada por mais de um mecanismo de ação, já que cepas em fase de crescimento estacionário também apresentam suscetibilidade a esse OE.

Células bacterianas na presença de CLO tem seu crescimento inibido devido a parada da síntese protéica. Nossos estudos mostram que as cepas OSSA testadas são mais sensíveis ao OEHC quando na presença de CLO. Confirmando os resultados encontrados para a ação do OEHC nas diferentes fases de crescimento (exponencial e estacionária), de que a ação antimicrobiana do OEHC pode estar associada a mais de um mecanismo de ação. Essa maior suscetibilidade do OEHC na presença do CLO, também pode estar relacionada com a maior e mais rápida entrada do CLO na célula bacteriana devido a ação do OEHC sobre os envoltórios celulares, constatada pela maior captação de cristal violeta, perda de material citoplasmático e alteração da morfologia bacteriana.

Burt (2004) sugere que o mecanismo de ação dos óleos essenciais sobre bactérias Gram-positivo ocorre pela destruição da parede celular e da membrana citoplasmática dos microrganismos, resultando na liberação e coagulação dos compostos do citoplasma. Em estudo com o ácido anacárdico, foi evidenciada sua atividade bactericida sobre cepas de *S. aureus* metilicina resistentes em qualquer estágio de crescimento, mesmo quando a divisão celular foi interrompida pela ação do cloranfenicol (MUROI; KUBO, 1996).

Os óleos essenciais podem modular a atividade de antimicrobianos, seja através de um efeito antagônico ou sinérgico. Assim, o uso concomitante de produtos vegetais e medicamentos convencionais (antibióticos) merece um olhar cuidadoso (ROCHA, 2012).

O OEHC foi capaz de modular a atividade antimicrobiana de diferentes antibióticos de uso clínico através de ação sinérgica ou antagônica, e em algumas

situações não interferiu na ação dos antimicrobianos (ATM) isoladamente. Para a cepa *S. aureus* ATCC 6538P foram constatados: 21,44% de sinergismo (AMI, NET e CLA), 57,14 % de indiferença (OXA, GEN, CRX, CLO, P/T, ERT, CIP e VAN), e 21,42 % de antagonismo (CFO, MEM e CLI). Para a cepa *S. aureus* ATCC 14458 foram constatados: 57,14 % de sinergismo (OXA, AMI, CRX, CLO, NET, MEM, CLA e VAN), 35,72% de indiferença (GEN, P/T, ERT, CIP e CLI,) e 7,14% de antagonismo (CFO). As associações com AMI, NET e CLA foram as únicas com efeito sinérgico para ambas as cepas testadas. A GEN, P/T e o ERT, quando em associações com OEHC, não tiveram sua ação alterada e a associação OEHC-CFO foi a única com ação antagônica.

Van Vuuren, Suliman e Viljoen (2009) estudaram a modulação de diferentes concentrações de óleos comerciais de *Melaleuca alternifolia* (Tea tree), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Mentha piperita* (hortelã pimenta) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) associadas com ciprofloxacina sobre linhagens de *S. aureus* e *Krebsiella pneumoniae*, e com anfotericina B sobre linhagens de *Candida albicans*. Os resultados encontrados mostraram um perfil de modulação predominantemente antagônico para *R. officinalis* sobre *S. aureus* e *C. albicans* e sinérgico sobre *K. pneumoniae*. Para as associações contendo *M. alternifolia* verificou-se uma frequência maior para antagonismo em relação ao sinergismo. Aquelas contendo *T. vulgaris* foram antagônicas sobre todas as cepas testadas enquanto as que apresentavam *M. piperita* exerceram sinergismo sobre *S. aureus*; antagonismo sobre *C. albicans* e sinergismo e antagonismo sobre *K. pneumoniae*, dependente da concentração utilizada.

Zago *et al.* (2009) avaliando a modulação de óleos essenciais na atividade de ATM sobre linhagens de *S. aureus* e *E. coli* isoladas de espécimes clínicos humanos, verificaram que *S. aureus* foi mais suscetível às associações OE-ATM e que os óleos de capim cidreira e hortelã exercem efeito sinérgico na ação de oito e sete ATM testados, respectivamente. Considerando os aspectos de similaridade da parede celular das espécies do grupo Gram positivo e sua maior sensibilidade aos óleos essenciais, Silva (2010) considera que essa maior susceptibilidade se deve à falta de uma barreira externa como no caso das cepas Gram negativo.

Associações de óleos essenciais e de seus compostos isolados (eugenol, timol, cavacrol, entre outros) e com antimicrobianos, como o CLO, mostraram resultados promissores sobre bactérias Gram-positivo e Gram-negativo sensíveis e resistentes a antibióticos em vários estudos de avaliação de atividade sinérgica

(GALLUCCI *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006; HEMAISWARYA E DOBLE, 2009; ZAGO *et al.*, 2009; PALANIAPPAN E HOLLEY, 2010; DUARTE *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2012; RIBEIRO, VELOZO E GUIMARÃES, 2013).

O ensaio de *checkerboard* por microdiluição em microplaca pode ser utilizado para testar a atividade antimicrobiana de associações de diferentes substâncias sobre um agente microbiano, que pode ser mensurada pelo cálculo das concentrações inibitórias fracionais das associações testadas (ORHAN *et al.*, 2005). No presente estudo também foi determinado a ocorrência de modulação da atividade da OXA pela ação do OEHc. Para isso, foram construídos gráficos do tipo isobograma, utilizando os valores de CIF (Concentração Inibitória Fracionada) e calculado os valores de ICIF (Índice da Concentração Inibitória Fracionada) das associações.

Para o efeito modulador do OEHc nas associações com OXA, foram constatadas ações sinérgicas (40,63%), indiferentes (50%) e antagônicas (9,73%) sobre as cepas OSSA testadas. Os valores de ICIF foram calculados para as associações capazes de inibir o crescimento visual das cepas OSSA nos poços das microplacas. Os valores de ICIF variaram de 0,122 a 0,75, indicando a ocorrência de uma redução de até 16 vezes nas CIM de OEHc e OXA para as cepas de *S. aureus* testadas.

Podemos também constatar nos isobogramas que a OXA e o OEHc interagem de forma sinérgica ou indiferente, dependendo da concentração utilizada para ambas as substâncias. As associações nas quais ocorre interação indiferente podem ser vistas como pontos entre as duas linhas tracejadas CIF (0,5; 0,5) e CIF (1; 1), as situações de sinergismo são visualizadas como pontos abaixo da linha tracejada CIF (0,5; 0,5) e no efeito antagônico os pontos encontram-se situados acima da linha tracejada CIF (1; 1).

O *S. aureus* ATCC 6538P apresentou dois pontos na zona de indiferença e dois pontos na zona de sinergismo. O *S. aureus* ATCC 14458 apresentou uma melhor resposta a associação do OEHc-OXA, apresentando um efeito sinérgico predominante, com a presença de três pontos na zona de sinergismo.

Bonapace *et al.* (2002) analisaram os efeitos das combinações de antibióticos sobre dez cepas de *Acinetobacter baumannii* pelos métodos de *checkerboard*, curva efeito do tempo de exposição e E-teste e encontraram que uma taxa de concordância entre resultados de 63%. Novy *et al.* (2011) em seu estudo, obtiveram ICIF de 0,418 para associações de um flavonoide, constituinte da *Scutellaria* spp., com oxitetraciclina e tetraciclina, sobre *S. aureus*.

O ensaio do tempo de morte pode ser realizado para identificar combinações sinérgicas entre substâncias sobre um isolado bacteriano e para confirmar os resultados obtidos no teste do *checkerboard*. A taxa de mortalidade é determinada pela contagem de células viáveis (UFC/mL) em relação ao tempo e o sinergismo é definido como uma diminuição $\geq 2\log_{10}$ UFC/mL determinada pela associação (JAYARAMAN *et al.*, 2010).

Na avaliação da influência do tempo de exposição a OEHc-OXA foram testadas aquelas com as menores concentrações capazes de inibir o crescimento visual das cepas nos poços das microplacas, mesmo que estas apresentassem efeito sinérgico ou indiferente. Para *S. aureus* ATCC 6538P foram utilizadas as associações: 0,156 mg/mL de OEHc + 0,19 μ g/mL de OXA), 0,625 mg/mL de OEHc + 0,097 μ g/mL de OXA e 0,312 mg/mL de OEHc + 0,097 μ g/mL de OXA. Para a cepa *S. aureus* ATCC 14458 foram testadas as associações: 0,156 mg/mL de OEHc + 0,19 μ g/mL de OXA, 0,312 mg/mL de OEHc + 0,19 μ g/mL de OXA e 0,156 mg/mL de OEHc + 0,19 μ g/mL de OXA.

Foi observado que todas as associações OEHc-OXA foram capazes de inibir significativamente o crescimento microbiano das cepas de *S. aureus*, quando comparado a inibição determinada pelo OEHc e pela OXA isolados, confirmando os resultados obtidos pelo método de *checkerboard*. Para *S. aureus* ATCC 6538P, a associação que apresentou melhor atividade foi 0,156 mg/mL de OEHc + 0,19 μ g/mL de OXA, sendo esta capaz de inviabilizar seu crescimento em 8 horas de exposição. A cepa *S. aureus* ATCC 14458 foi inviabilizada pela ação de todas as associações em no máximo 6 horas de contato.

Betoni *et al.* (2006) relatam a ocorrência de sinergismo entre produtos naturais e antimicrobianos, verificando a presença de sinergismo entre extratos de plantas e antibióticos que tem como mecanismo de ação a inibição da síntese de protéica.

As substâncias presentes nos óleos essenciais apresentam capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana citoplasmática microbiana. Além disso, existem mecanismos de interação sinérgica entre óleos essenciais e antimicrobianos que inibem o metabolismo microbiano (LAMBERT *et al.*, 2001; SANTIESTEBAN-LÓPEZ; PALOU; LÓPEZ-MALO, 2007).

O OEHc foi capaz de promover um aumento na captação do cristal violeta em 44,17 e 41,39% para as cepas *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458,

respectivamente, indicando a ocorrência de danos no envoltório celular microbiano. Essa alteração na permeabilidade está relacionada com a capacidade de interação dos componentes de óleos essenciais com a membrana citoplasmática, podendo os mesmos se dissolverem na bicamada lipídica, alinhando-se entre as cadeias de ácidos graxos, desestabilizando assim a membrana e aumentando sua fluidez, resultando no incremento danoso de sua permeabilidade passiva (ULTEE *et al.*, 2000; ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002)

O aumento da liberação de ácidos nucléicos após a exposição das cepas OSSA ao OEHC confirma a ocorrência de danos no envoltório celular, constatada pelo aumento da captação do cristal violeta. A exposição das cepas *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458 a CIM de OEHC determinou aumento de 57,5% e 50% no extravasamento celular, respectivamente. O aumento no extravasamento celular quando a cepa *S. aureus* ATCC 14458 foi exposta a CLM de OEHC foi de 194%.

A ação de óleos essenciais sobre bactérias Gram-positivo e fungos parece ocorrer através do mecanismo de destruição da parede celular e da membrana citoplasmática resultando na liberação dos componentes citoplasmáticos (COX *et al.*, 2000).

No ensaio do efluxo de íons potássio, as cepas de *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458, apresentaram aumentos significativos na liberação dos íons a partir dos primeiros 30 minutos de exposição ao OEHC. Os valores de liberação de potássio se mantiveram acima dos verificados para o grupo controle durante todos os intervalos de tempo do experimento. O aumento do efluxo dos íons potássio sugere a ocorrência de danos no envoltório celular, confirmando nossos resultados, ou sobre proteínas de membrana responsáveis pela manutenção da homeostase bacteriana.

Os óleos essenciais, devido a seu caráter lipofílico tem preferência por estruturas do envoltório bacteriano, resultando em seu acúmulo nas membranas e dilatação, com aumento da fluidez e permeabilidade, levando a perturbação das proteínas incorporadas, com inibição da respiração e alteração do transporte iônico (TROMBETTA *et al.*, 2005).

A análise da morfologia bacteriana, por microscopia de força atômica, de células de *S. aureus* ATCC 6538P tratadas com o OEHC (2,5 mg/ml) mostrou danos no envoltório celular visualizados pela presença de sulcos na superfície, além de uma variação significativa na altura e na rugosidade das células quando comparado ao controle sem tratamento, o que sugere a ocorrência de perda de material citoplasmático.

Os efeitos prejudiciais na morfologia de membranas celulares do *S. aureus* ATCC 6538 também foram mostrados por Lv *et al.* (2011), quando esta cepa foi tratada com a associação de concentrações inibitórias mínimas dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum* e *Citrus bergamia*, sendo possível observar danos microestruturais, que causaram o aumento na permeabilidade das células e perda da integridade da membrana.

Hafedh *et al.* (2010) verificaram após 24 horas de tratamento, que o óleo essencial de *Mentha longifolia* foi capaz de promover danos menos importantes nas bactérias cocóides utilizadas no estudo (*Micrococcus luteus* NCIMB 8166 e *S. aureus* ATCC 25923) quando comparado aos bacilos (*E. coli* ATCC 35218 e *Salmonella typhimurium* LT2), com a presença de rugosidades sobre a superfície celular.

O alto potencial infeccioso do *S. aureus* não está restrito apenas à sua facilidade de multiplicação e disseminação nos tecidos, mas também à produção de moléculas com grande poder patogênico, que incluem enzimas e toxinas (KONEMAN *et al.*, 2001; BRAUNWALD *et al.*, 2002). Com isso, as linhagens do *S. aureus* produzem catalase, enzima que catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, para proteção de metabolitos bacterianos que se acumulam durante o metabolismo e também para a proteção durante a fagocitose (BLAIOTTA *et al.*, 2010).

Na detecção do efeito de concentrações sub-inibitórias do OEHC na expressão de fatores de virulência microbiana do *S. aureus*, foi constatado que o OEHC é capaz de reduzir parcialmente a atividade da enzima catalase pelas cepas de *S. aureus* testadas. O extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* MART. EX. HAYNE utilizado em concentrações de 1/2X e 1/4X da concentração inibitória mínima, não foi capaz de bloquear totalmente a atividade da catalase. Embora tenha sido observada uma redução na sua intensidade (LINHARES; XIMENES, 2011).

Entre as enzimas e toxinas extracelulares produzidas pelas cepas de *S. aureus*, a coagulase é a mais conhecida. Sua ação transforma a protrombina em trombina que, por sua vez, ativa a formação da fibrina, a partir do fibrinogênio, coagulando o plasma (Martins, 1999). Sabe-se que o coágulo produzido resulta no acúmulo de fibrina ao redor da célula bacteriana, isolando a área infectada e dificultando a ação dos mecanismos de defesa (TAKAICHI *et al.*, 1997).

Concentrações sub-inibitórias do OEHC na expressão da coagulase não foram capazes de inibir a expressão da coagulase, para nenhuma das concentrações testadas. Na avaliação de concentrações sub-inibitórias de extratos hidroalcoólicos de

Hymenaea stigonocarpa MART. EX. HAYNE sobre fatores de virulência do *S. aureus*, não foi observada a inibição da atividade da coagulase, quando comparada as culturas não expostas aos extratos, o que está em concordância com os resultados encontrados em nosso estudo (LINHARES; XIMENES, 2011).

A beta-hemolisina (esfingomielinase c) é secretada em meios de cultura como uma exotoxina de peso molecular de 35,000 e apresenta alta atividade hemolítica em eritrócitos de carneiro (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000). Em nosso estudo, concentrações sub-inibitórias do OEHC determinaram uma redução significativa na atividade da hemolisina de *S. aureus* ATCC 6538P, entretanto este efeito não foi observado para a cepa *S. aureus* ATCC 14458.

Linhares e Ximenes (2011) constataram uma redução na atividade da beta-hemolisina em 50% das cepas de *S. aureus* testadas quando expostas a ½ da CIM do extrato hidroalcoólico da *Hymenaea stigonocarpa* MART. EX. HAYNE. Contudo, na mesma concentração foi constatado um aumento dessa atividade em 50% das cepas.

A redução na atividade da enzima lipase se mostra importante pela capacidade de estar relacionada a processos infecciosos mais profundos, facilitando a disseminação microbiana no hospedeiro (STEHR *et al.*, 2003). Concentrações sub-inibitórias do OEHC foram capazes de inibir a expressão da lipase por *S. aureus* ATCC 6538P, mas não por *S. aureus* ATCC 14458.

Linhares e Ximenes (2011) constataram uma redução da atividade da lipase estafilocócica em 80% das cepas de *S. aureus* expostas a concentrações sub-inibitórias do extrato hidroalcoólico da *Hymenaea stigonocarpa* MART. EX. HAYNE.

A detecção da expressão de desoxirribonuclease (DNase), exoproteína que catalisa a hidrólise de ligações fosfodiéster na estrutura do DNA e é tão importante quanto à coagulase para a patogênese do estafilococo, é importante na diferenciação de cepas patogênicas das não patogênicas, (GÜNDOĞAN; CITAK; TURAN, 2006). Em relação a detecção do efeito de concentrações sub-inibitórias do OEHC na expressão da atividade da enzima DNase no presente estudo, o OEHC não foi capaz de inibir sua expressão pelas cepas OSSA, em nenhuma das concentrações de testadas.

O pH é um dos fatores mais importantes relativos a atividade de compostos com atividade antimicrobiana (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2000). Burt (2004), ao investigar as propriedades antibacterianas de óleos essenciais, destacou o fato de que determinadas condições físicas, tais como baixo pH, baixas temperaturas e baixos níveis de oxigênio causavam um aumento da atividade antimicrobiana.

No ensaio de estabilidade em diferentes pH, o OEHc demonstrou uma melhor atividade antimicrobiana em faixas de pH mais alcalinos, sendo obtidas concentrações inibitórias mínimas menores para *S. aureus* ATCC 6538P (CIM: 1,25mg/mL) na faixa de pH de 7,5 a 9,0 e para *S. aureus* ATCC 14458 (CIM: 1,25mg/mL) na faixa de pH de 8,0 a 9,0.

Santiesteban-López, Palou e López-Malo (2007) demonstraram que baixas faixas de pH melhoravam a ação do timol, carvacrol e eugenol sobre a cepa *S. aureus* ATCC 29213, quando associados a sorbato de potássio, verificando assim um resultado diferente do observado para o presente estudo.

Wen *et al.* (2003) ao avaliarem a atividade anti-*Listeria* de ácidos fenólicos em valores de pH entre 4,5 e 6,5, observaram o aumento da atividade antimicrobiana no maior pH ajustado.

Entretanto, deve-se considerar que na avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias puras, há um menor número de interferentes quando comparada à avaliação da atividade de amostras complexas, como no caso os óleos essenciais ou os extratos brutos de espécies vegetais. Com isto, o conhecimento das características físico-químicas, como solubilidade, carga iônica e massa molecular, possibilita evidenciar possíveis interferências que possam ser causadas por constituintes desconhecidos presentes nas amostras (GREENWOOD, 2007).

Os resultados do presente trabalho reportam o bom potencial antimicrobiano do OEHc, assim como demonstram um elevado efeito modulador da atividade antimicrobiana, com inibição parcial de fatores de virulência e com mecanismo de ação voltado para o envoltório microbiano de cepas de *Staphylococcus aureus* oxacilina sensíveis.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

O OEHc apresentou uma boa atividade antimicrobiana sobre cepas *S. aureus* sensíveis a oxacilina (OSSA).

O OEHc é capaz de modular positivamente a atividade de antibióticos de uso clínico sobre cepas OSSA, com boa taxa de sinergismo, conseguindo reduzir significativamente a CIM da OXA e o tempo necessário para inviabilizar a crescimento celular.

O mecanismo de ação do OEHc sobre cepas OSSA está associado a alterações no envoltório celular, e possivelmente, a inibição da síntese de macromoléculas.

Os resultados deste trabalho sugerem que o OEHc é uma promissora alternativa terapêutica para o desenvolvimento de fármacos com atividade antimicrobiana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. n. Ed. 4, 2007. ISSN 1932633219.

AGUIAR, J. C. et al. Chemical constituents and larvicidal activity of *Hymenaea courbaril* fruit peel. **Nat Prod Commun**, v. 5, n. 12, p. 1977-80, Dec 2010. ISSN 1934-578X (Print)
1555-9475 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21299135> >.

AGUIAR, J. S. et al. Antimicrobial activity of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 436-440, 2008. ISSN 0102-695X. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2008000300018&script=sci_arttext&tlng=es >.

AIYEGORO, O.; AFOLAYAN, A.; OKOH, A. In vitro antibacterial time kill studies of leaves extracts of *Helichrysum longifolium*. **J Med Pl Res**, v. 3, n. 6, p. 462-467, 2009.

ALVES, T. M. D. A. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000. ISSN 0074-0276.

AMARAL, J. F. D. Atividade antiinflamatória, antinociceptiva, e gastroprotetora do óleo essencial de *croton sonderianus* muell. arg. 2004.

ARRHENIUS, S. P.; LANGENHEIM, J. H. Inhibitory effects of *Hymenaea* and *Copaifera* leaf resins on the leaf fungus, *Pestalotia subcuticularis*. **Biochemical systematics and ecology**, v. 11, n. 4, p. 361-366, 1983. ISSN 0305-1978.

BANDONI, A.; CZEPACK, M. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil. **Editora Edufes, Vitória**, 2008.

BARON, E. J.; PETERSON, I. R.; FINEGOLD, S. M. **Diagnostic Microbiology**. 9 ed. Mosby, St. Louis:: 1994.

BASTOS, G. M. et al. In vitro determination of the antimicrobial potential of homemade preparations based on medicinal plants used to treat infectious diseases. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 113-120, 2011.

ISSN 2179-443X. Disponível em: < http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/view/1324/1057 >.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493, 1966. ISSN 0002-9173.

BETONI, J. E. C. et al. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 4, p. 387-390, 2006. ISSN 0074-0276.

BIAVATTI, M. et al. Chemistry and bioactivity of *Raulinoa echinata* Cowan, an endemic Brazilian Rutaceae species. **Phytomedicine**, v. 8, n. 2, p. 121-124, 2001. ISSN 0944-7113.

BLAIOTTA, G. et al. Diversity of *Staphylococcus* species strains based on partial kat (catalase) gene sequences and design of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay for identification and differentiation of coagulase-positive species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 1, p. 192-201, 2010. ISSN 0095-1137.

BONAPACE, C. R. et al. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 44, n. 4, p. 363-366, 2002. ISSN 0732-8893.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 4, p. 933-951, 2001. ISSN 0893-8512.

BRAGA, F. C. et al. Screening Brazilian plant species for in vitro inhibition of 5-lipoxygenase. **Phytomedicine**, v. 6, n. 6, p. 447-452, 2000. ISSN 09447113. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10715848> >.

BRAGA, P. C.; RICCI, D. Atomic force microscopy: application to investigation of *Escherichia coli* morphology before and after exposure to cefodizime. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 18-22, 1998. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC105449/> >.

BRAUNWALD, E. et al. **Harrison: medicina interna, 15ª edição; Harrison's principles of internal medicine**. McGraw-Hill, 2002. ISBN 8586804266.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004. ISSN 0168-1605.

CABO, J. et al. The spasmolytic activity of various aromatic plants from the province of Granada. The activity of the major components of their essential oils. **Planta Med**, v. 20, p. 213-218, 1986.

- CALAINHO, D. B. Jesuítas e medicina no Brasil colonial. **Tempo, Niterói**, v. 10, n. 19, p. 61-75, 2005.
- CAMPOS, M. A. A.; UCHIDA, T. Influência do sombreamento no crescimento de mudas de três espécies amazônicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 3, p. 281-288, 2002. ISSN 1678-3921. Disponível em: < www.scielo.br/pdf/pab/v37n3/9001.pdf >.
- CARSON, C. et al. Susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus to the essential oil of Melaleuca alternifolia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 35, n. 3, p. 421-424, 1995. ISSN 0305-7453. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7782258> >.
- CARVALHO FILHO, J. D. et al. Produção de mudas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em diferentes ambientes, recipientes e composições de substratos. **Cerne**, v. 9, n. 1, p. 109-118, 2003. Disponível em: < <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=74409110> >.
- CASTELLEN, M. D. S. **Avaliação do estado de conservação de populações naturais de Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) por meio de análises de estrutura genética e autocorrelação espacial**. . 2005. 104 Tese Pós-graduação em Ecologia e Agroecossistemas, Universidade de São Paulo
- CAUMO, K. et al. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, v. 11, n. 16, 2010. ISSN 2178-8820.
- CECILIO, A. B. et al. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **J Ethnopharmacol**, v. 141, n. 3, p. 975-81, Jun 14 2012. ISSN 1872-7573 (Electronic) 0378-8741 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22469769> >.
- CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. **Antibiotics in laboratory medicine**, v. 3, p. 739-787, 1991.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Teste**. 2003a.
- _____. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically** 2003b.
- CONNER, D. Naturally occurring compounds. **FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-**, p. 441-441, 1993. ISSN 0891-8961.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999. ISSN 0893-8512.

COX, S. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of applied microbiology**, v. 88, n. 1, p. 170-175, 2000. ISSN 1365-2672.

CRAVEIRO, A. A. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Edições UFC, 1981.

CRUVINEL, A. R.; SILVEIRA, A. R.; SOARES, J. S. Perfil antimicrobiano de *Staphylococcus aureus* isolado de pacientes hospitalizados em UTI no Distrito Federal. **Cenarium Farmacêutico**, v. 4, p. 4, 2011.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop protection**, v. 22, n. 1, p. 39-44, 2003. ISSN 0261-2194. Disponível em: <
<http://eurekamag.com/research/033/788/effectiveness-plant-essential-oils-growth-botrytis-cinerea-fusarium-sp-clavibacter-michiganensis-subsp-michiganensis.php>>.

DE MORAIS, S. M. et al. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907, 2006. ISSN 0100-4042.

DEUSCHLE, R. Atividade antimicrobiana e análise fitoquímica de *Senecio desiderabilis* Vellozo (Asteraceae). **Atividade antimicrobiana e análise fitoquímica de Senecio desiderabilis Vellozo (Asteraceae)**, 2003.

DEUSCHLE, R. A. et al. Fracionamento do extrato diclorometânico de *Senecio desiderabilis* Vellozo e avaliação da atividade antimicrobiana. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 2, p. 220-223, 2007.

DEVI, K. P. et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107-115, 2010. ISSN 0378-8741.

DIAS, J. D. F. G.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Composition of essential oil and allelopathic activity of aromatic water of *Aster lanceolatus* Willd:(Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 469-474, 2009. ISSN 1984-8250.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000. ISSN 0893-8512.

DO ROSARIO, M. M. et al. Storage xyloglucans: potent macrophages activators. **Chem Biol Interact**, v. 189, n. 1-2, p. 127-33, Jan 15 2011. ISSN 1872-7786 (Electronic) 0009-2797 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20888807>>.

DORMAN, H.; DEANS, S. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000. ISSN 1365-2672.

DUARTE, A. et al. Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. **Phytomedicine**, v. 19, n. 3, p. 236-238, 2012. ISSN 0944-7113.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007. ISSN 1099-1573. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17199238> >.

ELISABETSKY, E.; SHANLEY, P. Ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. **Pharmacology & therapeutics**, v. 64, n. 2, p. 201-214, 1994. ISSN 0163-7258.

ELOFF, J. N.; MARTINI, N. D.; KATERERE, D. R. P. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 93, n. 2, p. 207-212, 2004. ISSN 0378-8741. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15234754> >.

EUCAST. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. **Clinical Microbiology Journal**, v. 9, n. 8, p. 1-7, 2003.

FARIA, R. C. B. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus*. 2008.

FERNANDES, T. T.; SANTOS, A. T. F. D.; PIMENTA, C. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS PLANTAS *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* E *Guazuma ulmifolia*. **Jornal de Patologia Tropical**, v. 34, n. 2, 2007. Disponível em: <
<https://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/1916/1841> >.

FERREIRA, M. V. C.; PAES, V. R.; LICHTENSTEIN, A. Penicilina: oitenta anos; Penicillin: eighty years. **Rev. med.(São Paulo)**, v. 87, n. 4, p. 272-276, 2008. ISSN 0034-8554.

FORZZA, R. et al. Lista de espécies da flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2010.

FRANCO, E.; BARROS, R. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 78-88, 2006. Disponível em: <
http://xa.yimg.com/kq/groups/15732052/979379030/name/artigo12_v8_n3.pdf >.

FRATERNALE, D.; GENOVESE, S.; RICCI, D. Essential oil composition and antimicrobial activity of aerial parts and ripe fruits of *Echinophora spinosa* (Apiaceae) from Italy. **Nat Prod Commun**, v. 8, n. 4, p. 527-30, Apr 2013. ISSN 1934-578X (Print) 1555-9475 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23738471> >.

GALLUCCI, N. et al. Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta-lactam antibiotics. **Mol Med Chem**, v. 10, n. 1, p. 30-2, 2006.

GAYOSO, C. et al. Ação inibitória do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume, a-pineno e b-pineno sobre fungos isolados de onicomicoses. **J. Bras. Fitomed**, v. 1, n. 1-4, p. 25-29, 2004.

GHELARDINI, C. et al. Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene. **Farmacologia**, v. 56, n. 5-7, p. 387-9, May-Jul 2001. ISSN 0014-827X (Print) 0014-827x.

GIRÓN, L. M. et al. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, n. 2, p. 173-187, 1991. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1795521> >.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Efeitos Antimicrobianos de Algumas Plantas Medicinais Brasileiras em Distúrbios Intestinais. **Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 2, 2011. ISSN 2176-9206. Disponível em: < <http://www.cesumar.br/pesquisa/periodicos/index.php/saudpesq/article/view/1610/1271> >.

GONÇALVES, L. et al. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 1, p. 8-14, 2003.

GORCHOV, D. L.; PALMEIRIM, J. M.; ASCORRA, C. F. Dispersal of seeds of *Hymenaea courbaril* (Fabaceae) in a logged rain forest in the Peruvian Amazonian. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 251-259, 2004. ISSN 0044-5967. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672004000200014 >.

GRAMOSA, N. S. **Estudo químico-farmacológico da *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae)**. 2001. 255 (Doutorado). Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza

GREENWOOD, D. **Antimicrobial chemotherapy**. Oxford University Press, 2007. ISBN 0198570163.

GUARIM NETO, G. A importância da flora amazônica para uso medicinal. **Horticultura Brasileira**, v. 15, n. sSuppl, 1997.

GUINOISEAU, E. et al. Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 29, n. 7, p. 873-9, Jul 2010. ISSN 0934-9723.

GÜNDOĞAN, N.; CITAK, S.; TURAN, E. Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurised milk and ice cream samples. **Food Control**, v. 17, n. 5, p. 389-392, 2006. ISSN 0956-7135.

GUOQUIU, W. et al. Effects of cations and pH on antimicrobial activity of thanatin and s-thanatin against *Escherichia coli* ATCC25922 and *B. subtilis* ATCC 21332. **Curr Microbiol**, v. 57, n. 6, p. 552-557, 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18810542> >.

HABER, B. Fibra de Algarroba: mucho más que fibra alimentaria. **Alimentación, Equipos y Tecnología**, p. 95-99, 2003.

HAFEDH, H. et al. Effect of *Mentha longifolia* L. ssp *longifolia* essential oil on the morphology of four pathogenic bacteria visualized by atomic force microscopy. **Afr. J. Microbiol. Res**, v. 4, n. 11, p. 1122-1127, 2010.

HALL, M.; MIDDLETON, R.; WESTMACOTT, D. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 11, n. 5, p. 427-433, 1983. ISSN 0305-7453. Disponível em: <<http://jac.oxfordjournals.org/content/11/5/427.abstract>>.

HAMMER, K. A.; CARSON, C.; RILEY, T. In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 591-595, 1998. ISSN 0305-7453.

HANCOCK, R. E. Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. **The Lancet infectious diseases**, v. 5, n. 4, p. 209-218, 2005. ISSN 1473-3099.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. **Phytomedicine**, v. 16, n. 11, p. 997-1005, 2009. ISSN 0944-7113.

HERNÁNDEZ-TERRONES, M. et al. Estudo fitoquímico e alelopático do extrato de caule de sucupira-branca (*Pterodon emarginatus*). **Planta Daninha**, v. 25, n. 4, p. 755-762, 2007.

HSIEH, P.-C.; MAU, J.-L.; HUANG, S.-H. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. **Food Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 35-43, 2001. ISSN 0740-0020.

IMAI, T. et al. Heartwood extractives from the Amazonian trees *Dipteryx odorata*, *Hymenaea courbaril*, and *Astronium lecontei* and their antioxidant activities. **Journal of Wood Science**, v. 54, n. 6, p. 470-475, Dec 2008. ISSN 1435-0211. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000261953000007 >.

ISHIBASHI, M. et al. Casein kinase II inhibitors isolated from two Brazilian plants < i> *Hymenaea parvifolia* and < i> *Wulffia baccata*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 9, n. 15, p. 2157-2160, 1999. ISSN 0960-894X.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern food microbiology**. 6 th. Springer, 2000. ISBN 0387231803.

JAYAPRAKASAM, B. et al. Terpenoids from Stinking toe (*Hymenaea courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities. **Food chemistry**, v. 105, n. 2, p. 485-490, 2007. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881460700338X>>.

JAYARAMAN, P. et al. Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. **International journal of biological sciences**, v. 6, n. 6, p. 556, 2010.

JIANG, Y. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 63-68, 2011. ISSN 1382-6689.

KHEADR, E. et al. Comparison of the sensitivity of commercial strains and infant isolates of bifidobacteria to antibiotics and bacteriocins. **International dairy journal**, v. 14, n. 12, p. 1041-1053, 2004. ISSN 0958-6946.

KHOO, S.; OEHLSCHLAGER, A.; OURISSON, G. Structure and stereochemistry of the diterpenes of *Hymenaea courbaril* (*Caesalpinioideae*) seed pod resin. **Tetrahedron**, v. 29, n. 21, p. 3379-3388, 1973. ISSN 0040-4020.

KLEVENS, R. M. et al. Estimating health care-associated infections and deaths in US hospitals, 2002. **Public health reports**, v. 122, n. 2, p. 160, 2007.

KÖHLER, I. et al. In vitro antiplasmodial investigation of medicinal plants from El Salvador. **Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 57, n. 3-4, p. 277, 2002. ISSN 0939-5075. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12064726> >.

KOKETSU, M. et al. Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, 1997. ISSN 0101-2061. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20611997000300017&script=sci_arttext >.

KONEMAN, E. et al. Diagnóstico Microbiológico–Texto e Atlas Colorido., 5ª MEDSI. **Rio de Janeiro, RJ**, p. 141-147, 2001.

KROGSTAD, D.; MOELLERING, R. Antimicrobial combinations. **Antibiotics in laboratory medicine, 2nd ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore**, p. 537-595, 1986.

LEE, Y.-T.; LANGENHEIM, J. H. Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). **Univ. Calif. Publ. Bot**, v. 69, p. 1-109, 1975.

LEWINSOHN, T.; PRADO, P. I. **Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento**. Editora Contexto São Paulo, 2002. ISBN 8572442111.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. Quantas espécies há no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 36-42, 2005.

LIMA, E.; YUNES, R.; CALIXTO, J. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. **Yunes, RA; Calixto JB. Plantas medicinais sob a ótica da**

química medicinal moderna. Santa Catarina: Argos Editora Universitária, p. 481-501, 2001.

LINARES-RODRIGUEZ, J. F.; MARTINEZ-MENENDEZ, J. L. Antimicrobial resistance and bacterial virulence. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 23, n. 2, p. 86-93, Feb 2005. ISSN 0213-005X (Print) 0213-005x. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15743580> >.

LINHARES, L. D. A.; XIMENES, E. C. P. A. **EFEITO DA CONCENTRAÇÃO SUB-INIBITÓRIA DO EXTRATO DE HYMENAEA STIGONOCARPA MART. EX. HAYNE SOBRE OS FATORES DE VIRULÊNCIA DE S. AUREUS. XIX Congresso de Iniciação Científica - UFPE**. NABUCO, F. J. Pernambuco - Recife: Anais do XIX Congresso de Iniciação Científica - UFPE. 1 2011.

LOMAZZI, G. **Aromaterapia**. 1. Blumenal/Santa Catarina: Susaeta Ediciones, 2006. ISBN 8430544925.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, vol. 1. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, p. 368, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. D. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. ISBN 8586714186.

LUZ, I. D. S. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS TOXINAS EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE LEITE E QUEIJO DE COALHO EM MUNICÍPIOS DA REGIÃO AGRESTE DE PERNAMBUCO. **Recife (PE): Fundação Oswaldo Cruz**, 2008.

LV, F. et al. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 3057-3064, 11// 2011. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911004704> >.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002. ISSN 0100-4042. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/qn/v25n3/9337.pdf> >.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**: Editora Prentice Hall. São Paulo: 608 p. 2004.

MARQUES, C. A. et al. Considerações anatômicas e análise de óleo essencial do hipanto e do fruto de *Hennecartia omphalandra* J. Poisson (Monimiaceae). **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, p. 415-429, 2008.

MARQUES, F. J. F. **Análise química e avaliação da atividade antimicrobiana de plantas do nordeste brasileiro sobre *Streptococcus mutans***. Monografia (Graduação). Fortaleza: Universidade Federal do Ceará: 82 p. 2007.

MARSAIOLI, A. J.; FILHO, H. F. L.; CAMPELLO, J. P. Diterpenes in the bark of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v. 14, n. 8, p. 1882-1883, 1975.

MARTIN, S. et al. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum frutescens*. **Planta medica**, v. 59, n. 06, p. 533-536, 1993. ISSN 0032-0943. Disponível em: < <https://www.thieme-connect.com/DOI/DOI?10.1055/s-2006-959755> >.

MARTIN, S. S.; LANGENHEIM, J. H.; ZAVARIN, E. Sesquiterpenes in leaf pocket resin of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v. 11, n. 10, p. 3049-3051, 1972. ISSN 0031-9422.

MARTIN, S. S.; LANGENHEIM, J. H.; ZAVARIN, E. Quantitative variation in leaf pocket resin composition in *Hymenaea courbaril*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 2, n. 2, p. 75-87, 1974. ISSN 0305-1978.

MARTINEZ, J. L. et al. A global view of antibiotic resistance. **FEMS Microbiol Rev**, v. 33, n. 1, p. 44-65, Jan 2009. ISSN 0168-6445 (Print) 0168-6445.

MARTINS, C. H. G. et al. Determinação in vitro da Atividade Antibacteriana dos Extratos Brutos da Casca e Polpa Farinácea de *Hymenaea courbaril* L. **Investigação**, v. 10, n. 2-3, 2010. ISSN 2177-4080. Disponível em: < <http://publicacoes.unifran.br/index.php/investigacao/article/view/314/252> >.

MARTINS JÚNIOR, P. D. O. et al. Prevalência do staphylococcus aureus resistente à meticilina, isolado em hemoculturas de pacientes internados em alguns hospitais do Distrito Federal, Brasil; Prevalence of meticilin resistant Staphylococcus aureus isolated in blood cultures of hospitalized patients in Some Hospitals at Distrito Federal-Brazil. **Brasília méd**, v. 46, n. 2, 2009. ISSN 0524-2053. Disponível em: < <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=531651&indexSearch=ID> >.

MARTINS, L. T. **Microbiologia: Staphylococcus**. 3 ed. São Paulo: 1999.

MATOS, J. M. D.; MATOS, M. E. O. **Farmacognosia: curso teórico – prático**. Fortaleza: UFC, 1989.

MILLEZI, A. F. et al. Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, p. 373-379, 2013. ISSN 1516-0572. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722013000300010&nrm=iso >.

MUROI, H.; KUBO, I. Antibacterial activity of anacardic acid and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 387-394, 1996. ISSN 1365-2672. Disponível em: < <http://europemc.org/abstract/MED/8849640> >.

NOGUEIRA, R. T. et al. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 8, p. 1153-1157, 2001. ISSN 0031-9422.

NOVY, P. et al. In vitro synergistic effects of baicalin with oxytetracycline and tetracycline against *Staphylococcus aureus*. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 6, p. 1298-1300, 2011. ISSN 0305-7453.

OKEKE, I. N.; LAMIKANRA, A.; EDELMAN, R. Socioeconomic and behavioral factors leading to acquired bacterial resistance to antibiotics in developing countries. **Emerging infectious diseases**, v. 5, n. 1, p. 18, 1999.

OLIVEIRA, R. et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2006. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v16n1/a13v16n1.pdf> >.

OMS. **A crescente ameaça da resistência antimicrobiana. Opções de ação**. Suíça: Organização Mundial da Saúde 2012.

ORHAN, G. et al. Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 1, p. 140-143, 2005. ISSN 0095-1137.

OTAÍZA O'R, F. Políticas de control de antimicrobianos en el nivel hospitalario. **Revista chilena de infectología**, v. 19, p. 219-221, 2002. ISSN 0716-1018. Disponível em: < http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182002019300010&nrm=iso >.

PADUCH, R. et al. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315-327, 2007. ISSN 0004-069X.

PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, R. A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 140, n. 2, p. 164-168, 2010. ISSN 0168-1605.

PANIZZA, S. **Plantas que curam:(cheiro de mato)**. 15. São Paulo: Ibrasa, 1997. 279 ISBN 8534800677.

PEDAUYÉ, J. Harina de algarroba y garrofín. **España: Región de Murcia Digital**, 2007.

PEREIRA, C. K. B. et al. **Composição química, atividade antimicrobiana e toxicidade do óleo essencial de *Hymenaea courbaril* (jatobá)**. 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. QUÍMICA, S. B. D. Águas de Lindoia - SP 2007.

PETRAKIS, P. V. et al. The effect of terpenoid extracts from 15 pine species on the feeding behavioural sequence of the late instars of the pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa*. **Behavioural Processes**, v. 69, n. 3, p. 303-322, 2005. ISSN 0376-6357.

PHILLIPS, C.; DUGGAN, J. The effect of temperature and citric acid, alone, and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri* in culture. **Food control**, v. 13, n. 6, p. 463-468, 2002. ISSN 0956-7135.

PINTO, A. A. D. C.; MADURO, C. B. Produtos e subprodutos da medicina popular comercializadas na cidade de Boa Vista, Roraima. **Acta Amazônica**, v. 33, n. 2, p. 281-290, 2003. Disponível em: < <http://acta.inpa.gov.br/fasciculos/33-2/PDF/v33n2a09.pdf> >.

PINTO, J. E. B. P.; SANTIAGO, E. J. A.; LAMEIRA, O. A. **Compêndio de plantas medicinais**: Lavras: UFLA/FAEPE 2000.

PRANCE, G. T.; DA SILVA, M. F. **Árvores de Manaus**. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, 1975.

PROBST, I. D. S. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E AVALIAÇÃO DE POTENCIAL SINÉRGICO. 2012.

RATES, S. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001. ISSN 0041-0101.

RIBEIRO, D. S. et al. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 687-696, 2012. ISSN 1679-0359.

RIBEIRO, D. S.; VELOZO, E. D. S.; GUIMARÃES, A. G. Interaction between the rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) and antimicrobial drugs in the control of bacteria isolated from foods. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 1, p. 10-19, 2013. ISSN 2179-4804. Disponível em: < <http://revista.uft.edu.br/index.php/JBB/article/viewFile/452/299> >.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1996.

ROCHA, G. M.; ROCHA, M. E. D. N. Uso popular de plantas medicinais. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 1, n. 2, 2009. ISSN 1980-2676.

ROCHA, L. Q. **Interferência do óleo essencial de folhas do quimiotipo II de *Lippia alba* (MILL.) NE BROWN na atividade antimicrobiana da oxacilina sobre *staphylococcus aureus* oxacilina-resistente**. 2012. 125 (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

RODRIGUES, A.; GUEDES, M. Utilização de plantas medicinais no Povoado Sapucaia, Cruz das Almas–Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 8, n. 2, p. 1-7, 2006. Disponível em: < http://www.sbpmed.org.br/download/issn_06/artigo1_v8_n2.pdf >.

RODRIGUES, J. H. **Historiografia e bibliografia do domínio holandês no Brasil**. Rio de Janeiro: Departamento da Imprensa Nacional 1949.

ROMEIRO, R. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**: UFV Viçosa 2007.

SADER, H. et al. Atividade antimicrobiana in vitro da cefpiroma em comparação com outros beta-lactâmicos de amplo espectro contra 804 amostras clínicas de nove hospitais brasileiros. **Rev Ass Med Brasil**, v. 44, n. 4, p. 283-8, 1998.

SANGWAN, N. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 1, p. 3-21, 2001. ISSN 0167-6903.

SANTIESTEBAN-LÓPEZ, A.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected aw and pH. **Journal of applied microbiology**, v. 102, n. 2, p. 486-497, 2007. ISSN 1365-2672.

SANTOS, F. S. D. D. Tradições populares de uso de plantas medicinais na Amazônia. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 6, p. 919-939, 2000. ISSN 0104-5970. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-59702000000500009&nrm=iso >.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V. Medicinal plants, phytomedicines, and phytotherapy. **Rational phytotherapy: a physician's guide to herbal medicine**, New York: Springer Verlag, v. 4, p. 1-39, 2001. Disponível em: < http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-98093-0_1 >.

SHIN, S.; LIM, S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. **J Appl Microbiol**, v. 97, n. 6, p. 1289-96, 2004. ISSN 1364-5072 (Print) 1364-5072.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995. ISSN 1092-2172.

SILVA, A. et al. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2003. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/qn/v29n6/10.pdf> >.

SILVA, F. et al. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. **J Med Microbiol**, v. 60, n. Pt 10, p. 1479-86, Oct 2011. ISSN 0022-2615.

SILVA, N. C. C. Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas [dissertação de mestrado]. **Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências**, 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004.

SOCIETY, A. O. C.; FIRESTONE, D. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. AOCS Champaign, IL., US, 1989.

SONG, Y.-D.; HU, H.-Y.; ZHOU, Y.-X. Lysis of stationary-phase bacterial cells by synergistic action of lytic peptidase and glycosidase from thermophiles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, n. 1, p. 44-49, 2010. ISSN 1369-703X.

SOUSA, C. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, S.; CITÓ, A.; LOPES, J. Constituintes do óleo essencial da própolis produzida na cidade de Pio IX-Piauí. **Rev. Bras. Plantas Med**, v. 8, n. 4, p. 1-3, 2006.

STEHR, F. et al. Microbial lipases as virulence factors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, n. 5, p. 347-355, 2003. ISSN 1381-1177.

STUBBLEBINE, W.; LANGENHEIM, J. Estudos comparativos da variabilidade na composição da resina da folha entre árvore parental e prole de espécies selecionadas de *Hymenaea*: comparação de populações Amazônicas com uma população do sudeste brasileiro. **Acta Amazonica**, v. 10, n. 2, p. 293-309, 1980. Disponível em: < <http://acta.inpa.gov.br/fasciculos/10-2/PDF/v10n2a07.pdf> >.

SUZUKI, R. et al. Characterization and antioxidant activity of Amazonian woods. **Journal of Wood Science**, v. 54, n. 2, p. 174-178, 2008. ISSN 1435-0211. Disponível em: < <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10086-007-0913-9.pdf> >.

TAKAICHI, S. et al. The major carotenoid in all known species of heliobacteria is the C30 carotenoid 4, 4'-diaponeurosporene, not neurosporene. **Archives of microbiology**, v. 168, n. 4, p. 277-281, 1997. ISSN 0302-8933.

TAMAYO, L. M.; GONZÁLEZ, D. M. A.; GARCÉS, Y. J. Propiedades farmacológicas del Algarrobo (*Hymenaea courbaril* Linneaus) de interés para la industria de alimentos. **Rev. Lasallista Investig**, p. 100-111, 2008.

_____. Evaluation to potential uses of the carob tree's fruit (*HYMENAEA COURBARYL* L)-shell and seeds-as a natural preserver for food. **Revista Lasallista De Investigación**, v. 8, p. 90-95, 2011.

TAMBE, Y. et al. Gastric cytoprotection of the non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene, beta-caryophyllene. **Planta Med**, v. 62, n. 5, p. 469-70, Oct 1996. ISSN 0032-0943 (Print) 0032-0943. Disponível em: < <https://www.thieme-connect.com/DOI/DOI?10.1055/s-2006-957942> >.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. 2. São Paulo: 2001.

TEIXEIRA, M. **Avaliação do efeito leishmanicida in vitro e in vivo de constituintes químicos ativos derivados de plantas medicinais**. 1999. 73 p. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Ceará

TEXEIRA, A. B. **Avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais das folhas dos quimiotipos I, II e III de Lippia alba (Mill.) N. E. Brown**. 2009. 139 Dissertação Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

TORTORA, G.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. 2003.

TOSCANO-GONZALEZ, J. Y. Uso tradicional de plantas medicinales en la vereda San Isidro, municipio de San Jose de Pare-Boyacá: un estudio preliminar usando tecnicas cuantitativas; Traditional Use of Medicinal Plants in the Sidewalk San Isidro, Municipality of San Jose de PareBoyacá: A Preliminary Study Using Quantitative Technical. **Acta biologica colombiana**, v. 11, n. 2, p. 137-146, 2006. ISSN 1900-1649. Disponível em: < http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=s0120-548x2006000200012&script=sci_arttext >.

TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1140516/> >.

TUROLLA, M. S. D. R.; NASCIMENTO, E. D. S. Toxicological information of some herbal medicines used in Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006. ISSN 1516-9332.

ULTEE, A.; BENNIK, M.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, 2002. ISSN 0099-2240.

ULTEE, A. et al. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Archives of microbiology**, v. 174, n. 4, p. 233-238, 2000. ISSN 0302-8933.

ULUBELEN, A. et al. Antibacterial diterpenes from the roots of *Salvia viridis*. **Planta medica**, v. 66, n. 05, p. 458-462, 2000. ISSN 0032-0943. Disponível em: < <https://www.thieme-connect.com/DOI/DOI?10.1055/s-2000-8596> >.

VAARA, M.; VAARA, T. Outer membrane permeability barrier disruption by polymyxin in polymyxin-susceptible and -resistant *Salmonella typhimurium*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 19, n. 4, p. 578-83, Apr 1981. ISSN 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6264852> >.

VAN DEN DOOL, H.; DEC KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography.

Journal of Chromatography A, v. 11, p. 463-471, 1963. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196730180947X> >.

VAN VUUREN, S.; SULIMAN, S.; VILJOEN, A. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. **Letters in applied microbiology**, v. 48, n. 4, p. 440-446, 2009. ISSN 1472-765X.

VILLAS BÔAS, G. D. K.; GADELHA, C. A. G. Oportunidades na indústria de medicamentos ea lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional; Opportunities in the pharmaceutical industry and the local development logic based on the Brazilian biomes: the basis for a national policy discussion. **Cad. saúde pública**, v. 23, n. 6, p. 1463-1471, 2007. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/csp/v23n6/20.pdf> >.

VIRTUOSO, S. et al. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 137-142, 2005. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2005000200012&script=sci_arttext >.

WAGENLEHNER, F.; WEIDNER, W.; NABER, K. Emergence of antibiotic resistance amongst hospital-acquired urinary tract infections and pharmacokinetic/pharmacodynamic considerations. **Journal of Hospital Infection**, v. 60, n. 3, p. 191-200, 2005. ISSN 0195-6701. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15893853> >.

WALSH, C. **Nature**. 2000.

WEI, L. S.; WEE, W. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. **Iran J Microbiol**, v. 5, n. 2, p. 147-52, Jun 2013. ISSN 2008-3289 (Print) 2008-3289 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23825733> >.

WEN, A. et al. Antilisterial activity of selected phenolic acids. **Food Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 305-311, 2003. ISSN 0740-0020.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZAGO, J. A. et al. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Rev. bras. farmacogn**, v. 19, n. 4, p. 828-83, 2009.

ZHENG, G.-Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of natural products**, v. 55, n. 7, p. 999-1003, 1992. ISSN 0163-3864. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1402962> >.

ZHOU, K. et al. Mode of action of pentocin 31-1: An antilisteria bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* from Chinese traditional ham. **Food Control**, v. 19, n. 8, p. 817-822, 2008. ISSN 0956-7135. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713507001685> >.

ANEXOS



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 32/13

Fortaleza, 03 de junho de 2013.

Prezado Pesquisador,

A Legislação Brasileira define Pesquisa com Seres Humanos como “Pesquisa que, individualmente, envolva o ser humano, de forma direta ou indireta, em sua totalidade ou parte dele, incluindo o manejo de informações ou materiais” conforme resolução 196/96 CNS-MS.

Como se depreende da leitura do resumo apresentado, não existe necessidade de apreciação ética do Projeto intitulado “Avaliação da atividade antimicrobiana e do mecanismo de ação do óleo essencial extraído de casca dos frutos de *Hymenaea courbaril* L.” do Pesquisador Gleilton Weyne Passo Sales, por parte deste Comitê de Ética em pesquisa.

Atenciosamente,

Dr. Fernando A. Frota Bezerra
Coordenador do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEP/UFCE

Prof. Dr Fernando Antônio Frota Bezerra
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
da universidade Federal do Ceará- UFC