



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

***Atividade Antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* das Folhas de  
*Plectranthus amboinicus* Frente Cepas Hospitalares de  
*Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina***

Fortaleza-CE

2011



FRANCISCO FÁBIO MARTINS DE OLIVEIRA

***Atividade Antimicrobiana in vitro e in vivo das Folhas de  
Plectranthus amboinicus Frente Cepas Hospitalares de  
Staphylococcus aureus Resistente à Meticilina***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. Como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Aparecida Tiemi Nagao Dias

Fortaleza-CE

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- O47a Oliveira, Francisco Fábio Martins de Oliveira.  
Atividade antimicrobiana in vitro e in vivo das folhas de *Plectranthus amboinicus* frente cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina. / Francisco Fábio Martins de Oliveira Oliveira. – 2019.  
95 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Profa. Dra. Aparecida Tiemi Nagao Dias.
1. *Plectranthus amboinicus*. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Antimicrobiano. 4. In vivo. I. Título.  
CDD 616.9
-

FRANCISCO FÁBIO MARTINS DE OLIVEIRA

**Atividade Antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* das Folhas de  
*Plectranthus amboinicus* Frente Cepas Hospitalares de  
*Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica,  
Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. Como  
requisito para obtenção do grau de Mestre.

Aprovado em : 28 de fevereiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Aparecida Tiemi Nagao Dias (Orientadora)  
(Universidade Federal do Ceará)

---

Profa. Dra. Selene Maia de Moraes  
(Universidade Estadual do Ceará)

---

Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro  
(Universidade Federal do Ceará)

---

Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst  
(Universidade Federal do Ceará)

Ao meu Pai, João P. de Oliveira pelo  
homem, filho e pai exemplar que é.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha companheira Daniele de Sousa Araujo por estar sempre do meu lado e pela compreensão dispensada nesses últimos anos;

À minha orientadora, Profa. Dra. Aparecida Tiemi Nagao Dias, por seu apoio, dedicação, competência e especial atenção nas revisões e sugestões, fatores fundamentais para conclusão deste trabalho;

Às Professoras Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst, Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho, Dra. Lilia Câmara e Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago, pela atenção e colaboração dispensada nesses dois últimos anos.

A todos os professores e colegas do mestrado que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), agradeço o apoio financeiro concedido a mim e ao projeto de pesquisa.

A DEUS, que todos os dias de minha vida me deu forças para continuar.

Eu sou de uma terra que o povo padece  
Mas não esmorece e procura vencer.  
Da terra querida, que a linda cabocla  
De riso na boca zomba no sofrer  
Não nego meu sangue, não nego meu nome  
Olho para a fome, pergunto o que há?  
Eu sou brasileiro, filho do Nordeste,  
Sou cabra da Peste, sou do Ceará.

(Patativa do Assaré)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Panorama histórico e epidemiológico de <i>S. aureus</i> resistente a meticilina.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4 Métodos de identificação laboratorial das estirpes MRSA.....</b>	<b>14</b>
1.4.1 Disco difusão.....	15
1.4.2 Teste de <i>screening</i> com oxacilina.....	15
1.4.3 Determinação da concentração inibitória mínima.....	15
1.4.4 Teste de aglutinação com partículas de látex para detecção de PBP2a.....	16
1.4.5 Métodos automatizados.....	16
1.4.6 Meios cromogênicos.....	17
1.4.7 Reação em cadeia da polimerase para detecção do gene <i>mecA</i> .....	17
1.4.8 Eletroforese em campo pulsado.....	17
<b>1.5 Plantas medicinais como alternativa de novos medicamentos.....</b>	<b>18</b>
<b>1.6 <i>Plectranthus amboinicus</i>.....</b>	<b>20</b>
1.6.1 Considerações botânicas.....	20
1.6.2 Composição química.....	21
1.6.3 Uso popular e ação farmacológica.....	22
1.6.4 <i>P. amboinicus</i> versus MRSA.....	23
<b>2. PERGUNTA DE PARTIDA.....</b>	<b>24</b>
<b>3. HIPÓTESES.....</b>	<b>24</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
4.1 Objetivo Geral.....	25
4.2 Objetivo Específico.....	25
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
<b>5.1 Caracterização das cepas de MRSA.....</b>	<b>26</b>
5.1.1 Perfil de Susceptibilidade aos Antimicrobianos.....	26
5.1.2 Método confirmatório para identificação de MRSA.....	26
5.1.2.1 Extração e purificação do DNA bacteriano.....	27
5.1.2.2 Amplificação das sequências gênicas <i>mecA</i> e <i>coag</i> .....	27
<b>5.2 Material botânico.....</b>	<b>28</b>
5.2.1 Obtenção dos extratos.....	28
5.2.2 Fracionamento do extrato etanólico.....	28
5.2.3 Fracionamento da fração acetato de etila (F4).....	29
5.2.4 Fracionamento cromatográfico da subfração F4b e isolamento de PA-1.....	30
5.2.5 Identificação molecular do composto PA-1.....	30
5.2.6 Obtenção do óleo essencial.....	31
5.2.7 Análise quantitativa do óleo essencial.....	31
5.2.8 Análise qualitativa dos compostos químicos do óleo essencial.....	31
<b>5.3 Análise da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>.....</b>	<b>33</b>
5.3.1 Teste de microdiluição em caldo das amostras vegetais e vancomicina.....	33
5.3.2 Cinética da inibição de crescimento.....	34
5.3.3 Bioautografia.....	35
5.3.5 Avaliação da interação entre as amostras vegetais e os antimicrobianos vancomicina e ciprofloxacina.....	36
<b>5.4 Ensaios de toxicidade.....</b>	<b>38</b>
5.4.1 Avaliação da atividade citotóxica do extrato EH, fração F4, composto PA-1	

e OE sobre macrófagos.....	38
5.4.2 Avaliação da toxicidade do extrato EH em camundongos.....	39
<b>5.5. Avaliação da atividade antimicrobiana em modelo animal.....</b>	<b>39</b>
5.5.1 Animais.....	39
5.5.2 Modelo de infecção.....	40
5.5.3 Tratamento.....	40
5.5.4 Histopatológico.....	42
<b>5.6 Análise estatística.....</b>	<b>42</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>79</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Constituintes da parede celular do <i>S. aureus</i> que contribuem para a indução de resposta imunológica no hospedeiro (Fonte: SANTOS et al., 2007) .....	3
<b>Tabela 2.</b> Enzimas e toxinas produzidas por <i>S. aureus</i> que participam dos mecanismos de patogenicidade da bactéria.....	4
<b>Tabela 3.</b> Plasmídeos e transposons que integram o <i>staphylococcal cassette chromosome</i> (SCC <i>mec</i> ) e conferem resistência a antimicrobianos.....	12
<b>Tabela 4.</b> <i>Screening</i> fitoquímico do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.....	21
<b>Tabela 5.</b> Dados resultantes do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico de <i>P. amboinicus</i> .....	29
<b>Tabela 6.</b> Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração F4 do extrato etanólico.....	29
<b>Tabela 7.</b> Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da subfração F4b.....	30
<b>Tabela 8.</b> Avaliação antimicrobiana <i>in vivo</i> do extrato EH e da fração F4 frente à cepa MRSA 08.....	41
<b>Tabela 9.</b> Perfil de susceptibilidade das cepas MRSA isoladas no HUWC.....	44
<b>Tabela 10.</b> Concentração inibitória mínima dos extratos, frações e óleo essencial de <i>P. amboinicus</i> contra cepas clínicas de MRSA.....	46
<b>Tabela 11.</b> CIM das subfrações e do composto PA-1 frente às cepas MRSA.....	48
<b>Tabela 12.</b> Valores da CIF, ICIF e a interpretação das associações do óleo essencial (A), extrato hidroalcoólico (B) e F4 (C) quando combinados com vancomicina e ciprofloxacina a cepa ATCC (65398) e três cepas clínicas de MRSA.....	51
<b>Tabela 13.</b> Composição química do óleo essencial das folhas de <i>P. amboinicus</i> .....	53
<b>Tabela 14.</b> Efeito inibitório do extrato EH e da fração F4, sobre o crescimento bacteriano nos abscessos de camundongos infectados com a cepa MRSA 08, após 72 h de infecção.....	59

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Colônias de *Staphylococcus aureus* em placa contendo meio ágar Mueller Hinton (A) e característica morfológica das bactérias em esfregaço corado pela técnica de Gram (B)..... 2
- Figura 2.** Prevalência de infecções hospitalares causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina em países da América Latina. (Fonte: GUZMÁN-BLANCO et al., 2009)..... 7
- Figura 3.** Evolução da resistência aos antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* resistente à penicilina ou PRSA; *S. aureus* resistente a meticilina ou MRSA; *S. aureus* resistente a meticilina adquiridos ou associados à comunidade (CA-MRSA) ..... 8
- Figura 4.** Localização do gene *mecA* no elemento genético SCC*mec* de *S. aureus* resistente a meticilina..... 13
- Figura 5.** *Plectranthus amboinicus*..... 21
- Figura 6.** Bioautografia. A, Subfrações de F4 aplicadas em placas de vidro revestidas com sílica gel F<sub>254</sub>; B, Corrida cromatográfica com fase móvel Hex; AcEOt (6:4); C, Cromatoplasmas após corrida cromatográfica, estando a da esquerda corada com vanilina; D. Cromatoplasma, não corada com vanilina, imersa em uma placa de Petri contendo 10<sup>6</sup> UFC/mL de bactérias em AMH..... 36
- Figura 7.** Análise da interação entre o EH, F4 e óleo essencial com vancomicina e ciprofloxacina, utilizando o método tabuleiro de xadrez. As colunas 1 e 2 foram disponibilizadas para determinação da CIM das amostras a e b, enquanto que, da coluna 5 a 12, foram usadas para determinar a CIM das amostras a e b quando combinadas. C+, controle positivo de crescimento; C-, controle negativo de crescimento..... 37
- Figura 8.** Procedimento para determinação da DL<sub>50</sub> com dose inicial de 2000 mg/Kg, segundo o protocolo proposto por OECD (2001) ..... 39
- Figura 9.** A, camundongos *Swiss* machos, de 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central da UFC; B, Análise do tamanho do abscesso com auxílio de um paquímetro..... 42
- Figura 10.** Cepas de *Staphylococcus aureus* identificadas como MRSA a partir do método de triagem por disco difusão..... 43
- Figura 11.** Perfil eletroforético, em gel de agarose 1 % dos produtos amplificados através da técnica de reação em cadeia da polimerase para o gene *coag* (A) e *mecA* (B) das cepas clínicas de *S. aureus* com susceptibilidade reduzida para meticilina. M representa o marcador de 1kpb, colunas de 1 a 14 representam os isolados clínicos..... 45
- Figura 12A.** Ação bacteriostática e bactericida do Extrato hidroalcolico de

<i>P.amboinicus</i> em diferentes concentrações, frente à cepa padrão de MRSA (ATCC 65398) .....	49
<b>Figura 12B.</b> Ação bacteriostática e bactericida da fração F4 do extrato etanólico de <i>P.amboinicus</i> em diferentes concentrações, frente à cepa padrão de MRSA (ATCC 65398).....	50
<b>Figura 12C.</b> Ação bacteriostática e bactericida do óleo essencial de <i>P.amboinicus</i> em diferentes concentrações, frente à cepa padrão de MRSA (ATCC 65398) .....	50
<b>Figura 13.</b> Cromatograma (CG/EM) do OE de <i>P. amboinicus</i> .....	52
<b>Figura 14.</b> Espectro de massas do 4-terpinenol.....	53
<b>Figura 15.</b> Espectro de massas do carvacrol.....	54
<b>Figura 16.</b> Espectro de massas do $\beta$ -cariofileno.....	54
<b>Figura 17.</b> Espectro de massas do $\alpha$ -Bergamoteno.....	54
<b>Figura 18.</b> Espectro de massas do oxido de cariofileno .....	54
<b>Figura 19.</b> Bioautograma das subfrações da fração F4 do extrato etanólico de <i>P. amboinicus</i> que apresentaram atividade antibacteriana. A, revelação com MTT e B, revelação com vanilina/ácido perclórico. As setas indicam os compostos que apresentaram zonas de inibição, como mostrado em 18A.....	55
<b>Figura 20.</b> Porcentagem da viabilidade celular (média $\pm$ erro padrão das triplicatas) de linhagem de macrófagos (RAW 264.7) frente ao extrato EH, fração F4, PA-1 e OE de <i>P. amboinicus</i> após 24 h de exposição.....	56
<b>Figura 21.</b> Volume dos abscessos subcutâneos em camundongos infectados com MRSA 08, após 72 h de tratamento intra-peritoneal com o extrato EH, fração F4 e vancomicina. Foi utilizado como controle, animais inoculados com Cytodex 2% e os tratados com salina.....	58
<b>Figura 22.</b> Camundongos infectados com a cepa MRSA via subcutânea e tratados via intra-peritoneal com salina (A) ou com F4 na dose de 500 mg/Kg (B).....	58
<b>Figura 23.</b> Mensuração dos parâmetros inflamatórios através de análise histopatológica, após 72 h do tratamento de camundongos <i>Swiss</i> infectados com a cepa MRSA. 08.....	60

## LISTA DE FLUXOGRAMA

<b>Fluxograma 1.</b> Esquema utilizado para obtenção dos extratos, frações, subfrações, composto PA-1 e óleo essencial de <i>P. Amboinicus</i> .....	3
	2
<b>Fluxograma 2.</b> Esquema utilizado para obtenção do óleo essencial das folhas de <i>P.amboinicus</i> .....	3
...	3

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt – Acetato de Etila

AMH - Ágar Mueller Hinton

BHI - *Brain Heart Infusion*

BORSA - *Borderline Resistant S. aureus*

CA-MRSA - *Community Associated Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*

CCD- Cromatografia em Camada Delgada

CENAUREMN- Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear,

CG/DIC – Cromatografia Gasosa Acoplado a Detector de Ionização por Chama

CG/EM - Cromatografia Gasosa Acoplado a Espectrômetro de Massa

CIF - Concentração Inibitória Fracionada

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMH - Caldo Mueller Hinton

CTAB - Brometo de Cetiltrimetilamônio

DCM - Diclorometano

DMSO – Dimetilsulfóxido

EH - Extrato hidroalcoólico

Ep - Éter de Petróleo

ET - Extrato Etranólico

EUA - Estados Unidos da América

F1- Fração Hexano

F2 – Fração Éter de Petróleo

F3 – Fração Diclorometano

F4 – Fração Acetato de Etila

F4a-f – Subfrações da Fração Acetato de Etila

F5 – Fração Metanol

Hex - Hexano

HUWC - Hospital Universitário Walter Cantídio

ICIF - Índice da Concentração Inibitória Fracionada

IK - Índices de Retenção de Kovats

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

LPV - Leucocidina de Panton-Valentine  
MEM - *Minimum Essential Media*  
MeOH - Metanol  
MODSA - *Methicillin Intermediate S.aureus*  
MRSA - *Methicillin Resistente Staphylococcus aureus*  
MSSA - *Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus*  
MTT - Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]  
OE - Óleo Essencial  
OECD - *Organization for Economic Cooperation and Development*  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
PBP - *Protein Binding Penicillins*  
PBS – Solução Tamponada Com Fosfato  
PCR - *Polymerase Chain Reaction*  
PFGE - *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*).  
PRSA - *Penicillin Resistente Staphylococcus aureus*  
Rf – Fator de Retenção  
RMN <sup>1</sup>H- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1  
RMN <sup>13</sup>C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13  
SCCmec - *Staphylococcal Cassette Chromosome*  
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio  
SENTRY – Programa de Vigilância Epidemiológica  
TE -Tampão Tris-EDTA  
TSCT-1 - Toxina da Síndrome de Choque Térmico  
UFC – Unidade Formadora de Colônia  
VISA - *Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus*  
VRSA –*Vancomycin Resistente S. aureus*

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng contra isolados clínicos de MRSA. A atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial, do extrato hidroalcoólico (HE), da fração acetato de etila (F4) e suas subfrações foram determinadas por microdiluição em caldo e bioautografia contra isolados clínicos de MRSA. O método de microdiluição de tabuleiro de xadrez foi usado para avaliar estudos de combinação de drogas *in vitro*. Para induzir a formação de abscessos, suspensões bacterianas foram adicionadas ao Citodex e inoculadas subcutaneamente em camundongos Swiss machos. O protocolo de tratamento consistiu de 2 doses de HE, a fração F4 ou vancomicina introduzidas intraperitonealmente em camundongos 3 e 12 h após a infecção. Dentre as amostras vegetais estudadas a que obteve o melhor efeito inibitório diante das cepas clínicas foi o óleo essencial com concentração inibitória mínima (CIM)  $\geq 0,07$  %v/v, fração acetato de etila (F4) com CIM  $\geq 0,25$  mg/mL e o composto PA-1 CIM = 0,125 mg/mL. As amostras de plantas foram bacteriostáticas a 2x e 4x CIM e bactericidas a 100 mg / ml. A fração F4 e o óleo essencial apresentaram sinergismo com a vancomicina. Uma redução significativa do volume de abscesso, contagem de células bacterianas nas amostras de abscesso e escores inflamatórios foi observada nos grupos tratados com fração HE e F4. As amostras foram eficazes no tratamento dos animais de um modo dose dependente, nos permitindo relatar a eficácia das amostras de folhas de *P. amboinicus* contra MRSA utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Palavras chaves: *Plectranthus amboinicus*, *S. aureus* resistente à metilicina, antimicrobiano, *in vivo*.

## ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the efficacy of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against clinical isolates of MRSA. The in vitro antimicrobial activity of the essential oil of the hydroalcoholic extract (HE), the ethyl acetate fraction (EA) and its subfractions were determined by broth microdilution and bioautography against clinical isolates of MRSA. The chessboard microdilution method was used to evaluate in vitro drug combination studies. To induce abscess formation, bacterial suspensions were added to Citodex and inoculated subcutaneously into male Swiss mice. The treatment protocol consisted of 2 doses of HE, the EA fraction or vancomycin introduced intraperitoneally in mice 3 and 12 h after infection. Among the drugs studied, the most effective inhibitory effect against clinical strains was essential oil with minimal inhibitory concentration (MIC)  $\geq 0.07\%$  v / v, ethyl acetate fraction (F4) with MIC  $\geq 0.25$  mg / mL and the compound PA-1 MIC = 0.125 mg / mL. Plant samples were bacteriostatic at 2x and 4x MIC and bactericidal at 100 mg / ml. The EA and essential oil fraction showed synergism with vancomycin. A significant reduction in abscess volume, bacterial cell count in the abscess binders and inflammatory scores was observed in the HE and EA fraction treated groups. Samples were effective in treating the animals in a dose-dependent manner. The present study proved the efficacy of the fractions of *P. amboinicus* against MRSA using in vitro and in vivo assays.

Key words: *Plectranthus amboinicus*, methicillin resistant *S. aureus*, antimicrobial, *in vivo*.

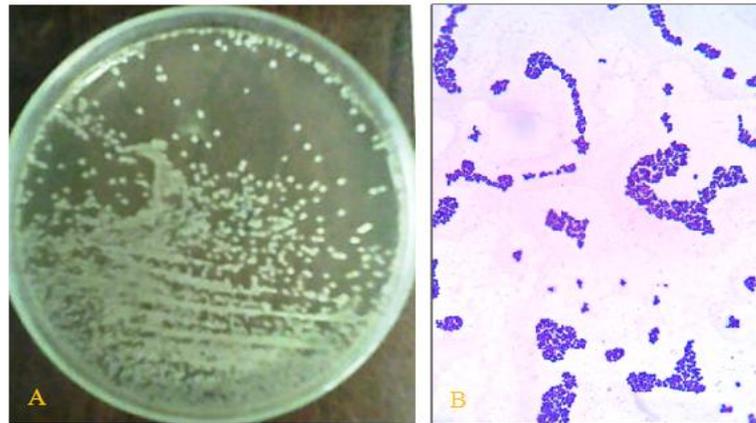
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* compreende diversas espécies e subespécies que se encontram amplamente distribuídas na natureza, sendo principalmente encontradas na pele, membranas e mucosas de aves e mamíferos (SANTOS et al., 2007). O gênero *Staphylococcus* foi proposto em 1884 por Rosenbach e inserido dentro da família Micrococcaceae. Estudos de biologia molecular, perfis de ácidos graxos, composição da parede celular e estudos com RNA ribossômico 16S promoveram a inclusão do gênero *Staphylococcus* em uma nova família, a Staphylococcaceae (GARRITY; HOLT, 2000) Atualmente, já são 42 espécies descritas dentro do gênero (NCBI, 2006), sendo a maioria coagulase negativa. A síntese desta enzima parece ser restrita ao *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini* (KONEMAN et al., 2008).

Os microrganismos do gênero *Staphylococcus* apresentam forma de cocos, ocorrendo na forma de células isoladas, em pares, tétrades e cadeias curtas, porém tendem a aparecer em grupos semelhantes a cachos de uva e com colônias grandes, redondas e dourado-amarelas (Figura 1). São Gram positivas, possuem diâmetros que variam entre 0,5 e 1,5  $\mu\text{m}$ , imóveis, catalase-positivas, e não formam esporos. Praticamente todas as espécies de *Staphylococcus* são anaeróbias facultativas, mas possuem crescimento mais rápido em aerobiose. São microrganismos mesófilos, com temperatura ótima de crescimento de 37° C e pH ótimo de 6 a 7 (KLOOS; BANNERMAN, 1999).

Dentre as espécies do gênero *Staphylococcus*, destaca-se *Staphylococcus aureus* (coagulase-positiva) como a mais envolvida em doenças em seres humanos, seguida de duas espécies coagulase-negativas *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* (KONEMAN et al., 2008). Em amostras clínicas humanas, é suficiente a identificação da coagulase para a distinção de *S. aureus* dos demais estafilococos patogênicos. No entanto, esse procedimento fenotípico não diferencia *S. aureus* das demais espécies coagulase-positivas do gênero, as quais são de interesse veterinário.



**Figura 1.** Colônias de *Staphylococcus aureus* em placa contendo meio ágar Mueller Hinton (AMH) (A) e característica morfotintorial das bactérias em esfregaço corado pela técnica de Gram (B).

A espécie *Staphylococcus aureus* foi descrita pela primeira vez por Alexander Ogston, em 1880, em material obtido de lesões purulentas de membro inferior de um paciente (OGSTON, 1884). De acordo com o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, a classificação taxonômica de *Staphylococcus aureus* segue a seguinte sequência: Filo: Firmicutes, Classe: *Bacilli*, Ordem: *Bacillales*, Família: *Staphylococcaceae*, Gênero: *Staphylococcus*, Espécie: *S. aureus*.

*S. aureus* é uma bactéria ubíqua, altamente resistente às condições adversas ambientais, tais como ambientes secos ou com concentrações elevadas de sal, o que facilita a colonização temporária ou permanente da pele e mucosas (MATOUSKOVA; JANOUT, 2008). Estima-se que de 20 a 40 % dos adultos sejam carreadores permanentes, sendo as narinas os sítios de colonização mais frequentes. Outros sítios incluem o períneo, a faringe, as axilas, a região inguinal e, com menor frequência, o trato gastrointestinal (WERTHEIM et al., 2005).

A transmissão do *S. aureus* ocorre por contato direto ou indireto com a bactéria. Indivíduos de todas as faixas etárias podem ser acometidos, com ênfase para as crianças com idade inferior a cinco anos ou em determinadas situações predisponentes, como diabetes *mellitus*, insuficiência renal crônica, insuficiência hepática crônica, desnutrição grave, fibrose cística, usuários de droga endovenosa e pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (MELISH; CAMPBELL, 1998).

*S. aureus* é capaz de desencadear uma série de doenças, desde formas brandas como foliculite, impetigo, furúnculo e carbúnculo, até infecções que envolvam risco de vida, tais

como meningite, síndrome do choque tóxico, pericardite, endocardite, pneumonia, entre outros (HINRICHSEN et al., 2005). Os fatores mais comuns que predisõem um indivíduo a infecções estafilocócicas mais graves são defeitos na quimiotaxia dos leucócitos, defeitos na opsonização da bactéria por anticorpos ou componentes do complemento, defeitos na destruição intracelular após fagocitose, presença de corpos estranhos, injúrias de pele e mucosas, infecções virais, e outras condições clínicas como, diabetes, má nutrição e idade avançada e uso irracional de antimicrobianos (KONEMAN et al., 2008).

A infecção e colonização dos tecidos por *S. aureus* decorrem de uma grande variedade de fatores de virulência, incluindo toxinas tais como as citotoxinas alfa, beta, delta e gama, leucocidina de *Panton-Valentine* (LPV), toxinas esfoliativas A e B, enterotoxinas A-E, G-I e a toxina da Síndrome de Choque Térmico TSCT-1 (antiga enterotoxina F). As enzimas mais conhecidas são a coagulase e a catalase, entre outras, como as lipases, nucleases, hialuronidase, fibrinolisinase e  $\beta$ -lactamases (KONEMAN et al., 2008). Os constituintes da parede celular de *S. aureus*, toxinas e enzimas e suas funções estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1.** Constituintes da parede celular do *S. aureus* que contribuem para a indução de resposta imunológica no hospedeiro (Fonte: SANTOS et al., 2007).

Constituinte	Definição e função
Ácido tecóico	Polissacarídeo espécie-específico constituído de fosfato de ribitol e N-acetilglucosamina, capaz de ativar a via alternativa do complemento e estimular a produção de citosinas
Glicanopeptídeo	Polímero de polissacarídeo que atua como agente quimiotático para leucócitos polimorfonucleares (PMN) e induz a produção de IL-1 e opsoninas
Proteína A	Proteína ligada ao peptidoglicano presente em mais de 90 % das cepas de <i>S. aureus</i> e que se liga a porção Fc da molécula IgG contribuindo para geração de efeitos anticomplementares, quimiotáticos, antifagocitários, reações de hipersensibilidade e lesão plaquetária
Cápsula	Estrutura polissacarídica que envolve a parede celular da maioria das cepas de <i>S. aureus</i> protegendo-a da fagocitose mediada pelo complemento (C3b), aumentando a virulência e a capacidade de invasão dos tecidos e corrente sanguínea
Adesinas	Moléculas que fazem parte da estrutura do glicocálix e que se ligam aos receptores químicos encontrados na superfície das células epiteliais do hospedeiro

**Tabela 2.** Enzimas e toxinas produzidas por *S. aureus* que participam dos mecanismos de patogenicidade da bactéria.

<b>Nome</b>	<b>Classe</b>	<b>Função</b>
$\beta$ -lactamases	Enzima	Inativa a ação dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos pela abertura do anel $\beta$ -lactâmico
Coagulase	Enzima	Induz conversão do fibrinogênio em fibrina, independente da presença do íon $\text{Ca}^{2+}$ e dos fatores V, VI e VII da coagulação sanguínea, provocando a deposição de fibrina em torno do microrganismo
Hialuronidase	Enzima	Despolimeriza o ácido hialurônico, favorecendo a disseminação do microrganismo pelos órgãos e tecidos do hospedeiro.
Catalase	Enzima	Converte o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, inativando sua ação tóxica sobre o microrganismo
Alfatoxina	Toxina	É capaz de lisar hemácias e causar danos em plaquetas
Betatoxina	Toxina	Degrada a esfingomielina, provocando lesões na membrana de eritrócitos
Deltatoxina	Toxina	Possui propriedades tensoativas, atuando como detergente e é responsável pelos efeitos sobre a membrana dos eritrócitos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e plaquetas
Gamatoxina	Toxina	Atividade hemolítica, cujo mecanismo não está devidamente definido
PVL	Toxina	Composta por dois componentes protéicos (S e F) que atuam sinergicamente. Altera a permeabilidade da membrana e ataca os leucócitos polimorfonucleares e macrófagos
Esfoliatina	Toxina	Promove a clivagem do extrato granuloso da epiderme, causando síndromes cutâneas severas (síndrome da pele escaldada e impetigo bolhoso)
TSST-1	Toxina	Provoca febre, choque e envolvimento de sistemas orgânicos múltiplos, incluindo erupção cutânea descamativa

Enterotoxinas (A-E)	Toxina	Toxinas protéicas pirogênicas, termoestáveis, responsáveis pela intoxicação alimentar, podendo provocar vômitos e diarreias
---------------------	--------	---

AMPc: monofosfato de adenosina cíclico; PVL: leucocidina Panton-Valentine; TSST-1: toxina da síndrome do choque tóxico.

## 1.2 Panorama histórico e epidemiológico de *S. aureus* resistente a meticilina

Na era pré-antibiótica, *Staphylococcus aureus* era considerada como um dos mais importantes agentes causadores de infecções hospitalares graves, especialmente as cirúrgicas. Bacteremias por *Staphylococcus aureus* levavam ao óbito 80 a 90% dos casos (SKINNER; KEEFER, 1941).

A implantação da antibioticoterapia no início da década de 1930, com o emprego da sulfanilamida (descoberta por Gerard Domagk, em 1932), aparentemente ditava o fim das enfermidades causadas por doenças infecciosas. Contudo, observa-se que, já no final daquela década, surgiam as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes àquele quimioterápico. No início da década de 1940, com a introdução da penicilina, houve uma melhora no prognóstico das doenças infecciosas bacterianas, no entanto, relatos de cepas resistentes à penicilina começaram a surgir após dois anos (RAMMELKAMP & MAXON, 1942). *S. aureus* passou a desenvolver a capacidade de produzir  $\beta$ -lactamase (penicilinase), capaz de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico da penicilina, tornando-a inativa. Em 1944, apenas 5% dos *S. aureus* eram resistentes à penicilina, enquanto que em 1960 essa resistência já era superior a 80%, tanto para cepas isoladas de infecções hospitalares como aquelas adquiridas na comunidade. A resistência antimicrobiana estendia-se a outros antibióticos beta-lactâmicos, como a amoxicilina e ampicilina (BARRETT et al., 1970). Este padrão de resistência era em primeiro lugar emergente em hospitais e, em seguida, disseminava-se para a comunidade. Este é um padrão bem estabelecido que se repete a cada nova onda de resistência antimicrobiana nos dias atuais (CHAMBERS, 2001).

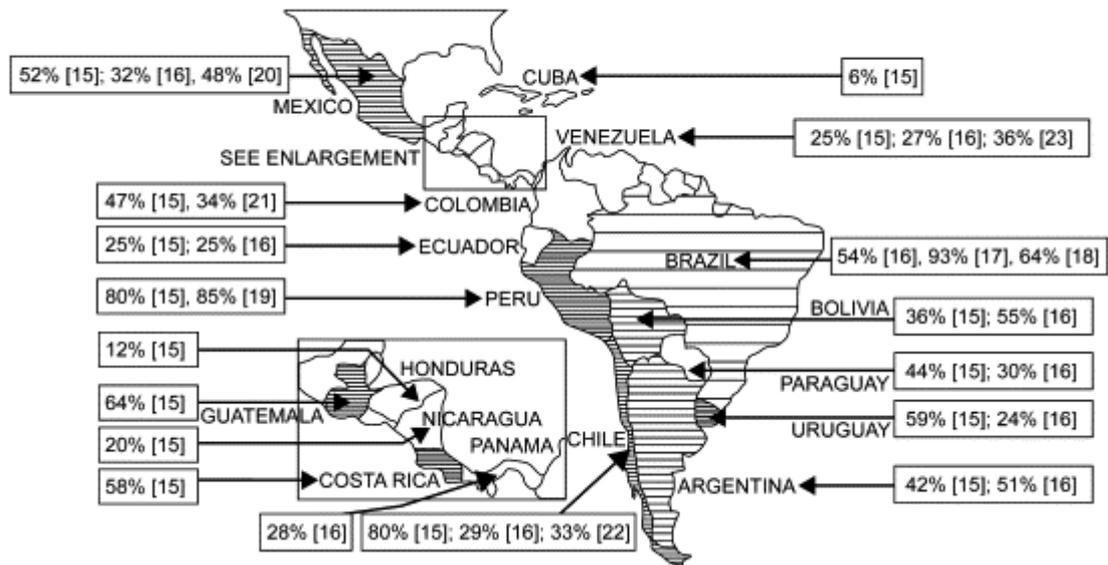
Em 1959, o isolamento do ácido 6-aminopenicilânico, um precursor do anel  $\beta$ -lactâmico, tornou possível a produção de penicilinas semi-sintéticas. Modificações na cadeia desse precursor das penicilinas resultaram em proteção do anel  $\beta$ -lactâmico contra a ação hidrolítica das  $\beta$ -lactamases. Os primeiros desses agentes antimicrobianos disponíveis para uso clínico foram a oxacilina e a meticilina, que solucionaram temporariamente o problema causado pela resistência do *S. aureus* a penicilina. Porém, o uso desses agentes foi

rapidamente seguido do surgimento de cepas resistentes, descritas a partir de 1961, sendo estas identificadas pela sigla MRSA (*Methicillin resistente Staphylococcus aureus*) (JEVONS; BARBER, 1961).

Desde então, o número de casos de infecção por MRSA aumentou vertiginosamente em várias partes do mundo, principalmente na Europa (KAYSER, MAK, 1972), nos Estados Unidos da América (EUA) (SABATH et al., 1968) e na Austrália (MCDONALD et al., 1981). Em diversas áreas, a vigilância epidemiológica constatou um aumento da frequência do achado de isolados de MRSA no ambiente hospitalar (JESSEN et al., 1969; PAVILLARD et al., 1982), e aumento na proporção de infecções nosocomiais (KAYSER, MAK, 1972). Havia grande preocupação que a maioria dos isolados de MRSA, além de produzirem  $\beta$ -lactamase, eram reservatórios de determinantes de resistência para uma variedade de outros antimicrobianos, incluindo as quinolonas, estreptomicina, tetraciclina, sulfonamidas, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina, o ácido fusídico, gentamicina e neomicina (LYON, SKURRAY, 1987).

Na maioria das vezes, as taxas de infecção pelo MRSA baseiam-se em estudos científicos publicados, pois ainda são raros os países que realizam programas de vigilância epidemiológica do MRSA. Em estudo realizado por SENTRY (1998), que incluía hospitais dos EUA, Canadá e Europa, verificou que *S. aureus* era responsável por 22% das infecções sistêmicas, 23,2% das infecções do trato respiratório, e 39,2% das infecções de pele e mucosas (PFALLER et al., 1998). Entre 1997 e 1999, a prevalência de enfermidades causadas por MRSA foi de 23% na Austrália, 67% no Japão, 35% na América Latina, 32% nos EUA e 26% na Europa (DIEKEMA et al., 2001). Estudo realizado entre os anos de 2004 e 2007 detectou que 48,3% de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas em 33 centros da América Latina eram resistente a metilina (ROSSI et al., 2008).

No Brasil, a ampla distribuição de casos de MRSA alertam para a necessidade de um programa de vigilância que desenvolva estratégias para melhorar o controle e tratamento na colonização e infecção por MRSA. A prevalência de infecções por MRSA em serviços de saúde atinge índices elevados, variando de 54 a 93 % (Figura 2).



**Figura 2.** Prevalência de infecções hospitalares causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina em países da América Latina. (Fonte: GUZMÁN-BLANCO et al., 2009).

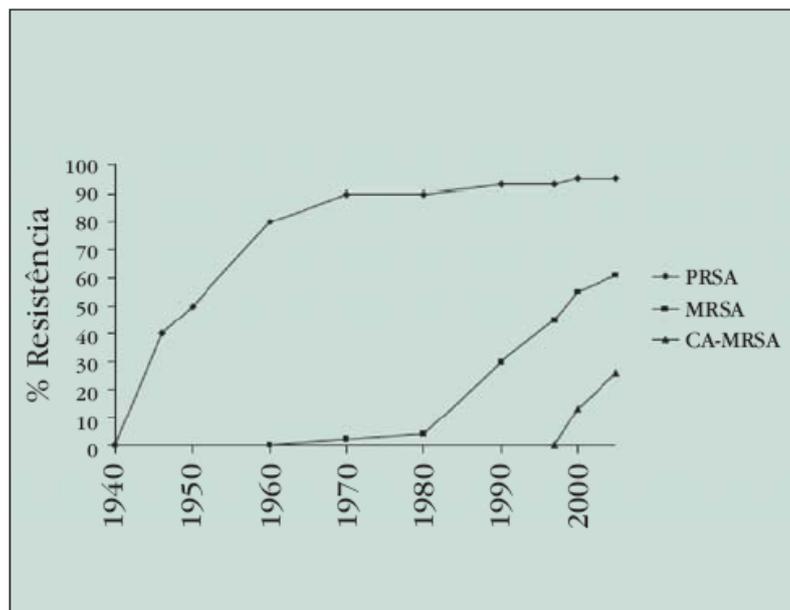
Além do custo humano, é importante ressaltar o alto custo econômico relacionado com o aumento de infecções por MRSA. Um dos fatores que mais contribuem com o custo econômico decorrente de infecções nosocomiais causadas por MRSA é o aumento do tempo de permanência do paciente no hospital (BJÖRHOLT et al., 2004). NULENS et al., 2008, verificaram em um hospital universitário alemão, que a média de permanência dos 22.400 pacientes internados anualmente era de 8,4 dias, no entanto, a média elevava para 39,9 dias entre aqueles que contraíam bacteremia por MRSA.

Estudo realizado em um hospital nos EUA revelou que as infecções sistêmicas causadas por MRSA levavam a um aumento do tempo de permanência do paciente no hospital em 40%, e conseqüentemente, à elevação do custo do tratamento em pelo menos 32% (KOPP et al., 2004). Um hospital universitário na Finlândia estimou o custo do tratamento de 14 meses decorrentes de um surto de MRSA, como sendo de U\$ 1.279.385,00 (KANERVA et al., 2007).

No entanto, o MRSA não pode mais ser considerado um patógeno relacionado exclusivamente às infecções associadas ao ambiente hospitalar. A partir dos anos 1990, começaram a ser relatados casos de infecções por MRSA na comunidade (CA-MRSA, *community associated methicillin resistant Staphylococcus aureus*), em pacientes sem fatores

de risco, conhecidos para aquisição de MRSA, ou seja, não apresentavam contato frequente, direto ou indireto, com serviços de saúde que pudessem de alguma forma, predispor o paciente a infecções por MRSA. Desta forma, o MRSA passou a acometer indivíduos na comunidade, provocando infecções de pele, de mucosas e pulmonares, levando a altos índices de morbi-mortalidade (CHAMBERS, 2001; CDC, 1999; WEBER, 2005).

O primeiro relato de CA-MRSA ocorreu em 1993 na Austrália, isolado de amostras de populações aborígenes (UDO et al., 1993) e, em 2002, ganhou atenção nos Estados Unidos após surtos de infecções cutâneas em atletas na cidade de Los Angeles (CDC, 2003). Na América do Sul, infecções causadas por MRSA em pacientes não hospitalizados foram observadas inicialmente no Uruguai em 2001 (MA et al., 2005). Já no Brasil, o primeiro registro de infecção por CA-MRSA foi relatado por RIBEIRO et al. (2005) e, mais recentemente, também foi relatado o primeiro caso de infecção grave (ROZENBAUM et al., 2009). Estudos nos EUA e na Europa têm demonstrado que o CA-MRSA está emergindo como um patógeno de relevância a nível de Saúde Pública, visto que infecções de maior gravidade tem sido relatadas entre crianças e adultos clinicamente saudáveis (VANDENESCH et al.; VAN DER FLIER et al.; MONGKOLRATTANTHAI et al., 2003; FRANCIS et al., 2005). A Figura 3 apresenta o perfil da evolução da resistência antimicrobiana de *S. aureus* aos antibióticos beta-lactâmicos.



**Figura 3.** Evolução da resistência aos antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* resistente à penicilina ou PRSA; *S. aureus* resistente a meticilina ou MRSA;

*S. aureus* resistente a meticilina adquiridos ou associados à comunidade (CA-MRSA). (Fonte. BUSTOS-MARTÍNEZ et al., 2006)

Além de CA-MRSA infectarem indivíduos sem fatores de risco aparentes, essas cepas possuem perfis de resistência e virulência peculiares. Quanto à resistência, elas são menos resistentes a outras classes de antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos do que os MRSA (DAUM, 2007; KAPLAN, 2005). Apresentam uma sensibilidade a antimicrobianos, como clindamicina, gentamicina, ciprofloxacina, sulfametaxazol/trimetoprim e vancomicina, que varia de 85% a 100%, e resistência apenas a oxacilina e a outros  $\beta$ -lactâmicos (LOPES, 2005; RIBEIRO et al., 2005). Em relação à virulência, nas cepas CA-MRSA existe alta prevalência dos genes que codificam a produção da leucocidina de Pantón-Valentine, uma exotoxina associada a infecções graves de pele e de partes moles, bem como a pneumonia necrosante (GILLET et al., 2002). Apesar de diversos estudos publicados sobre possíveis diferenças quanto à virulência entre os *S. aureus* sensíveis e os resistentes a meticilina, não há, até o momento, evidências conclusivas sobre essa questão (ROZGONYI et al., 2007).

A maioria das infecções hospitalares causadas por MRSA está associada com um número relativamente pequeno de clones epidêmicos disseminados nos vários continentes. Durante a última década, cinco clones de MRSA foram identificados pela combinação de diferentes métodos de tipagem molecular, sendo eles conhecidos como clone Ibérico, Brasileiro, Húngaro, Nova-Iorquino-Japonês e pediátrico (HIRAMATSU et al., 2001; ZHANG et al., 2005; SZCZEPANIK et al., MAREE et al., 2007; SCRIBEL et al., 2009).

As cepas MRSA restringiram o uso da antibioticoterapia no combate às infecções por *S. aureus* à vancomicina e teicoplanina. A vancomicina é um glicopeptídeo conhecido desde 1956, quando foi colocado à disposição da Medicina graças a Cormick. Entretanto, foi deixada à parte justamente devido ao sucesso da meticilina, da oxacilina e de outras isoxazolilpenicilinas. A vancomicina é eficiente no tratamento das infecções causadas pelas cepas MRSA, apesar de apresentar efeitos nefrotóxicos e ototóxicos (SRINIVASAN et al., 2002; VELÁZQUEZ-MEZA, 2005). Lamentavelmente, já existem cepas resistentes a esse glicopeptídeo, as conhecidas cepas VRSA (*vancomycin resistente S. aureus*). O aumento do uso da vancomicina provocou uma pressão seletiva, que levou ao surgimento de *Staphylococcus aureus* coagulase-negativo com sensibilidade reduzida à vancomicina e a outros glicopeptídios (TIWARI; SEN, 2006).

Em 1996, foi identificado no Japão o primeiro isolado de *S. aureus* com suscetibilidade reduzida à vancomicina (*vancomycin intermediate Staphylococcus aureus*

[VISA]) (HIRAMATSU, 1998). Desde então, diversos relatos de isolados de VISA ocorreram no mundo, inclusive no Brasil (OLIVERIA et al., 2001). Em junho de 2002, o primeiro *Staphylococcus aureus* com resistência plena à vancomicina foi identificado em Michigan, EUA (WEIGEL et al.; CHANG et al., 2003). Outras cepas resistentes foram relatadas em alguns países, além do Brasil e Jordânia (PALAZZO et al., 2005; BATAINEH, 2006)

Hoje, felizmente, ainda existem alternativas terapêuticas contra as cepas resistentes aos glicopeptídeos teicoplanina e vancomicina, como as estreptograminas (quinupristina/daltopristina), as oxazolidinonas e as associações de antibióticos, como vancomicina e  $\beta$ -lactâmicos (TAVARES, 2002).

### **1.3 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina**

Os alvos de atuação dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são enzimas com função de transpeptidases e que atuam nas etapas finais da formação da parede celular das bactérias. Essas enzimas, por se ligarem aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, são chamadas de PBP (*protein binding penicillins*). As PBPs são proteínas de membrana que estão envolvidas na biossíntese da parede celular, promovem a formação das pontes transversas de pentaglicinas do peptidoglicano, através da ligação da D-alanina de uma cadeia peptídica com a L-lisina da cadeia subsequente. Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, ao inibirem as PBPs, impedem a formação da camada de peptidoglicano da parede celular, o que acarreta na morte bacteriana (GUIGNARD, et al., 2005). Cepas susceptíveis de *S. aureus* produzem quatro PBPs, ou seja, PBP 1, 2, 3 e 4, sendo as PBPs 1, 2 e 3 consideradas como principais alvos dos  $\beta$ -lactâmicos (BOYLE-VAVRA et al., 2003).

A resistência a meticilina surgiu devido a uma alteração na PBP. A nova proteína, a PBP2a, possui menor afinidade pela maioria dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, e tem sido considerada como pré-requisito para o alto nível de resistência a estes antimicrobianos em isolados de MRSA. A produção da PBP2a confere resistência a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, uma vez que possui baixa afinidade para os mesmos (DE JONGE et al., 1993).

O nível de resistência a meticilina, definida pela concentração inibitória mínima – CIM, depende da quantidade da produção da PBP2a, que é influenciada por vários fatores genéticos. A expressão fenotípica da resistência dos MRSA pode ser homogênea ou heterogênea. Na resistência heterogênea, apenas uma pequena fração da população expressa resistência antimicrobiana ( $10^{-6}$  a  $10^{-8}$ ). Um fenótipo menos frequente é a resistência antimicrobiana homogênea, onde toda a população de células é altamente resistente. Assim a

expressão de resistência a meticilina em MRSA pode variar em diferentes cepas, desde a CIM de 1,5 µg/mL, muito próxima da CIM de cepas suscetíveis, até 800 µg/mL em culturas uniformemente resistentes (EL-ADHAMI & STEWART, 1997).

*S. aureus* que possuem o gene *mecA* e, conseqüentemente a PBP2a, apresentam uma forma de resistência a meticilina designada por intrínseca. Quando estes dois elementos estão ausentes poderá tratar-se de um *S.aureus* sensível a meticilina (MSSA) ou com susceptibilidade reduzida a meticilina. Este último tipo designa-se por BORSA (*borderline-resistant S. aureus*), quando possui uma hiperprodução de penicilinase estafilocócica, ou MODSA (*methicillin intermediate S.aureus*) quando possui PBPs normais, mas com baixa afinidade aos antibióticos β-lactâmicos. Tanto o BORSA como o MODSA são geneticamente distintos do MRSA, não se sabendo ao certo o seu significado clínico ou epidemiológico, no entanto, ao contrário do MRSA, parecem que contra ambos podem ser tratados com as penicilinas resistentes às β-lactamases e cefalosporinas (HARTSTEIN et al., 2004).

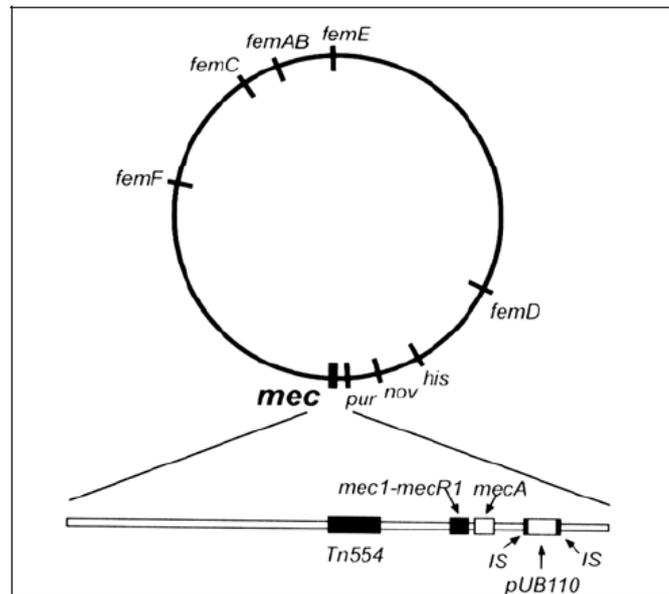
A PBP2a não tem origem na espécie de *S. aureus*, uma vez que não há nenhum alelo equivalente do gene *mecA* em cepas de MSSA. A identificação de um gene homólogo ao *mecA*, presente em grande número de isolados de *Staphylococcus sciuri*, indica a origem extra espécie deste gene. O gene *mecA* de *S.sciuri* e de MRSA apresentam 88% de similaridade entre os aminoácidos. Apesar da similaridade, isolados de *S. sciuri* carreadores do gene homólogo ao *mecA* não apresentam resistência intrínseca a meticilina, presumindo-se que este gene, nativo do *S. sciuri*, apresenta função biológica não relacionada com a resistência a antibióticos. Por outro lado, a diferença entre as sequências é suficiente para indicar que *S. aureus* não adquiriram o gene *mecA* diretamente das cepas de *S. sciuri* (COUTO et al., 2003)

Uma análise comparativa de três genomas de *S. aureus* revelou que, dentro de um plano genético relativamente constante, a plasticidade nas espécies é conferida por transferência horizontal de elementos genéticos de origem desconhecida, que se inserem no genoma (ITO et al., 2003). As cepas de MRSA, em sua evolução e proteção contra a pressão seletiva, adquiriram e integraram ao seu genoma um elemento genético móvel de 21 a 67 kb, denominado *staphylococcal cassette chromosome (SCCmec)*, que contém o gene de resistência a meticilina (*mecA*) e outros determinantes de resistência a antibióticos plasmídeos e transposons (Tabela 3) (ITO et al., 2001; MA et al., 2002). Além disso, contém genes regulatórios (*mecI* – repressor do gene *mecA* e *mecRI* – indutor do gene *mecA*), sequência de inserção e genes que codificam para as recombinases (*ccr*) responsáveis pela excisão e mobilidade deste elemento, ver Figura 4 (ITO et al., 2001). Alguns genes, denominados genes auxiliares, fatores essenciais ou genes *fem* (*factor essential for methicilin resistance*),

auxiliam o gene *mecA* a expressar um alto nível de resistência aos betalactâmicos. Foram identificados muitos desses genes *fem*, denominados *femA*, *femB*, *femC*, *femD*, *femE* e *femF* (VANNUFFEL et al., 1995).

**Tabela 3.** Plasmídeos e transposons que integram o *staphylococcal cassette chromosome* (SCC*mec*) e conferem resistência a antimicrobianos (Fonte: ITO et al., 2003).

Elemento genético móvel	Genes de resistência	Resistência	SCC <i>mec</i>
Transposons			
Tn554	<i>ermA</i> <i>ant(9)</i>	grupo MLS espectinomicina	Tipo II e III
Tn5801	<i>tetM</i>	tetraciclina	Tipo II
Tn4001	<i>aacA-aphD</i>	Aminoglicosídeos	Tipo II
Tn552	<i>blaZ</i>	β-lactâmicos	Tipo II e IV
ψTn554	<i>cadA</i>	Cádmio	Tipo III
Plasmídeos			
pUB110	<i>Ant(4)</i> <i>bleO</i>	aminoglicosídeos bleomicina	Tipo I e II
PN315 e pMW2	<i>Blaz no Tn552</i>	β-lactâmicos	Tipo II e IV
pMu50	<i>qacA aacA-aphD</i>	antisépticos	Tipo II
pI258	<i>merA</i>	penicilina e mercúrio	Tipo III
pT181	<i>tetK</i>	tetraciclina	Tipo III



NOTA: IS indica os elementos IS431 (o mesmo que IS257) que ladeiam o plasmídeo de resistência à tobramicina pUB110. *Tn554* é um transposon contendo o gene *ermA*, que codifica a resistência induzida à eritromicina.

**Figura 4.** Localização do gene *mecA* no elemento genético SCC*mec* de *S.aureus* resistente a meticilina (Fonte: CHAMBERS, 1997).

Até o momento, sete tipos diferentes de SCC*mec* (I-VII) já foram descritos, os quais se diferem entre si quanto à composição do complexo *mec* e os genes *ccr* (SOUSA et al., 2005; REINERT et al., 2008; DEURENBERG et al., 2009). As cepas hospitalares de MRSA estão geralmente associadas com os tipos I, II e III, enquanto que os isolados de CA-MRSA estão associadas ao tipo IV e, menos frequentemente, ao tipo V e VII (SOUSA et al., 2005; KLUYTMANS et al., 2006).

Os elementos genéticos SCC*mec* tipos I, IV, V, VI e VII contêm o gene *mecA* como o único determinante de resistência, causando resistência apenas a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, enquanto que os tipos II e III contêm múltiplos determinantes para a resistência, como plasmídeos integrados e transposons, e são responsáveis pela multirresistência normalmente encontrada em cepas de MRSA hospitalares (SOUSA et al., 2005; ZETOLA et al., 2005; BOYLE-VAVRA et al., 2007). Entretanto, devido ao seu maior tamanho, a transferência horizontal dos elementos SCC*mec* tipo II e III é mais difícil de ocorrer, quando comparados com os demais tipos de SCC*mec* (ZETOLA et al., 2005; BOYLE-VAVRA et al., 2007).

Devido ao seu menor tamanho e ausência de outros genes de resistência, as cepas SCC<sub>mec</sub> tipo IV são provavelmente mais móveis, o que facilitaria sua transferência horizontal entre as espécies (COHEN, 2005).

O gene *mecA* é regulado pelo sistema de genes regulatórios *mecI/mecR1*, que estão presentes no genoma do MRSA. Eles codificam para as proteínas repressora MecI e indutora MecR1, respectivamente, sendo esta última denominada de proteína transmembrana sinalizadora sensível ao antibiótico  $\beta$ -lactâmico (DEURENBERG, STOBBERINGH, 2008).

A proteína MecI, quando presente, reprime a transcrição do gene *mecA* e do par de genes *mecR1-mecI* na ausência de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, através da ligação à região operadora destes genes no DNA bacteriano. Isso significa que quando não houver antibióticos desta classe no meio ambiente a que a bactéria está exposta, não ocorrerá transcrição do gene *mecA* até a proteína PBP2a nem transcrição dos genes reguladores do *mecA*. Porém, na presença de um antibiótico  $\beta$ -lactâmico, a proteína transmembrana sinalizadora sensível a  $\beta$ -lactâmicos (MecR1) é auto clivada e o domínio metaloprotease, que está localizado na parte citoplasmática dessa proteína, torna-se ativo. Esta metaloprotease cliva a proteína MecI, que por sua vez, estava ligada à região operadora do *mecA*, permitindo assim a transcrição do gene e a subsequente produção da conhecida proteína alterada PBP2a (DEURENBERG, STOBBERINGH, 2008).

#### **1.4 Métodos de identificação laboratorial das estirpes MRSA**

Diversos métodos têm sido utilizados para a detecção da resistência a oxacilina no *Staphylococcus aureus*. Essa detecção muitas vezes pode ser difícil, principalmente devido ao fenômeno da heterorresistência. Os métodos historicamente mais usados baseiam-se em modificações na tentativa de aumentar a expressão da resistência à oxacilina. Tais modificações incluem alteração da temperatura de incubação a 33-35°C, ao invés de 37°C, do tempo de incubação de 24 horas, ao invés de 16-18 horas, e adição de cloreto de sódio ao meio de cultura.

A presença de estafilococos identificados como sendo resistentes a oxacilina devem ser relatados como resistentes a outros  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, carbapenêmicos, cefalosporinas e combinações de  $\beta$ -lactâmicos com inibidores de  $\beta$ -lactamases), independentemente dos resultados dos testes *in vitro* (CHAMBERS, 1997; VELASCO et al., 2005).

#### 1.4.1 Disco difusão

Este teste permite a classificação da maioria das cepas bacterianas como suscetíveis, intermediárias ou resistentes a uma variedade de agentes antimicrobianos. O método apresenta diversas vantagens, uma vez que se trata de uma técnica simples, de baixo custo, de boa reprodutibilidade, e fornece resultados de fácil interpretação.

O teste consiste na aplicação de um inóculo padronizado de bactérias (aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL) à superfície de uma placa de ágar Mueller-Hinton. Discos de papel-filtro impregnados com uma concentração fixa de antibiótico são colocados na superfície inoculada do ágar. As placas são incubadas por 16-18 horas em atmosfera ambiente a 35°C. Os diâmetros das zonas de inibição de crescimento ao redor de cada disco de antibiótico são medidos em milímetros examinando-se a placa com luz refletida (CLSI, 2009).

Para o *S. aureus*, o teste com disco de cefoxitina é comparável ao disco de oxacilina para a detecção de resistência à oxacilina mediada por *mecA*; o teste com disco de cefoxitina é mais fácil de ser lido, sendo o método preferido. De acordo com o resultado da cefoxitina, é reportado o resultado da oxacilina como suscetível ou resistente. Se o resultado obtido for intermediário para oxacilina, deve-se realizar o teste para detecção do gene *mecA* ou PBP2a e a CIM, ou o teste de triagem em ágar com oxacilina (CLSI, 2009).

#### 1.4.2 Teste de *screening* com oxacilina

Outro teste que pode ser utilizado para detecção da resistência com boa acurácia é o teste de *screening*, com placa contendo AMH suplementado com 4% de NaCl e 6 µg/mL de oxacilina (CAVASSINI et al., 1999; SWENSON et al., 2001; SAKOULAS et al., 2001). Uma grande vantagem do teste é o baixo custo, sobretudo quando se deseja testar vários isolados ao mesmo tempo e apenas para oxacilina, por exemplo, em estudos de vigilância epidemiológica.

#### 1.4.3 Determinação da concentração inibitória mínima

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da oxacilina para os estafilococos inclui métodos de diluição em ágar e em caldo (macrodiluição e microdiluição), e de gradiente de difusão em ágar (E-test). Apesar dos métodos possibilitarem uma avaliação quantitativa da resistência a oxacilina e de serem métodos muitas vezes considerados padrões,

os mesmos parecem não possuir acurácia maior do que os testes fenotípicos qualitativos (SWENSON et al., 2001; GRADELSKI et al., 2001; VELASCO et al., 2005). No entanto, devido à existência de outros mecanismos de resistência, esses métodos podem e devem ser utilizados como confirmatórios e/ou auxiliares em isolados nos quais o padrão de suscetibilidade é duvidoso ou de difícil diagnóstico.

#### 1.4.4 Teste de aglutinação com partículas de látex para detecção de PBP2a

Testes para detecção do gene *mecA* ou a proteína gerada por sua expressão, a proteína PBP2a, são os métodos mais acurados para avaliar a resistência à oxacilina e podem ser usados para confirmação dos resultados de disco difusão dos isolados de *S. aureus* (CLSI, 2008).

A técnica de aglutinação com partículas de látex é rápida e de fácil execução. Consiste na detecção de PBP2a extraída de colônias teste. O método baseia-se na aplicação de partículas de látex impregnadas com anticorpos monoclonais reativos com PBP2a, que quando presente na amostra, reage promovendo aglutinação macroscopicamente visível. Em amostras de MRSA cultivadas em ágar sangue, estudos reportam uma sensibilidade de 98,5 – 100% e uma especificidade de 100%. Entretanto, colônias cultivadas em meios seletivos, contendo substâncias como NaCl, oxacilina ou metilicina, podem afetar a reatividade do teste, principalmente quando se trata de isolados heterogêneos que não apresentam bom crescimento em meios seletivos (BROWN, 2001).

Isolados de *S. aureus* que possuem o gene *mecA*, ou que produzem PBP2a, devem ser reportados como sendo resistentes à oxacilina e, na ausência do gene ou da proteína, reportados como suscetíveis. Devido à ocorrência de outros mecanismos de resistência que não a presença do gene *mecA*, isolados no qual a CIM para oxacilina for  $> 4 \mu\text{g/mL}$  e gene *mecA* ou PBP2a negativos, o isolado deve ser reportado como oxacilina-resistente. Esses isolados devem apresentar-se como suscetíveis à cefoxitina (CLSI, 2008).

#### 1.4.5 Métodos automatizados

Em relação aos métodos automatizados, como o Vitek e o MicroScan, sua acurácia foi avaliada em alguns estudos. É difícil comparar os resultados dos mesmos, visto que há frequentes mudanças de *software* e diferentes cartões ou painéis são disponibilizados. Alguns estudos demonstraram acurácia comparável à dos testes de disco-difusão, porém outros

evidenciaram sensibilidade e especificidade baixas, se cepas heterorresistentes ou *borderline* forem testadas (SWENSON et al., 2001; FELTEN et al., 2002).

#### 1.4.6 Meios cromogênicos

Outros métodos que podem ser utilizados incluem alguns meios cromogênicos, como MRSASelect (Bio-Rad), MRSA ID (BioMérieux), ORSAB (Oxoid), CHROMagar MRSA, entre outros. Em termos de acurácia, esses meios parecem não oferecer grande vantagem em relação aos demais métodos fenotípicos já discutidos, apesar de serem práticos por possibilitar o isolamento de *S. aureus* e a avaliação da resistência a oxacilina em apenas uma etapa (DIEDEREN et al., 2005; CHERKAOUI et al., 2007).

#### 1.4.7 Reação em cadeia da polimerase para detecção do gene *mecA*

A detecção do gene *mecA* por métodos moleculares, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR), é considerada o padrão ouro para avaliação qualitativa da resistência à oxacilina. Alguns trabalhos relatam o uso de PCR simultâneo para detecção dos genes *femA* e *mecA* para identificação de MRSA (OLIVEIRA et al. 2002).

É importante lembrar que isolados *mecA*-positivos (ou PBP2a-positivos) devem ser relatados como resistentes à oxacilina, no entanto, isolados *mecA*-negativos (ou PBP2a-negativos) devem ser relatados como sensíveis apenas se a CIM para oxacilina for  $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$  devido à ocorrência, ainda que rara, de outros mecanismos de resistência como superprodução de  $\beta$ -lactamases e presença de PBPs modificadas (CHAMBERS et al., 1997; CLSI, 2007).

#### 1.4.8 Eletroforese em campo pulsado

Outro método utilizado para a genotipagem de estafilococos é o PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*). Indicado para estudos com finalidade epidemiológica (CHANG et al. 2000), é particularmente útil na investigação de surtos hospitalares (TEIXEIRA et al. 1995).

No PFGE, as enzimas de restrição reconhecem sítios pouco frequentes, o que resulta em fragmentos de DNA grandes. O número de fragmentos varia de um isolado para outro. A combinação desses fatores possibilita a formação de padrões eletroforéticos de fácil análise e comparação (SADER et al. 1994; BANNERMAN 1995).

O PFGE tem sido considerado um método padrão ouro para a tipagem de MRSA em razão de seu elevado poder discriminatório, sua alta reprodutibilidade e sua boa correlação com dados epidemiológicos (SENNA et al., 2002). Um exemplo de uso prático deste método foi o trabalho realizado por SADER et al., 1994, onde a digestão com a enzima SmaI e posterior separação dos fragmentos por PFGE revelaram seis diferentes padrões de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP) em cepas isoladas de diferentes hospitais do Brasil. Cepas com idêntico padrão foram encontradas em oito dos nove hospitais investigados, demonstrando ampla disseminação de um mesmo clone de MRSA (SADER et al., 1994).

### **1.5 Plantas medicinais como alternativa de novos medicamentos.**

O uso de plantas medicinais se perde ao longo da história do ser humano que, em busca de alívio as suas dores e enfermidades, foi impelido a analisar os fenômenos da natureza a fim de encontrar soluções que pudessem minorar seus sofrimentos (BRAGANÇA, 1996; DEVIENNE, 2004).

No Brasil, o uso de plantas medicinais no tratamento de enfermidades foi influenciado pela cultura indígena, africana e asiática, cujas marcas foram integradas em um conjunto de princípios que visam a cura de doenças e restituem ao homem a vida natural (OLIVEIRA, 1999). No Brasil, podemos encontrar em toda extensão territorial, aproximadamente 50 mil espécies de plantas, porém grande parte é totalmente desconhecida e apenas uma ínfima parte foi analisada e explorada para verificação de seu potencial medicinal (DINIZ, 1997; SILVA et al., 2008).

A fitoterapia e/ou o uso de plantas medicinais faz parte da prática da medicina popular e constitui um conjunto de saberes transmitidos, principalmente pela tradição oral, de forma perfeitamente articulada entre os diversos usuários e praticantes (CARRARA, 2007). No entanto, essa prática vem perdendo força a partir das décadas de 40 e 50, com a industrialização dos medicamentos (BRAGANÇA, 1996).

Observa-se que o tratamento terapêutico com plantas medicinais está voltando a ser incentivado nos dias atuais, sobretudo devido a alguns fatores, tais como a falta de acesso da população ao medicamento industrializado, necessidade de pesquisas com plantas medicinais em busca de novos medicamentos, menor tempo e custos reduzidos para produção de medicamentos originados de plantas, e elevado grau de efeitos colaterais provocados por medicamentos industrializados (SILVA et al., 2008).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a prática do uso de plantas medicinais é tida como a principal opção terapêutica de aproximadamente 80% da população mundial, sendo as plantas medicinais consideradas como a maior e melhor fonte de obtenção de fármacos para a humanidade (SANTOS, 1995).

Por esses e outros motivos, as plantas medicinais passaram a ser cogitadas por profissionais da área da saúde, e por instituições governamentais, como um recurso terapêutico possível de utilização no atendimento de algumas necessidades dos serviços básicos de saúde. Isto pode ser observado atualmente em unidades de saúde, onde parte dos medicamentos essenciais não são suficientes para suprir a demanda dos usuários.

O extrato bruto e o óleo essencial são os derivados das plantas medicinais mais utilizados na medicina popular. Os extratos vegetais são produtos resultantes de extração por solventes e concentração por evaporação do líquido extrator de um vegetal convenientemente preparado (COUTINHO, 2004). Nos extratos vegetais estão presentes certas substâncias que conferem o mecanismo de ação próprio daquele extrato contra alguns males. São algumas delas: flavonóides, taninos, alcalóides, mucilagens, terpenóides, entre outros.

Os óleos essenciais são líquidos oleosos voláteis de aroma forte e quase sempre agradável. Normalmente são elaborados a partir das folhas e com composição química bastante complexa a depender da parte da planta do qual é destilado, da hora do dia, da época do ano, da variedade do vegetal, do tipo de solo e clima (LAVABRE, 1992). São constituídos principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos, ésteres, alcoóis, fenóis, aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos (SIANI et al., 2000).

Os óleos essenciais possuem atividades antiinflamatória, analgésica, sedativa, expectorante, estimulante, antiparasitária, diurética, anticonvulsivante e antimicrobiana comprovadas cientificamente (CARDOSO, 2008; RADUNZ, 2001). Assim como os óleos essenciais, os extratos vegetais também são conhecidos por seu uso na medicina popular e suas atividades terapêuticas. Muitas pesquisas têm comprovado a atividade antimicrobiana de extratos vegetais de diversas plantas medicinais (CUNHA et al., 1995; GNAN; DAMELLO, 1999; KHAN; KIHARA; OMOLOSO, 2001).

Estudos sobre as atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas têm sido relatados em muitos países tais como Brasil, Cuba, Índia, México e Jordânia que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais para uso como antibacteriano e/ou antifúngico (MARTÍNEZ ET AL., 1996; NAVARRO ET AL., 1996; AHMAD & BEG, 2001; MAHASNEH ET AL., 1999; DUARTE ET AL., 2005).

A busca de substâncias vegetais com elevada atividade antimicrobiana é de extrema importância, pois além de esclarecer cientificamente o uso popular de muitas plantas medicinais, garantindo seu uso seguro, nos proporciona a oportunidade de encontrar compostos com atividade antimicrobiana muitas vezes superior aos fármacos atuais. A planta *Plectranthus amboinicus* por se tratar de uma planta rica em metabólitos com potenciais antimicrobianos e anti-inflamatórios, tem sido alvo de intensos estudos.

## 1.6 *Plectranthus amboinicus*

### 1.6.1 Considerações botânicas

A família Lamiaceae contém vários gêneros, tais como sage (*Salvia*), manjerição (*Ocimum*) e hortelã (*Mentha*), com uma rica diversidade de uso etnobotânico. Outro importante gênero é o *Plectranthus*, um gênero que contém cerca de 300 espécies encontradas na África tropical, Ásia e Austrália. Algumas espécies de *Plectranthus* são difíceis de serem identificadas devido à falta de critérios morfológicos bem estabelecidos para diferenciação entre espécies e entre gêneros estreitamente relacionados entre si (PATON et al., 2004).

*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng é uma planta aromática nativa da Índia e cultivada em várias partes do mundo, inclusive no Brasil (HEDGE, 1992). Pode atingir até 1 m de altura, tem folhas com pecíolos que medem de 1,5 a 4,5 cm, com lâminas suborbicular, rombóides, carnuda, macia reniforme, com 5 a 10 cm de comprimento, apresentando sabor e aroma semelhantes ao do orégano (Figura 5). Os sinônimos de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng incluem *Plectranthus aromaticus* Roxb, *Coleus aromaticus* Benth e *Coleus amboinicus* Lour. Popularmente é conhecida por diversos nomes, mas no Brasil é denominada de malvariço, malvarisco, malva, hortelã-da-folha-grande, hortelã-graúda, hortelã-grossa e hortelã-grande (MATOS, 1994).



**Figura 5.** *Plectranthus amboinicus*

#### 1.6.2 Composição química

A partir de um levantamento bibliográfico no *Chemical Abstract* (1907-2010), verificou-se que diversos compostos químicos já foram isolados tais como carvacrol, cariofileno, terpineol, timol,  $\beta$ -cariofileno, óxido de cariofileno e outros no óleo essencial. Flavonóides como apigenina, quercetina, luteonina e taxifolina, além de ácidos terpênicos e taninos foram encontrados no extrato da planta (ALBUQUERQUE, 2000; VERA et al., 1993). Estudo de prospecção do extrato hidroalcoólico pode ser visualizado na Tabela 4.

**Tabela 4.** *Screening* fitoquímico do extrato hidroalcoólico das folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Fonte: GURGEL et al., 2009a).

<b>Metabólitos</b>	<b>Reagentes</b>	<b>Presença/ausência</b>
Alcalóides	Dragendorff	-
Derivados do ácido cinâmico	2-aminoetildifenil borato	+
Flavonóides	2-aminoetildifenil borato	+
Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas	Vanilina clorídrica	+

Monoterpenóides, sesquiterpenóides e diterpenóides	Vanilina ácido sulfúrico	+
Terpenóides e esteróides	Lieberman/Burchard	+
Iridóides	Vanilina ácido sulfúrico	-
Saponinas	Anisaldeido	-

### 1.6.3 Uso popular e ação farmacológica

Popularmente conhecida como malvarisco, é um anti-séptico bucal, demulcente e balsâmico, muito útil no tratamento de rouquidão, de inflamação da boca e garganta, sendo também usada tradicionalmente, contra tosse e bronquite na forma de xarope (lambedor) e de balas. As folhas inteiras podem ser sugadas lentamente no caso de rouquidão ou dor de garganta. É utilizado popularmente como expectorante e para tratar a dor de ouvido (DINIZ et al., 1998).

*Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng também é citada frequentemente no tratamento de asma, de bronquite e de inflamação da garganta na Índia e no Caribe (MORTON, 1992; JAIN; LATA, 1996), e em Cuba é usada para tratar infecções e asma (CASTILLO; GONZALES, 1999; CANO; VOLPATO, 2004). No Brasil, era utilizada para o tratamento de processos inflamatórios e de ulcerações da pele causadas por *Leishmania brasiliense* (FRANÇA et al., 1996). É usada também para tratar queimaduras e mordidas de escorpião na Malásia (MORTON, 1992). Na Índia, o suco das folhas é usado para tratar alergias da pele (HARSHA et al., 2003). Também é usada popularmente no tratamento da dispepsia, indigestão, diarreia e como carminativo na Índia e na África (MORTON, 1992; JAIN; LATA, 1996; ONG; NORDIANA, 1999). É usada no Caribe para tratar distúrbios cardíacos (MORTON, 1992) e para tratar desordens sensoriais associadas ao ouvido e ao olho na Polinésia (ZPEMICK, 1972), Na Índia, suas folhas são friccionadas nos olhos para aliviar as conjuntivites (MORTON, 1992).

É importante na Ásia e na América do Sul para o tratamento das febres (MORTON, 1992; HARSHA et al., 2002) e na cura do cólera (GURIB-FAKIM et al., 1996). As folhas são utilizadas frequentemente no tratamento de doenças urinárias no Amazonas e na Índia (JAIN; LATA, 1996; YOGANARASIMHAN, 2000).

Diversos estudos já foram publicados ratificando grande parte do uso popular, sendo alguns destes citados a seguir. Nas folhas, foram encontradas atividade broncodilatadora em cobaia e atividade antituberculose (CARBAJAL et al., 1991; FRAME et al., 1998). Atividade antioxidante foi constatada em estudos *in vitro*, tendo sido atribuída tal papel aos flavonóides e outros compostos presentes nas folhas. A atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico demonstrou ser compatível ao  $\alpha$ -tocoferol (SALMÁN et al., 1996). Revisão de CASTILLO & GONZÁLES (1999), mostrou que há alguns estudos de farmacologia pré-clínica identificando atividades antitussígenas e antiepiléticas (MORTON, 1992; CASTILLO; GONZÁLEZ, 1999; NEUWINGER, 2000).

Demonstrou-se intenso efeito antinociceptivo periférico e central com administração do extrato de malvarisco em modelo animal (NUNES et al., 2000). Possui atividade citotóxica e antitumoral e pode ser usada no tratamento do câncer (BHAKUNI et al., 1969; GURGEL et al., 2009b). Sua ação anti-inflamatória foi verificada por (MORTON, 1992; GURGEL et al., 2009; CHANG et al., 2010), antiepilética, (SALMÁN et al., 1996) e antimicrobiana (HATTORI et al.; KUSUMOTO et al., 1995; QUEIROZ, 1998; NOGUEIRA et al., 2008; GURGEL et al., 2009). As ações farmacológicas descritas para esta planta evidenciam o enorme potencial medicinal da espécie justificando sua grande utilização na medicina popular como também a necessidade de investimentos para fins industriais.

#### 1.6.4 *P.amboinicus* versus MRSA

Pouco se sabe sobre o efeito antimicrobiano de *P. amboinicus* contra *S. aureus*. Foram verificados somente dois relatos na literatura abordando este assunto, sendo o de NOGUEIRA et al., 2008 o primeiro a demonstrar o efeito inibitório do óleo essencial e extrato hidroalcoólico sobre cepas clínicas de *S. aureus* sensíveis a meticilina e posteriormente GURGEL et al., 2009, abordando o efeito bactericida e bacteriostático do extrato hidroalcoólico sobre uma cepa padrão de MRSA.

A ação bactericida do extrato hidroalcoólico parece promissora, uma vez que a cinética de morte bacteriana nas primeiras horas de exposição com o extrato das folhas de *P. amboinicus* é semelhante à da fluorquinolona, perfloxacina, ofloxacina e norfloxacina (GURGEL et al., 2009). Outro ponto que reforça o uso desta espécie no tratamento de infecções por *S. aureus* é ausência de toxicidade em ensaios *in vivo* (PAULO et al. 2009; NUNES et al., (1998). No entanto, estudos para investigar se o uso desta espécie medicinal interfere com antimicrobianos de uso clínico e ensaios *in vivo* que comprovem os resultados

já levantados *in vitro*, são imprescindíveis antes de qualquer indagação a respeito do uso clínico de *P. amboinicus* para tratamento de infecções por *S. aureus* multirresistentes ou não.

## **2.0 PERGUNTA DE PARTIDA**

Sabe-se que a espécie *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng tem demonstrado atividade contra MRSA *in vitro*, mas será se o mesmo pode ser aferido para ensaios *in vivo*? E quais compostos químicos estariam envolvidos nesta atividade?

## **3.0 HIPÓTESES**

Devido ao fato de dois estudos (NOGUEIRA et al., 2008; GURGEL et al., 2009), mencionarem atividade antimicrobiana *in vitro* de *P. amboinicus* contra MSSA e MRSA, assim como possuem quantidades consideradas de metabólitos flavonóides, triterpenos e compostos fenólicos conhecidamente ativos contra microrganismos e por vários autores relatarem a baixa toxicidade do extrato das folhas desta planta, acreditamos que o efeito antimicrobiano *in vivo* possa ser alcançado, assim como a identificação do (s) compostos ativos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* das folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng sobre cepas hospitalares de MRSA.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Determinar as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) do extrato hidroalcoólico, extrato etanólico e suas frações e do óleo essencial da planta contra cepas hospitalares de MRSA;
- Determinar os efeitos bactericida e bacteriostático das drogas vegetais contra MRSA;
- Identificar os metabólitos ativos do extrato etanólico e do óleo essencial das folhas da planta e avaliar sua atividade antimicrobiana contra MRSA;
- Analisar a associação *in vitro* das drogas vegetais com os antibióticos vancomicina e ciprofloxacina;
- Avaliar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* das amostras vegetais;
- Avaliar a atividade antimicrobiana das drogas vegetais em camundongos, a partir de modelos de abscesso subcutâneo;

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Caracterização das cepas de MRSA

As cepas de MRSA utilizadas no estudo foram isoladas de diferentes espécimes clínicos originários de pacientes internados no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), UFC. Todos os testes *in vitro* neste trabalho foram executados em paralelo com duas cepas padrão de *S. aureus* sensível a meticilina (ATCC 25923) e *S. aureus* resistente a meticilina (ATCC 65398), ambas obtidas da coleção de culturas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) do Instituto Oswaldo Cruz-RJ. Após sua caracterização através de provas bioquímicas (catalase, coagulase, fermentação do manitol) e imunológicas (detecção de proteína A e fator de coagulação), as cepas foram mantidas em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) contendo 20 % de glicerol a - 20°C.

#### 5.1.1 Perfil de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

As cepas, após caracterizadas, foram submetidas a um teste de susceptibilidade à oxacilina, como sugerido por RALLAPALLI et al., 2008. Um disco de oxacilina 1 µg (Oxoid, Reino Unido) foi deixado sobre a superfície de uma placa contendo meio de cultura AMH suplementado com NaCl 4%, estando a mesma previamente semeada com 100 µL do inóculo de 10<sup>8</sup> UFC/mL da cepa a ser testada em toda sua superfície. A zona de inibição foi determinada após 24 h de incubação a 35°C. Organismos que apresentaram zona de inibição igual ou menor que 10 mm foram interpretados como resistentes. O perfil de susceptibilidade aos demais agentes antimicrobianos foi analisado conforme o proposto pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009a), antigo NCCLS, empregando os seguintes discos (Oxoid, Reino Unido): ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), ampicilina (30 µg), cloranfenicol (10 µg), tetraciclina (30 µg), eritromicina (15 µg), sulfametoxazol/trimetoprima (1,25/23,75 µg) e vancomicina (30 µg).

#### 5.1.2 Método confirmatório para identificação de MRSA

Como método confirmatório para identificação de MRSA utilizou-se o procedimento proposto por RALLAPALLI et al, (2008), através de reação da amplificação dos genes *mecA* e *coag* de *S. aureus*.

### 5.1.2.1 Extração e purificação do DNA bacteriano

As cepas bacterianas foram incubadas por 16 h em caldo BHI, e em seguida, 2 mL da cultura foram transferidos para um tubo de microcentrífuga e centrifugados por 5 minutos a 3000 rpm. Os sedimentos foram ressuspensos em 567 µL de tampão TE para o qual 30 µL de SDS 10% e 3 µL de 20 mg / ml proteinase K foram adicionados, misturados suavemente e incubados por 1 hora a 37 ° C. Em seguida, foram adicionados 100 µL de NaCl 5M, 80 µL de CTAB 10% e incubados por 10 minutos a 65 ° C.

Após incubação, igual volume de clorofórmio / álcool isoamílico (24:1) foi adicionado e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo, e igual volume de clorofórmio / álcool isoamílico (24:1) foi novamente adicionado e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa superior foi transferida para um outro tubo e 0,8 volumes de isopropanol foi adicionado e misturado delicadamente até que houvesse precipitação de DNA. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspensionado em 50 µL de tampão TE.

### 5.1.2.2 Amplificação das sequências gênicas *mecA* e *coag*

Utilizou-se a técnica de reação de cadeia em polimerase para amplificação dos genes *mecA* e *coag*. O primeiro par de *primers* foi obtido a partir da região do gene *mecA*, ou seja, sequência senso *mec1* (5' AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC 3') 1282-1303 e a sequência anti-senso *mec2* (5' AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC) 1793-1814. O produto amplificado continha 533 pb. O segundo par de *primers* foi obtido a partir da região do gene da coagulação, com a sequência senso *coag1* (5 'ACCACAAGGTACTGAATCAACG 3') 1432-1453 e a sequência anti-senso *coag2* (5 'TGCTTTCGATTGTTTCGATGC 3') 2399-2418, com produto de 759 pb.

Alíquota de 1µl contendo 50 ng de DNA genômico foi adicionado a uma mistura contendo 7,8 µL de água destilada, 10 µL de PCR Master Mix GoTaq (Promega, EUA), 0,6 µL dos *primers*. A seguir, foi colocada em um termociclador programado da seguinte maneira: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido 40 ciclos a 94°C por 40 s, 55°C por 2 min.; 72°C por 2 min. Após a amplificação, os produtos foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1% por 20 min, 70V. As bandas foram reveladas com brometo de etídio.

## 5.2 Material Botânico

As folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng foram coletadas às 8:00 h no Horto Prof. Francisco José de Abreu Matos, Fortaleza, Ceará. Uma exsicata de número 40080 foi depositada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

### 5.2.1 Obtenção dos extratos

Para obtenção do extrato etanólico (ET), 7,0 kg de folhas de *P. amboinicus* foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar a 45°C por 48 h e posteriormente foram moídas. Uma quantidade correspondente a 600 g do material moído foi macerado com etanol absoluto por 5 dias a temperatura ambiente. O macerado foi então filtrado e concentrado em um evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40° C. O etanol recuperado foi reutilizado para macerar o material vegetal utilizado anteriormente, durante 72 h. O processo de remaceração foi repetido por 6 vezes.

O extrato hidroalcoólico (EH) foi obtido deixando-se 3,0 kg de folhas frescas macerar com etanol 70% (3 litros) durante 10 dias. Em seguida, o material foi concentrado em evaporador rotativo.

### 5.2.2 Fracionamento do extrato etanólico

Para investigação dos constituintes com atividade antimicrobiana presentes no extrato vegetal, 80 g do extrato etanólico foi submetido a um fracionamento cromatográfico usando uma coluna filtrante (10 x 16 cm com gel de sílica 60 (0,063 a 0,200) sob pressão reduzida e eluentes em grau crescente de polaridade, ou seja, hexano (Hex), éter de petróleo (Ep), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH). Todas as frações foram concentradas em evaporador rotativo, sob pressão reduzida a 40°C, conforme mostra a Tabela 5.

**Tabela 5.** Dados resultantes do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico de *P. amboinicus*.

<b>Frações</b>	<b>Eluente</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>Massa (g)</b>
F1	Hex	2000 mL	2,3
F2	Ep	2000 mL	1,2
F3	DCM	5000 mL	35,9
F4	AcOEt	5000 mL	29,6
F5	MeOH	2000 mL	5,9

### 5.2.3 Fracionamento da fração acetato de etila (F4)

Todas as frações foram submetidas ao teste de microdiluição em caldo para avaliação de sua função antimicrobiana, descrito no item 5.3.1. Uma vez que o teste de microdiluição evidenciou que a fração F4 era detentora da ação antimicrobiana contra cepas MRSA, a mesma foi submetida a um novo fracionamento cromatográfico a fim de determinar os fatores de retenção (Rf) dos compostos capazes de inibir o crescimento bacteriano. Utilizou-se uma coluna de 22 x 6 cm contendo gel de sílica 60 e hexano e acetato de etila em grau crescente de polaridade, como eluentes, A Tabela 6 mostra os dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração F4.

**Tabela 6.** Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração F4 do extrato etanólico.

<b>Eluente</b>	<b>Concentração (%)</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>Subfrações/ massa (g)</b>
Hex: AcOEt	90:10	2000 mL	F4a/ 2,1
Hex: AcOEt	80:20	2000 mL	F4b/ 2,4
Hex: AcOEt	70:30	2000 mL	F4c/ 3,2
Hex: AcOEt	60:40	1000mL	F4d/ 1,5
Hex: AcOEt	50:50	1000 mL	F4e/ 1,1
AcOEt	100	1000 mL	F4f/ 0,8
MeOH	100	2000 mL	F4g/ 17,3

As subfrações foram avaliadas através de bioautografia descrita no item 5.3.3 e microdiluição em caldo. Verificou-se que a subfração F4b apresentava ação antimicrobiana. Dessa forma, a mesma foi submetida a um novo fracionamento cromatográfico.

#### 5.2.4 Fracionamento cromatográfico da subfração F4b e isolamento de PA-1

A subfração F4b (2,4 g) foi submetida a um fracionamento através de uma coluna cromatográfica (12,5 x 1,5 cm), contendo gel de sílica 60 (0,063 a 0,200). As frações foram eluídas com hexano, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade de acordo com os dados descritos na Tabela 7.

**Tabela 7.** Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da subfração F4b.

FRAÇÃO	ELUENTE
1 a 10	Hex
11 a 40	Hex: AcOEt (95 : 5)
41 a 82	Hex: AcOEt (90 : 10)
83 a 194	Hex: AcOEt(88 : 12)
195 a 230	Hex: AcOEt (80 : 20)
231 a 289	Hex: AcOEt(70 : 30)
290 a 321	Hex: AcOEt(50 : 50)
322 a 353	AcOEt
354 a 385	MeOH

Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD), foi possível reunir as frações 83 a 211 obtidas que apresentaram 70 mg de uma mistura cristalina de cor amarela. Após sucessivos tratamentos desta mistura por coluna cromatográfica de Sephadex, foi possível isolar 40 mg de um sólido cristalino de cor amarela denominado de PA-1.

#### 5.2.5 Identificação molecular do composto PA-1

O composto PA-1 foi enviado ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear, CENAUREMN, do Departamento de Química Orgânica e

Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, para análise através da ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1 (RMN  $^1\text{H}$ ) e de carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) uni e bidimensionais.

#### 5.2.6 Obtenção do óleo essencial

Utilizou-se o procedimento descrito por (TIWARI et al., 2003) para obtenção do óleo essencial (OE) de *P. amboinicus*. Folhas frescas (1,0 kg) foram submetidas à hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger durante 2 h. O óleo essencial foi separado do destilado aquoso, deixado secar com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e mantido a  $4^\circ\text{C}$  até o momento do uso. O rendimento obtido foi de 1,7 mL de óleo essencial.

#### 5.2.7 Análise quantitativa do óleo essencial

A análise quantitativa dos compostos químicos do óleo essencial foi realizada com auxílio de um cromatógrafo gasoso acoplado a detector de ionização por chama (CG/DIC), utilizando um equipamento Shimadzu GC-17 A, sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme) contendo sílica fundida ZB-5MS (dimetilpolisiloxano 5%) e hélio como gás de arraste com fluxo de 1 mL/min. A temperatura foi programada mantendo  $40^\circ\text{C}$  por 1-2 min, seguido de um aumento de  $4^\circ\text{C}/\text{min}$  até atingir  $180^\circ\text{C}$ , seguido de um aumento em intervalos de  $20^\circ\text{C}$  até atingir  $280^\circ\text{C}$ . Esta temperatura foi mantida por 7 min. A temperatura do injetor foi de  $250^\circ\text{C}$  e a do detector (ou interface) foi de  $280^\circ\text{C}$ . Injetou-se um volume de 0,5  $\mu\text{L}$  de acetato de etila, com taxa de partição do volume injetado de 1:48 e pressão na coluna de 48,7 kPa. A quantificação dos constituintes se deu pela normalização da área (%).

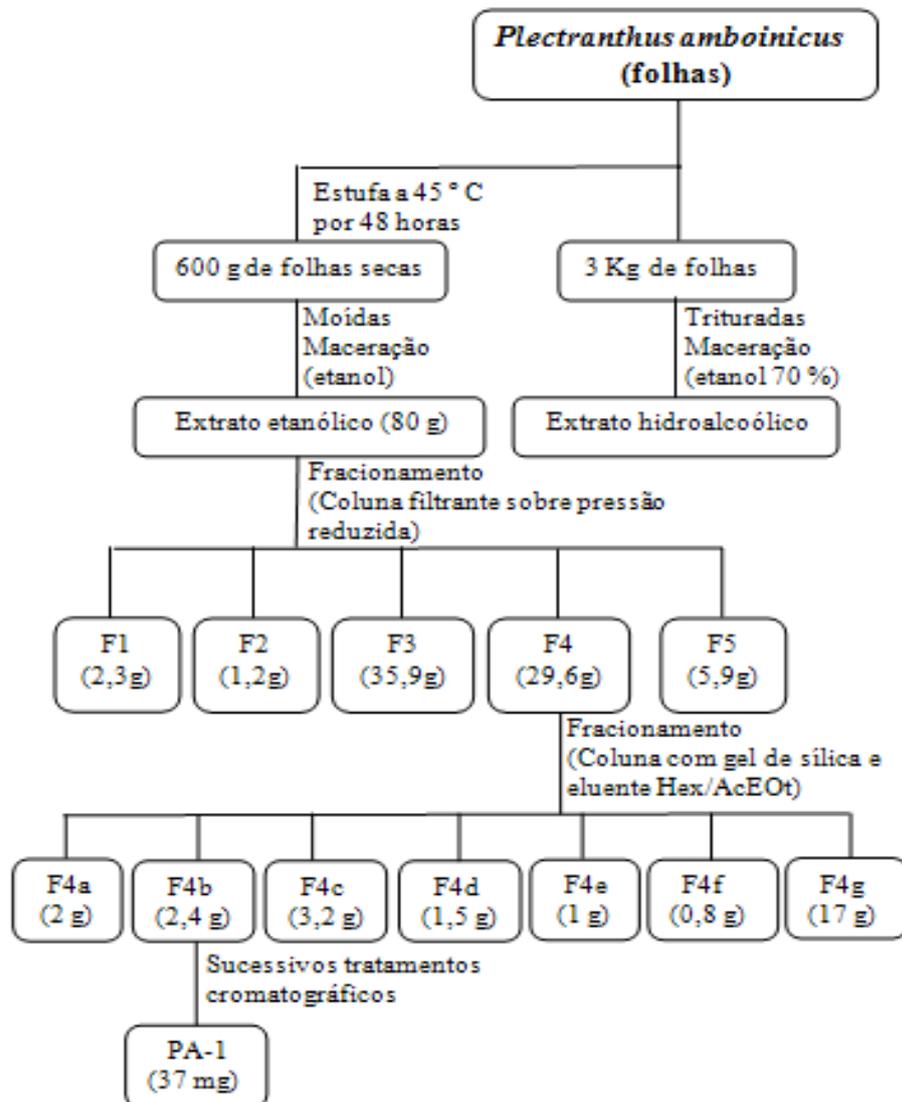
#### 5.2.8 Análise qualitativa dos compostos químicos do óleo essencial

A análise qualitativa dos compostos químicos do óleo essencial foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (CG/EM) Shimadzu, modelo QP5050A), equipado com um autoinjeter AOC-20i (Shimadzu) e provido de uma coluna capilar (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme) contendo sílica fundida (5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano). Foram utilizadas as mesmas condições operacionais da análise quantitativa e espectrômetro de massa com detector de captura iônica com energia de impacto de 70 eV. Os componentes do óleo essencial foram identificados

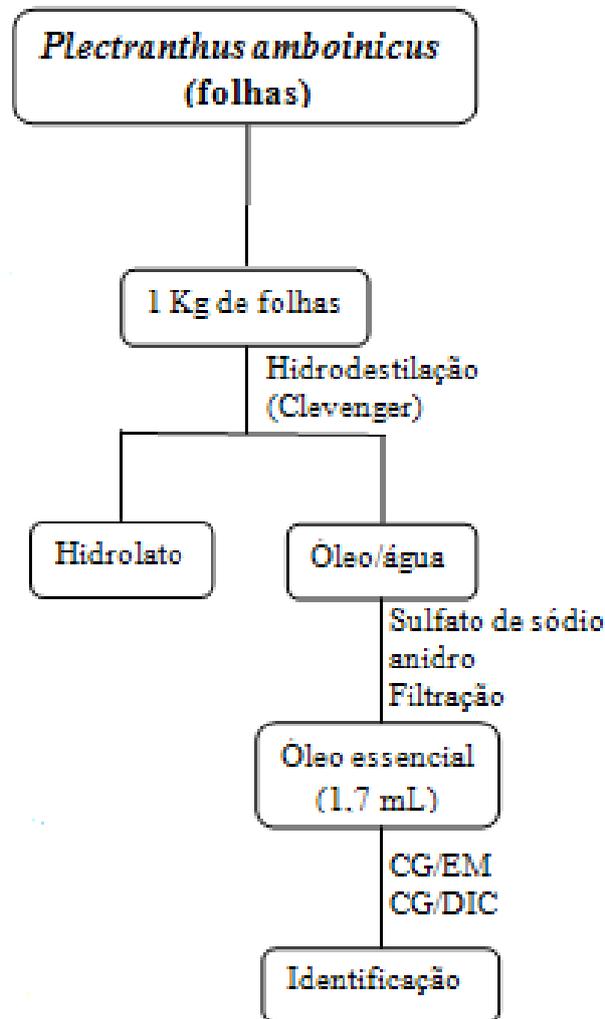
através de correlação com índices de retenção e espectros de massa relatados na literatura (ALENCAR et al., 1990; ADAMS, 2007).

O Fluxograma 1 e 2 resume as várias etapas para obtenção dos extratos e suas frações e subfrações, do sólido PA-1 e do óleo essencial de *P. amboinicus*.

**Fluxograma 1.** Esquema utilizado para obtenção dos extratos, frações, subfrações, composto PA-1 e óleo essencial de *P. amboinicus*.



**Fluxograma 2.** Esquema utilizado para obtenção do óleo essencial das folhas de *P.amboinicus*.



### 5.3 Análise da atividade antimicrobiana *in vitro*.

#### 5.3.1 Teste de microdiluição em caldo das amostras vegetais e vancomicina

Para determinar a CIM, testes de microdiluição em caldo foram realizados em microplacas de 96 poços (Costar, EUA), conforme procedimento sugerido por (ALVES et al., 2008; CLSI, 2009b). Inicialmente, as cepas clínicas e padrões foram descongelados, semeados em caldo BHI e incubadas por 24 h a 35°C. Só então, a concentração bacteriana do inóculo foi

estimada a partir da medida de absorvância da suspensão de bactérias através de espectrofotômetro em comprimento de onda de 620 nm, correspondente a escala de McFarland 0,5, ou seja, de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Em seguida, a suspensão foi diluída a 1/10 com salina 0,9 %.

Cada poço das placas recebeu 100  $\mu$ L do caldo Mueller-Hinton (CMH), 5  $\mu$ L do inóculo ( $5 \times 10^5$  UFC) e 100  $\mu$ L dos extratos, frações, subfrações e do óleo essencial em concentrações finais que variaram de 0,062 a 16 mg/mL em DMSO (Merck, Darmstadt, Alemanha) 5 % e 0,019 a 5,0 %, v/v em DMSO 3 %, respectivamente. A concentração do composto PA-1 no teste variou de 0,003 a 1 mg/mL. Por último, as microplacas foram vedadas com filme plástico e incubadas a 35 °C por 24 h, sem agitação. Como controle positivo, foi utilizada vancomicina (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, EUA) nas concentrações de 0,125 a 32  $\mu$ g/mL e, como controle negativo, DMSO variando de 0,039 a 10 %, v/v.

Após a incubação, adicionou-se a cada poço 10  $\mu$ L de resazurina (Sigma, Steinheim, Alemanha) a 0,01% em solução aquosa esterilizada e reincubou a 35°C por 2 h. A cor azul indicava ausência de crescimento microbiano, enquanto que a cor vermelha indicava a presença de células viáveis.

### 5.3.2 Cinética da inibição de crescimento

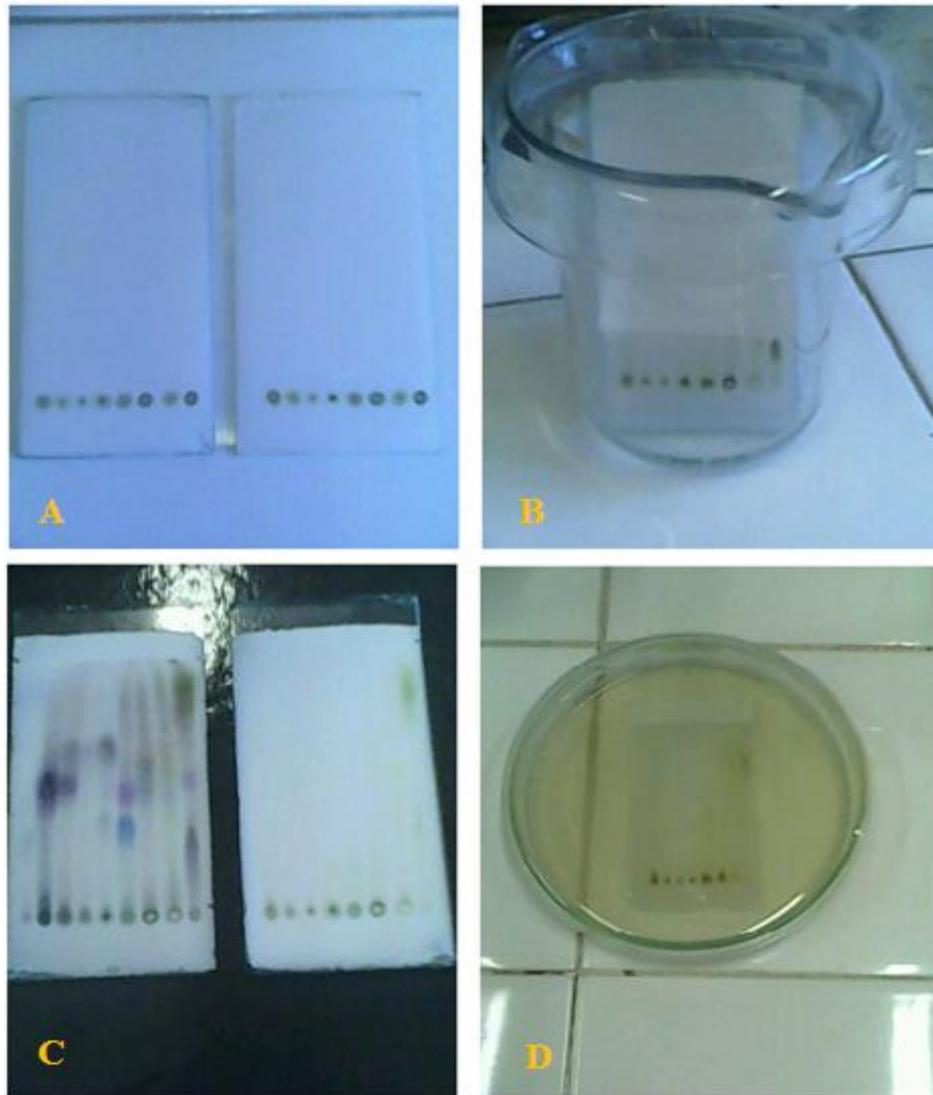
Este método experimental permite não só determinar a morte bacteriana em função do tempo de exposição ao antimicrobiano, como também permite avaliar o efeito bactericida ou bacteriostático (NCCLS, 1999). Tubos testes (T) e controles (C), contendo 4 mL de CMH cada, foram inoculados com 1 mL da suspensão de MRSA (ATCC 65398), na concentração correspondente a  $10^8$  UFC/mL, e incubados a 35 °C por 2 h. A seguir, foram adicionados 4 mL de cada amostra vegetal no tubo T, em concentrações que variaram de duas e quatro vezes a CIM e 4 mL de BHI com 5 % de DMSO no tubo C. Os tubos T e C foram incubados a 35 °C e alíquotas de 30  $\mu$ L eram coletadas em intervalos de 0, 2, 4, 6, 8 e 24 h após adição das amostras vegetais. Seis diluições seriadas de razão 10 das alíquotas foram semeadas em placas contendo ágar BHI para determinar a contagem de células viáveis, a qual foi expressa em log de UFC/mL. O efeito bactericida foi definido para concentração capaz de acarretar um decréscimo maior ou igual a 3 log UFC/mL ou morte de 99,9 % das células viáveis em um tempo específico, enquanto que o efeito bacteriostático foi atribuído às concentrações incapazes de levar a um decréscimo igual ou acima a 3 log UFC/mL.

### 5.3.3 Bioautografia

As subfrações de F4 foram submetidas ao ensaio de bioautografia, conforme protocolo de MOULARI et al., 2006. Inicialmente, 20 mg das amostras vegetais foram solubilizadas em 1 mL de metanol e aplicadas em volumes de 10 µL em uma placa de vidro revestida com sílica gel F<sub>254</sub>. As amostras foram eluídas com hexano: acetato de etila (6:4) e, após volatilização dos solventes, a mesma foi depositada em uma placa de Petri, onde foram adicionados 60 mL de AMH já inoculados com 10<sup>6</sup> UFC/mL de bactérias.

A placa de Petri foi deixada a 4 °C por 2 h para permitir a difusão das amostras vegetais pelo meio de cultura, e só então incubada a 35 °C por 24 h. O bioautograma foi corado com uma solução aquosa de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], MTT, na concentração de 5 mg/mL para observação das zonas de inibição. A formação de halos incolores ou amarelados indicou inibição do crescimento. Foi determinado para cada banda seu coeficiente de retenção, segundo a fórmula:  $R_f = \text{Distância percorrida pela mancha desde a origem} / \text{distância percorrida pelo solvente desde a origem}$

Paralelamente, foi realizada uma segunda placa cromatográfica para revelação das substâncias através de sua exposição à irradiação ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm) e por imersão em solução de vanilina 5 g/100 mL de ácido perclórico 0,75 M em 100 mL de etanol, seguido de aquecimento em soprador térmico durante alguns segundos, ver Figura 6.



**Figura 6.** Bioautografia. A, Subfrações de F4 aplicadas em placas de vidro revestidas com sílica gel F<sub>254</sub>; B, Corrida cromatográfica com fase móvel Hex: AcEOt (6:4); C, Cromatoplasmas após corrida cromatográfica, estando a da esquerda corada com vanilina; D. Cromatoplasma, não corada com vanilina, imersa em uma placa de Petri contendo 10<sup>6</sup> UFC/mL de bactérias em AMH.

#### 5.3.4 Avaliação da interação entre as amostras vegetais e os antimicrobianos vancomicina e ciprofloxacina

O método tabuleiro de xadrez tem sido muito utilizado para avaliar interações entre antimicrobianos *in vitro* (GRIF et al., 2001; ORHAN et al., 2005; KAMATOU et al., 2006). Para tanto, testamos combinações entre OE, EH e F4 e os fármacos vancomicina e

ciprofloxacina, ambos em concentrações oito vezes à da CIM. As amostras vegetais e os fármacos foram diluídas e adicionadas aos poços de uma microplaca de 96 poços (Costar, EUA) de fundo em U (Figura 7), seguida de adição de 5 µL do inóculo da cepa MRSA (ATCC 65398) ou de 3 cepas de isolados clínicos na concentração de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Após incubação a 35°C por 24 h, 10µL de resazurina (0,01%) estéril foram adicionados às placas seguidas por 2 h de nova incubação a 35°C.

Para avaliar o efeito combinatório foi utilizado o índice da concentração inibitória fracionada (ICIF). O ICIF é a soma da concentração inibitória fracionada (CIF) de ambas as drogas combinadas, já a CIF é a razão entre a CIM da droga quando combinada e a CIM da droga sozinha, como mostra a fórmula abaixo.

$$\frac{A}{\text{CIM a}} + \frac{B}{\text{CIM b}} = \text{CIF A} + \text{CIF B} = \text{ICIF}$$

Onde,

A = CIM da amostra a e

CIM a = CIM da amostra a sozinha

B = CIM da amostra b em combinação

CIM b = CIM da amostra b sozinha

$$\text{ICIF} = \frac{A}{\text{CIM a}} + \frac{B}{\text{CIM b}} = \text{CIF A} + \text{CIF B} =$$

				CIM das amostras quando combinadas								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CIM a	CIM b	C-		1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
	1/2	1/2		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	
B	1/4	1/4			1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8
					1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
C	1/8	1/8			1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16
					1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
D	1/16	1/16			1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32
					1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
E	1/32	1/32	C+		1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64
				1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	
F	1/64	1/64			1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128
					1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
G	1/128	1/128			1/256	1/256	1/256	1/256	1/256	1/256	1/256	1/256
					1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
H	1/256	1/256			1/512	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512
					1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512

**Figura 7.** Análise da interação entre o EH, F4 e óleo essencial com vancomicina e ciprofloxacina, utilizando o método tabuleiro de xadrez. As colunas 1 e 2 foram

disponibilizadas para determinação da CIM das amostras a e b, enquanto que, da coluna 5 a 12, foram usadas para determinar a CIM das amostras a e b quando combinadas. C+, controle positivo de crescimento; C-, controle negativo de crescimento. A associação é dita ser sinérgica quando o ICIF for  $< 1$ , aditivo  $\text{ICIF} = 1$ , indiferente  $1 < \text{ICIF} < 4$ , e antagônica  $\text{ICIF} \geq 4$  (ORHAN et al., 2005; KAMATOU et al., 2006).

## 5.4 Ensaios de toxicidade

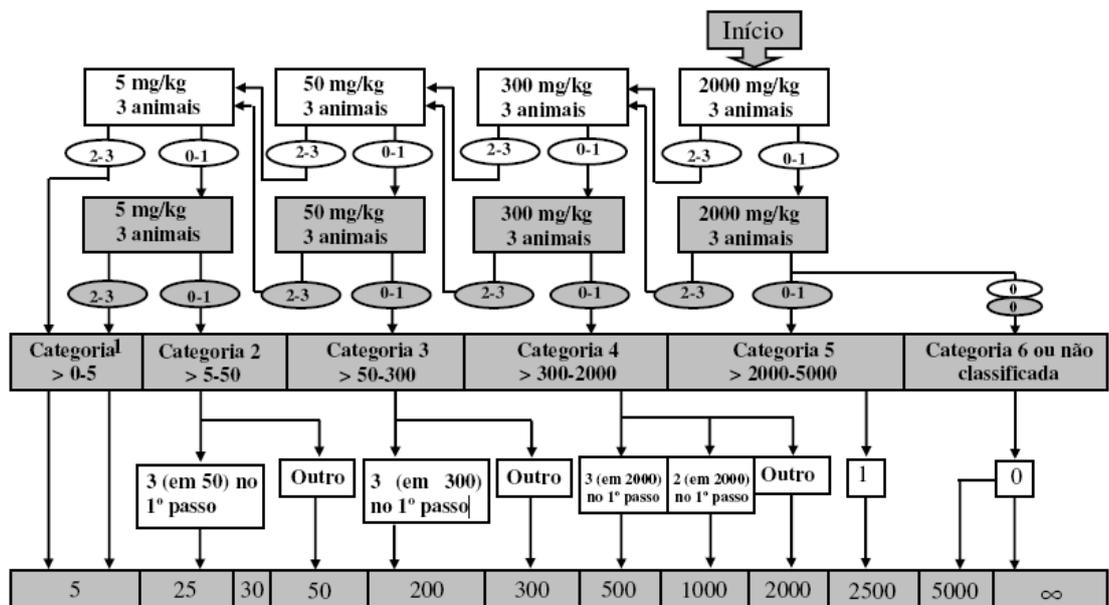
### 5.4.1 Avaliação da atividade citotóxica do extrato EH, fração F4, composto PA-1 e OE sobre macrófagos

A linhagem de macrófagos RAW 264.7 foi obtida do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivados em garrafas de plástico ou placas de microcultura, em meio MEM (*Minimum Essential Media*), suplementado com 10% v/v de soro bovino fetal, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100  $\mu\text{g/mL}$ ). As células foram incubadas a 37°C, em atmosfera com 95 % de umidade e 5 % de  $\text{CO}_2$  a 37°C. Antes de cada experimento as células foram incubadas em meio sem soro bovino fetal por 24 h para a obtenção de células na fase  $G_0$  do ciclo celular. Para cada experimento foi removido o meio de cultura e as células foram incubadas com tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v) a 37°C por aproximadamente 10 min, para obtenção da suspensão de células. A tripsina foi inativada adicionando o mesmo volume de meio com soro bovino fetal. A suspensão foi então centrifugada a 4500 rpm por 10 min (MARTINS et al., 2005; CHAIM, 2005).

O sobrenadante foi descartado e as células resuspensas em meio de cultura. Os macrófagos foram quantificados em câmara de *Neubauer* e subcultivados ( $1 \times 10^5$  céls/mL) permitindo o crescimento confluyente por 24 h. A seguir, as células foram tratadas com concentrações de duas e quatro vezes a CIM para o extrato EH, fração F4 e PA-1 e de duas vezes a CIM e 0,6 % v/v para o óleo essencial, por 24 h. Após o tratamento das células, 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram desprezados, sendo adicionados 10  $\mu\text{L}$  de MTT 500  $\mu\text{g/mL}$  dissolvido em salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7.4. Este método baseia-se na avaliação da atividade metabólica de células viáveis, a partir da formação de um produto colorido (sal formazan, que é insolúvel em água). Após incubação por 4 h a 37°C em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$ , foi adicionado SDS (10%) em HCl 0,01N para solubilizar os cristais de formazan. As placas foram novamente incubadas por 17 h e em seguida realizada a leitura em espectrofotômetro (570 nm). Os ensaios foram realizados em triplicatas (MOSMANN, 1983).

#### 5.4.2 Avaliação da toxicidade do extrato EH em camundongos

A avaliação da toxicidade do extrato EH foi verificada a partir da Dose Letal 50 ou  $DL_{50}$ , de acordo com o protocolo proposto pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD, 2001). O extrato hidroalcoólico foi dissolvido em PBS, pH= 7,4, na concentração inicial de 2000 mg/kg administrada por via oral (método de gavagem) a três camundongos previamente mantidos em jejum de três horas com água a vontade. A mortalidade foi monitorada por 14 dias. Finalizado este período, outros três camundongos receberam mais uma dose do extrato (2000 mg/Kg), que foi escolhida dependendo do número de animais mortos na etapa anterior (Figura 8). Uma vez que a mortalidade foi igual à obtida na etapa anterior, o teste foi finalizado e a  $DL_{50}$  estimada. Caso contrário, outros três animais seriam utilizados.



**Figura 8.** Procedimento para determinação da  $DL_{50}$  com dose inicial de 2000 mg/Kg, segundo o protocolo proposto por OECD (2001).

#### 5.5. Avaliação da atividade antimicrobiana em modelo animal

##### 5.5.1 Animais

Camundongos *Swiss*, machos, de 25 a 30 g, imunocompetentes, provenientes do Biotério Central da UFC, com ciclos de dia e noite, com ração e água à vontade, foram

empregados para analisar o efeito antimicrobiano das folhas de *P. amboinicus*. Os procedimentos experimentais em animais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade federal do Ceará.

#### 5.5.2 Modelo de infecção

O modelo de infecção adotado neste trabalho foi proposto por BUNCE et al., (1992), com algumas modificações.

##### *Suspensão de Cytodex*

Foi empregado Cytodex 3, o qual consiste de uma fina camada de colágeno desnaturado quimicamente e ligado a uma matriz de dextran (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). A suspensão de citodex 2 % em PBS foi preparada e autoclavada.

##### *Preparo do inóculo*

Uma cepa clínica (MRSA 08) foi semeada em ágar BHI a 35 °C por 16 h e, a seguir, uma colônia foi selecionada e inoculada em 5 mL de caldo BHI e submetida a nova incubação a 35°C por 6 h. A seguir, a absorbância da suspensão foi ajustada, com auxílio da escala 0,5 de Mc Farland 0,5, que correspondia a uma concentração de  $10^8$  UFC/mL. A partir daí, duas suspensões foram preparadas, a suspensão 1 com inóculo bacteriano, Cytodex 2% e caldo BHI na proporção de 5:1:4 e a suspensão 2, com Cytodex 2% e caldo BHI, na proporção 1:9 (controles positivo e negativo, respectivamente).

##### *Infecção dos animais*

Após dois dias de aclimação no ambiente do laboratório, os pelos do flanco direito dos animais foram retirados e, então, inoculados 0,2 mL das suspensões por via subcutânea.

#### 5.5.3 Tratamento

Para análise do efeito terapêutico via intraperitoneal do extrato EH e da fração F4, disponibilizaram-se de 45 camundongos agrupados, infectados e tratados como ilustrado na

Tabela 8. As amostras vegetais e a vancomicina foram administradas por via intraperitoneal 3 e 12 h após infecção e, só então, os animais foram observados em intervalos de 24 h até serem sacrificados por deslocamento cervical com 72 h de infecção.

Os abscessos foram medidos com auxílio de um paquímetro para determinação do volume do abscesso [ $V = (\pi/6) L \cdot W^2$ ], onde L é o comprimento e W a largura (Figura 9). Os abscessos foram removidos e adicionados em tubos contendo 2 mL de salina 0,9 % e em seguida alíquotas de 100  $\mu$ L foram diluídas a fim de determinar o número de células viáveis por abscesso (UFC/ abscesso). Seis diluições seriadas na razão 10 das alíquotas foram semeadas em placas contendo ágar BHI e incubadas a 35°C por 48 h. O número de células viáveis foi expresso em log UFC/mL. Um pequeno fragmento do tecido sobre o abscesso foi removido e enviado para análise histopatológica.

**Tabela 8.** Avaliação antimicrobiana *in vivo* do extrato EH e da fração F4 frente à cepa MRSA 08.

Grupo	Nº animais	Inóculo*	Tratamento
A	3	Suspensão-2	-----
B	6	Suspensão-1	Salina
C	6	Suspensão-1	EH 500 mg/Kg
D	6	Suspensão-1	EH 250 mg/Kg
E	6	Suspensão-1	F4 500 mg/Kg
F	6	Suspensão-1	F4 250 mg/Kg
G	6	Suspensão-1	Van 20 mg/Kg
H	6	Suspensão-1	Van 10 mg/Kg

\*A suspensão-1 continha inóculo da cepa clínica MRSA 08 e Cytodex 2%. A suspensão-2 continha apenas Cytodex 2% em PBS.



**Figura 9.** A, camundongos *Swiss* machos, de 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central da UFC; B, Análise do tamanho do abscesso com auxílio de um paquímetro.

#### 5.5.4 Histopatológico

As amostras de tecido foram fixadas por um período mínimo de 48 h e incluídas em parafina. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e método do Gram, sendo as mesmas analisadas por microscopia óptica (Olympus AX70, EUA). Os abscessos foram avaliados por um médico patologista que desconhecia o protocolo de tratamento. As amostras foram classificadas em escores que variavam de 0 a 3, segundo os seguintes parâmetros: infiltrado celular, fibrose, edema, angiogênese, hemorragia e necrose. O grau 0 era considerado dentro dos limites de normalidade; 1, quando eram verificadas alterações até 25 %; 2, alterações até 75 %; e 3, mais do que 75 %.

#### 5.6 Análise estatística

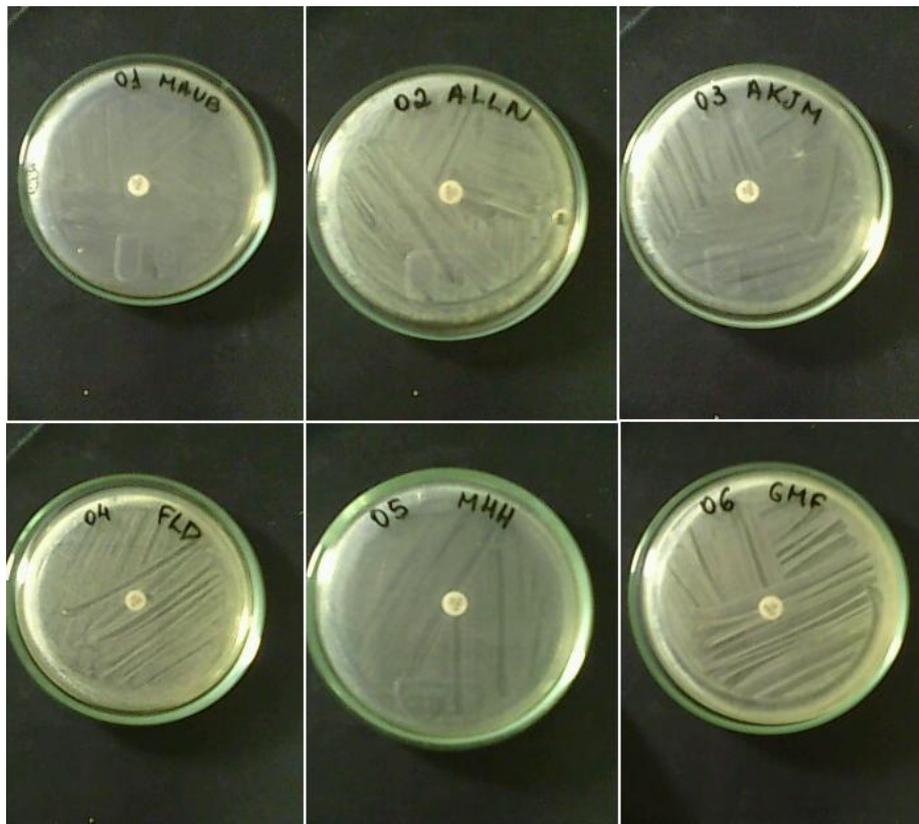
Os dados dos ensaios biológicos foram apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média e comparados pelo método de ANOVA, T de Student, complementado pelo teste de Tukey. Foram considerados significantes comparações cujos  $p \leq 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Caracterização das cepas MRSA

#### 6.1.1 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e triagem de identificação das cepas MRSA

Quatorze cepas de MRSA isoladas de amostras biológicas de pacientes internados no HUWC foram devidamente identificadas a partir de métodos bioquímicos, sorológicos e moleculares, sendo 10 (71,4%) destas provenientes de hemocultura. Após triagem de resistência à oxacilina por disco difusão (Figura 10) as cepas foram submetidas a teste de susceptibilidade aos antimicrobianos usados na rotina do HUWC. Todas as cepas apresentaram resistência a cinco ou mais antibióticos e sensibilidade à vancomicina (Tabela 9).



**Figura 10.** Cepas de *Staphylococcus aureus* identificadas como MRSA a partir do método de triagem por disco difusão.

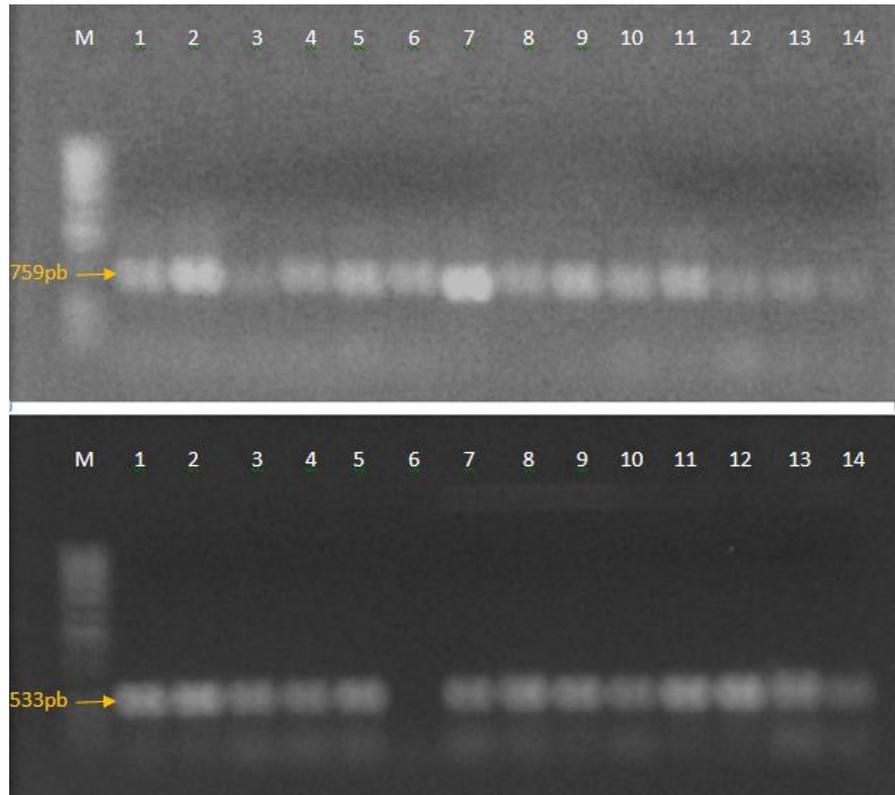
**Tabela 9.** Perfil de susceptibilidade das cepas MRSA isoladas no HUWC.

Cepas clínicas	Ec	Pen	Amp	Eri	Gen	Clo	Tet	Sut	Cip	Van
MRSA 01	SA	R	R	R	R	R	nt	R	R	S
MRSA 02	SA	R	R	S	S	R	R	R	S	S
MRSA 03	SA	R	R	R	R	R	R	R	R	S
MRSA 04	SA	R	R	R	R	nt	S	R	S	S
MRSA 05	SA	R	nt	R	R	R	R	nt	S	S
MRSA 06	SA	R	R	R	R	R	nt	R	R	S
MRSA 07	SA	R	R	R	R	S	S	R	S	S
MRSA 08	SA	R	R	S	S	R	R	R	S	S
MRSA 09	SA	R	R	S	S	S	R	R	S	S
MRSA 10	SA	R	R	R	R	R	S	R	S	S
MRSA 11	PC	R	R	R	R	R	R	nt	S	S
MRSA 12	SPD	R	R	R	R	nt	R	R	S	S
MRSA 13	PC	R	R	R	R	R	R	R	R	S
MRSA 14	SPD	R	R	R	R	R	R	R	R	S

Ec, espécime clínico; SA, sangue; PC, ponta de cateter; SPD, secreção de pé diabético; nt, não testado; Pen, penicilina; Amp, ampicilina; Eri, eritromicina; Gen, gentamicina; Clo, cloranfenicol; Tet, tetraciclina; Sut, sulfametoxazol/trimetoprima; Cip, ciprofloxacina; Van, vancomicina.

#### 6.1.2 Confirmação da identificação de MRSA através da detecção dos genes *mecA* e *coag*

Foi extraído o DNA de quatorze cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina identificados previamente por provas bioquímicas, sorológicas e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. Todos os isolados foram submetidos à técnica da PCR e eletroforese em gel de agarose 1% com revelação por brometo de etídio. Observou-se um produto de amplificação com 759 pb em todas as cepas, correspondentes aos *primers* *coag1* e *coag2* (Figura 11A). Todas as cepas MRSA amplificaram para o gene *mecA*, exceto uma (MRSA06) (Figura 11B).



**Figura 11.** Perfil eletroforético, em gel de agarose 1 % dos produtos amplificados através da técnica de reação em cadeia da polimerase para o gene *coag* (A) e *mecA* (B) das cepas clínicas de *S. aureus* com susceptibilidade reduzida para meticilina. M representa o marcador de 1kpb, colunas de 1 a 14 representam os isolados clínicos.

## 6.2 Análise da atividade antimicrobiana *in vitro*.

6.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima das amostras vegetais frente cepas clínicas de MRSA.

As CIMs do extrato etanólico e suas frações, do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial das folhas de *P. amboinicus* estão representadas na Tabela 10. Verificou-se que o óleo essencial é detentor do melhor efeito inibitório com CIM  $\geq 0,078$  % v/v, seguido da fração F4, bem mais efetiva que as demais frações, com CIM  $\geq 0,25$  mg/mL e do extrato EH com CIM  $\geq 2$  mg/mL.

**Tabela 10.** Concentração inibitória mínima dos extratos, frações e óleo essencial de *P. amboinicus* contra cepas clínicas de MRSA

Cepa MRSA	Controles			Extratos			Frações (mg/mL)				
	Pos ( $\mu\text{g/mL}$ )	Neg (% v/v)	Cc	OE (% v/v)	EH (mg/mL)	ET (mg/mL)	F1	F2	F3	F4	F5
	Van	DMSO	Bac								
(ATCC 25923)	1	> 10	+	0,156	4	8	> 16	> 16	8	0,5	> 16
(ATCC 65398)	1	> 10	+	0,078	4	4	> 16	> 16	8	0,5	> 16
MRSA 01	2	> 10	+	0,156	4	8	> 16	> 16	8	0,5	> 16
MRSA 02	2	> 10	+	0,156	2	4	> 16	> 16	> 16	0,5	> 16
MRSA 03	1	> 10	+	0,156	2	8	> 16	> 16	> 16	0,25	> 16
MRSA 04	1	> 10	+	0,078	2	8	> 16	> 16	> 16	0,5	> 16
MRSA 05	1	> 10	+	0,078	4	4	> 16	> 16	8	0,5	> 16
MRSA 06	2	> 10	+	0,078	4	8	> 16	> 16	> 16	0,25	> 16
MRSA 07	2	> 10	+	0,078	2	4	> 16	> 16	> 16	0,5	> 16
MRSA 08	1	> 10	+	0,078	2	4	> 16	> 16	> 16	0,5	> 16
MRSA 09	2	> 10	+	0,078	2	8	> 16	> 16	> 16	0,5	> 16
MRSA 10	1	> 10	+	0,156	2	4	> 16	> 16	8	0,5	> 16
MRSA 11	2	> 10	+	0,156	2	8	> 16	> 16	8	0,5	> 16
MRSA 12	2	> 10	+	0,078	2	8	> 16	> 16	8	0,5	> 16
MRSA 13	2	> 10	+	0,156	2	8	> 16	> 16	> 16	0,25	> 16
MRSA 14	2	> 10	+	0,078	2	8	> 16	> 16	> 16	0,5	> 16

Pos, positivo; Neg, negativo; Cc, controle de crescimento; Bac, bactérias; OE, óleo essencial; EH, extrato hidroalcoólico; ET, extrato etanólico; F1, fração hexano; F2, fração éter de petróleo; F3, fração diclorometano; F4, fração acetato de etila; F5, fração metanol; Van, vancomicina, DMSO, dimetilsulfóxido; +, crescimento.

### 6.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima das subfrações de F4 e do composto PA-1 frente cepas clínicas de MRSA

A fração F4, como demonstrado anteriormente, foi a que apresentou melhor atividade antimicrobiana. Com o intuito de determinar os compostos ativos, a mesma foi submetida a fracionamento cromatográfico, que resultou em sete subfrações denominadas de F4a-g. Tanto a CIM destas subfrações como a do composto PA-1, isolado a partir da subfração F4b, estão apresentados na Tabela 11. Apenas as quatro primeiras subfrações F4a, F4b, F4c e F4d foram capazes de inibir o crescimento bacteriano nas concentrações testadas, sendo as subfrações F4b-d com  $CIM \geq 0,5$  mg/mL e a F4a com  $CIM \geq 1$ mg/mL. O composto PA-1 mostrou-se ter efeito inibitório superior as sub-frações, com  $CIM = 0,125$  mg/mL.

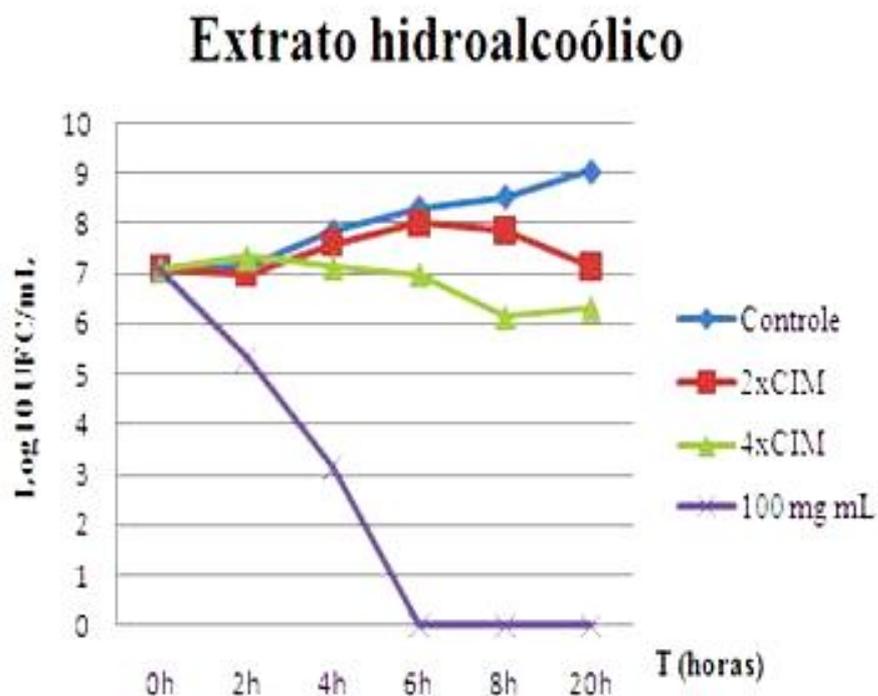
**Tabela 11.** CIM das subfrações e do composto PA-1 frente às cepas MRSA.

Cepas	Controles			Composto (mg/mL) PA-1	Subfrações (mg/mL)						
	Pos (µg/mL)	Neg (% v/v)	Cc		F4a	F4b	F4c	F4d	F4e	F4f	F4g
	Van	DMSO	Bac								
(ATCC 25923)	1	> 10	+	0,125	2	0,5	0,5	0,5	> 16	> 16	> 16
(ATCC 65398)	1	> 10	+	0,125	1	0,5	0,5	0,5	> 16	> 16	> 16
MRSA 01	2	> 10	+	0,125	1	0,5	1	0,5	> 16	> 16	> 16
MRSA 06	2	> 10	+	0,125	2	0,5	0,5	1	> 16	> 16	> 16
MRSA 09	2	> 10	+	0,125	1	0,5	0,5	0,5	> 16	> 16	> 16

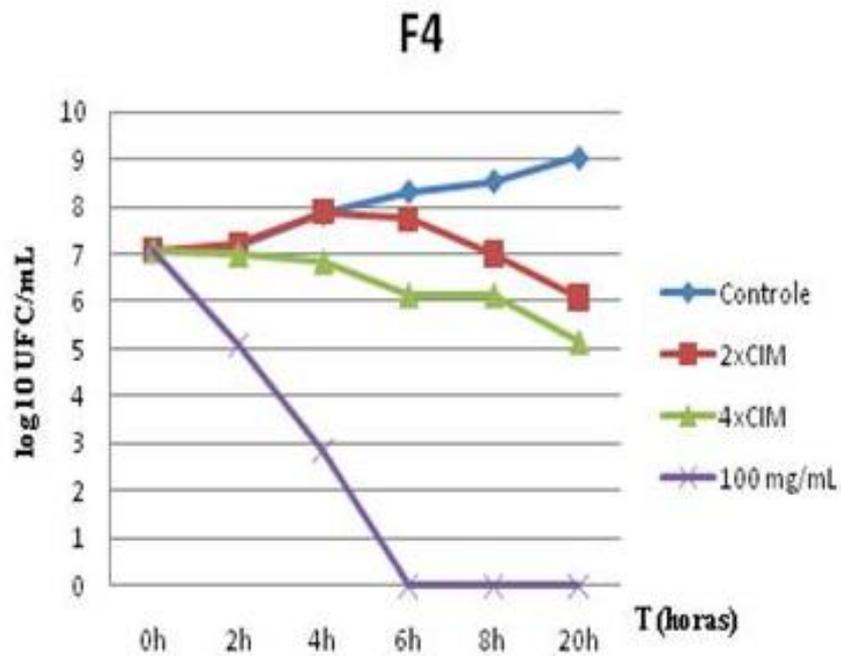
Pos, positivo; Neg, negativo; Cc, controle de crescimento; Bac, bactérias; +, crescimento, F4a-g, subfrações da fração F4.

### 6.2.3 Cinética da inibição do crescimento bacteriano

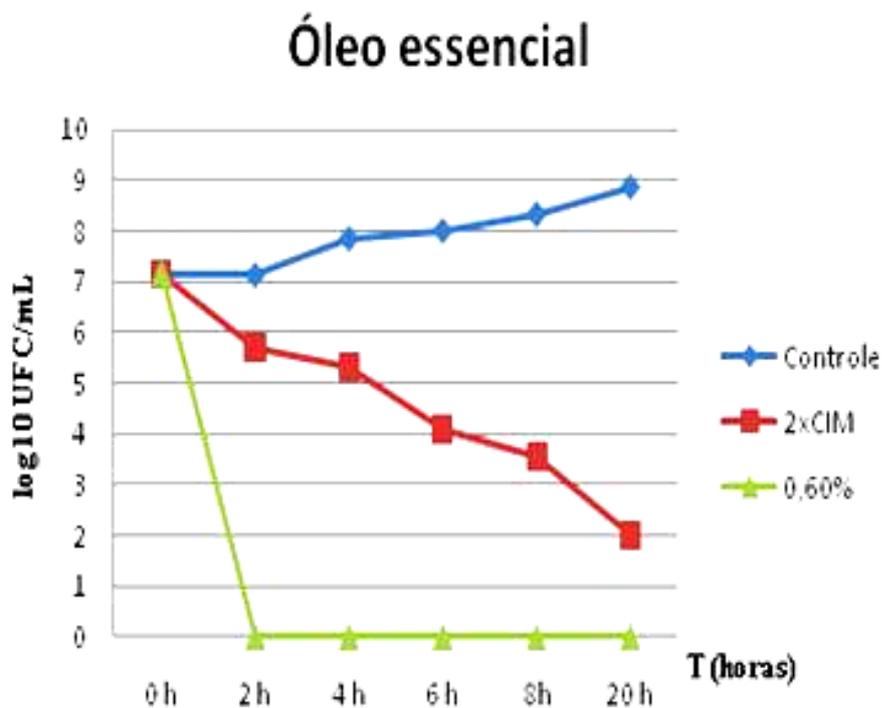
O efeito bacteriostático e bactericida do extrato EH, da fração F4 e do OE foram determinados sobre a cepa padrão (ATCC 65398) (Figura 12 A-C). Tanto o extrato EH como a fração F4 apresentaram ação bacteriostática, nas concentrações de duas e quatro vezes a CIM, e ação bactericida na concentração de 100 mg/mL, entre 2 e 4 h de incubação. Ao contrário do extrato EH e da fração F4 o óleo essencial apresentou efeito bactericida em todas as concentrações testadas, tendo sido observado um decréscimo de três log em 6 h e sete log nas duas primeiras horas de exposição da bactéria ao óleo nas concentrações de duas vezes a CIM e 0,6 %, respectivamente.



**Figura 12A.** Ação bacteriostática e bactericida do Extrato hidroalcoólico de *P.amboinicus* em diferentes concentrações, frente à cepa padrão de MRSA (ATCC 65398).



**Figura 12B.** Ação bacteriostática e bactericida da fração F4 do extrato etanólico de *P.amboinicus* em diferentes concentrações, frente à cepa padrão de MRSA (ATCC 65398).



**Figura 12C.** Ação bacteriostática e bactericida do óleo essencial de *P.amboinicus* em diferentes concentrações, frente à cepa padrão de MRSA (ATCC 65398).

6.2.4 Sinergismo entre as amostras vegetais extraídas de *P. amboinicus* e os antibióticos vancomicina e ciprofloxacina.

Para análise do efeito sinérgico entre as amostras vegetais e os antibióticos, vancomicina e ciprofloxacina, foi utilizado o método tabuleiro de xadrez (GRIF et al., 2001; ORHAN et al., 2005; KAMATOU et al., 2006). Os valores da CIF, ICIF e a interpretação das combinações estão apresentadas na Tabela 12. As associações entre o extrato EH e os antibióticos foram consideradas indiferentes para todas as cepas testadas. Já a fração F4 apresentou atividade sinérgica com a vancomicina e aditiva com ciprofloxacina, enquanto que o óleo essencial mostrou efeito sinérgico com ciprofloxacina e aditivo com vancomicina.

**Tabela 12.** Valores da CIF, ICIF e a interpretação das associações do óleo essencial (A), extrato hidroalcoólico (B) e F4 (C) quando combinados com vancomicina e ciprofloxacina a cepa ATCC (65398) e três cepas clínicas de MRSA.

**A**

Cepas	OE – Van				OE – Cip			
	CIF				CIF			
	OE	Van	ICIF	At <sup>a</sup>	OE	Cip	IFIC	At
ATCC (65398)	0,5	0,5	1	A	0,25	0,5	0,75	S
MRSA 05	0,5	0,5	1	A	0,25	0,5	0,75	S
MRSA 08	0,5	0,5	1	A	0,25	0,5	0,75	S
MRSA 12	0,5	0,5	1	A	0,25	0,5	0,75	S

**B**

Cepas	EH – Van				EH – Cip			
	CIF				CIF			
	Eh	Van	ICIF	At	Eh	Cip	IFIC	At
ATCC (65398)	1	1	2	I	0,5	2	2,5	I
MRSA 05	1	2	3	I	0,5	2	2,5	I
MRSA 08	1	1	2	I	0,5	2	2,5	I
MRSA 12	1	1	2	I	0,5	2	2,5	I

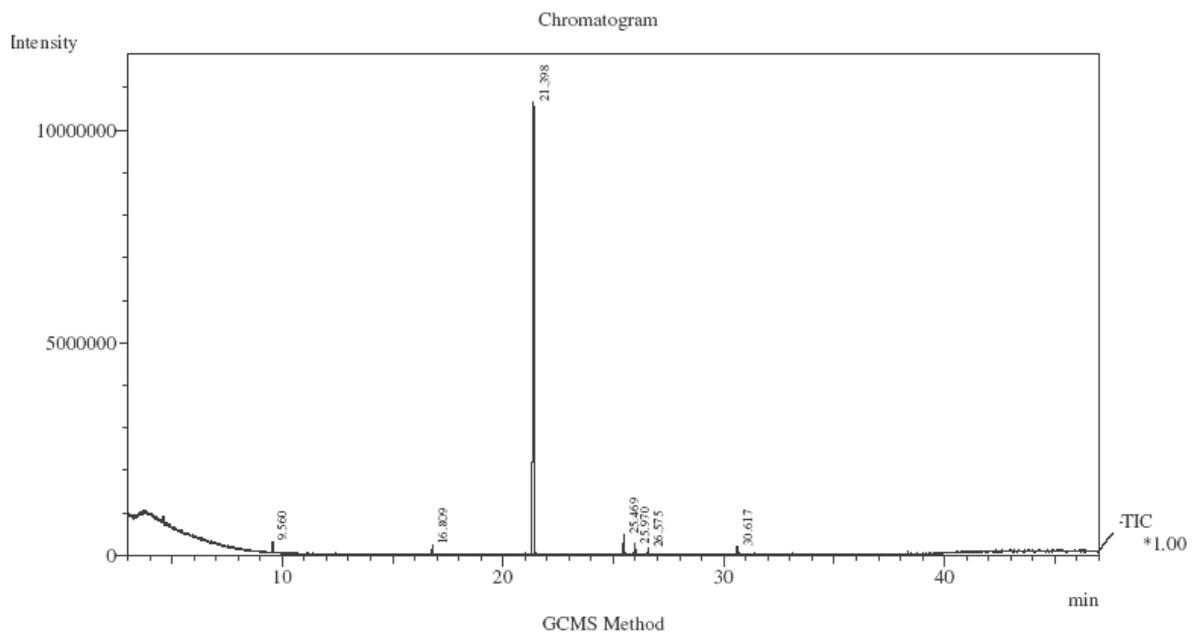
C

Cepas	F4 – Van				F4 – Cip			
	CIF				CIF			
	F4	Van	ICIF	At	F4	Cip	IFIC	At
ATCC (65398)	0,5	0,25	0,75	S	0,5	0,5	1	A
MRSA 05	0,5	0,25	0,75	S	0,5	0,5	1	A
MRSA 08	0,5	0,25	0,75	S	0,5	0,5	1	A
MRSA 12	0,5	0,25	0,75	S	0,5	0,5	1	A

CIF, concentração inibitória fracionada; ICIF, índice da concentração inibitória fracionada; At, atividade; <sup>a</sup> S, sinergismo; An, antagonismo; I, indiferença; A, aditivo.

#### 6.2.5 Caracterização química do óleo essencial das folhas de *P.amboinicus*.

O estudo da composição química do óleo essencial das folhas *P. amboinicus* foi realizado por CG/EM na análise qualitativa e por CG/DIC na análise quantitativa. O cromatograma obtido por CG/EM está apresentado na Figura 13.



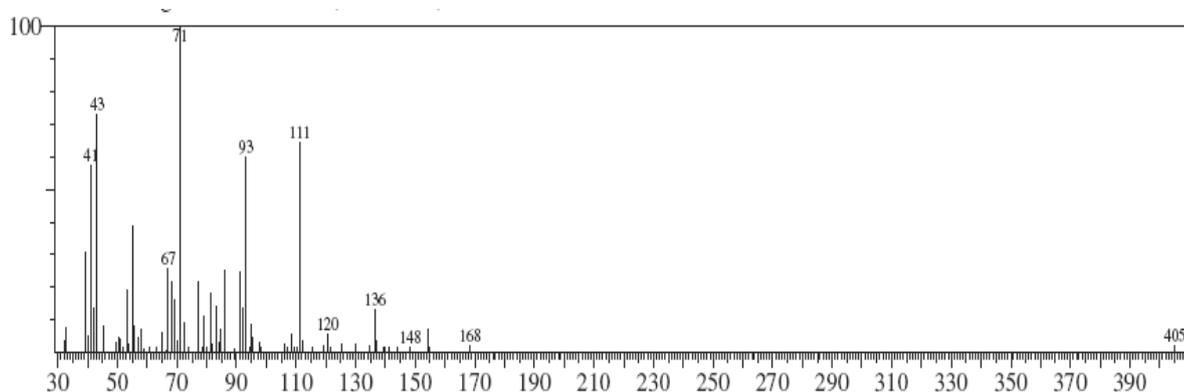
**Figura 13.** Cromatograma (CG/EM) do OE de *P. amboinicus*.

Os componentes do óleo essencial foram identificados através da comparação de seus espectros de massas (Figuras 14 a 18) com espectros existentes na literatura (ALBUQUERQUE, 2000), com espectros do banco de dados (NIST 21 e NIST 107) do equipamento e, também, pela comparação dos índices de retenção com aqueles da literatura. Os índices de retenção de Kovats (IK) foram determinados utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub>) injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras, utilizando a equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963). Desta forma foi possível, a identificação de 98,1% dos constituintes do óleo, sendo o composto majoritário o carvacrol com 90,55 %, como mostra a Tabela 13.

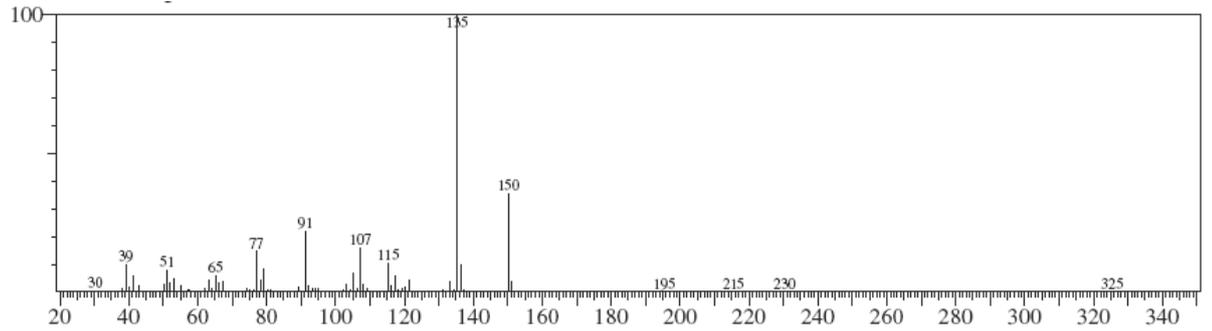
**Tabela 13.** Composição química do óleo essencial das folhas de *P. amboinicus*

Retenção (tempo/min)	Compostos	(%)	Índice de Kovats
16,80	4-Terpinenol	1,34	1177
21,39	Carvacrol	90,55	1298
25,46	β-Cariofileno	3,09	1417
25,97	α-Bergamoteno	1,78	1433
30,97	Oxido de cariofileno	1,36	1583
	Total	98,12	

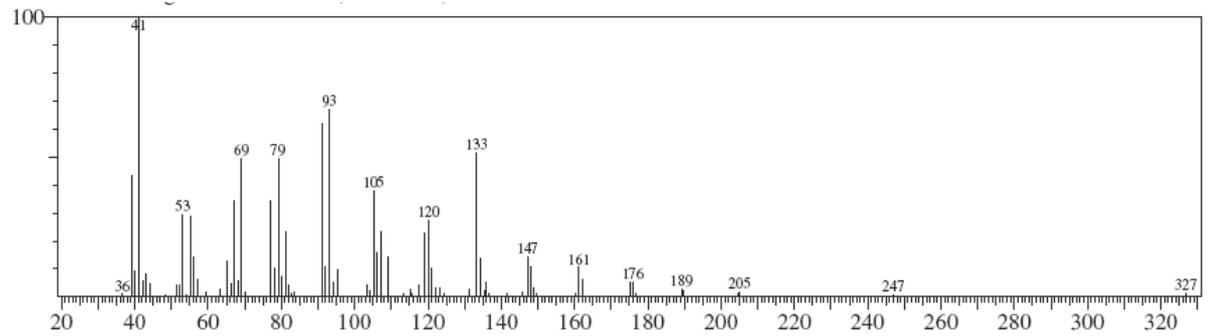
As Figuras 14 a 18 mostram os espectros de massas de cada constituinte identificado, obtidos em espectrômetro de massa através da técnica de impacto eletrônico de 70 eV.



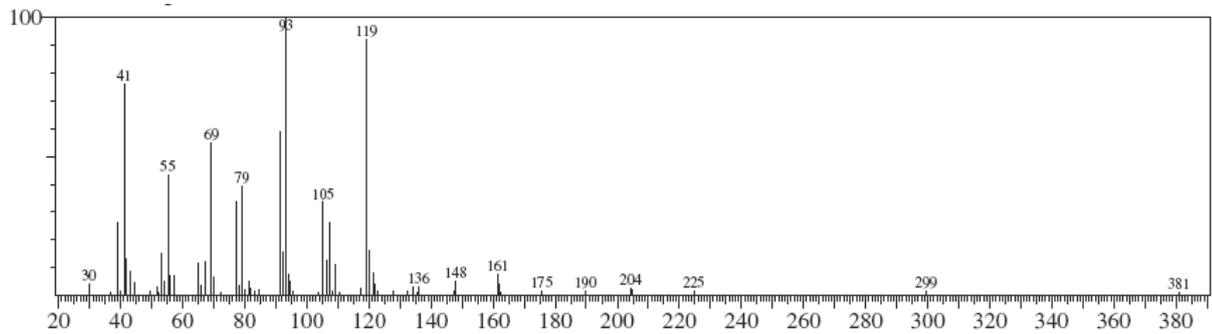
**Figura 14.** Espectro de massas do 4-terpinenol.



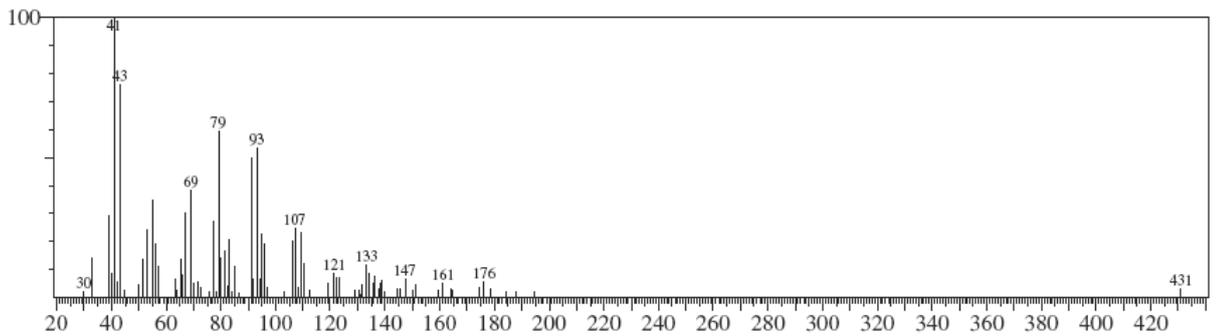
**Figura 15.** Espectro de massas do carvacrol.



**Figura 16.** Espectro de massas do  $\beta$ -cariofileno.



**Figura 17.** Espectro de massas do  $\alpha$ -Bergamoteno

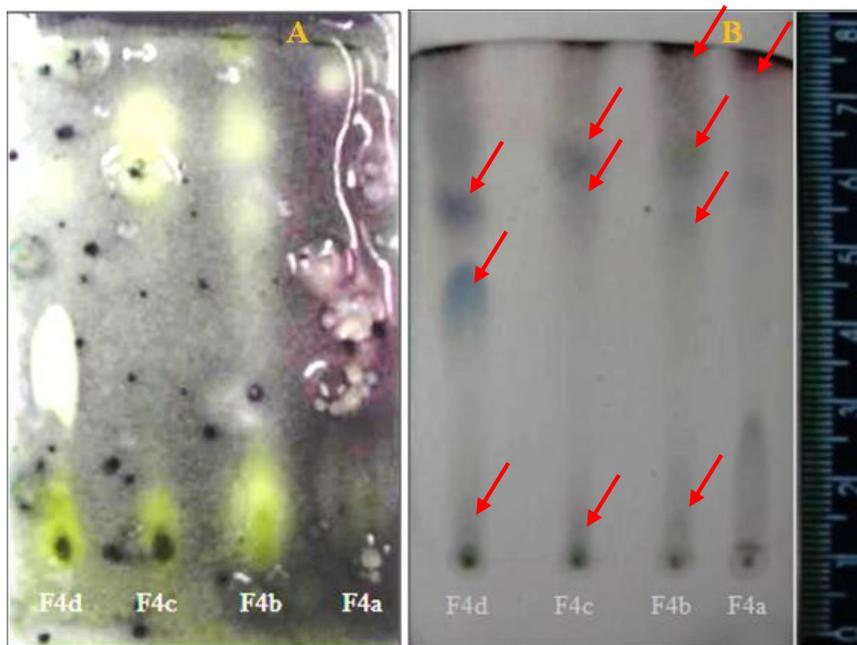


**Figura 18.** Espectro de massas do oxido de cariofileno,



### 6.2.6 Bioautografia

Apenas as subfrações F4a-d apresentaram atividade antibacteriana, com ativos antimicrobianos de diferentes polaridades. As zonas de inibição microbiana exibidas pelos diferentes constituintes químicos, o perfil químico das subfrações e os fatores de retenção (Fr) dos compostos ativos são mostrados na Figura 19, A-B.



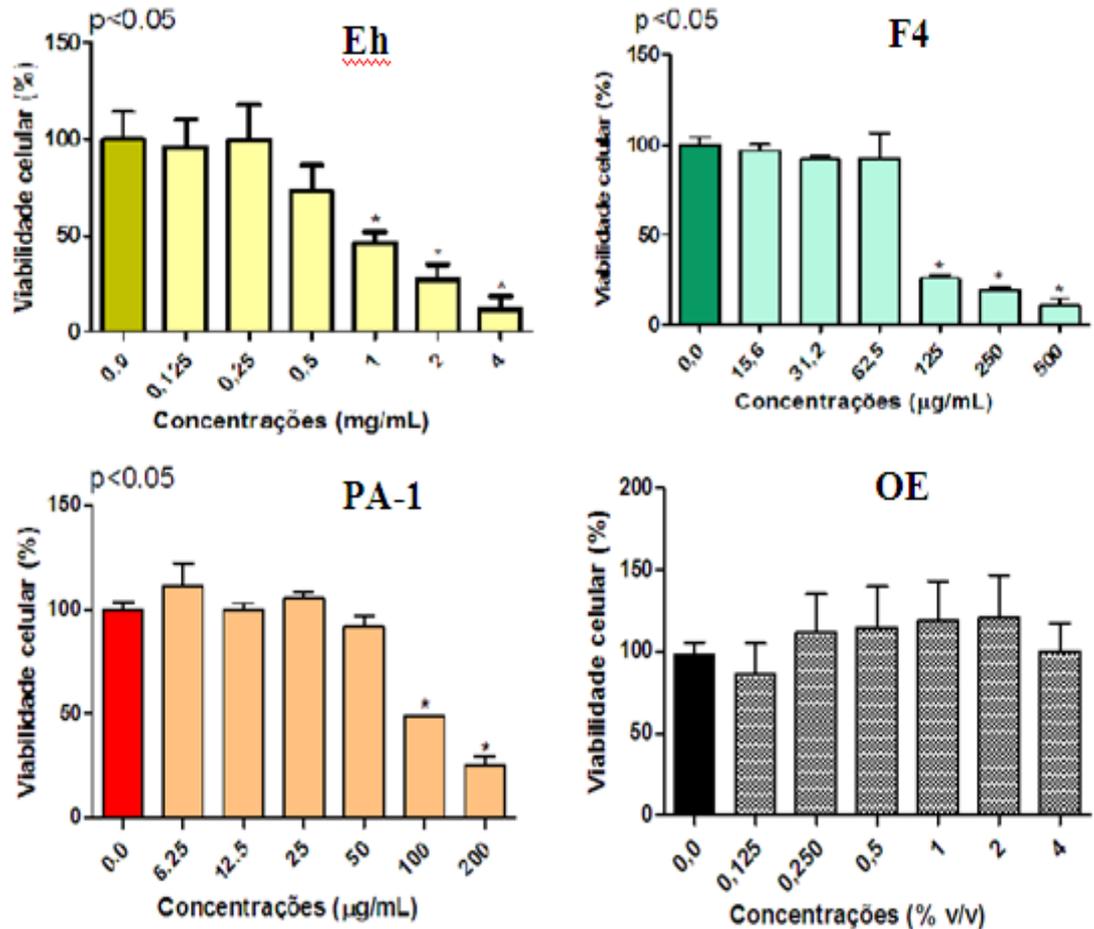
**Figura 19.** Bioautograma das subfrações da fração F4 do extrato etanólico de *P. amboinicus* que apresentaram atividade antibacteriana. A, revelação com MTT e B, revelação com vanilina/ácido perclórico. As setas indicam os compostos que apresentaram zonas de inibição, como mostrado em 19A.

## 6.3 Avaliação toxicológica das amostras vegetais

### 6.3.1 Ensaio de citotoxicidade

A Figura 20 apresenta a porcentagem da viabilidade celular (média  $\pm$  erro padrão das triplicatas) frente a diferentes concentrações do extrato EH, fração F4, PA-1 e OE. Tanto o extrato EH, fração F4 e o sólido PA-1 apresentaram efeito citotóxico sobre a linhagem RAW 264.7, tendo sido verificada a média da concentração inibitória 50 % (IC<sub>50</sub>) de 817  $\mu$ g/mL,

99,6  $\mu\text{g/mL}$  e 79,8  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Já o óleo essencial não alterou a viabilidade celular em nenhuma das diluições testadas.



**Figura 20.** Porcentagem da viabilidade celular (média  $\pm$  erro padrão das triplicatas) de linhagem de macrófagos (RAW 264.7) frente ao extrato EH, fração F4, PA-1 e OE de *P.amboinicus* após 24 h de exposição.

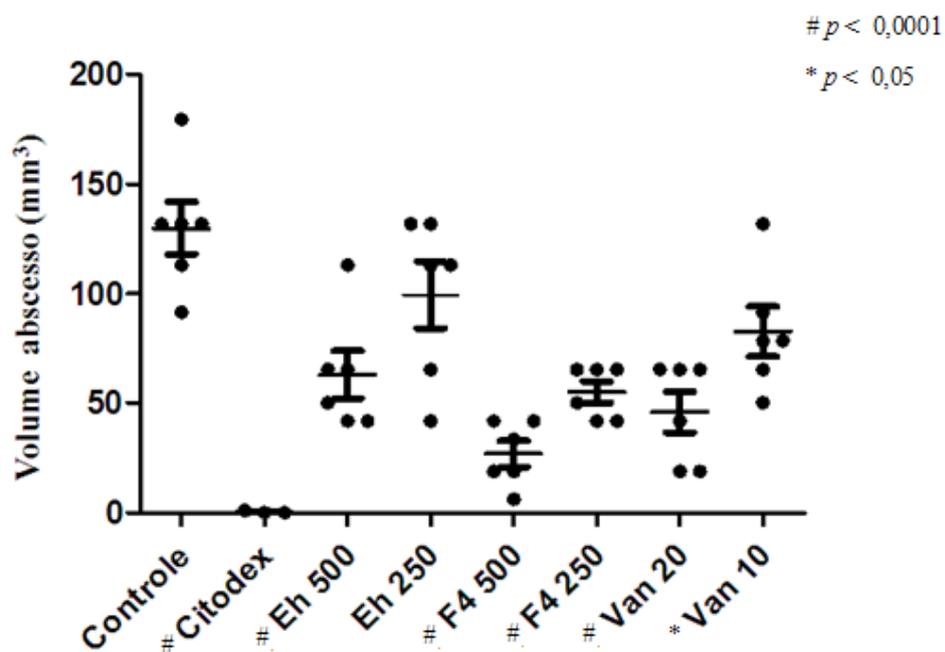
### 6.3.2 Avaliação da toxicidade do extrato EH em camundongos

A dose de 2000 mg/kg do extrato hidroalcoólico não levou a morte de nenhum dos três animais em nenhuma das duas etapas propostas, conforme proposição da OECD (Figura 8). De acordo com o esquema proposto, a  $DL_{50}$  foi estimada como sendo de  $> 5000$  mg/kg.

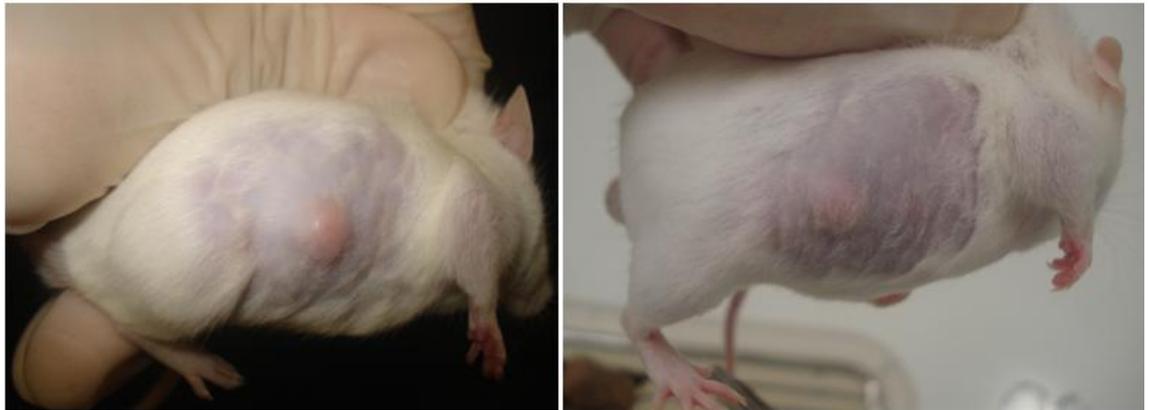
## 6.4 Avaliação da atividade antimicrobiana em modelo animal

6.4.1 Medida do volume dos abscessos subcutâneos após tratamento com extrato EH e fração F4 por via intra-peritoneal.

O efeito do extrato EH e da fração F4 sobre a formação do abscesso subcutâneo em camundongos pode ser visualizado na Figura 21. Observou-se menor volume dos abscessos nos animais tratados por via intra-peritoneal com EH, F4 e vancomicina, quando comparados aos controles não tratados. Após 72 h de tratamento, o volume médio dos abscessos nos animais tratados com EH na dose de 500 mg/kg foi de 62,98 mm<sup>3</sup>, enquanto que os animais tratados com salina obtiveram volume médio de 129,9 mm<sup>3</sup> ( $p < 0,0001$ ). Não se observou diferença significativa entre os animais tratados com EH 250 mg/kg e os tratados com salina. Nos animais tratados com F4 houve menor volume dos abscessos em todas as concentrações testadas quando comparados ao grupo controle, no entanto, com a dose de 500 mg/kg, a redução foi mais significativa com 26,88 mm<sup>3</sup>, ( $p < 0,0001$ ). A vancomicina demonstrou efeito significativo apenas na dose de 20 mg/kg, com volume médio dos abscessos de 45,97 mm<sup>3</sup> ( $p < 0,0001$ ). Para todos os tratamentos foram observados efeito dose dependente, ou seja, quanto maior a dose melhor foi o efeito. A Figura 22, mostra dois camundongos, um tratado com salina (Figura 22A) e o outro, com F4 na concentração de 500 mg/kg (Figura 22B).



**Figura 21.** Volume dos abscessos subcutâneos em camundongos infectados com MRSA 08, após 72 h de tratamento intra-peritoneal com o extrato EH, fração F4 e vancomicina. Foi utilizado como controle, animais inoculados com Cytodex 2% e os tratados com salina.



**Figura 22.** Camundongos infectados com a cepa MRSA via subcutânea e tratados via intra-peritoneal com salina (A) ou com F4 na dose de 500 mg/Kg (B).

#### 6.4.2 Inibição do crescimento bacteriano nos abscessos

A Tabela 14 mostra o efeito inibitório do extrato EH e da fração F4 sobre o crescimento bacteriano nos abscessos, onde o extrato EH demonstrou ser eficaz apenas na dose de 500 mg/kg, com número de células viáveis por abscesso aproximadamente de 1,5 log a menos que o grupo controle ( $p < 0,05$ ). Nos animais tratados com F4, observou-se atividade antimicrobiana para ambas as doses de 250 e de 500 mg/kg, com números de células viáveis de aproximadamente 2,5 e 1,9 log, respectivamente, a menos do que os valores observados para os animais tratados com salina ( $p = 0,0001$ ). O extrato EH na dose de 500 mg/Kg, mostrou ser eficaz tanto quanto a vancomicina na dose de 10 mg/Kg. Por outro lado, o número de células viáveis encontrado nos abscessos dos grupos tratados com F4 foi equivalente aos dos grupos tratados com vancomicina. Atividade antibacteriana dose dependente foi observada em todos os grupos.

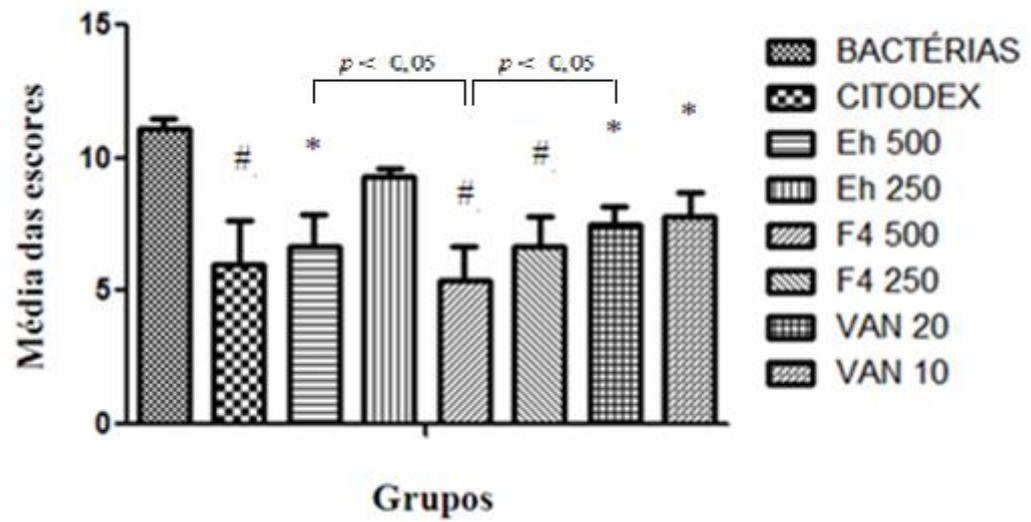
**Tabela 14.** Efeito inibitório do extrato EH e da fração F4, sobre o crescimento bacteriano nos abscessos de camundongos infectados com a cepa MRSA 08, após 72 h de infecção.

Cepa	Tratamento	Dose (mg/kg)	CIM (mg/mL)	Log UFC/sítio (M ± SD)
(MRSA 08)	Controle			7,17 ± 0,41
	Eh	500	2	5,58 ± 0,51 <sup>#</sup>
		250		6,87 ± 0,48
	F4	500	0,5	4,66 ± 0,73 <sup>*</sup>
		250		5,29 ± 0,48 <sup>#</sup>
	Vancomicina	20	0,002	4,21 ± 0,91 <sup>*</sup>
		10		5,40 ± 0,86 <sup>#</sup>

M, média; SD, erro padrão; <sup>#</sup>,  $p < 0,05$ ; <sup>\*</sup>,  $p = 0,0001$

#### 6.4.3 Análise histopatológica

A análise histopatológica dos abscessos dos animais infectados com a cepa MRSA 08 e tratados com as amostras vegetais e a vancomicina foi realizada em todos os grupos com 72 h de tratamento. Como parâmetros inflamatórios, foram considerados o infiltrado celular, edema, angiogênese, fibrose, necrose e hemorragia, tendo sido atribuído escores que variaram de 0 a 3. Melhora significativa no processo inflamatório supurativo foi observada nos grupos tratados com EH 500 mg/kg, vancomicina e F4. O tratamento com F4, na dose de 500 mg/Kg, mostrou ser mais eficiente na resolução dos abscessos do que os animais tratados com salina ( $p < 0,0001$ ), com EH ( $p < 0,05$ ) ou com vancomicina ( $p < 0,05$ ) (Figura 23).



**Figura 23.** Mensuração dos parâmetros inflamatórios através de análise histopatológica, após 72 h do tratamento de camundongos *Swiss* infectados com a cepa MRSA. 08. #,  $p < 0,001$ ; \*,  $p < 0,05$

## 7. DISCUSSÃO

*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, tem, cada vez mais, tornado-se um grave problema de Saúde Pública, não só em decorrência das altas taxas de incidência no ambiente hospitalar, como também devido ao risco iminente de sua propagação na comunidade entre indivíduos sadios (FRANCIS et al., 2005). As quatorze cepas de MRSA isoladas de espécimes clínicos e incluídas no presente estudo demonstraram ser resistentes a mais de 5 dos 9 antimicrobianos testados através da técnica de disco difusão, como recomenda pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009a). Cepas de MRSA com esse perfil de resistência são facilmente isoladas em ambiente hospitalar, como observado em outros trabalhos (MARIN, 2002). Entre os poucos antibióticos utilizados como alternativa terapêutica para pacientes infectados por MRSA está a vancomicina (TAVARES, 2002).

Neste trabalho, os antimicrobianos ciprofloxacina e vancomicina ainda parecem ser uma alternativa terapêutica para pacientes infectados por MRSA, uma vez que foi observada resistência para estes antimicrobianos de 36 % e 0 %, respectivamente. Uma vez estudos com microrganismos resistentes a antimicrobianos é indispensável uma correta identificação dos mesmos, procuramos confirmar os resultados obtidos no teste de disco difusão, empregando a técnica de reação em cadeia de polimerase para detecção dos genes *coag* e *mecA*, como sugerido por outros autores (RALLAPALLI et al, 2008). Em todas as cepas foram detectados tais genes, exceto a cepa MRSA 06, com a qual não se observou produto de amplificação correspondente ao gene *mecA*.

Uso de componentes de plantas com fins terapêuticos vem aumentando no Brasil, e de acordo com a Organização Mundial de Saúde, estas poderão ser a melhor fonte para se obter uma variedade de drogas (21 e 22). GIBBONS (2006), cita vários exemplos de metabólitos isolados de plantas com atividade antimicrobiana frente ao gênero *Staphylococcus*. Produtos naturais vegetais, têm sido apontados como inibidores de bombas de efluxo, um novo alvo na busca de novos antimicrobianos (GIBBONS, 2006). No entanto, é importante lembrar que o uso das plantas não pode se realizar de forma indiscriminada, uma vez que não estão isentas de potencial tóxico. No entanto, o uso das plantas não pode se realizar de forma empírica, mas baseado em estudos controlados de eficácia e toxicidade (NOGUEIRA et al., 2008).

A planta *P. amboinicus* usada popularmente em quadros patológicos como infecção urinária, otite externa, conjuntivite e faringite, foi mencionada em estudos anteriores como

detentora de ação antimicrobiana contra MSSA e MRSA. NOGUEIRA et al. (2008) comprovaram através do método de difusão em gel a ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *P. amboinicus* contra *S. aureus* sensível a meticilina. Os primeiros relatos de estudos com cepas resistentes a meticilina (MRSA) foram apresentados por GURGEL et al (2009). Os autores verificaram atividade antimicrobiana para o extrato hidroalcoólico da planta contra cepas padrões MSSA (ATCC 25923) e MRSA (ATCC6538) através do método de difusão em gel, tendo observado uma média de concentração inibitória mínima (CIM) do extrato de 9,3 mg/mL, superior à média encontrada em nosso estudo (4,8 mg/mL).

Quanto ao óleo essencial, os autores (NOGUEIRA et al., 2008) encontraram uma CIM de 4 e 8%, enquanto em nosso estudo, o óleo essencial apresentou uma  $CIM \geq 0,078$  % v/v. É importante ressaltar que nosso método aplicado para análise antimicrobiana é o de microdiluição em caldo, que certamente melhora muito a sensibilidade analítica do ensaio, já que a técnica de difusão em gel pode não ser adequada pois apresenta resultados variáveis, a depender da viscosidade e, portanto, da capacidade de difusão da amostra em questão.

Quando comparamos nossos extratos entre si, verificamos que o extrato hidroalcoólico apresentou melhor desempenho ( $CIM \geq 2$  mg/mL) do que o extrato etanólico ( $CIM \geq 4$  mg/mL) tanto para as cepas padrão como com as cepas clínicas. Verificamos ainda que o extrato hidroalcoólico e a fração F4 apresentaram ação bacteriostática nas concentrações de duas e quatro vezes a CIM, ou seja, 4 e 8 mg/mL para o EH e 1 e 4 mg/mL para F4, e ação bactericida para ambas na concentração de 100 mg/mL, no período entre 2 e 4 h de incubação com uma cepa clínica de MRSA. Efeito bactericida do EH também foi observado por GURGEL et al (2009), porém na concentração de 1200 mg/mL.

Embora não possamos traçar uma comparação direta entre as concentrações do extrato e aquelas do óleo, verificamos que o óleo essencial de *P. amboinicus* apresentou um excelente desempenho, com efeito bactericida em todas as concentrações testadas. A atividade bactericida do óleo na concentração de duas vezes a CIM sobre a cepa MRSA (ATCC 65398), iniciou-se após 6h de incubação, atingindo a redução de  $5 \log_{10}$  UFC/mL em 20h. Já na concentração de 0,6 % v/v, o óleo mostrou ser bactericida nas primeiras duas horas de incubação reduzindo o número de células bacterianas viáveis a zero. Até então, estudos não tinham relatado ação antimicrobiana do óleo essencial de *P. amboinicus* sobre MRSA.

A análise cromatográfica do óleo essencial por CG-EM e CG-DIC indicou ser este constituído por uma mistura com sete compostos, onde cinco deles foram responsáveis por

98,12 % da constituição do óleo. Embora se saiba que timol e carvacrol sejam isômeros, o que os tornam impossível de identificar por CG/DIC, o carvacrol respondeu por 90,55% do óleo, sendo responsável pelo efeito antimicrobiano do óleo essencial de *P.amboinicus* (dados não apresentados). Estudos anteriores tem relacionado a atividade antimicrobiana do carvacrol à sua estrutura, sugerindo claramente que o grupo livre fenólico do carvacrol é vital para a sua atividade antimicrobiana (ARFA et al., 2006). Atividade anti MRSA do carvacrol já foi descrita por outros autores (NOSTRO et. al., 2004).

Em busca de resposta para explicar o efeito antimicrobiano observado para os extratos, propusemo-nos a fracionar o extrato etanólico por coluna cromatográfica sob pressão reduzida, utilizando eluentes com polaridade crescente. Obtivemos cinco frações F1-F5, tendo sido cada fração submetida a testes de microdiluição em caldo. Apenas as frações F3 e F4 mostraram efeito inibitório com CIM de 8 e  $\geq 0,25$  mg/mL, respectivamente. O efeito antimicrobiano superior de F4 comparativamente às demais frações e extratos deveu-se provavelmente ao acúmulo de metabólitos ativos presentes na planta como flavonóides e triterpenos (ALBUQUERQUE, 2000; VERA et al., 1993, GURGEL et al., 2009a).

Submetemos a fração F4 a um novo fracionamento, desta vez, utilizando hexano e acetato de etila em grau crescente de polaridade e em seguida as sete subfrações F4a-F4g oriundas do fracionamento foram avaliadas por testes antimicrobianos de microdiluição em caldo e bioautografia. A bioautografia sugeriu que atividade antimicrobiana das subfrações, que foram capaz de inibir o crescimento das cepas MRSA a partir dos ensaios de microdiluição, eram decorrentes de um conjunto de substâncias com polaridades próximas, podendo estas atuarem de forma sinérgica ou isoladamente, como foi observado para um sólido (PA-1) isolado da subfração F4b com cristais em forma de agulha, amarelados, fator de retenção de 0,82 e visível no UV 365 nm. O sólido PA-1, mostrou-se muito eficaz, tendo apresentado uma CIM de 0,125 mg/mL, tanto para as cepas padrões como para três isolados clínicos, enquanto que F4 apresentou uma CIM  $\geq 0,5$  mg/mL e o extrato etanólico  $\geq 4$  mg/mL. Os resultados da RMNH<sup>1</sup> e RMNC<sup>13</sup> para o sólido PA-1 não foram apresentados.

Nos ensaios para verificação de sinergismo pelo método do tabuleiro de xadrez, foram verificados resultados satisfatórios com considerável sinergismo nas ocasiões onde o óleo essencial foi usado em combinação com ciprofloxacina, e quando F4 foi combinado com vancomicina. Por outro lado, parece que o extrato EH e os antibióticos associados agem sobre as cepas de MRSA a partir de mecanismos antimicrobianos independentes, com ICIF maior que um e menor que quatro nas duas associações. Efeito sinérgico do óleo essencial com

cefalotina e ampicilina, assim como antagonismo com gentamicina e cloranfenicol foram relatados por OLIVEIRA et al. (2006). Diante do exposto, cria-se uma possibilidade do uso destes produtos naturais combinados aos antimicrobianos vancomicina e ciprofloxacina, no intuito de aumentar o potencial antimicrobiano dos fármacos. No entanto, não podemos descartar a necessidade de estudos *in vivo* que comprovem tais resultados.

No estudo da toxicidade celular, utilizando linhagem de macrófagos RAW 264.7 em cultura, observou-se que o EH, fração F4 e PA-1 mostraram discreto efeito citotóxico com  $IC_{50}$  de 817  $\mu\text{g/mL}$ , 99,6  $\mu\text{g/mL}$  e 79,8  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Apesar do extrato EH ter apresentado efeito tóxico *in vitro*, em concentrações inferiores a CIM, o mesmo parece não ocorrer *in vivo*, uma vez que a  $DL_{50}$  em camundongos foi acima de 500 mg/kg de peso do animal. PAULO et al. (2009), em estudos anteriores, também observaram  $DL_{50} > 500$  mg/Kg de peso do animal para o extrato hidroalcoólico. De acordo NUNES et al. (1998), o extrato aquoso das folhas de *P. amboinicus* na dose de 400 e 600 mg/Kg, em ratos Wistar, não alterou significativamente nenhum dos parâmetros hematológicos (hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos, linfócitos e neutrófilos) e bioquímicos (glicose, creatinina, bilirrubina total, fosfatase alcalina, colesterol total, triglicerídeos, AST, ALT e uréia) analisados. Os mesmos parâmetros hematológicos e bioquímicos citados anteriormente foram analisados em seres humanos após administração de *P. amboinicus* por PAULO et al., (2009), e novamente nenhuma alteração significativa foi observada entre os pacientes estudados. O óleo essencial não levou a alteração da viabilidade celular em nenhuma das diluições testadas.

Vários modelos experimentais de infecção de pele e tecidos moles têm sido descrito na literatura (BUNCE et al., 1992; HEBEISEN et al., 2001; LIVERMORE et al., 2001). Os protocolos variam amplamente em termos do animal, cepas bacterianas empregadas, introdução de materiais estranhos e o tempo do estudo. Estudos usando ágar BHI e Cytodex no inóculo infectante são citados por alguns autores (BUNCE et al., 1992). No presente estudo, optou-se em avaliar o efeito antimicrobiano do EH e da fração F4 em um modelo de tratamento intra-peritoneal, administrando-se duas doses da amostra vegetal, uma logo após 3 h a partir da infecção dos animais e outra, após 12 h. Este modelo permite avaliar a capacidade de um composto “proteger” o hospedeiro da infecção.

Na literatura, geralmente tem se utilizado camundongo SKH1 e Cytodex com base na consistência da infecção e as vantagens de camundongos sem pêlos na avaliação de infecções de pele (BUNCE et al., 1992; FERNANDEZ et al., 2010). No presente estudo,

não foi possível a utilização de tais animais, pois não encontramos em nosso meio nenhuma possibilidade viável de adquiri-los. Dessa forma, optamos pelos camundongos *Swiss*.

Com objetivo de se induzir uma resposta inflamatória local, o que facilitaria a formação dos abscessos, utilizamos Cytodex, no entanto, obtivemos sucesso em induzir a formação do abscesso somente a partir da concentração de 2 % de Cytodex (dados não apresentados). O tratamento com EH mostrou-se eficaz apenas na dose de 500 mg/Kg com redução tanto no volume dos abscessos como no número de células bacterianas viáveis. A redução no volume dos abscessos e no número de células viáveis, foi tão visível quanto a observada para os animais tratados com vancomicina na dose de 20 e 10 mg/Kg, respectivamente. Por outro lado, a fração F4 foi eficaz em ambas as doses testadas, onde o tratamento com a dose de 500 mg/Kg foi mais eficaz do que qualquer outro tratamento quando comparada as médias do volume dos abscessos entre os grupos. Mas, quanto ao número de células viáveis o tratamento com F4 foi semelhante ao da vancomicina. Todos tratamentos mostraram efeito dose dependente.

A rápida recuperação dos animais tratados com EH e F4, deve ser não só graças ao efeito antimicrobiano comentado anteriormente, mas também ao efeito antiinflamatório já relatado por outros estudos (GURGEL et al., 2009b; CHANG et al., 2010), e os observados por nós, onde a partir da análise histopatológica dos abscessos pôde-se perceber melhora significativa para os animais tratados com EH na dose de 500 mg/Kg, vancomicina e F4, sendo este último o tratamento de melhor resolução dos parametros inflamatórios analisados.

Em intensas buscas realizadas na literatura, não encontramos relatos demonstrando a eficácia de *P. amboinicus* em modelos de abscesso subcutâneo induzidos por microrganismos, desta maneira, nossos dados são relevantes e inéditos. Estudos estão sendo continuados com o intuito de identificar e caracterizar os constituintes das subfrações F4a-d, oriundas da fração F4 do extrato étanólico. A partir da análise destes resultados, não só ratifica os achados *in vitro* citados em outros trabalhos, como também alerta a comunidade científica para o potencial terapêutico das folhas de *P. amboinicus* contra infecções por *S. aureus*, independentemente da presença ou ausência do gene *mecA*. Paralelamente, é visível a eficácia antimicrobiana *in vitro* do o óleo essencial e a ausência de citotoxicidade, tornando-o um excelente candidato para avaliações posteriores em protocolos clínicos de antisepsia e desinfecção.

## 8.CONCLUSÕES

- Foi observada ação antimicrobiana *in vitro* sobre cepas clínicas de MRSA tanto para os extratos como para o óleo essencial das folhas, tendo o óleo o melhor efeito inibitório com Concentração inibitória mínima  $\geq 0,078$  %v/v.
- Entre as frações do extrato etanólico, a fração F4 foi a que melhor mostrou efeito inibitório com CIM  $\geq 0,25$  mg/mL, ação antimicrobiana superior aos extratos hidroalcoólico e etanólico.
- Tanto o extrato EH como a fração F4 apresentaram efeito bacteriostático nas concentrações de duas e quatro vezes a CIM. No entanto, efeito bactericida foi alcançado para ambos na concentração de 100 mg/mL, após 3 h de incubação com a cepa MRSA (ATCC 65398). O óleo essencial apresentou efeito bactericida em todas as concentrações testadas, tendo sido capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano após as primeiras duas horas de incubação com a cepa MRSA (ATCC 65398) na concentração do óleo essencial de 0,6 % v/v.
- A partir das análises cromatográficas CG/DIC e CG/EM, foram identificados cinco compostos, tendo sido o carvacrol o componente majoritário com 90,55 %. A ação antimicrobiana do óleo foi atribuída ao cavacrol.
- Os ensaios de bioautografia mostraram que o efeito antimicrobiano de F4 decorre de mais de um composto, estando estes distribuídos entre as subfrações F4a-d. A partir da subfração F4b foi isolado um sólido, PA-1, com atividade antimicrobiana superior aos extratos, frações e subfrações. Não se pode também descartar a possibilidade de efeito sinérgico entre os constituintes da planta;
- O óleo essencial e a fração F4 mostraram ser capazes de potencializar os efeitos antimicrobianos *in vitro* dos antibióticos vancomicina e ciprofloxacina, porém o mecanismo de ação antimicrobiana do extrato EH parece atuar de forma independente daqueles conhecidos para vancomicina e ciprofloxacina.

- O extrato EH e a fração F4 e o composto PA-1 foram citotóxicos para linhagens de macrófagos (RAW 264.7) em concentrações inferiores às CIMs encontradas para as cepas de MRSA. No entanto, a citotoxicidade do extrato EH parece não ter apresentado efeito significativo no sistema biológico, uma vez que observamos  $DL_{50}$  acima de 500 mg/mL em camundongos tratados com 2000 mg/Kg do extrato hidroalcoólico. Efeito citotóxico para o óleo essencial não foi observado em nenhuma das concentrações testadas.
- O extrato EH mostrou atividade antimicrobiana *in vivo* apenas na dose de 500 mg/kg, com redução significativa tanto no volume como no número de bactérias viáveis nos abscessos. A fração F4 foi eficaz tanto na concentração de 250 mg/kg como na de 500 mg/kg, sendo a de 500 mg/kg mais eficaz que qualquer outro tratamento quando comparado à média do volume dos abscessos entre os grupos. A fração F4 mostrou ser eficaz tanto quanto a vancomicina na capacidade de inibir o crescimento de MRSA em camundongos infectados.
- A partir da análise histopatológica, percebe-se que ambas as amostras vegetais proporcionaram melhoras significativas nos parâmetros inflamatórios analisados. Porém, acredita-se que tais resultados não sejam atribuídos apenas aos efeitos antimicrobianos mencionados anteriormente, mas também a outras atividades farmacológicas já conhecidas como, por exemplo, ação anti-inflamatória.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE RL 2000. **Contribuição ao estudo químico de plantas medicinais do Brasil: *Plectranthus barbatus* Andr. e *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng.** Fortaleza, 166 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará
- ALVES, E. G., et al. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Quimica Nova**, Vol. 31, No. 5, 1224-1229 2008
- BANNERMAN TL, HANCOCK GA, TENOVER FC, MILLER M. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology** 33: 551-555, 1995.
- BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P.R et al. (Eds.). Manual of clinical microbiology. Washington: **American Society for Microbiology**, p. 384-404, 2003.
- BARBER, M., Methicillin-resistant staphylococci, **Journal of Clinical Pathology** 14 ,p. 385. 1961.
- BARRETT, F. F. et al., Bacteriophage types and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus*: Boston City Hospital, **Archives of Internal Medicine** 125, p. 867, 1970.
- BATAINEH AB: Resistance of *Staphylococcus aureus* to Vancomycin in Zarqa, **Jordan Pakistan Journal of Medical Sciences**, 2006
- BJÖRHOLT, I.; HAGLIND, E. Cost-savings achieved by eradication of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA)-16 from a large teaching hospital. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.23, n.9, p.688-695, set. 2004.
- BOYCE, J.M. (1997) Epidemiology and prevention of nosocomial infections. In: The Staphylococci in Human Disease (Crossley, K.B. and Archer, G.L., Eds.), pp. 309–329. Churchill Livingstone, New York.
- BOYLE-VAVRA S, DAUM RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantone-Valentine leukocidin. **Laboratory Investigation**; 87: 3-9, 2007.
- BOYLE-VAVRA S, YIN S, CHALLAPALLI M, DAUM RS. Transcriptional Induction of the Penicillin-Binding Protein 2 Gene in *Staphylococcus aureus* by Cell Wall-Active Antibiotics Oxacillin and Vancomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 47(3): 1028-1036, 2003.
- BRAGANÇA ALR. Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar. Niterói: **EDUFF**; 1996.
- BROWN, D. F. J. & WALPOLE, E., Evaluation of the Mastalex Latex Agglutination Test for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Grown on Different Screening Media, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.47, p. 187 – 189, 2001.

BUNCE, C., L. et al., 1992. A murine model of cutaneous infection with gram-positive cocci. **Infection and Immunity**. 60: 2636–2640, 1992.

BUSTOS-MARTÍNEZ J. A, et al., *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. **Rev Biomedical**;17:287-305, 2006.

CARRARA D. Por que devemos incentivar a Fitoterapia no atendimento á saúde. Disponível em <<http://www.cesamep.hpg.ig.com.br/ftakerel.htm>>, cessado em: 10 out de 2007.

CAVASSINI, M. et al. Evaluation of MRSA-Screen, a simple anti-PBP 2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1591-4, 1999.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – Minnesota and North Dakota, 1997-1999. **Morb Mortal Wkly Rep**, v. 48, p. 707-10, 1999.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Outbreaks of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections – Los Angeles County, California, 2002-3. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**;52:88, 2003.

CHAMBERS HF. Community-associated MRSA-resistance and virulence converge. **N Engl J Med**2005; 7;352(14): 1485-7.

CHAMBERS, H.F. Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 781-791, 2001.

CHANG HR, et al., Use of pulsed-field gel electrophoresis in the analysis of recurrent *Staphylococcus aureus* infections in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. **American Journal of Nephrology** 20: 463-467, 2000.

CHANG, J. C. et al., Potential Use of Plectranthus amboinicus in the Treatment of Rheumatoid Arthritis Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 7, Issue 1, Pages 115-120, 2010

CHANG, S. et al. Infection with vancomycinresistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. **England Journal of Medicine**; 348:1342–7, 2003.

CHERKAOUI, A. et al. Comparison of four chromogenic media for culture based screening of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 500-3, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2009b). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard-Eighth Edition. Norma M07-A8, v. 29(2).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). (2009a). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard Tenth Edition. Norma M02-A10, v. 29(1).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, seventeenth informational supplement, document M100-S17. Wayne, PA, USA: CLSI, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Eighteenth informational supplement, M100-S18. Wayne, PA, 2008.

COHEN P R. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections: a review of epidemiology, clinical features, management, and prevention. **International Journal of Dermatology**; 46: 1-11, 2005.

COUTINHO, H. D. M.; BEZERRA, D. A. C.; LÔBO, K.; BARBOSA, I. J. F. **Atividade antimicrobiana de produtos naturais** . p. 78-85, 2004.

COUTO I, WU S W, TOMASZ A, LENCASTRE H. Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of the *mecA* homologue native to the species. **Journal. Bacteriology**; 185(2): 645–653, 2003.

DAUM, R.S. Skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **England Journal of Medicine**, v. 357, p. 380-90, 2007.

DE JONGE, B. L. M et AL., Altered muropeptide composition in *Staphylococcus aureus* strains with an inactivated *femA* locus. **Journal. Bacteriology**. 175: 2.779-2.782, 1993

DEURENBERG R H, STOBBERINGH E E. The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Current Molecular Medicine**; 9, 100-115, 2009.

DEURENBERG RH & STOBBERINGH EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**; 8: 747-763, 2008.

DEVIENNE, K. F. et al., Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 11-14, 2004.

DIEDEREN, B. et al. Performance of CHROMagar MRSA medium for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1925-7, 2005.

DIEKEMA DJ, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999, **Clinical Infectious Diseases**; 32 (suppl. 2): S114-132

DINIZ MFFM, et al., **Memento fitoterápico: as plantas como alternativa terapêutica: conhecimentos populares e científicos**. João Pessoa: Ed. Universitária; 1997.

EL-ADHAMI, W. & STEWART, P. R., Genome organization of *Staphylococcus aureus* isolates from different populations. **Journal of Medical Microbiology**. 46: 297-306, 1997.

- FELTEN, A. et al. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system and the MRSA-screen latex agglutination test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2766- 71, 2002.
- FRANCIS, J. S. et al., Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton-Valentine leukocidin genes. **Clinical Infectious Diseases**; 40(1): 100-7, 2005.
- GARRITY, G. M., HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: An Overview of the Road Map to the manual**. New York: Bergey's Manual Trust/Springer, 2000.
- GILLET, Y. et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. **Lancet**, v. 359, p. 753-9, 2002.
- GRADELSKI, E. et al. Correlation between genotype and phenotypic categorization of staphylococci based on methicillin susceptibility and resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2961-3, 2001.
- GUIGNARD, B; ENTENZA, J M; MOREILLON, P. b-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Current Opinion in Pharmacology**, 5:479–489, 2005.
- GURGEL, A. P. A. D., et al. Antibacterial Effects of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae) in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Latin American Journal of Pharmacy**, 28 (3): 460-4, 2009a
- GURGEL, A. P. A. et al., *In vivo* study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae) **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, Issue 2, p. 361-363, 2009b.
- GUZMÁN-BLANCO M, et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. **International Journal of Antimicrobial Agents**; 34(4):304-8, 2009.
- HARTSTEIN, A. I; SEBASTIAN, T. J; AND STRAUSBAUGH, L. J. “Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus*” In: C. Glen MAYHALL, ed. **Hospital Epidemiology and Infection Control**. 3ª Edição. Filadélfia, 2004.
- HEDGE, I. C. A global survey of the biogeography of the Labiatae. In Harley, R. M. and Reynolds, T (eds). **Advances in Labiatae Science**. pp. 7-17, 1992.
- HIRAMATSU K, CUI L, KURODA M, ITO T. The emergence and evolution of methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**; 9: 486-93, 2001.
- HIRAMATSU, K. Vancomycin resistance in *Staphylococci*. **Drug Resistance Updates**, 1: 135-50, 1998

ITO T, et al., Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**; 45(5): 1323-36, 2001.

ITO T, OKUMA K, MA XX, YUZAWA H, HIRAMATSU K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resistance Updates**; 6(1): 41-52, 2003.

JESSEN, O. et al., Changing staphylococci and staphylococcal infections. A ten-year study of bacteria and cases of bacteremia, **England Journal of Medicine** 281, p. 627, 1969.

JEVONS M. P., “Celbenin”-resistant staphylococci, **British Medical Journal** 1, p. 124, 1961.

KAMATOU, G. P. P., et al. (2006). In vitro evidence of antimicrobial synergy between *Salvia*

KANERVA, M. et al., Costs of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Journal of hospital infection**, v.66 n.1, p.22-28, mai. 2007.

KAPLAN, S.L. et al. Three-year surveillance of community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 1785-91, 2005.

KAYSER, F. H. AND T.M. MAK, Methicillin-resistant staphylococci, **American Journal of the Medical Sciences** 264, p. 197. 1972.

KLEVENS, R.M. EDWARDS, J.R., et al., Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992–2003, **Clinical Infectious Diseases** 42, pp. 389–391, 2006.

KLOOS, W.E. & BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P.R et al. (Eds.). Manual of clinical microbiology. Washington: **American Society for Microbiology**, p. 264-82, 1999.

KLUYTMANS-VANDENBERGH M F Q, KLUYTMANS J A J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. **Clinical Microbiology and Infection**; 12(1): 9-15, 2006.

KONEMAN, E.W, et al., **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KOPP, B. J.; NIX, D. E.; ARMSTRONG, E. P. Clinical and economic analysis of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* infections. **The Annals of pharmacotherapy**, v.38 n.9, p.1377-1382, set. 2004.

KOPP, B. J.; NIX, D. E.; ARMSTRONG, E. P. Clinical and economic analysis of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* infections. **The Annals of pharmacotherapy**, v.38 n.9, p.1377-1382, set. 2004.

LAVABRE, M, Aromaterapia: **a cura pelos óleos essenciais**. Rio de Janeiro, 1992.

LOPES, H. V. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. **Revista panamericana de infectología**, v. 7, n. 3, p. 34-6, 2005.

LYON, B.R. AND SKURRAY, R.A. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis, **Microbiology Rev.** 51, p. 88, 1987.

MA XX, et al., Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**; 46(4): 1147-52, 2002.

MA, X. X. et al., Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**; 11:973-976, 2005.

MAREE CL, DAUM RS, BOYLE-VAVRA S, MATAYOSHI K, MILLER LG. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing healthcare-associated infections. **Emerging Infectious Diseases**; 13(2): 236-42, 2007.

MARLOWE, E.M. et al. Practical strategies for detecting and confirming vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*: a tertiary-care hospital laboratory's experience. *J Clin Microbiol*, v. 39, p. 2637-9, 2001.

MASAKATSU, T. et al., In Vivo Antibacterial Activity of S-3578, a New Broad-Spectrum Cephalosporin: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Experimental Infection Models antimicrobial agents and chemotherapy, Aug. 2003, p. 2507–2512

MATOS F. J. A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais. Projeto para pequenas comunidades.** Fortaleza: Ed. UFC, 1994.

MATOUSKOVA, I. & JANOUT, V. Current knowledge of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, 152(2):191–202, 2008.

MCDONALD, M. A. HURSE AND K.N. SIM, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia, **Medical Journal of Australia** 2, p. 191, 1981.

MELISH ME, CAMPBELL KA. Coagulase-Positive Staphylococcal Infections. In: Feigin RD, Cherry JD, editors. **Textbook of Pediatric Infectious Diseases**. 4th ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1998.

MONGKOLRATTANOTHAI, K. et al., Severe *Staphylococcus aureus* infections caused by clonally related community-acquired methicillin-susceptible and methicillin-resistant isolates. **Clinical Infectious Diseases**; 37(8): 1050-8, 2003

MORAN, G.J. et al., Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department, *N Engl J Med* 355 (2006), pp. 666–674.

MOULARI, B. et al., Isolation and in vitro antibacterial activity of astilbin, the bioactive flavanone from the leaves of *Harungana madagascariensis* Lam. Ex poir. (Hypericaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 2, p. 272-278, 2006.

NAIMI T. S, et al., Epidemiology and clonality of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota, 1996-1998. **Clin Infect Dis**2001; 33(7): 990-6.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Taxonomy Browser. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>. Acesso em: 20 dez. 2006.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 1999. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved guideline M26-A.

NOGUEIRA, J. C. R. et al.,Atividade antimicrobiana invitro de produtos vegetais emotite externa aguda **Rev Bras Otorrinolaringol**2008;74(1):118-24.

NULENS, E., et al., Cost of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* search and destroy policy in a Dutch university hospital. **Journal of Hospital infection**, v.68, n.4, p.301-307, abr. 2008.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Guideline for Testing of Chemicals: Acute oral toxicity – Acute Toxic Class Method. Paris:OECD, Guideline 423, 2001.

OGSTON, A “Em Abscesses”.Clássicos em doenças Infectious ". **Reviews of Infectious Diseases**,6 (1): 122–28, 1984.

OLIVEIRA DC, LENCASTRE H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother** 46: 2155-2161, 2002.

OLIVEIRA KRA. A fitoterapia no serviço de Saúde Pública da Paraíba. In: Diniz M FFM. **Das plantas medicinais aos fitoterápicos: abordagem multidisciplinar**. 2.ed. João Pessoa: Editora Universitária; 1999.

OLIVEIRA, G. A. et al., Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.** 22:443-448, 2001

ORHAN G., BAYRAM A., ZER Y., BALCI I. (2005). Synergy Tests by E Test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, 43, 140 – 143.

PALAZZO ICV, ARAUJO MLC, DARINI ALC: First Report of Vancomycin-Resistant Staphylococci Isolated from Healthy Carriers in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, 43:179-185, 2005.

PATON, A.J. et al., Phylogeny and evolution of basils and allies (Ocimeae, Labiatae) based on three plastid DNA regions. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 31, 277–299, 2004

PAVILLARD, R. et al., Epidemic of hospital-acquired infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in major Victorian hospitals, **Medical Journal of Australia**1, p. 451, 1982.

PFALLER MA, JONES RN, DOERN GV, KUGLER K. Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). **Antimicrob Agents Chemother**;42(7):1762–70, 1998.

RAMMELKAMP, CH, MAXON, T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**.51:386-389, 1942.

REINERT C, MCCULLOCH J A, WATANABE S, ITO T, HIRAMATSU K, MAMIZUKA E M. Type IV SCCmec found in decade old Brazilian MRSA isolates. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**;12(3):213 216, 2008.

RIBEIRO, A. et al., First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. **Journal of Clinical Microbiology**; 43(4): 1985-8, 2005.

RIBEIRO, J. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among patients visiting the emergency room at a tertiary hospital in Brazil. **BrazJ Infect Dis**, v. 9, n. 1, p. 52-5, 2005.

ROSSI F, GARCÍA P, RONZON B, CURCIO D, DOWZICKY MJ. Rates of antimicrobial resistance in Latin America (2004-2007) and in vitro activity of the glycylicline tigecycline and of other antibiotics. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**; 12(5):405-15, 2008.

ROZENBAUM, R. et al., The first report in Brazil of severe infection caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**; 42(8):756-60, 2009.

ROZGONYI, F., et al. Is MRSA more virulent than MSSA? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, p. 843-5, 2007.

SABATH, L.D. et al., Methicillin resistance of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*., **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 302, 1968.

SADER HS, PIGNATARI AC, HOLLIS RJ, JONES RN. Evaluation of interhospital spread of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA. **Hospital Epidemiology and Infection Control** 15: 320-323, 1994.

SAKOULAS, G. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of mecA-positive susceptible strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3946-51, 2001.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SCRIBEL LV, et al. Clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmecIV in a university hospital in Porto Alegre, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2009.

SENNA JPM, PINTO CA, CARVALHO LPS, SANTOS DS. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and PCR analysis of polymorphisms on the *mec* hypervariable region for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology** 40: 2254-2256, 2002.

SIANI, A. C. Óleos essenciais. **Biotecnologia ciência & Desenvolvimento**, v. 2, p. 38-43, Brasil, 2000.

SILVA F. L. A. et al., use of medicinal plants by the elders at a family's health strategy uso de plantas medicinais pelos idosos em uma estratégia saúde da família. **Revista de Enfermagem UFPE on line**; 2(1):9-16, 2008.

SKINNER, D, KEEFER, C. S. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. **Archives of Internal Medicine**.68:851-875, 1941.

SOUSA M A, CONCEIÇÃO T, SIMASC, LENCASTRE H. Comparison of genetic backgrounds of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals and the community. **Journal of Clinical Microbiology**, 5150–5157, 2005.

SRINIVASAN, A.; DICK, J. D.; PERL, T. M. Vancomycine resistance in staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 3, p. 430-8, 2002.

SRINIVASAN, A.; DICK, J. D.; PERL, T. M. Vancomycine resistance in staphylococci. *Clin Microbiol Rev*, v. 15, n. 3, p. 430-8, 2002.

SWENSON, J.M. et al. Performance of eighth methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3785-8, 2001.

SZCZEPANIK A, KOZIOL-MONTEWKA M, AL-DOORI Z, MORRISON D, KACZOR D. Spread of a single multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone carrying a variant of staphylococcal cassette chromosome *mec* type III isolated in a university hospital. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**; 26(1): 29-35, 2007.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. Rio de Janeiro: Editora Atheneu,caps. 1 e 5, 2002.

TEIXEIRA LA, et al., Geographic spread of epidemic multiresistant *S. aureus* clone in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology** 33: 2400-2404, 1995.

- TIWARI, H. K.; SEN, M. R. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, n. 156, 2006.
- UDO, E. E, et al., Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. **Journal of Hospital Infection**; 25:97-108, 1993.
- VAN DER FLIER M, et al., Fatal pneumonia in an adolescent due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* positive for Pantone-Valentine-leukocidin. **Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde**; 147(22): 1076-9, 2003.
- VANDENESCH, F. et al., Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Pantone-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. **Emerging Infectious Diseases**; 9(8): 978-84, 2003.
- VANNUFFEL P, et al., specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology** 33: 2864-2867, 1995.
- VANNUFFEL P, GIGI J, EZZEDINE H, VANDERCAM B, DELMEE M, WAUTERS G et al. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin*
- VELASCO, D. et al. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, p. 379-82, 2005.
- VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Pública de México**, v. 47, p. 381-7, 2005.
- VERA R, MONDON JM, PIERIBATTESTI JC. Chemical composition of the essential oil and aqueous extract of *Plectranthus amboinicus*. **Planta Médica** 59: 182-183, 1993.
- WEBER, J. T. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**. (41 Suppl 4): S269-S272, 2005.
- WEIGEL LM, et al. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. **Science**; 302:1569-71, 2003.
- WERTHEIM, H F. L, et al., The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **Lancet Infectious Diseases**,; 5: 751-62. 2005
- YUNES, R. A.; CALIXTO, J.B. Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos Editora Universitária, 2001
- ZETOLA N, FRANCIS J S, NUERMBERGER E L, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. **Lancet Infectious Diseases**; 5: 275 -286, 2005.

ZHANG K, MCCLURE J, ELSAYED S, LOUIE T, CONLY JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**; 43.

## ANEXO A

### PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

**Artigo 1.** Oliveira, F. F. M., Torres A. F., Gonçalves T. B., Santiago G. M., de Carvalho C. B., et al. (2013) Efficacy of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng in a murine model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin abscesses. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2013: 291592.