



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PLANTAS MEDICINAIS
FRENTE À BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES E A SUA
INTERAÇÃO COM DROGAS ANTIMICROBIANAS**

Rosa Márcia Corrêa Saraiva

BELEM – PA
2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PLANTAS MEDICINAIS
FRENTE À BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES E A SUA
INTERAÇÃO COM DROGAS ANTIMICROBIANAS**

Autora: Rosa Márcia Corrêa Saraiva

Orientador: Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

BELÉM - PA

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde – UFPA

Saraiva, Rosa Márcia Corrêa.

Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente à bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas / Rosa Márcia Corrêa Saraiva ; orientador, José Maria dos Santos Vieira - 2012.

94fls.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia. Belém, 2012.

1. Plantas medicinais. 2. Extratos vegetais. 3. Farmacorresistência bacteriana múltipla. 4. Sinergismo farmacológico. 5. Antagonismo de drogas. I. Título.

CDD: 22.ed.: 615.321

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rosa Márcia Corrêa Saraiva

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PLANTAS MEDICINAIS FRENTE À BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES E A SUA INTERAÇÃO COM DROGAS ANTIMICROBIANAS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovada em 28 de agosto de 2012

Banca Examinadora:

Prof. Dr. JOSÉ MARIA DOS SANTOS VIEIRA

Instituição: ICS/UFPA Assinatura: _____

Profa. Dra. MARTA CHAGAS MONTEIRO

Instituição: ICS/UFPA Assinatura: _____

Profa. Dra. ANTONIA BENEDITA RODRIGUES VIEIRA

Instituição: ICB/UFPA Assinatura: _____

BELÉM- PA

2012

Dedico este trabalho à minha família, por que sem eles não teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Á Deus por que ele é minha fortaleza.

A minha família Ricardo, Andréa e Rodrigo pelo amor, apoio e incentivo.

Ao meu pai Luiz (in memorian) e minha mãe Rosa, pelo exemplo de determinação e coragem.

Aos meus irmãos, Lílian e Fernando, pelo abraço fraterno e amigo.

Ao meu primo Mauricio pela ajuda de última hora

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira, obrigado pelo seu otimismo, boa vontade e força nas horas difíceis.

Aos demais Professores da Pós-graduação pela amizade, força e apoio no decorrer desses anos em especial a Prof. Dra. Roseane Maria Ribeiro Costa, pelas palavras de incentivo nas horas de desespero.

A Direção do Laboratório Central do Estado (LACEN), por ter cedido suas instalações para realização de meus experimentos.

As minhas amigas de mestrado Angélica e Edinilza pelo choro consolado nas horas de angústia e pela mão amiga na hora de seguir em frente.

Aos meus colegas de mestrado e UFPA que seguiram junto nesta batalha, Carla e Jailton.

Aos amigos do LAC/FACULDADE DE FARMÁCIA/UFPA que sempre me incentivaram.

A Universidade Federal do Pará - Programa de Pós Graduação (PPGCF), pela oportunidade concedida

Aos colegas da Pós-graduação Dayse Nascimento, Edinilza Borges e Fabrício. Alexopulos por cederem os extratos usados neste trabalho.

Aos meus amigos do LACEN, Ana, Cintia, George, Lúcia, Rogéria e Susan por sua compreensão e amizade.

As técnicas do LACEN, Lúcia Teixeira e Terezinha, por colaborarem na preparação dos meios de cultura, enfim a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho,

.

.

"O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano".

Isaac Newton

RESUMO

SARAIVA, R.M.C. **ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PLANTAS MEDICINAIS FRENTE À BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES E A SUA INTERAÇÃO COM DROGAS ANTIMICROBIANAS**. 94f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2012.

O controle de micro-organismos infecciosos multirresistentes às vezes é ineficaz mesmo com o desenvolvimento de novos antibióticos. Diversos extratos de plantas medicinais têm efeitos antimicrobianos o que pode representar uma alternativa terapêutica para doenças infecciosas, principalmente quando associados aos antibióticos de uso clínico. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana de plantas medicinais sobre bactérias multirresistentes e os efeitos de sua interação com drogas antimicrobianas. Foi determinada a atividade antibacteriana de extratos e frações das plantas *Eleutherine plicata* (marupazinho), *Geissospermum vellosii* (pau-pereira) e *Portulaca pilosa* (amor-crescido) frente a isolados de *Staphylococcus aureus* Oxacilina Resistente (ORSA) e de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, provenientes de processos clínicos humanos, assim como a interação destes produtos vegetais com drogas antimicrobianas de uso clínico. A atividade antibacteriana foi determinada pelo método de disco difusão em ágar Muller Hinton e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em placas utilizando caldo Muller Hinton como meio de cultura e resazurina a 0,01% como revelador de crescimento bacteriano. Os extratos e frações foram testados nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5, 31,2 e 16,2 µg/mL dissolvidos em DMSO a 10%. As plantas *E. plicata* e *G. vellosii* demonstraram atividade contra os isolados ORSA com CIM de 125 µg/mL, enquanto que *P. pilosa* teve ação sobre os isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes com CIM de 250 µg/mL. Ocorreram 25% de sinergismo e apenas 5% de antagonismo entre as 120 interações de produtos vegetais e drogas antimicrobianas testadas. Frente aos isolados ORSA houve sinergismo com as drogas ciprofloxacina, clindamicina e vancomicina tanto com os derivados de *E. plicata* como os de *G. vellosii*. Os produtos de *P. pilosa* potencializaram a ação das drogas aztreonam, cefepime e piperacilina+tazobactam frente aos isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes. Os resultados comprovaram o potencial das plantas *E. plicata*, *G. vellosii* e *P. pilosa* no controle de infecções bacterianas envolvendo fenótipos multidrogas resistentes (MDR) e que a sua interação com drogas antibacterianas pode representar uma nova alternativa na terapia destas infecções.

Palavras-chave: Plantas medicinais, extratos vegetais, farmacorresistência bacteriana múltipla, sinergismo farmacológico, antagonismo de drogas.

ABSTRACT

SARAIVA, R.M.C. **ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MEDICINAL PLANTS USED AGAINST MULTI-RESISTANT BACTERIA AND THEIR INTERACTION WITH ANTIMICROBIAL AGENTS.** 94f. Thesis (Master). Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Institute of Health Sciences, Federal University of Pará, Belém-PA, 2012.

Infection control of the multidrug-resistant microorganisms sometimes is ineffective even with the development of new antibiotics. Many herbal extracts have antimicrobial effects and may represent an alternative therapy for infectious diseases, mainly when associated with antibiotics of clinical use. The aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of medicinal plants in multidrug-resistant microorganisms and their interaction with antimicrobial agents. We evaluate the antibacterial activity of plant extracts and fractions of *Eleutherine plicata* ("marupazinho") *Geissospermum vellosii* ("pau-pereira") and *Portulaca pilosa* ("amor-crescido") against isolates of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) and multi-resistant bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, from human clinical isolates. Also we evaluate interaction of these plant extracts with antimicrobial agents of clinical use. The antibacterial activity was determined by disk diffusion on Mueller Hinton agar and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by micro dilution plate technique using Muller Hinton broth as culture medium and 0.01% resazurin as a developer of bacterial growth. The extracts and fractions were tested at concentrations of 500, 250, 125, 62.5, 31.2 and 16.2 µg/mL dissolved in 10% DMSO. Plants *E. plicata* and *G. vellosii* demonstrated activity against ORSA isolates with MICs of 125 µg/mL, whereas *P. pilosa* had an effect on the isolates of *P. aeruginosa* with MIC of 250 µg/mL. There were 25% of synergism and only 5% of antagonism of all 120 plant and antimicrobial agents interaction tested. ORSA isolates had synergistic interaction with ciprofloxacin, clindamycin and vancomycin agents and with both plant derivatives of *E. plicata* and *G. vellosii*. The derivatives of *P. pilosa* potentiated the action of the aztreonam, cefepime and piperacillin + tazobactam agents compared to the isolates of *P. aeruginosa* multidrug-resistant. The results shows therapeutic potential of *E. plicata*, *G. vellosii* and *P. pilosa* in the control of bacterial infections involving multidrug-resistant phenotype (MDR) and its interaction with antibacterial agents may represent a new alternative in the therapy of these infections.

Keywords: medicinal plants, plant extract, drug multiple bacterial, pharmacological synergism, drug Antagonism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Bulbo de <i>Eleutherine plicata</i> (Marupazinho).....	20
Figura 2- Folhas de <i>Geissospermum vellosii</i> (Pau pereira).....	22
Figura 3- <i>Portulaca pilosa</i> (Amor-crescido).....	24
Figura 4- <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA, isolado em ágar manitol salgado.....	28
Figura 5- Evolução da resistência do <i>Staphylococcus aureus</i>	30
Figura 6- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolada em ágar Muller Hinton.....	30
Figura 7- Exsicata da <i>Eleutherine plicata</i>	43
Figura 8- Princípio do teste suscetibilidade pela metodologia do disco-difusão.	46
Figura 9- Controle de toxicidade do DMSO em ágar Muller Hinton sobre <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i>	56
Figura10- Determinação da concentração inibitória mínima da <i>Eleutherine plicata</i>	63
Figura11- Determinação da concentração inibitória mínima do <i>Geissospermum vellosii</i>	64
Figura12- Determinação da concentração inibitória mínima da <i>Portulaca pilosa</i>	64
Figura13- Demonstração da interação do Extrato Etanólico Bruto (EEB) e da Fração Diclorometano (FD) de <i>Eleutherine plicata</i> + Antibióticos frente ao isolado 2 de <i>S. aureus</i> oxacilina-resistente (ORSA).....	68
Figura 14- Demonstração da interação do Extrato Etanólico Bruto (EEB) e da Fração Diclorometano (FD) do <i>Geissospermum vellosii</i> + Antibióticos frente ao isolado 2 de <i>S. aureus</i> oxacilina-resistente (ORSA).....	69
Figura 15- Demonstração da interação da Fração Acetato de Etila (FAE) e da Fração Hidroalcoólica (FHA) da <i>Portulaca pilosa</i> + Antibióticos frente ao isolado 3 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente.....	69
Figura 16- Demonstração da interação da Fração Acetato de Etila (FAE) e da Fração Hidroalcoólica (FHA) da <i>Portulaca pilosa</i> + Antibióticos frente ao isolado 1 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Perfil de suscetibilidade em disco difusão de isolados selvagens de <i>Staphylococcus aureus</i> ORSA e da cepa ATCC 25923 de <i>Staphylococcus aureus</i> sensível.....	52
Tabela 2- Perfil de suscetibilidade em disco difusão de isolados selvagens de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistentes e da cepa ATCC de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sensível.....	53
Tabela 3- Avaliação da Atividade antibacteriana da <i>Eleutherine plicata</i> pelo método de disco difusão em ágar.....	58
Tabela 4- Avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto de <i>Geissospermum vellosii</i> pelo método de disco difusão em ágar.....	60
Tabela 5- Avaliação da atividade do extrato etanólico bruto de <i>Portulaca pilosa</i> pelo método de disco difusão em ágar.....	61
Tabela 6-Determinação da concentração inibitória mínima dos produtos vegetais frente às bactérias testadas.....	63
Tabela 7- Interação entre extratos de plantas e antibióticos sobre <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66
Tabela 8- Resultados da Interação do EEB e FD de <i>Eleutherine plicata</i> com antibióticos frente à <i>Staphylococcus aureus</i>	67
Tabela 9- Resultados da Interação do EEB e da FA de <i>G. vellosii</i> com antibióticos frente à <i>Staphylococcus aureus</i>	68
Tabela 10- Resultados da Interação da FAE e FHA de <i>Portulaca pilosa</i> com antibióticos frente à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Drogas antimicrobianas associadas aos extratos e frações de <i>E. plicata</i> e <i>G. vellosii</i> frente à <i>S. aureus</i>	50
Quadro 2 – Drogas antimicrobianas associadas às frações de <i>P. pilosa</i> frente à <i>P. aeruginosa</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATCC	<i>American Type Culture Colection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CDC	<i>Centers for Diasease Control for and Prevention –Antibiotics</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EE	Extrato Etanólico
EMB	Agar Eosina – Azul de Metileno
ESBL	Beta-lactamase de Amplo Espectro
FD	Fração Diclorometânica
FA	Fração Alcaloídica
FAE	Fração Acetato de Etila
FHA	Fração Hidroalcoólica
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
MBL	Metalobetalactamase
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan- americana de Saúde
PBP	Proteína Ligadora de Penicilina
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

UFPA	Universidade Federal do Pará
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Plantas medicinais.....	18
2.1.2 <i>Eleutherine plicata</i> – Marupazinho.....	20
2.1.3 <i>Geissospermum vellosii</i> – Pau-pereira.....	22
2.1.4 <i>Portulaca pilosa</i> L.....	23
2.2 Resistência bacteriana.....	25
2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	27
2.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
2.3 Interações de plantas medicinais com drogas antimicrobianas.....	32
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo geral.....	41
3.2 Objetivos específicos.....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 Material.....	42
4.1.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAL DE CONSUMO.....	42
4.1.2 MATERIAL VEGETAL.....	43
4.1.2.1 <i>Eleutherine plicata</i>	43
4.1.2.2 <i>Portulaca pilosa</i>	44
4.1.2.3 <i>Geissospermum vellosii</i>	44
4.1.3 PREPARO DO MATERIAL VEGETAL.....	44
4.1.4 LINHAGENS BACTERIANAS.....	45
4.2 Métodos.....	45
4.2.1 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DAS AMOSTRAS SELVAGENS.....	45
4.2.1.1 Padronização do inóculo.....	45
4.2.1.2 Teste de suscetibilidade pela metodologia de disco difusão em meio sólido.....	46
4.2.2 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS	

EXTRATOS VEGETAIS.....	47
4.2.2.1 Teste de toxicidade do DMSO.....	47
4.2.2.2 Verificação da contaminação dos extratos.....	47
4.2.2.3 Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais pelo método de disco difusão em meio sólido.....	47
4.2.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS EXTRATOS VEGETAIS.....	48
4.2.4 EFEITOS DA INTERAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS COM AS DROGAS ANTIMICROBIANAS.....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1 Avaliação do perfil de resistência das amostras selvagens.....	52
5.2 Teste de toxicidade do DMSO.....	54
5.3 Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais.....	56
5.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	61
5.5 Interferência dos extratos sobre o efeito das drogas antimicrobianas	66
6 CONCLUSÕES.....	73
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais no tratamento de doenças é uma estratégia antiga utilizada por praticamente todas as populações do mundo. Registros históricos datados desde 4.000 a.C. comprovam a utilização de plantas na busca pela cura de enfermidades nos povos egípcios e chineses, entre outros. Na Ásia, África e América Latina, existe uma dependência na medicina alternativa como uma solução para problemas de saúde da população. No Brasil é comum, tanto nas regiões mais pobres como também nas grandes cidades, o comércio de plantas medicinais em feiras livres, mercados populares e plantadas nos quintais de casas (DUARTE, 2006).

O Brasil possui a maior biodiversidade de plantas do mundo, contando com um número estimado acima de 20% do número total de espécies do planeta. Com mais de 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% do total mundial, esta rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação de uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado. Aproximadamente 48% dos medicamentos empregados na terapêutica advêm direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais (CARVALHO et al. 2007).

De acordo com projeções do Instituto Brasileiro de Plantas Medicinais (IBPM), o mercado de medicamentos fitoterápicos movimentará até 500 milhões de dólares por ano no Brasil e estima-se que no mundo, seria gasto cerca de US\$ 27 bilhões (em torno de 7% do mercado mundial de medicamentos) com plantas medicinais. O mercado farmacêutico tradicional cresce, mundialmente, de 3% a 4% ao ano, enquanto o de fitoterápicos sobe de 6% a 7% (BOTSARIS, 2010).

A OMS reconhece a importância do potencial terapêutico das plantas, mas faz advertências quanto ao uso e preparo inadequado, e recomenda cuidados se considerarmos a falta de conhecimento sobre os possíveis efeitos colaterais com uma administração conjunta a medicamentos prescritos (MOERMAN, 1991; FARNSWORTH, 1994; DE SMET, 1997; CALIXTO, 2000). De qualquer forma, o que ocorre na maioria das sociedades atuais é uma complementaridade entre a alopatia e o uso de plantas medicinais (LUSTOSA, 2012).

Em razão ao aumento da resistência bacteriana às múltiplas drogas antimicrobianas surgem à preocupação e a procura de novas alternativas

terapêuticas, com as plantas medicinais representando uma importante fonte para obtenção destes medicamentos. A atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais foi comprovada em vários estudos realizados em países que possuem uma flora diversificada (HOLETZ et al. 2002; NOVAIS et al. 2003; NOSTRO et al. 2004; AHMED et al., 2005; LIMA et al., 2006; PAREKH & CHANDA, 2007; ADWAN et al. 2008; PORFÍRIO et al. 2009; CANTON e ONOFRE., 2010; MULYANINGSIH et al. 2011; CHEN-LUNG et al. 2012). Na Amazônia Brasileira, com grande variedade de plantas medicinais, pesquisas evidenciando que estas podem ser fontes de substâncias antimicrobianas têm sido frequentemente relatadas nos últimos anos (BARBOSA et al. 2008; RIBEIRO et al. 2009; MENEZES et al. 2009; ARAÚJO. 2010; VINAGRE et al. 2011; CAMELO et al. 2011; MENDES et al. 2011; NASCIMENTO et al. 2012)

Segundo MICHELIN et al. (2005) os antibióticos vegetais possuem uma estrutura química que difere daquela dos antibióticos derivados de micro-organismos, podendo regular o metabolismo intermediário de patógenos, ativando ou bloqueando reações e síntese enzimática ou mesmo alterando a estrutura de membranas. Porém, desde o advento dos antibióticos, o uso de derivados de plantas como antimicrobianos tem sido virtualmente inexistente (COWAN, 1999).

Após descobrir a penicilina, Fleming foi também o primeiro a observar a resistência natural dos micro-organismos aos antibióticos, descrevendo que bactérias do grupo coli-tifoide não eram inibidas pela penicilina. A causa dessa resistência foi descoberta por Abraham e Chain que demonstraram em culturas de *Escherichia coli* uma enzima capaz de bloquear a ação da penicilina, denominada de penicilinase (BUSH, 1989).

A aquisição de resistência aos antimicrobianos trata-se de um fenômeno genético, relacionado com alteração de genes contidos nos micro-organismos, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem à ação das drogas, estes mecanismos de ação podem ser: interferência na síntese da parede celular; inibição da síntese de proteína; interferência na síntese de ácido nucléico; diminuição da permeabilidade ao agente antimicrobiano e destruição da estrutura da membrana celular (TENOVER, 2006).

A resistência bacteriana pode surgir por aquisição de mutações ou por aquisição de material genético de outras bactérias. Os genes que codificam proteínas envolvidas nos mecanismos de resistência podem estar localizados no

cromossomo ou em elementos extra cromossômicos, como os plasmídeos e os transposons, que se movimentam com facilidade de uma cepa para outra, de uma espécie para outra, ou mesmo de um gênero a outro (TAVARES, 2001; ROSSI e ANDREAZI, 2005).

Apesar da disponibilização de novos antibióticos, a resistência bacteriana ocorre em ritmo crescente nos diferentes patógenos Gram positivos e Gram negativos e representa um grande desafio terapêutico (ROSSI e ANDREAZI, 2005). Nas últimas décadas o enfoque dado para o controle das infecções por bactérias Gram negativas, pode ter contribuído para o surgimento de bactérias Gram positivas multirresistentes, principalmente *Staphylococcus* resistentes a meticilina, *Pneumococcus* resistente à penicilina e eritromicina, *Enterococcus* resistentes à vancomicina e também as Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* resistentes a β -lactâmicos e carbapenens (LOW e NADLER, 1997; SANTOS FILHO et al. 2002).

Considerando o aumento de bactérias multirresistentes devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, o reconhecimento da Organização Mundial de Saúde (OMS) quanto ao potencial terapêutico das plantas, e que o uso associado das plantas medicinais e/ou seus subprodutos com drogas antimicrobianas pode inibir ou intensificar o efeito terapêutico dos medicamentos convencionais, o presente trabalho pretende selecionar potenciais candidatos ao desenvolvimento de fitoterápicos antibacterianos, bem como avaliar possíveis interações com a atividade de drogas antimicrobianas utilizadas na rotina da clínica médica.

Para isso, foram selecionadas as plantas *Eleutherine plicata* (marupazinho), *Portulaca pilosa* (amor-crescido) e *Geissospermum vellosii* (pau pereira) por serem plantas utilizadas na medicina tradicional da Amazônia para tratamento de doenças infecciosas (SCHULTES e RAFFAUT, 1990; MORS, 2000; DI STASI e HURAMA-LIMA, 2002; PINTO, 2008; FENNER et al. 2006), e que estão em processo de estudo das atividades biológicas e de caracterização fitoquímica e farmacognóstica nos grupos de pesquisa do Programa de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará – PPGCF-UFPa

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” (OMS, 2002). A terapêutica caracterizada pela utilização de plantas medicinais em suas diferentes preparações farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal, caracteriza a fitoterapia (LUZ NETTO JR, 1998).

A utilização de plantas pelo homem objetivando a promoção e manutenção de sua saúde é comprovada historicamente por registros de longa data, como por exemplo, os egípcios, assírios, mesopotâmicos, indianos e chineses. As plantas serviam para afecções variadas, desde febres, distúrbios psicológicos e gastrointestinais, a infecções bacterianas, acne, gota, e até epilepsia, pelo emprego de formulações simples, como cataplasmas, chás, decoctos, pós, defumadouros, tinturas e outras formulações herbais (BALUNAS e KINGHORN, 2005; HALBERSTEIN, 2005).

O conhecimento acumulado durante séculos continua sendo valioso para as gerações atuais. A etnofarmacologia fornece pistas sobre substâncias potencialmente úteis no desenvolvimento de novos fármacos baseado em observações feitas em diversas áreas como química, bioquímica, botânica, farmacologia e antropologia (FABRICANT e FARNSWORTH, 2001).

Em todo o mundo, e em particular nos países da América do Sul, o uso de plantas medicinais contribui significativamente com os primeiros cuidados com a saúde (MACIEL et al. 2002). No Brasil devido à riqueza de sua flora e ao conhecimento popular transmitido através das gerações, as plantas medicinais são vendidas em feiras livres e mercados populares, muitas delas sendo usadas para curar várias enfermidades da população (DUARTE, 2006).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) os remédios extraídos de plantas são utilizados por 80% da população mundial, em especial nas

áreas rurais dos países em desenvolvimento ou em locais onde a população não tem acesso ou condições de adquirir medicamentos (TADEG, 2005). Nos países desenvolvidos, a chamada medicina complementar e alternativa tem sido utilizada com frequência, de forma concomitante à medicina convencional. Nos Estados Unidos, por exemplo, o crescimento da fitoterapia foi superior a 50% no período de 1997 a 2002 (RIBEIRO e MOURA, 2009).

A OMS lançou em 2002, um plano de estratégias para incentivar a utilização da medicina tradicional (ou alternativa) nos programas de Assistência à Saúde de seus países membros, sendo as metas principais: a criação de políticas públicas para o incentivo a programas de aplicação nos Sistemas Nacionais de Atenção à Saúde; fomento a segurança, eficácia e qualidade da prática da medicina tradicional; aumento do acesso a esta prática terapêutica e promoção do uso racional da medicina tradicional (OMS, 2002).

No Brasil, um número significativo de plantas é usado na forma de extratos brutos para tratar infecções comuns embora, poucas evidências científicas sejam relatadas comprovando a eficácia desse tratamento. Sob este aspecto, verifica-se que a fitoterapia vem crescendo no país, tornando-se um setor econômico importante devido a sua popularidade como alternativa nos cuidados com a saúde (LIMA et al. 2006).

A política para o uso de plantas medicinais no serviço público no Brasil foi estabelecida através da Portaria nº. 971 de 03 de maio de 2006 que aprovou, na forma do Anexo, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde – SUS (BRASIL, 2006a) e, através do Decreto nº. 5813 de 22 junho de 2006 que aprovou a Política de Plantas medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) no país (BRASIL, 2006b).

Reconhecendo o potencial terapêutico das plantas medicinais e visando o seu melhor aproveitamento para a população brasileira, o Ministério da Saúde através do Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos (DAF), órgão da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos (SCTIE), aprovou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de saúde (RENISUS), que lista 71 espécies vegetais que foram selecionadas por serem amplamente utilizadas pela população brasileira. A finalidade da relação é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da lista de plantas medicinal e fitoterápica a serem disponibilizados para uso da população, com

segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença. (BRASIL, 2009).

2.1.2. *Eleutherine plicata* – Marupazinho

Planta do gênero *Eleutherine*, pertencente à família Iridaceae, a *Eleutherine plicata* está amplamente distribuída no Brasil. Muitos autores consideram a *E. plicata* (Fig. 1) e *E. bulbosa* como sendo a mesma espécie, tendo características muito semelhantes. É uma planta herbácea bulbosa e rizomatosa, acaule, entouceirada, de 20 a 30 cm de altura, suas folhas são simples, inteiras, plissadas longitudinalmente e inflorescência em panículas de flores rosa. Os bulbos apresentam escamas semelhantes à cebola, de coloração vinho e exsudando látex branco quando cortados. Multiplicam-se facilmente pelos bulbos, tornando-se persistente em muitas áreas a ponto de ser considerada “planta daninha”. Nas regiões do Sul e Sudeste do Brasil, perde a parte aérea durante o inverno e na região Nordeste formam touceiras decumbentes (ALBUQUERQUE, 1989; VIEIRA, 1992; LORENZI e MATOS, 2002).



Figura 1 - Bulbo de *Eleutherine plicata* (marupazinho)
Fonte: BORGES, 2012

A planta é nativa da América tropical, incluindo os campos secos da Amazônia brasileira, conhecida popularmente como marupazinho, marupaú, marupari, palmeirinha, marupá-piranga, marupari (LORENZI e MATOS, 2002).

Esta planta é amplamente utilizada na medicina caseira de quase todo país, principalmente na região Amazônica, hábito iniciado pelas populações indígenas desta região. De acordo com o uso popular, os rizomas são empregados contra gastralgia, diarreia e vermes intestinais (SCHULTES, 1990; MORS, 2000), há relatos também de possuir ação dilatadora coronária, potencialmente útil no tratamento de doenças cardíacas (CHEN et al. 1984) e ação antifertilidade (WENIGER 1982; GRENAND, 1987).

Como medicação caseira, na Amazônia, é usada para o tratamento de diarreia e amebíase, fervendo-se 2 bulbos cortados em pequenos pedaços durante 15 minutos em 500 mL de água e ingerindo-se uma xícara antes das refeições (GRENAND, 1987).

PINTO, (2008) em levantamento etnofarmacêutico realizado na cidade de Igarapé-Miri-PA-Brasil, relatou a utilização dos bulbos de *E. plicata* em forma de chá pela população local no tratamento de diarreia, amebíase, infecção intestinal, doenças hepáticas, hemorragias e anemia. Ao extrato dessa planta foram comprovadas propriedades antibacterianas e antifúngicas (MENEZES et al., 2009; RIBEIRO, 2008; MALHEIROS, 2008; RIBEIRO et al. 2009) e antiparasitária com efeito contra *E. histolytica/dispar* (NASCIMENTO et al. 2012). É citada na sua composição química a presença de naftoquinona, antraquinonas do tipo crisofanol, além de uma saponina esteroideal (GRENAND, 1987; ALBUQUERQUE, 1989; VIEIRA, 1992).

RIBEIRO, (2008) relatou que no teste de prospecção fitoquímica de *E. plicata* foram detectados açúcares redutores, fenóis, taninos, esteroides, terpenóides, azulenos, carotenoides, depsídios, depsidonas e derivados de cumarina enquanto que MALHEIROS, (2008) isolou os compostos isoeleuterol e isoeleuterina da fração clorofórmica de bulbos da planta através de cromatografia de alta eficiência (CLAE). NASCIMENTO et al. (2012) relataram que o isoeleuterol e isoeleuterina seriam os responsáveis pela atividade antimicrobiana frente ao protozoário *E. histolytica/E. dispar* demonstrada pelo extrato bruto da planta.

A *E. plicata* faz parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais elaborada pelo Ministério da Saúde do Brasil como sendo de interesse ao Sistema Único de

Saúde (SUS) para estudos visando futuras aplicações em fitoterápicos (BRASIL, 2009).

2.1.3. *Geissospermum vellosii* – Pau-pereira

A família das Apocynaceae é considerada dicotiledônea caracterizada normalmente pela presença de látex, sendo constituída por cerca de 155 gêneros e 2000 espécies, com distribuição nas regiões Tropicais e Subtropicais (LORENZI,1998) A família Apocynaceae se caracteriza quimicamente de estruturas alcaloidicas (PEREIRA et al.2007) principalmente monoterpênicos (BOLZANI et al.,1987). Vários alcaloides indólicos já foram isolados desta família, em especial dos gêneros *Aspidosperma* e *Geissospermum*.

O *Geissospermum vellosii* (Fig. 2), árvore com altura em torno de 10-15m, com o tronco de 40-60 cm de diâmetro, que ocorre desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, em Minas gerais, Goiás e no Mato Grosso. É conhecida popularmente como guatambu, peroba ou Pau-pereira. Desta espécie foi isolado o alcaloide N-metiltetraidroelipiticina (BOLZANI et al.1987; LORENZI,1992).



Figura 2 - Folhas de *Geissospermum vellosii* (pau pereira)
Fonte: <http://www.arvores.brasil.nom.br/florin/pereira.htm>

Francisco Freire Allemão de Cysneiros (1797-1874), médico e botânico brasileiro, reuniu características diferenciais da planta e observando que estas eram distintas de todas apresentadas por gêneros existentes, criou em 1845, o gênero *Geissospermum*, levando em consideração a disposição genérica das sementes. Em homenagem ao primeiro botânico que a descreveu, Freire Allemão denominou a espécie de *Geissospermum vellosii* Allemão (Apocynaceae). Muitas espécies são chamadas popularmente de pau-pereira, como a *Aspidosperma parvifolium* A. DC. (Apocynaceae), o que leva a confusões, já que as constituições químicas destas espécies são diferentes. Esta aspidosperma é utilizada pelo povo para a cura das mesmas enfermidades e por isso é reconhecida pelo mesmo nome (JÁCOME et al. 2003, 2004).

Utilizada pelos indígenas contra impaludismo, inapetência, má digestão, tontura, prisão de ventre e como febrífugo e segundo levantamento etnobotânico realizado por FENNER et al. (2006) é usado popularmente no tratamento de sinais e sintomas relacionados a infecções fúngicas e como antisséptico. Além disso, sua madeira era utilizada para construção e fabricação de cabos de ferramentas agrícolas (PIO, 1984). O farmacêutico brasileiro, Ezequiel Corrêa dos Santos isolou o princípio ativo das cascas do pau-pereira, em 1838, e o descreveu como sendo um alcaloide, denominando-o pereirina.

Segundo ALMEIDA et al. (2007a) o *Geissospermum vellosii* possui várias classes de compostos metabolitos secundários em especial os alcaloides, e a casca apresenta os seguintes alcaloides: geissospermina, geissosquizina, geissoschizolina e flavopereirina.

Não foi encontrado qualquer relato sobre a pesquisa da atividade antimicrobiana da planta na literatura pesquisada.

2.1.4 *Portulaca pilosa* L – Amor-crescido

A família *Portulacaceae* inclui cerca de 30 gêneros e 500 espécies, que se distribuem principalmente no Oeste da América do Norte, América do Sul e África, com alguns poucos representantes na Europa e Ásia. Os gêneros mais representativos são: *Portulaca* L. com cerca de 100 espécies, *Calandrinia* Kunth com

cerca de 150 espécies e *Talinum* Adans com mais de 50 espécies (CAROLIN, 1993). Essa família tem distribuição cosmopolita, sendo ocorrentes no Brasil, aproximadamente, 30 espécies, pertencentes aos gêneros *Portulaca* e *Talinum* (SOUZA e LORENZI, 2005).

A *Portulaca pilosa* L (Fig. 3) é uma planta herbácea com folhas carnosas e flores vermelhas em cachos terminais, sendo comum nas Américas. Como uso popular, a infusão das folhas, em descanso noturno, é hepato-protetor, antidiarréico e diurético, ao passo que as folhas contusas, em emplastro, servem para queimaduras, erisipelas e ferimentos (MENDES et al. 2011). Estudos com o extrato hidroalcoólico de *P. pilosa* verificaram que essa espécie possui efeitos renais, aumentando a excreção de íons potássio, mas não apresenta ação diurética ou mudança na excreção de sódio como acreditado popularmente (ROCHA et al. 1994). A atividade de inibição de tirosinase de cogumelo *in vitro* pode tornar a espécie passível de ser utilizada no tratamento de melanomas, se essa atividade for confirmada em testes que utilizem melanócitos humanos (BAURIN et al. 2002). Segundo DI STASI e HURAMA-LIMA, (2002), a planta possui potencialidade de ser importante antibiótico de largo espectro.



Figura 3 - *Portulaca pilosa* :amor-crescido
Fonte: <http://www.plantasquecuram.com.br/Templates/>

Segundo MENDES et al. (2011) a prospecção fitoquímica do extrato etanólico da *P. pilosa* revelou a presença de açúcares redutores, fenóis e taninos, esteroides,

triterpenóides, glicosídeos cardíacos e carotenoides, e na verificação preliminar da atividade antimicrobiana, ocorreu atividade apenas contra *P. aeruginosa*.

OLIVEIRA et al. (2011) não encontraram atividade da planta frente ao *Mycobacterium tuberculosis*.

2.2 Resistência bacteriana

As doenças infecciosas afetam milhões de pessoas em todo o mundo e ao longo da história da humanidade, sempre representaram uma das principais causas de morte. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças infecciosas representam 26% da mortalidade global estimando-se que cerca de 50.000 pessoas morra a cada dia em todo o mundo por estas doenças (BECKER et. al. 2006; CHANDA e RAKHOLIYA, 2011). O problema tem se agravado devido o surgimento de micro-organismos multirresistentes, presentes em infecções hospitalares e comunitárias, diminuindo as opções de antibioticoterapia (LEVY, 2005; ANDRADE et al. 2006; REYNOLDS, 2009; ANURADHA et al. 2010).

Segundo o critério mais usado, bactérias ou germes multirresistentes são os micro-organismos que apresentam resistência à maioria dos antimicrobianos, para os quais esses germes são originalmente sensíveis (COUTO, 2003). O uso indiscriminado e irresponsável de antibióticos, terapêutica ou profilaticamente, humano ou veterinário, tem favorecido a pressão seletiva e predominância de espécies bacterianas cada vez mais resistentes (DEL FIOL et al. 2010).

A descoberta dos antibióticos foi uma parte essencial no combate a infecções bacterianas que sempre assolaram a humanidade. Entretanto, o desenvolvimento e a disseminação da resistência bacteriana aos antibióticos atualmente disponíveis é uma séria preocupação mundial.

Muitos programas internacionais de controle da resistência bacteriana foram lançados desde o fim da década de 1990, como exemplo: *Sentry Antimicrobial Surveillance Program*, em 1997; *Europeau Antimicrobial Resistance Surveillance Sytem* (EARSS), em 1998; *Centers for Diasease Control for and Prevention Antibiotics* (CDC), em 1998. No Brasil a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana em Serviços de Saúde (RM) foi criada pela Agencia

Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 2004, em parceria com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública do Ministério da Saúde (CGLAB - SVS). Todos estes programas visam à conscientização sobre o uso racional de antibióticos, além da pesquisa sobre o mecanismo de transferência da resistência bacteriana e novos métodos de detecção da mesma (BOUCHILON et al. 2004; TENOVER, 2006).

A eficácia de antibióticos para combater infecções microbianas foi muito promissora logo após a sua introdução. No entanto, em seu discurso de 1945 quando recebeu o Prêmio Nobel, Fleming advertiu que o uso indevido de antibióticos resultaria em resistência (FLEMING, 1945). Algumas décadas após esse discurso, o problema da resistência antimicrobiana tornou-se generalizado e uma questão relevante na medicina.

O primeiro caso de resistência antimicrobiana foi publicado em 1947 quando relatado o isolamento de *Staphylococcus pyogenes* (atualmente *Staphylococcus aureus*) resistentes à penicilina em 38 de 100 pacientes com infecções estafilocócicas na Inglaterra (BARBER, 1947).

Em 1957, o anel lactâmico ácido 6-aminopenicilânico foi purificado abrindo as pesquisas para a penicilina semissintética. A síntese da metecilina e ampicilina em 1960 e 1961 marcou a introdução da penicilina semissintética ocorrendo, em seguida, relatos sobre a redução na incidência de resistência como resultado da introdução dos novos antibióticos (WALDVOGEL, 1999; ROLINSON e GEDDES, 2007). No entanto, logo em seguida em 1961, cepas de *S. aureus* resistentes a metecilina e outras penicilinas semissintéticas foram isoladas (JEVONS, 1961). Em 1984, foi estimado que a sensibilidade de *S. aureus* à penicilina foi reduzida de 85% antes de 1946 a entre 20% e 30%.

Em 2003, foi relatada que a ocorrência de *S. aureus* metecilina resistente (MRSA) isolados de swab nasal de indivíduos saudáveis foi 91% na Coreia (JEONG et al. 2007) e 82,1% na Alemanha (FLUEGGE et al. 2006). A incidência elevada em indivíduos saudáveis foi relacionada com a utilização excessiva de antibióticos.

Um relatório do Canadá estima que a resistência de cepas de *S. aureus* MRSA foi de cerca de 92% para fluoroquinolonas e de 90% para claritromicina (ZHANEL et al. 2008).

JACOBS et al. (2008) relataram que a susceptibilidade de *Streptococcus pneumoniae* às penicilinas e clindamicina foi inferior a 49% em todos os isolados testados nos EUA em 2004.

A proporção de MRSA em todos os isolados de *S. aureus* na Inglaterra e País de Gales aumentaram de forma constante entre 1989 e 1997 (SMAC, 1998). No entanto, um relatório da Health Protection Agency (HPA) do Reino Unido indicou que o aumento atingiu o pico e estabilizou em 42% entre 2000 e 2002, depois que um declínio foi experimentado baixando a incidência para cerca de 38% em 2006 (LHPA, 2007). O declínio pode ser devido a uma maior consciência e política mais eficiente no uso de antibióticos e a programas rigorosos de controle de infecção no Reino Unido (PATEL e MANDAN, 2000).

Segundo NGOWKE et al. (2011), a epidemiologia da resistência aos antibióticos varia de região e de país. Enquanto alguns países estão registrando um declínio, outros estão experimentando um aumento da resistência bacteriana. No entanto, está evidente que o aumento ou a diminuição tem sempre uma ligação direta com o uso indiscriminado de antibióticos (TACCONELLI et al. 2009).

2.2.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcaceae, juntamente como os gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. Atualmente, o gênero *Staphylococcus* possui 33 espécies, sendo que 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. A principal espécie deste gênero é o *S. aureus*, que tem a forma esférica (são cocos), cerca de 1 µm de diâmetro, e formam grupos com aspecto de cachos de uvas. Importante patógeno envolvido na etiologia das infecções humanas, sendo encontrado, como microbiota normal, nas fossas nasais, virilha e axilas. É responsável por diferentes tipos de infecções, a maioria infecções ligeiras da pele e tecidos moles, mas também é agente etiológico de formas graves de pneumonia, endocardites e sepsis (MENEGOTTO e PICOLI, 2007).

A bactéria *S. aureus* apresenta uma grande variação no grau de sensibilidade a antimicrobianos de amplo espectro de ação, como, por exemplo, *Staphylococcus aureus* intermediário a vancomicina (VISA), *Staphylococcus aureus* resistente a

meticilina/oxacilina (MRSA/ORSA). Estudos têm documentado também um aumento de custos associados a infecções por MRSA em hospitais, onde decorrem de internação prolongada, necessidade de antimicrobianos mais caros e gastos indiretos com medidas de controle da infecção (ROSSI e ANDREAZZI, 2005).

O aumento da frequência de infecções hospitalares causadas por *S. aureus* (Fig. 4) resistentes à MRSA/ORSA foi paralelamente acompanhado da aquisição de resistência à maioria dos antimicrobianos com atividade antiestafilocócica disponíveis, como aminoglicosídeos, cloranfenicol, lincosamídeos, macrolídeos, quinolonas e tetraciclina. Por conseguinte, os glicopeptídeos, principalmente a vancomicina, tornaram-se uma das poucas alternativas terapêuticas eficazes no tratamento de infecções causadas por cepas *S. aureus* MRSA/ORSA (CHAMBERS, 1997; LOWY, 1998; OLIVEIRA et al. 2000).



Figura 4 - Cepa de *Staphylococcus aureus* MRSA isolado em Agar manitol salgado
<http://medchrome.com/wp-content/uploads/2010/05/s.aureus-agar.jpg>

Em 1946, nos Estados Unidos da América, cerca de 5 % de *Staphylococcus* isolados de pacientes era resistentes à penicilina. Em 1949 esta resistência podia ser notada em 29% dos germes isolados nos hospitais americanos; em 1950 atingia 50% e em 1959 era cerca de 80%. A resistência do estafilococo à penicilina G atinge quase 100% das amostras hospitalares na maioria dos países, inclusive no Brasil, verificando-se elevada resistência desta bactéria também nas amostras comunitárias (TAVARES, 2001; ROSSI e ANDREAZZI, 2005).

As infecções causadas por *S. aureus*, apresentam morbidade e mortalidade elevadas. O *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) é o patógeno nosocomial mais

envolvido em infecções hospitalares sendo responsável por inativar a ação de vários antibióticos (STRATTON, 2000). Geralmente também apresentam resistência a fluoquinolonas, lincosamidas e macrolídeos (HIRAMATSU, 1997). Dados do *National Nosocomial Infections Surveillance* (NNIS), do *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC), nos Estados Unidos da América (EUA), mostraram que, desde 1999, a proporção de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) ultrapassa 50% entre os pacientes em UTI. No Brasil, os índices de cepas MRSA são também bastante elevados (40% a 80%), principalmente em UTIs (ANVISA, 2010).

O *S. aureus* possui três mecanismos de resistência à meticilina: hiperprodução de beta-lactamases; presença de uma proteína ligadora de penicilina (PBP) alterada denominada PBP2a e modificações na capacidade de ligação das PBPs. Possuem cinco PBPs, enzimas que catalisam a etapa terminal da síntese da parede bacteriana e se localizam na membrana celular da bactéria. As PBP 1, 2 e 3 são essenciais e tem alta afinidade com antibióticos beta-lactâmicos. A resistência à meticilina é devida a produção da proteína alterada PBP2a, que apresenta baixa afinidade com os antibióticos beta-lactâmicos e que é codificada pelo gene cromossômico *MecA* (TOMASZ et al. 1989).

Em 1997, foram descritos *S. aureus* com resistência a vancomicina e teicoplanina, denominados como VRSA. Seu mecanismo de resistência está associado a uma ativação da síntese da parede celular, com a produção elevada de seus componentes (resíduos de mucopeptídeo) reduzindo a quantidade de antibiótico que chega a membrana plasmática (BOYLE-VAVRA et al. 2001). O primeiro caso de VRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina), cepas que apresentam CIM de $> \text{ou} = 32 \mu\text{g/mL}$, foi reportado nos EUA, Michigan, em um paciente de 40 anos, com diabetes e insuficiência renal crônica, e portador de VRE (*Enterococcus* resistente à vancomicina). A presença do gene *vanA*, nesse VRSA, sugere que a resistência pode ter sido adquirida com a troca do material genético do VRE, isolado da mesma amostra (ANVISA, 2010).

Em 2000, foram encontradas no Brasil, as primeiras cepas de *S. aureus* com resistência a vancomicina em um hospital de referência do município de Queimados, no Rio de Janeiro. Em 2002, foi encontrado nos EUA, o primeiro isolado clínico de cepas VRSA, com concentração inibitória mínima (CIM) = $8 \mu\text{g/mL}$. Outras cepas resistentes foram relatadas em Japão, França, Reino Unido e Alemanha (BADDOUR et al. 2006, TIWARI e SEN, 2006).

A figura 5 mostra a evolução da resistência do *S. aureus* de 1996 a 2002.

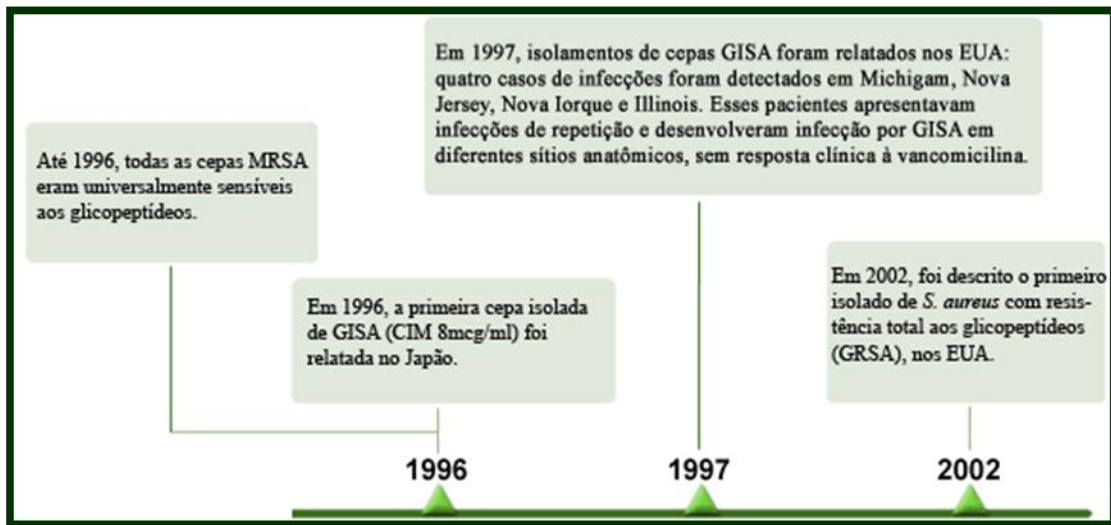


Figura 5 - Evolução da resistência do *S.aureus*
 Fonte: www.anvisa.gov.br

2.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

É um bacilo aeróbio Gram-negativo não fermentador de açúcar (Fig. 6), pertencente à família Pseudomonaceae. Patógeno oportunista presente em infecções hospitalares, urinárias e sepse, estando mais suscetíveis pacientes com queimaduras, possui alta mortalidade podendo chegar a 33% em pacientes imunodeprimidos (MARRA et al. 2006).



Figura 6 - Cepa de *Pseudomonas aeruginosa* isolado em Agar Muller Hinto
 Fonte: Copyright © 2007 Environmental Microbiology Laboratory, Inc

A epidemiologia de *P. aeruginosa* reflete sua predileção por um meio ambiente úmido, crescendo facilmente em solos, água, plantas e animais (BRITO et al. 2000; ANDRADE et al. 2002). A umidade é um fator crítico em reservatórios hospitalares de *P. aeruginosa*, como: equipamentos de ventilação mecânica, soluções de limpeza, desinfetantes, pias e panos de chão, sendo altamente resistentes à variação de temperatura. Em situações epidêmicas tem sido demonstrada contaminação a partir de fonte comum como respiradores, umidificadores, reservatórios de água, alimentos e medicações, assim como transmissão pessoa-pessoa, através das mãos, especialmente em unidades de terapia intensiva (UTI). Nas UTI neonatal, os pacientes infantis estão constantemente em riscos de infecção por *P. aeruginosa* pela sua imaturidade fisiológica e imunológica (ALEGRE, 2000; MARTINS et. al. 2004; MOORE e FLAWS, 2011).

Esse micro-organismo pode apresentar resistência natural ou adquirida a grande número de antibióticos utilizados na clínica médica; resistência natural à penicilina, ampicilina, cefalosporina de 1^a e 2^a gerações, sulfametoxazol-trimetropina, e adquirida a fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, ticarcilina e piperacilina, cefalosporina de 3^a e 4^a gerações e carbapenêmicos, através de vários mecanismos: baixa permeabilidade da membrana externa, sistema de efluxo, produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos, alteração do alvo das fluoroquinolonas e produção de β -lactamases (LI et al.1994; LEHMAN e THOMAS, 2007).

A baixa permeabilidade da membrana externa de *P. aeruginosa* ocorre quando os canais proteicos de difusão inespecíficos denominados de porinas encontram-se expressas em pequeno número ou ausentes, diminuindo a concentração do antimicrobiano no meio intracelular, potencializado pela ação das bombas de efluxo, que são canais constitutivos da membrana celular, sistemas estes que atuam de forma sinérgica (LIVERMORE, 2001; CHUANCHUEN, 2002).

A produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos está relacionada com enzimas que provocam modificações em diferentes sítios das moléculas do aminoglicosídeos, através da acetilação, fosforilação e/ou adenilação. Quase todas as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* expressam estas enzimas (MINGEOT-LECLERQ et al.1999; POOLE, 2005).

Durante a última década foram identificadas enzimas que promovem a hidrólise das cefalosporinas e dos carbapenêmicos, mas não o aztreonam; elas pertencem à classe B de Ambler e por destruírem os carbapenêmicos, são denominadas de carbapenases (GALES et al. 2003; FIGUEIREDO et al. 2009). Desde 2002, seguindo uma tendência mundial, isolados produtores de metalobetalactamase (MBL) começaram a ser descritos no Brasil, sendo responsáveis pelos elevados níveis de resistência aos carbapenêmicos. Com exceção do aztreonam, essas enzimas degradam todos os betalactâmicos, incluindo as associações com inibidores comerciais de betalactamases, como tazobactam, clavulanato e sulbactam (GALES et al. 2003; SADER et al. 2005).

Os antibióticos carbapenêmicos imipenem (IPM) e meropenem (MEM) são betalactâmicos de amplo espectro, derivados da tienamicina, com atividade bactericida no tratamento de infecções provocadas por isolados multirresistentes de *P. aeruginosa*. Possuem considerável estabilidade diante da maioria das betalactamases, incluindo as de amplo espectro (ESBL); por essa razão, os carbapenêmicos são considerados fármacos de reserva, frequentemente empregados como último recurso no tratamento de infecções hospitalares causadas por bactérias Gram-negativas resistentes aos demais betalactâmicos ou a outros antibacterianos (POIREL et al. 2000; RUPP e FEY, 2003).

2.3 Interação de plantas medicinais com drogas antimicrobianas

A resistência microbiana cada vez maior às drogas existentes é um problema sério de saúde e, portanto, há uma necessidade premente para procurar novas classes de substâncias antibacterianas, especialmente a partir de fontes naturais. Uma alternativa terapêutica para o tratamento de micro-organismos resistentes a antibióticos é a utilização de extratos vegetais. Há muitas vantagens no uso de compostos antimicrobianos de plantas medicinais, como menos efeitos colaterais, melhor tolerância do paciente, mais econômico, melhor aceitação devido à longa história de uso e ser renovável por estar disponível na natureza (GUR et al. 2006; PAREKH e CHANDA, 2007). Ao contrário das drogas sintéticas, os antimicrobianos de origem vegetal não estão associados a efeitos colaterais e tem um grande

potencial terapêutico para muitas doenças infecciosas (CHANDA et al. 2010; HABBAL et al. 2011). Inúmeros trabalhos comprovaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas (DUARTE, 2006).

No entanto, o problema da resistência à droga continua aumentando. Assim, a necessidade do momento é desenvolver agentes antimicrobianos úteis ou novas formas de tratar o micro-organismo resistente (SHARMA e KUMAR, 2006; NEGI e DAVE, 2010). Nesse caso, uma nova forma de terapia seria a utilização da combinação de terapia antimicrobiana sinérgica entre agentes antimicrobianos conhecidos e extratos de plantas bioativas. Segundo CHANDRA e RAKHOLIYA, (2011), a terapia da combinação entre extratos de plantas e antibióticos, pode expandir o espectro antimicrobiano, evitar o aparecimento de resistência mutante e minimizar a toxicidade.

Às vezes o uso de um único antibiótico não produz os efeitos inibitórios eficazes desejados, mas uma combinação de drogas, muitas vezes exerce um efeito sinérgico que ultrapassa o seu desempenho individual. O efeito sinérgico pode ser devido à formação do complexo certo que se torna mais eficaz na inibição de uma espécie particular de micro-organismo, quer por inibição da síntese da parede da célula ou provocando a sua lise ou morte (CHANDA e RAKHOLYA, 2011).

A combinação de produtos naturais economicamente mais viáveis, associados com antibióticos disponíveis, mostra-se como uma alternativa importante, uma vez que o efeito sinérgico entre ambos pode proporcionar uma maior atividade antibacteriana frente a micro-organismos sensíveis e resistentes. Assim sendo, o efeito potencializado dessas associações pode servir como nova estratégia para tratamento de infecções, possibilitando o uso de drogas antimicrobianas quando esta de forma isolada não apresentar-se eficaz sobre determinadas linhagens bacterianas (SALVAT et al. 2001; KUMAR et al. 2009).

Extratos de diversas plantas têm apresentado além de suas propriedades antibacterianas, a capacidade de interferir na atividade antibiótica e uma forte tendência na potencialização de antibióticos. Esta interação positiva já foi demonstrada em vários estudos, muitas vezes com resultados promissores.

A associação de extratos de várias plantas com ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina contra bactérias sensíveis (*S. aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Proteus* spp) e bactérias resistentes isoladas de ambiente hospitalar (*K. pneumoniae*, *Shigella* spp, *Proteus* spp, *P. aeruginosa*,

Enterobacter aerogenes, *E. coli* e *S. aureus*) mostrou que em alguns casos ocorreu sinergismo, possibilitando que antibióticos já ineficazes apresentassem ação sobre estas bactérias. Houve sinergismo na combinação dos extratos de *Syzygium aromaticum* (cravo), *Syzygium cumini* (jambolão), *Punica granatum* (romã) e *Thymus vulgaris* (tomilho) com os antibióticos sobre *P. aeruginosa* resistente. Para *K. pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes* somente a associação do extrato de *Thymus vulgaris* com ampicilina teve efeito sinérgico (NASCIMENTO et al., 2000).

O chá de *Camellia sinensis* (chá verde) combinado com beta-lactâmicos contra *S. aureus* MRSA demonstrou ter um efeito sinérgico potencializando a atividade dos antibióticos (ABASCAL e JARNELL, 2002).

BRAGA et al. (2005), avaliaram a interação entre extrato metanólico de *Punica granatum* (romã) e antibióticos contra 30 isolados clínicos de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA) e relataram atividade sinérgica, variando de 38% a 73%, com os 5 antibióticos testados (cloranfenicol, gentamicina, ampicilina, tetraciclina e oxacilina).

BETONI et al., (2006) usando a associação de 13 drogas antimicrobianas com 8 extratos de plantas (*Mikania glomerata* - guaco, *Psidium guajava* - goiabeira, *Syzygium aromaticum* - cravo, *Allium sativum* - alho, *Cymbopogon citratus* – erva-cidreira, *Zingiber officinale* – gengibre, *Baccharis trimera* – carqueja e *Mentha piperita* – hortelã-pimenta) frente à *S. aureus*, verificaram que as mais altas taxas de sinergismo ocorreram com os antibióticos de síntese de proteínas (cloranfenicol, tetraciclina, netilmicina, eritromicina e gentamicina), mas todos os outros antibióticos testados apresentaram algum tipo de sinergismo com os extratos estudados. De modo geral, os extratos de cravo, goiabeira e erva-cidreira revelaram as mais altas taxas de ação sinérgica com os antibióticos. Os sinergismos registrados para os extratos de plantas com fraca atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, tais como *Cymbopogon citratus* (erva-cidreira), é um dado importante, pois mostrou um perfil semelhante ao sinergismo do extrato de *Syzygium aromaticum* (cravo), que se apresentou como o mais eficiente inibidor de crescimento do *S. aureus* no estudo. Os autores alertaram que é importante investigar a capacidade sinérgica de extratos de plantas ou de outros produtos naturais, independentes da atividade antimicrobiana que eles têm.

O extrato bruto de *Salvia officinalis* (sálvia) reduziu as CIM de aminoglicosídeos (gentamicina, arbecacina e estreptomicina) contra *Enterococcus*

resistentes à vancomicina (VRE). Quando isolado a partir do extrato o possível composto antimicrobiano identificado como carnosol (um diterpenóide), este mostrou uma fraca ação antimicrobiana, mas reduziu bastante as CIM dos aminoglicosídeos, indicando que potencializou a atividade antimicrobiana frente ao VRE (HORIUCH et al. 2007).

Os extratos das plantas *Psidium guajava*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia fruticosa*, *Majorana syriaca*, *Ocimum basilicum*, *Syzygium aromaticum*, *Laurus nobilis* e *Rosa damascena* provocaram a redução das CIM de vários antibióticos frente a isolados de *S. aureus* resistentes MRSA e *S. aureus* sensíveis MSSA provenientes de processos clínicos humanos, mas a redução foi maior frente aos isolados resistentes (ADWAN e MHANNA, 2008).

ODUNBAKU et al.(2008) relataram atividade sinérgica entre antibióticos tradicionais e extrato etanólico de folhas de *Ficus exasperata* (figueira) contra *Escherichia coli* e *S. aureus*. Neste estudo, foram selecionados antibióticos de diferentes alvos em bactérias (síntese de proteínas, ácidos nucleicos e síntese da parede celular). O estudo revelou que a interação do extrato bruto da planta com os inibidores de síntese de proteínas (gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol e eritromicina) teve a maior atividade inibidora.

O extrato da planta *Hyptis martiuscii* revelou atividade antimicrobiana frente a *E. coli* e a sua interação com os aminoglicosídeos amicacina, gentamicina, kanamicina, neomicina e tobramicina provocou sinergismo, ocorrendo uma relevante redução nas CIM desses antibióticos frente à bactéria (COUTINHO et al. 2009a).

A associação do extrato etanólico de *Turnera ulmifolia* Benth com os aminoglicosídeos gentamicina e kanamicina provocou efeito sinérgico sobre *S. aureus* MRSA, entretanto, nenhum efeito foi observado sobre *S. aureus* MSSA (COUTINHO et al. 2009b).

ADWAN et al. (2009) avaliaram a possível interação *in vitro* entre extratos alcoólicos de folhas *Rhus coriaria* (sumagre), *Psidium guajava* (goiabeira), *Lawsonia inermis* (folhas) e sementes de *Sarcopoterium spinosum* (arbusto) e os antimicrobianos oxitetraciclina e gentamicina (inibidores de síntese de proteínas), enrofloxacin (fluorquinolona de uso veterinário que age por inibição de síntese de ácidos nucleicos) e sulfadimetoxina (sulfonamida que age por inibição competitiva) contra isolados clínicos de *S. aureus* MRSA. Os inibidores da síntese de proteínas (oxitetraciclina e gentamicina) e o inibidor competitivo (sulfadimetoxina) mostraram

alta taxa de sinergismo quando combinados com os extratos das plantas, enquanto que a interação com o inibidor da síntese de ácido nucleico (enrofloxacin) não mostrou este efeito tendo diminuído o diâmetro do halo de inibição caracterizando antagonismo.

AIYEGORO et al. (2009a), avaliando as interações entre extratos de *Helichrysum longifolium* em combinação com seis antibióticos: penicilina G, amoxicilina, cloranfenicol, oxitetraciclina, eritromicina e ciprofloxacina frente a várias bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, encontraram pelo método da curva de sobrevivência, uma resposta sinérgica de cerca de 61,7% dentre todas as interações testadas, em 26,67% a interação foi indiferente e em apenas 11,66% revelaram ação antagônica. Sinergismo foi detectado para combinações envolvendo todos os antibióticos. A mais alta taxa de sinergismo foi detectada na combinação de penicilina G com o extrato metanólico da planta contra uma cepa de *Salmonella* spp ambiental. Uma vez que o sinergismo não foi específico para qualquer classe de antibióticos, os autores sugeriram ser provável que o alvo para esta interação foi genética, portanto não é necessário estabelecer a base molecular desta interação.

CHATTERJEE et al. (2009), avaliaram a interação do extrato etanólico da folha *Vangueria spinosa* Roxb. (*Rubiaceae*) com os antibióticos doxiciclina e ofloxacina pelo método do índice de concentração inibitória fracionada (FICI) e através da curva de sobrevivência, contra uma bactéria Gram-positiva (*S. aureus*) e três bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*). Ocorreram ações sinérgicas com os dois antibióticos, frente a todas as bactérias exceto contra *P. aeruginosa* para a qual se observou sinergismo somente com a combinação ofloxacina e extrato de planta.

A atividade sinérgica de oxitetraciclina com extrato metanólico de *Thespesia populnea* foi demonstrada contra 12 diferentes bactérias Gram positiva e Gram-negativa, com uma maior atividade sinérgica observada contra *Shigella boydii* (KUMAR et al. 2009).

O composto 20-hidroxiecdisona isolado da raiz da planta *Achyranthes japonica* Nakai apresentou fraca atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* MRSA, mas quando associado aos antibióticos ampicilina e gentamicina, houve efeito sinérgico com uma significativa redução das CIM dos antibióticos frente à bactéria (KIM et al. 2009).

No estudo da associação do extrato etanólico das folhas de *Ocimum*

gratissima com antibióticos, NWEZE e EZE, (2009) relataram que enquanto houve sinergismo com a ampicilina frente a *E. coli* e *Proteus mirabilis*, este efeito sinérgico com septrin foi notado somente contra *E. coli*. A atividade sinérgica do extrato também foi demonstrada quando associado aos antifúngicos cetoconazol e nistatina frente ao fungo leveduriforme *Candida albicans*.

O extrato metanólico bruto das folhas de *Helichrysum pedunculatum* mostrou apreciável atividade antimicrobiana contra isolados de bactérias implicadas em infecções de feridas, com zonas de inibição que variaram entre 18 e 27 mm e CIM variando entre 0,1 e 5,0 mg/mL. O efeito da combinação do extrato com oito antibióticos de primeira linha frente às bactérias testadas mostrou que quando foi usada a CIM do extrato ocorreram 55,68% de sinergismo e 44,32% foram indiferentes e utilizando a CIM $\frac{1}{2}$ houve sinergismo em 55,81% das interações e 43,19% indiferentes. No total, 60% das interações foram sinérgicas. Não foi verificado antagonismo em nenhuma das interações testadas (AYEGORO et al. 2009b).

O extrato etanólico bruto das folhas de *Varethemia iphinoides* quando associado ao cefotaxime, um antibiótico do grupo das cefalosporinas de 3ª. geração provocou sinergismo frente a *S. aureus* e *B. subtilis* e antagonismo frente a *E. coli* e *S. epidermidis* (ABU-HIJLEH et al. 2009).

O estudo da interação do extrato de *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo) com 30 antibióticos de diferentes classes contra *S. aureus* e *E. coli* pelo método de disco difusão revelou que ocorreu sinergismo com as quinolonas ciprofloxacina e norfloxacina, com os inibidores de síntese de parede celular ceftazidima e aztreonam e com o inibidor de síntese de proteínas gentamicina tanto para *S. aureus* como para *E. coli*. A fração apolar foi mais efetiva quanto ao número de sinergismo provocado. Frente à bactéria Gram positiva *S. aureus* ocorreu maior número de ação sinérgica do extrato com os antibióticos do que frente a Gram-negativa *E. coli* (CANTON e ONOFRE, 2010).

AHMED et al. (2010) investigaram o efeito inibitório de dois antibióticos, penicilina e tetraciclina contra *Staphylococcus aureus* individualmente e em combinação com extrato etanólico das folhas e do caule de *Salvadora persica*. O maior efeito sinérgico foi observado quando o *S. aureus* foi exposto à combinação de tetraciclina com extrato do caule da planta com o halo de inibição do antibiótico aumentando de 23 mm para 31,5 mm na técnica de disco difusão. Quando foi

associado com extrato das folhas, a tetraciclina teve o halo aumentado de 18 para 21 mm. A associação do extrato do caule e da folha da planta com penicilina não produziu o mesmo efeito inibitório.

As interações entre extratos etanólicos de *Rhus coriaria* (semente), *Sacropoterium espinhosa* (semente) e *Rosa Damascena* (flor) em combinação com os antibióticos oxitetraciclina, penicilina G, cefalexina, sulfadimetoxina e enrofloxacin mostraram efeitos sinérgicos com redução significativa das CIM dos antibióticos frente a isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes às drogas. A interação mais relevante foi com a combinação de *R. coriaria* e os antibióticos testados, quando se observou uma significativa diminuição na CIM e uma alta atividade bactericida sobre todas as cepas testadas (ADWAN et al. 2010).

Utilizando a metodologia de disco-difusão, SILVA, (2010) observou que para *S. aureus* houve sinergismo entre o extrato de *Matricaria chamomilla* L com duas drogas (tetraciclina e rifampicina). Para *Escherichia coli*, o extrato de *Vernonia polyanthes* (assa peixe) mostrou sinergismo com duas drogas (gentamicina e cefepime) e o extrato de *Eugenia uniflora* L. (pitanga) para uma droga (cefepime); o extrato de *Matricaria chamomilla* L (camomila) apresentou antagonismo com 4 drogas (cefalotina, gentamicina, cefepime e cloranfenicol) e o extrato de *Bacharis dracunculifolia* D.C. (alecrim do campo) com uma droga (cloranfenicol). Nos casos de sinergismo foram possíveis inibições de crescimento bacteriano superiores as drogas testadas isoladamente, enquanto que o antagonismo foi verificado apenas para linhagens de *E.coli*.

A associação *in vitro* de eritromicina com o extrato de folhas de *Euphorbia hirta* contra isolados clínicos de *S. aureus* mostrou efeito sinérgico relevante (ADIKWU et al. 2010).

OLIVEIRA et al. (2011) pesquisaram a atividade sinérgica de norfloxacin, tetraciclina e eritromicina com extrato etanólico de casca de *Mangifera indica* L. contra isolados de *S. aureus*. O extrato individual não apresentou significativa atividade antibacteriana (CIM $\geq$ 2048 $\mu\text{g/mL}$), mas com a interação com antibióticos houve redução de quatro vezes nos valores de CIM para tetraciclina e eritromicina (CIM = 512 $\mu\text{g/mL}$), indicando que o extrato pode servir como uma fonte de adjuvante potencial de antibióticos.

Efeitos sinérgicos foram observados com a interação de *Dichrostachys glomerata* com cloranfenicol, tetraciclina e norfloxacin em 75% das bactérias com

fenótipos de MDR (multi-drogas resistentes) testadas (*E. coli*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*). Com extrato de *Beilschmiedia cinnamomea* sinergismos foram observados em 62,5% das bactérias MDR quando associado à cloranfenicol, cefepime, norfloxacin e ciprofloxacina e em 75% com eritromicina (FANKAM et al. 2011).

HUSSIN e EL-SAYED (2011) demonstraram interação sinérgica na combinação dos extratos de *Punica granatum*, *Thymus vulgaris* e *Commiphora molmol* com tetraciclina contra tanto bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *Bacillus megaterium*), como bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*).

Efeitos sinérgicos foram relatados por ELBASHIT et al. (2011) pela interação dos extratos aquoso, metanólico, clorofórmio, hexânico e alcoólico de *Cakile maritima*, *Mesembryanthemum crystallinum*, *Atriplex halimus*, *Withania somnifera* e *Marrubium vulgare* com vários antibióticos frente a *E. coli* e *S. aureus* resistentes. Os mais altos efeitos sinérgicos foram verificados quando utilizados extratos etanólicos das plantas e a interação mais eficiente foi com tetraciclina e minociclina.

SOUSA et al. (2011), relataram a atividade antibacteriana e a interferência de *Lantana camara* L. e *Lantana montevidensis* Briq. na atividade de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos. Os extratos das folhas e raízes das plantas foram avaliados com relação à atividade antibacteriana isoladamente e em associação com antibióticos aminoglicosídeos, pelo teste de microdiluição. Os extratos apresentaram atividade inibitória para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas analisadas. A atividade mais efetiva foi demonstrada pelo extrato das folhas de *L. montevidensis* frente a *P. aeruginosa* (CIM 8 µg/mL) e *E. coli* (CIM 16 µg/mL). Efeitos sinérgicos foram verificados na interação dos extratos com os aminoglicosídeos, com redução das CIM. O efeito sinérgico mais representativo foi observado pelo extrato de raízes de *L. montevidensis* na associação com a amicacina frente a *P. vulgaris*, com redução da CIM de 625 para 20 µg/mL.

A investigação da interação do extrato de *Afezelia africana* com vários antibióticos (tetraciclina, penicilina, eritromicina, amoxicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, oxitetraciclina e ampicilina) contra bactérias Gram positivas (*E. faecalis*, *S. aureus*, *B. pumilis*, *Micrococcus kristinae*, *M. luteus*, *B. subtilis* e *S. epidermidis*) e Gram negativas (*K. pneumoniae* e *P. vulgaris*) mostrou que em geral, houve resposta sinérgica em cerca de 63,79% para todas as combinações frente a

todos os organismos testados. Não foi detectado antagonismo entre os 176 testes efetuados (AIYEGORO et al. 2011).

O sinergismo entre o extrato de *Melissa officinalis* com cinco antibióticos comumente utilizados (estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina, amoxicilina e rifampicina) foi investigado pelo método de disco difusão frente á bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *S. aureus*) e Gram-negativas (*Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *P. mirabilis*). O melhor efeito sinérgico foi verificado na interação do extrato com o cloranfenicol, a tetraciclina e a amoxicilina para todas as bactérias testadas (STEFANOVIC e COMIC, 2012).

FERNANDES et al.(2012), observaram efeito sinérgico na interação do extrato de *Psidium guineense* com amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, azitromicina, cefoxitina, ciprofloxacina, gentamicina, penicilina e meropenem frente às cepas de *S. aureus* MRSA. A combinação do extrato com os agentes antimicrobianos resultou em uma redução de oito vezes da CIM dos antibióticos, sugerindo uma alta interação sinérgica. As menores taxas de sinergismos foram encontradas na associação do extrato com a cefoxitina.

O extrato acetato de etila de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth demonstrou atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A interação do extrato com a polimixina provocou sinergismo contra *P. aeruginosa*, aumentando o halo de inibição do antibiótico no teste de sensibilidade por disco difusão. Não houve interferência do extrato na ação da vancomicina sobre *S. aureus* (CALLOU et al. 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Verificar a ação antibacteriana *in vitro* dos extratos das plantas *Eleutherine plicata*, *Geissospermum vellosii* e *Portulaca pilosa* sobre cepas bacterianas ATCC e isolados selvagens multirresistentes de *S. aureus* e *P. aeruginosa* isoladas de casos clínicos humanos e a sua interação com antibióticos.

3.3 Objetivos específicos

- Determinar o perfil de suscetibilidade dos isolados selvagens de *S. aureus* e *P. aeruginosa*.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de *Eleutherine plicata*, *Geissospermum vellosii* e *Portulaca pilosa* frente às cepas ATCC e isolados multirresistentes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*.
- Avaliar a toxicidade do DMSO frente às cepas ATCC de *S. aureus* e *P. aeruginosa*.
- Determinar a concentração inibitória mínima dos extratos de *Eleutherine plicata*, *Geissospermum vellosii* e *Portulaca pilosa*.
- Avaliar a interação dos extratos de *Eleutherine plicata*, *Geissospermum vellosii* e *Portulaca pilosa* com drogas antibacterianas utilizadas na clínica médica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAL DE CONSUMO

Estufa bacteriológica marca FANEM

Autoclave marca PHOENIX

Câmara de fluxo laminar marca VECO

Balança analítica marca GEHARA modelo AG 200

Turbidímetro marca DESIMAT

Placas de petri descartável 90x15 mm - INLAB

Pipetas automáticas de 10, 50, 100 e 500 µL - INLAB

Swab esterilizado - INLAB

Balão de fundo chato de 500 mL -

Discos para antibióticos brancos esterilizados LABORCLIN ref: 901945

Ponteiras descartáveis de 10-200 µL - BIOSYSTEMS

Agar Muller Hinton marca HIMEDIA

Agar manitol salgado marca HIMEDIA

Agar eosina- azul de metileno marca HIMEDIA

Agar nutriente marca HIMEDIA

Caldo Muller Hinton marca HIMEDIA

Antibiótico marca LABORCLIN e NEWPROV (Aztreonam 30µg, Cefoxitina 30µg, Cefepime 30µg, Clindamicina 2µg, Ceftazidima 30µg, Ciprofloxacina 5µ, Eritromicina 15µg, Imipenem 10µg, Oxacilina 10µg, Piperacilina/Tazobactam 100/10µg, Vancomicina 30µg).

Dimetil-sulfóxido – DMSO - DIFCO

Densitometro Densichek plus marca BIOMÉRIEUX

Microplaca para ELISA 96 poços, fundo em U, esterilizada, BIOSYSTEMS

Resazurina sódica INLAB ref: 6620

4.1.2 MATERIAL VEGETAL

Os extratos vegetais das plantas marupazinho (*Eleutherine plicata*), pau-pereira (*Geissospermum vellosii*) e amor-crescido (*Portulaca pilosa*) foram obtidos no Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFPA cedidos pelos farmacêuticos Edinilza da Silva Borges, Dayse Lucia do Nascimento Brandão e Fabrício Alexopulos.

4.1.2.1 *Eleutherine plicata*

Os bulbos da espécie *E. plicata* (marupazinho), foram coletados na localidade de Vila Fátima, município de Traquateua - PA., Brasil, BR 318, Lat. 1.1436°, Long. 46.95511°, Alt. 88 pés (Fonte: GPS) em setembro de 2010. A sua exsicata (Fig. 7) foi herborizada e depositada no Herbário João Murça Pires do Museu Paraense Emílio Goeldi sob o registro MG. 202631(MG Belém-PA)



Figura 7 - Exsicata *E. plicata* nº MG. 202631
Fonte: (BORGES, 2012).

4.1.2.2 *Portulaca pilosa*

As amostras frescas das partes aéreas do vegetal foram coletadas no mês de fevereiro de 2011, na comunidade de Santa Helena, região do baixo Acará, estado do Pará, às proximidades de Belém. A área da coleta caracteriza-se por ser de terra firme, de vegetação típica amazônica. Posteriormente, uma fração da planta foi destinada à identificação botânica, a qual foi realizada no Museu Paraense Emílio Goeldi pela Dra. Márlia Coelho.

4.1.2.3 *Geissospermum vellosii*

As cascas do tronco de *Geissospermum vellosii* foram coletadas, em julho de 2010, no Ramal do Madeireiro, na Rodovia PA-150, Município de Moju, Estado do Pará. A identificação do material vegetal foi realizada no Museu Paraense Emílio Goeldi pela Dra. Márlia Coelho.

4.1.3. PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

A *Eleutherine plicata* estava armazenada sob a forma de extrato etanólico bruto (EEB) e fração diclorometano (FD), o *Geissospermum vellosii* sob a forma de extrato etanólico bruto (EEB) e fração alcaloídica (FA) e a *Portulaca pilosa* na forma de extrato etanólico bruto (EEB), fração acetato de etila (FAE) e fração hidroalcoólica (FHA). Todos estavam acondicionados em recipientes de vidro vedados com tampa e mantidos sob-refrigeração. Estes materiais foram obtidos através de metodologias utilizadas pelo Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará (BARBOSA et al. 2004).

4.1.4 LINHAGENS BACTERIANAS

Para as avaliações antimicrobianas foram selecionadas uma bactéria Gram-positiva (*S. aureus*) e uma Gram-negativa (*P. aeruginosa*). Foram utilizadas cepas bacterianas da *American Type Culture Collection* (ATCC): *S. aureus* ATCC 25923 sensível a oxacilina e aos demais agentes anti-*Staphylococcus* testados e *P. aeruginosa* ATCC 27853 sensível aos agentes anti-*Pseudomonas*. Foram utilizados também isolados de *S. aureus* oxacilina resistente-ORSA (02), *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos produtora de metalo-beta-lactamase (01) e *P. aeruginosa* multirresistente (2) isoladas de processos clínicos humanos no Laboratório de Saúde Pública do Pará (LACEN-PA). As cepas e isolados foram mantidos em freezer a 20°C em caldo BHI com 15% de glicerol até a sua utilização. Para uso nos testes, as bactérias foram inicialmente semeadas em meio EMB (ágar eosina – azul de metileno) para *P. aeruginosa* e ágar manitol salgado para *S. aureus* e incubadas a 35°C por 24 horas. Após os crescimentos, foram repicadas para tubos de ágar nutriente e estocadas a temperatura ambiente.

4.2 Métodos

4.2.1 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DAS AMOSTRAS SELVAGENS

4.2.1.1 Padronização do inóculo

A padronização do inóculo foi feita pelo método de suspensão direta das colônias CLSI, (2009a), que consiste em fazer uma suspensão direta em solução salina, de colônias isoladas selecionadas de uma placa de ágar Muller Hinton após 18-24 horas de incubação a 35° C. A suspensão foi ajustada para que sua turbidez

coincidissem com a da solução padrão de McFarland 0,5, aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC/mL, usando o Densichek plus (Densitômetro).

4.2.1.2 Teste de suscetibilidade pela metodologia de disco difusão em meio sólido

Foi utilizado o teste descrito por BAUER et al. (1966) e CLSI, (2009a), um método simples e confiável. O teste consistiu em aplicar com *swab* esterilizado um inoculo bacteriano com aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC/mL (como preparado no item 4.2.1.1) em toda a superfície de uma placa de Petri de 90 mm contendo ágar Muller Hinton. Após um período de até 15 minutos foram colocados os discos antimicrobianos sobre a placa semeada. As placas foram incubadas por 18 a 24 horas em estufa bacteriológica com temperatura de 36°C . Após a incubação, os diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor de cada disco foram mensurados em milímetros, que são relacionados à sensibilidade da amostra bacteriana. Os halos foram interpretados nas categorias sensível, intermediário ou resistente de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009a).

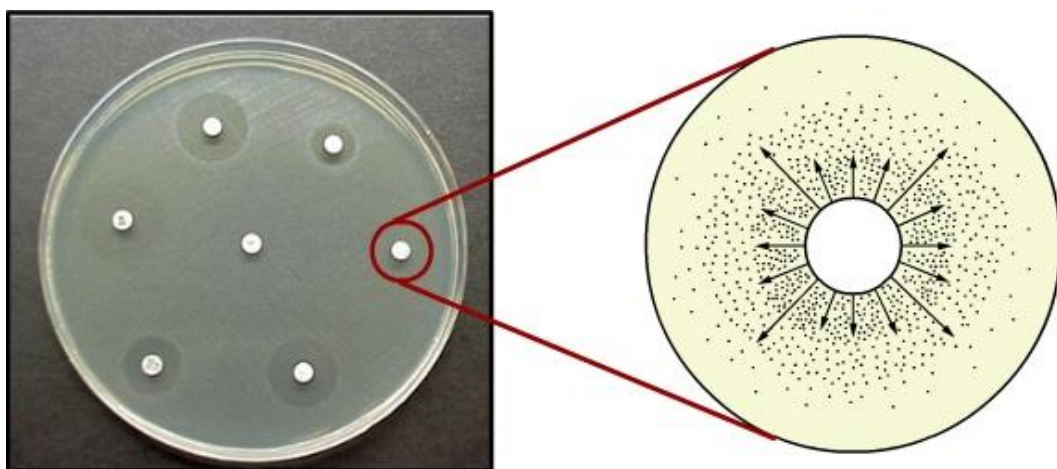


Figura 8: Princípio do teste de suscetibilidade pela metodologia de Disco difusão

Fonte: http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2

4.2.2. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS VEGETAIS

4.2.2.1. Teste de toxicidade do DMSO

Com a finalidade de verificar qual a melhor concentração de DMSO para uso nos testes microbiológicos, os extratos etanólicos de *E. plicata*, *G. vellosii* e *P. pilosa* foram diluídos em DMSO nas proporções de 20, 10, 5 e 2,5 %, retirados 100 µl de cada alíquota e adicionados em 100µl de caldo Muller Hinton em poços de placas de microdiluição. Em seguida foram adicionados 100 µl da suspensão das bactérias *S. aureus* ATCC 25923 e *P. aeruginosa* 27853 em caldo Muller Hinton diluída até 1×10^6 UFC/ mL (correspondente à escala 0,5 de Mac Farland). As placas foram incubadas a 36 °C durante 24 h. Após a incubação, 10 µL de cada poço inoculado, foram semeados em placas de ágar Muller Hinton para verificar a presença ou ausência de colônias.

4.2.2.2. Verificação da contaminação dos extratos

Os extratos foram avaliados quanto à contaminação bacteriana ou fúngica previamente aos testes antimicrobianos, através de semeadura em meio ágar triptona de soja (TSA - *trypticase soy agar*) com incubação em estufa bacteriológica por 24 horas a 35°C para bactérias e em meio ágar Sabouraud com incubação à temperatura ambiente por 5 dias para fungos. Após a incubação observou-se o aparecimento ou não de colônias nos meios.

4.2.2.3. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais pelo método de disco difusão em meio sólido

Nesta etapa foram testados apenas os extratos etanólicos brutos das plantas como triagem às etapas seguintes. Para avaliação da atividade antimicrobiana foi empregado o método de disco difusão em ágar segundo BAUER et al. (1966) e CLSI, (2009a) com adaptações de BERTINI et al. (2005), LIMA et al. (2006) e SANTOS et al. (2007). Cada suspensão de micro-organismo foi semeada (em duplicata), com auxílio de um *swab* descartável, em toda a superfície de meio ágar Muller Hinton. Em seguida foram adicionados discos para antibióticos brancos esterilizados (INTERLAB), de 6 mm de diâmetro, impregnados com 10 µL de cada extrato das plantas testadas em uma concentração de 500 µg/mL e 250 µg/mL dissolvidos em DMSO a 10%. Após incubação das placas a 36°C por 24 h foi realizada a leitura dos resultados medindo-se o halo formado ao redor dos discos contendo os extratos. Foi considerado como resultado final de cada extrato a média das 2 medidas e como suscetível halo igual ou acima de 8 mm de diâmetro considerando também o diâmetro do disco (DANTAS et al. 2010).

4.2.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS EXTRATOS VEGETAIS

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida pela menor concentração da substância antimicrobiana capaz de inibir a multiplicação de um isolado bacteriano. O método utilizado foi o de microdiluição em placas, de acordo com ELOFF, (1998) com adaptações de FANKAM et al. (2011) e SOUSA et al. (2011).

O inóculo consistiu na preparação de uma suspensão bacteriana em solução salina, com turvação correspondente a 0,5 da Escala McFarland (1×10^8 UFC/mL) (como preparado no item 4.2.1.2). Em seguida essa suspensão foi diluída até 1×10^6 UFC/ mL em caldo Muller Hinton e volumes de 100 µL foram então adicionados em microplaca esterilizadas contendo 96 poços, acrescido de 100 µL de diferentes concentrações dos extratos dissolvidos em DMSO a 10% e caldo Muller Hinton. O volume final em cada poço foi de 200 µL e a concentração final em cada poço foi de 500, 250, 125, 62,5, 31,2 e 16,2 para os extratos (LÔBO et al. 2010; FANKAM et al. 2011; SOUSA et al. 2011). Os testes foram efetuados em duplicata.

As placas foram incubadas a 36° C por 18-24 h. Para revelação dos resultados, foi preparada uma solução indicadora de resazurina sódica em água destilada na concentração de 0,01%. Após a incubação, 15 µL da solução indicadora foram adicionados em cada cavidade e as placas incubadas por 3 horas em temperatura ambiente. A leitura dos resultados para determinação da CIM foi considerada como positiva para os poços que apresentaram coloração azul indicando ausência de crescimento visível e negativa os de coloração vermelha significando a presença de células viáveis (ALVES et al. 2008; SOUSA et al. 2011; BITU et al. 2012; PROBST, 2012).

4.2.4 EFEITOS DA INTERAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS COM AS DROGAS ANTIMICROBIANAS

A interferência dos extratos vegetais sobre o efeito das drogas antimicrobianas selecionadas foi determinada através da técnica de difusão em meio sólido utilizando discos de papel de filtro (BETONI et al. 2006; CANTON e ONOFRE, 2010; ELBASHITI et al. 2011 e CALLOU et al. 2012).

Foram selecionadas as drogas antimicrobianas comumente empregadas no tratamento de infecções provocadas por *S. aureus* e *P. aeruginosa* e com base nas recomendações do CLSI, (2009b) para a realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana.

Para *S. aureus*: Eritromicina, Clindamicina, Cefoxitina, Oxacilina, Vancomicina e Ciprofloxacina.

Para *P.aeruginosa*: Ceftazidima, aztreonam, cefepime, ciprofloxacina, imipinem e Piperacilina-Tazobactam.

Os antibióticos que foram associados aos extratos e frações vegetais pertenciam a classes variadas e mecanismos diferentes (Quadro 1 e 2)

Quadro 1 – Drogas antimicrobianas associadas aos extratos e frações de *E. plicata* e *G. vellosii* frente à *S. aureus*.

Antibiótico	Classe	Mecanismo de ação
Cefoxitina	Cefalosporina de 2 ^a . Geração	Inibidor de síntese de parede celular
Clindamicina	Macrolídeo	Inibidor de síntese proteica
Ciprofloxacina	Quinolonas	Inibidor de síntese de DNA
Eritromicina	Macrolídeo	Inibidor de síntese proteica
Oxacilina	Penicilina	Inibidor de síntese de parede celular
Vancomicina	Glicopeptídeo	Inibidor de síntese de parede celular

Quadro 2 – Drogas antimicrobianas associadas às frações de *P. pilosa* frente à *P. aeruginosa*.

Antibiótico	Classe	Mecanismo de ação
Aztreonam	Monobactâmicos	Inibidor de parede celular
Ceftazidima	Cefalosporina de 3 ^a . Geração	Inibidor de síntese da parede celular
Cefepima	Cefalosporina de 4 ^a . Geração	Inibidor de síntese da parede celular
Ciprofloxacina	Quinolonas	Inibidor de síntese de DNA
Imipinem	Carbapenêmico	Inibidor de síntese de parede celular
Piperacilina + Tazobactam	Penicilina + β -Lactâmico	Inibidor de parede celular + Inibidor de β -Lactamase

Os discos dos antibióticos nas suas respectivas concentrações foram embebidos com 10 μ L do extrato na concentração correspondente a CIM determinada anteriormente (item 4.2.3) e em seguida colocados em placas de Petri contendo ágar Muller Hinton inoculado com as suspensões bacterianas. Essas placas foram incubadas a 36°C por 18-24 h. Após incubação foram medidos os halos de inibição e anotadas as interferências dos extratos sobre o efeito dos antibióticos frente às bactérias testadas, através dos seguintes parâmetros: (CLEELAND e SQUIRES, 1991; CANTON e ONOFRE, 2010).

Efeito sinérgico (S) – quando o halo de inibição do crescimento microbiano formado pela aplicação combinada do extrato mais o antibiótico for $\geq$ que 2 mm, quando comparado com o halo de inibição formado pela ação do antibiótico isoladamente.

Efeito antagônico (A) – quando o halo de inibição decorrente da ação combinada do antibiótico com o extrato for menor que 2mm do diâmetro daquele desenvolvido pela ação isolada do antibiótico.

Efeito indiferente (I), quando ocorreu a formação de halo de inibição consequente à aplicação combinada do extrato com antibiótico com diâmetro igual àquele da aplicação isolada do antibiótico.

As bactérias testadas foram selecionadas de acordo com os testes positivos na determinação preliminar da atividade antimicrobiana dos extratos, sendo: Para *S. aureus* – Extratos de *Eleutherine plicata* e de *Geissospermum vellosii*; Para *P. aeruginosa* – Extrato de *Portulaca Pilosa*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do perfil de suscetibilidade das amostras selvagens

Os micro-organismos testados *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram selecionados por apresentarem maior prevalência em resistência bacteriana hospitalar e por serem recomendados como micro-organismos padrões para testes de suscetibilidade antimicrobiana, sendo responsáveis por várias formas de infecções em humanos e por adquirirem, com mais frequência, resistência aos antimicrobianos (OPLUSTIL et al.2010; ANVISA, 2010). A determinação do perfil de resistência dos isolados de processos clínicos humanos foi realizada para verificar se a amostra representava uma bactéria multirresistente.

A tabela 1 revela que o isolado 1 de *S. aureus* apresentou resistência a oxacilina e cefoxitina. Cefoxitina é um antibiótico usado como ponto de corte para identificar resistência à meticilina/oxacilina. O isolado 2 foi sensível apenas à vancomicina, droga de escolha para terapêutica em casos de *S. aureus* com resistência à oxacilina. Esses resultados indicaram que as duas cepas são classificadas como ORSA (*S. aureus* oxacilina resistente), dado preocupante por trata-se de isolados provenientes de pacientes hospitalizados.

Tabela 1 - Perfil de suscetibilidade em disco difusão de isolados selvagens de *S. aureus* ORSA e da cepa ATCC 25923 de *S. aureus* sensível.

Antibióticos	<i>S. aureus</i> ORSA Isolado 1	<i>S. aureus</i> ORSA Isolado 2	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Cefoxitina	R	R	S
Clindamicina	S	R	S
Ciprofloxacina	S	R	S
Eritromicina	S	R	S
Oxacilina	R	R	S
Vancomicina	S	S	S

R - Resistente; S- Sensível

Alta frequência de MRSA/ORSA foi relatada em vários trabalhos (FREBOURG et al. 1999; HANBERGER et al. 2001; SADOYAMA et al. 2002; SILVA et al. 2003; BERNARDES et al. 2004; QUESADA et al. 2005; LEITE, 2008; VINCENT et al. 2009; PADOVESE et al. 2010; WELTE e PLETZ, 2010) mostrando que o controle da disseminação dessa bactéria nos hospitais exige a adoção de medidas específicas e reforçando a necessidade de novas terapias. No Brasil os índices de cepas ORSA têm aumentado representando um sério problema de saúde pública (MELO et al. 2007; REYNOLDS, 2009; ANURADHA et al. 2010; MOREIRA e GONTIJO FILHO, 2012).

A tabela 2 revela que os isolados de *P. aeruginosa* 1 e 3 foram resistentes a todos os antibióticos testados e o isolado 2 apresentou sensibilidade intermediária para aztreonam e piperacilina + ticarcilina, sendo resistentes às demais drogas testadas. Convém ressaltar, que os isolados foram resistentes ao imipenem, uma droga de última geração no tratamento das infecções causadas por esta bactéria. Estes resultados caracterizam os isolados como *P. aeruginosa* multirresistentes. As amostras foram isoladas de pacientes hospitalizados, confirmando que a resistência bacteriana tem se agravado devido à emergência destes micro-organismos multirresistentes em infecções hospitalares, principalmente em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI).

Tabela 2 - Perfil de suscetibilidade em disco difusão de isolados selvagens de *P. aeruginosa* multirresistentes e da cepa ATCC

Antibióticos	<i>P.aeruginosa</i> Isolado 1	<i>P.aeruginosa</i> Isolado 2	<i>P.aeruginosa</i> Isolado 3	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853
Aztreonam	R	I	R	S
Ceftazidima	R	R	R	S
Cefepime	R	R	R	S
Ciprofloxacina	R	R	R	S
Imipenem	R	R	R	S
Piperacilina+ Tazobactam	R	I	R	S

R – Resistente; S – Sensível; I – Intermediário

O isolado 2 de *P. aeruginosa* demonstrou ser produtor de metalobetalactamase, após confirmação diagnóstica realizada no laboratório de referência da Fundação Oswaldo Cruz-RJ (FIOCRUZ-RJ). No presente estudo,

mesmo apresentando halo intermediário para aztreonam e piperacilina-tazobactam, isto é, sensibilidade reduzida, a sua ocorrência é considerado um fato preocupante, pois a sua disseminação em um hospital representaria risco de morte em grandes números, devido à falta de opção terapêutica caso os pacientes não respondessem ao tratamento com estes antibióticos. Embora o nome KPC esteja associado ao nome do micro-organismo do qual foi isolada pela primeira vez (*Klebsiella pneumoniae* carbapemase), atualmente a produção de beta-lactamase não está restrita unicamente a esta espécie, podendo ser produzida por outros Gram negativos como *E. coli*, *Enterobacter* spp. e *P. aeruginosa*. Além de hidrolisar os carbapenêmicos, a bactéria produtora de beta-lactamase inativa penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Uma vez que antibióticos carbapenêmicos são a última opção terapêutica no tratamento de infecções por bactérias multirresistentes, a sua disseminação entre bactérias de interesse médico é um sério problema de saúde pública (PEIRANO et al. 2009; MONTEIRO et al. 2009; ZAVASCKI et al. 2009; PAVEZ et al. 2009).

P. aeruginosa além de ser uma bactéria oportunista por natureza é frequentemente isolada a partir de espécimes clínicos de pacientes com infecção hospitalar, apresentando resistência simultânea a um grande número de antimicrobianos disponíveis. A ocorrência de *P. aeruginosa* multirresistentes tem sido constantemente relatada, principalmente em pacientes hospitalizados (ARRUDA et al. 1999; TOLEMAN et al., 2002; PELLEGRINO et al. 2002; ANDRADE et al. 2003; GALES et al. 2003, 2004 ; RIBEIRO, 2004; POIREL et al. 2004; BRATU et al. 2005; FERRAREZE et al. 2006; VILLEGAS et al. 2007; AKPAKA et al. 2009; POIREL et al. 2010; GE et al. 2011). Esses dados mostram a relevância da pesquisa de novas opções terapêuticas, com as plantas medicinais podendo se tornar uma alternativa de grande potencial no controle desses micro-organismos.

5.2. Teste de toxicidade do DMSO

Com o intuito de melhorar a qualidade dos procedimentos com extratos vegetais, tornou-se comum a utilização de solventes como o DMSO (dimetil-

sulfóxido) e o etanol, para facilitar a dispersão dos mesmos no meio de cultura (BRUNI et al. 2004; BAYDAR et al. 2004). No presente estudo, optou-se por usar DMSO porque foi o solvente que provocou melhor dissolução dos extratos e por ser bastante usado na pesquisa da atividade antimicrobiana de extratos vegetais e óleos essenciais (HUSSIN e EL-SAYED, 2011; ABD-AZIZ et al. 2011; ADIKWU et al. 2011; STEFANOVIC e COMIC, 2012).

O DMSO desempenha um papel importante na dissolução de amostras a serem avaliadas em testes biológicos. Entretanto, é citado que o DMSO pode ter efeito citotóxico dependendo da concentração utilizada (MUIR, 2007). Além disso, FLORÃO (2006), alertou que o DMSO inibe significativamente a proliferação de linfócitos humanos por atuar, provavelmente, sobre os mecanismos de ativação celular, sendo seu uso impróprio para incorporação de derivados vegetais em meio aquoso quando se deseja investigar atividades imunomodulatórias com células mononucleares humanas. Por isso, antes de realizar o teste de microdiluição em placas foram realizados testes para avaliar sua toxicidade frente a cepas de *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Para estes testes, foi utilizada a mesma metodologia da determinação da CIM dos extratos frente às respectivas cepas.

Em nosso trabalho, quando se utilizou DMSO nas concentrações de 2,5, 5 e 10% para a cepa de *P. aeruginosa* verificou-se que o solvente não impediu o crescimento bacteriano, porém na concentração de 20% a bactéria teve seu crescimento inibido, sugerindo que esta concentração tem ação tóxica para a bactéria, portanto, pode não ser apropriada para ser utilizada nessa espécie. Para as cepas de *S. aureus* observou-se que nenhuma concentração inibiu o crescimento das espécies (Fig. 9).

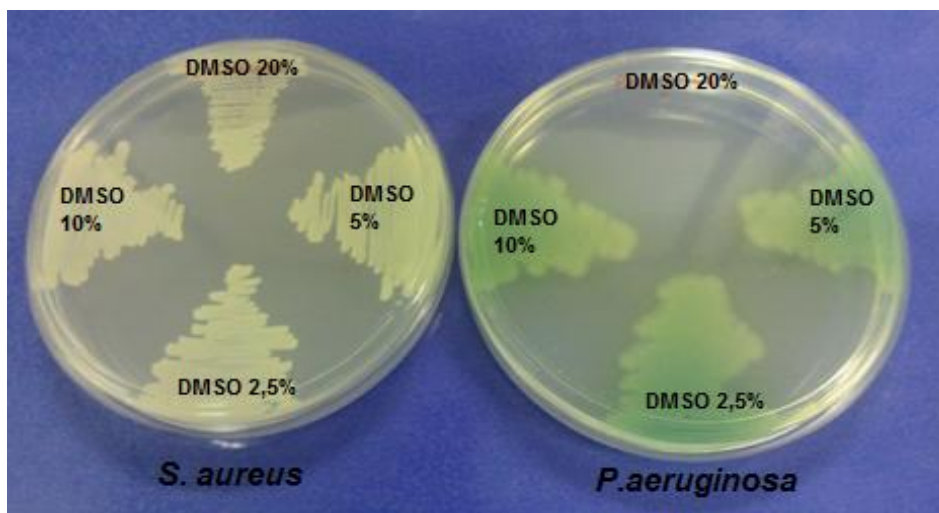


Figura 9 - Controle da ação de DMSO em ágar Muller Hinton sobre *P. aeruginosa* e *S. aureus*

Com base nestes resultados todos os extratos foram diluídos com DMSO na concentração de 10%, que mostrou ser uma concentração ideal para ser usada nas duas espécies testadas e provocou uma boa dissolução dos produtos.

Outros autores também afirmam utilizarem esta concentração na pesquisa da atividade antimicrobiana de extratos vegetais citando que não houve interferência no crescimento das bactérias testadas (CARVALHO, 2007; AYRES et al. 2008; ABD-AZIZ et al. 2011; COSTA et al. 2011)

Segundo alguns autores o DMSO foi inerte para o desenvolvimento de *E. coli*, *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp e *Klebsiella* sp (DALMARCO et al. 2007), para *E. coli* resistente a aminoglicosídeos (COUTINHO et al., 2009a) e para *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum* (CORDOVA et al. 2010). SUFREDINI et al. (2006) utilizando o DMSO a 50% não encontraram toxicidade para bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *E. faecalis*) e Gram-negativas (*E. coli* e *P.aeruginosa*).

5.3 Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais

A avaliação da contaminação dos extratos e frações realizada previamente aos testes antimicrobianos indicou que estes estavam livres de contaminação por bactérias ou fungos, não ocorrendo desenvolvimento de colônias nos meios ágar TSA e ágar Sabouraud após a incubação. Estes resultados revelaram que os

produtos apresentavam boas condições microbiológicas para serem utilizados na presente pesquisa.

A avaliação preliminar da atividade antibacteriana foi realizada pelo método de disco difusão em meio sólido. Dentre as técnicas de triagem, esse método é o mais adequado para se trabalhar com extratos vegetais coloridos e/ou com solventes orgânicos, pois é possível evaporar o solvente do disco, antes da colocação deste no meio de cultura (RIOS et al. 1987) e a cor não interfere na leitura dos resultados. Nesse método, entretanto, a presença de partículas em suspensão na amostra pode interferir na difusão da substância antimicrobiana no ágar, mas o pequeno volume necessário e a possibilidade de testar vários compostos por placa frente a um único micro-organismo foram vantagens observadas no emprego desse método (VAN DE BERGHE e VLIETINCK, 1991).

DUARTE (2006) chamou atenção para o fato de que não existe um consenso sobre a concentração aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos conhecidos. Alguns autores consideram para extratos vegetais, somente resultados similares aos de antibióticos conhecidos, desde que se trabalhe com uma fração já determinada (ALIGIANIS et al. 2001).

ALIGIANIS et al. (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados do CIM, considerando como: forte inibição – CIM até 500 $\mu\text{g/mL}$; inibição moderada – CIM entre 600 e 1500 $\mu\text{g/mL}$ e como fraca inibição - CIM acima de 1600 $\mu\text{g/mL}$. Já para Sartoratto et al. 2004, uma forte atividade de extratos vegetais seria para valores de CIM entre 50-500 $\mu\text{g/mL}$, CIM com atividade moderada entre 600-1500 $\mu\text{g/mL}$ e fraca atividade acima de 1500 $\mu\text{g/mL}$. Critérios alternativos, foram descritas por FABRY et al. (1998), que consideraram extratos possuindo valores de CIM abaixo de 8000 $\mu\text{g/mL}$ como possuindo atividade antimicrobiana aproveitável. HOLETZ et al. (2002) sugeriram CIM abaixo de 100 $\mu\text{g/mL}$ para forte atividade antimicrobiana, entre 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$ moderada atividade, entre 500 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ fraca atividade e acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ como sem atividade.

No presente trabalho, foi realizada uma triagem dos extratos etanólicos das plantas quanto a sua atividade antibacteriana partindo das concentrações de 500 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$ considerando que estes produtos são extratos brutos. Esses valores de acordo com critérios sugeridos por HOLETZ et al., (2002) seriam de moderada atividade antimicrobiana. Mas, considerando os critérios menos rigorosos

de FABRY et al. (1998), de ALIGIANIS et al. (2001) e de SARTORATTO et al. (2004), os extratos nas concentrações estudadas teriam uma forte atividade antimicrobiana. Evidencia-se, dessa maneira, a necessidade de estudos mais avançados, visando padronizar a concentração aceitável da atividade antimicrobiana de extratos vegetais com potencial de aproveitamento para fitoterápicos ou para pesquisa de novas drogas antimicrobianas.

Todos os extratos e frações em estudo demonstraram atividade para pelo menos uma espécie de bactéria multirresistente testada, comprovando que as plantas medicinais podem representar uma importante alternativa no controle da resistência bacteriana.

A *Eleutherine plicata* mostrou atividade antibacteriana para *S. aureus* ATCC 25923 e às cepas MRSA/ORSA nas concentrações de 500 µg/mL e 250 µg/mL para o EEB demonstrando que a resistência da cepa selvagem não interferiu nos resultados (Tabela 3). Este resultado é promissor, pois uma das poucas alternativas terapêutica para bactérias ORSA é a droga vancomicina (ALMEIDA et al. 2007b). Além do mais, cepas de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) e *S. aureus* com sensibilidade intermediária à vancomicina (VISA) já foram isoladas e tem sido motivo de grande preocupação no controle da resistência bacteriana (BOYLE-VAVRA et al. 2001; BADDOUR et al. 2006; TIWARI e SEN, 2006).

Apesar de ter ação sobre a bactéria Gram positiva *S. aureus*, o extrato da planta *E. plicata* não apresentou atividade para a bactéria Gram negativa *P. aeruginosa*.

Tabela 3 - Avaliação da Atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto de *Eleutherine plicata* pelo método de disco difusão em ágar.

Bactérias	Concentração 500 µg/L	Concentração 250 µg/mL
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	S (14 mm)	S (11 mm)
<i>S. aureus</i> Isolado 1	S (13 mm)	S (10 mm)
<i>S. aureus</i> Isolado 2	S (13 mm)	S (10 mm)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	R (0)	R (0)
<i>P. aeruginosa</i> Isolado 1	R (0)	R (0)
<i>P. aeruginosa</i> Isolado 2	R (0)	R (0)
<i>P. aeruginosa</i> Isolado 3	R (0)	R (0)

S- sensível; R- resistente; (halo de inibição em mm- milímetros)

Segundo VLIETINCK et al. (1995), RABE et al. (1997), LIN et al. (1999) e KELMANSON et al. (2000), muitas das plantas com atividade antimicrobiana que já foram estudadas são ativas apenas contra cepas de bactérias Gram-positivas. URZUA et al. (1998) sugeriram que a membrana externa das bactérias Gram-negativas poderia agir como uma barreira contra as substâncias ativas presente nos extratos de plantas. No entanto, vários autores encontraram extratos vegetais com atividade tanto para bactérias Gram positivas como para negativas (KHAN et al. 2009; KUETE et al. 2010; ABD AZIZ et al. 2011; STEFANOVIC & COMIC, 2012). RIBEIRO et al. (2009) demonstraram que extratos de folhas de goiabeira, pirarucu e pariri foram ativos contra cepas de ambos os grupos de bactérias.

PORFIRIO et al. (2009) e RIBEIRO et al. (2009) verificaram atividade antibacteriana no extrato de *Eleutherine plicata* Herb (marupazinho) mostrando maior atividade contra a bactéria Gram positiva *S. aureus*. A presença de taninos no extrato pode ser responsável pela atividade antimicrobiana da planta (DJIPA et al. 2000).

MALHEIROS, (2008) relatou que o extrato etanólico e a fração clorofórmica de *E. plicata* tiveram atividade frente à *S. aureus* e *C. albicans*, não tendo ação para cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa*. Através da determinação da CIM o autor verificou que a fração clorofórmica foi mais ativa que o extrato etanólico.

No estudo preliminar do EEB de *Geissospermum vellosii* (Tabela 4) verificou-se atividade para *S. aureus* sensível e resistente a oxacilina nas concentrações de 500 µg/mL e 250 µg/mL, não tendo atividade contra *P. aeruginosa*. Os halos de inibição formados foram menores do que os desenvolvidos pela *Eleutherine plicata*.

Tabela 4 - Avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto de *Geissospermum vellosii* pelo método de disco difusão em ágar.

Bactérias	Concentração 500 µg/ml	Concentração 250 µg/ml
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	S (10 mm)	S (10 mm)
<i>S. aureus</i> isolado 1	S (10 mm)	S (9 mm)
<i>S. aureus</i> isolado 2	S (10 mm)	S (8 mm)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	R (0)	R (0)
<i>P. aeruginosa</i> Isolado 1	R (0)	R (0)
<i>P. aeruginosa</i> Isolado 2	R (0)	R (0)
<i>P. aeruginosa</i> Isolado 3	R (0)	R (0)

S- sensível; R- resistente; (halo de inibição em mm- milímetros)

CORREIA et al. (2008) em seu estudo com o extrato bruto de *Geissospermum argenteum*, pertencente à mesma família do *G. vellosii*, relataram que ocorreu atividade antimicrobiana contra cepas de *P. aeruginosa* na concentração de 20 µg/mL, de 80 µg/mL para *S. aureus* sensível e de 5 µg/mL para *S. aureus* multirresistente.

Como não foi encontrado qualquer relato sobre a pesquisa da atividade antimicrobiana da planta na literatura pesquisada, os resultados de *G. vellosii* frente a *S. aureus* representam mais uma evidência importante para concluir que as plantas são um reservatório de substâncias antimicrobianas que não são apenas potentes contra patógenos-alvos, mas também podem representar uma alternativa de superar os mecanismos da resistência microbiana.

O aumento crescente da frequência de *S. aureus* resistentes à ORSA/MRSA e a possibilidade do aparecimento de amostras resistentes à vancomicina tornam importante o desenvolvimento de novas drogas com atividade anti-estafilocócicas e, nesse contexto, os extratos de *E. plicata* e de *G. vellosii* mostraram potencial como alternativa terapêutica.

Na avaliação preliminar do extrato etanólico bruto da *P. pilosa* (Tabela 5), verificou-se atividade antimicrobiana somente para *P. aeruginosa* nas concentrações de 500 e 250 µg/mL.

Tabela 5 - Avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto de *Portulaca pilosa* pelo método de disco difusão em ágar.

Bactéria	Concentração 500 µg/ml	Concentração 250 µg/ml
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	R (0)	R (0)
<i>S. aureus</i> isolado 1	R (0)	R (0)
<i>S. aureus</i> isolado 2	R (0)	R (0)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	S (20 mm)	S (18 mm)
<i>P. aeruginosa</i> isolado 1	S (10 mm)	S (9 mm)
<i>P. aeruginosa</i> isolado 2	S (10 mm)	S (9 mm)
<i>P. aeruginosa</i> isolado 3	S (9 mm)	S (8 mm)

S- sensível; R- resistente; (halo de inibição em mm- milímetros)

BASTOS, (2008) avaliando o potencial antimicrobiano do extrato bruto de *P. pilosa*, através do teste de difusão em ágar, não observou atividade microbiana para *S. aureus*, *C. albicans* e *P. aeruginosa*. Entretanto MENDES (2011) em uma avaliação preliminar com o extrato de *P. pilosa* pelo método de difusão em ágar frente ao *P. aeruginosa* verificou halo de 25 mm de diâmetro na concentração de 500 µg/mL e de 20 mm na concentração de 250 µg/m, o que corrobora nossos resultados. Os autores sugeriram que a presença de fenóis e taninos, que eles encontraram na prospecção fitoquímica do extrato de planta, seria responsável pela atividade antimicrobiana.

OLIVEIRA et al. (2011) relataram que o extrato etanólico de *P. pilosa* não demonstrou atividade quando testado contra a bactéria álcool-ácido-resistente *Mycobacterium tuberculosis*. Convém ressaltar que esta bactéria possui um alto teor de lipídeos na composição da parede celular, o que impediria a ação do extrato sobre a bactéria.

5.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Após a determinação da atividade antimicrobiana preliminar, realizada com os extratos etanólicos brutos das plantas sobre os micro-organismos testados, foram

selecionados extratos e frações das plantas que apresentaram resultado positivo (halo ≥ 8 mm) contra cada um dos micro-organismos do estudo. Para determinação da CIM, os produtos vegetais (extratos e frações) foram testados em concentrações de 500; 250; 125; 62,50; 31,25 e 15,62 $\mu\text{g/mL}$ pelo método de microdiluição em placas. A CIM representa a menor concentração do produto capaz de inibir a multiplicação de um isolado bacteriano.

Na determinação da CIM optou-se pelo método de ELLOF, (1998) por ser um método que foi idealizado para uso em extratos vegetais e vem sendo bastante utilizado, principalmente devido à sua sensibilidade e a quantidade mínima de reagentes, o que possibilita um maior número de réplicas, aumentando a confiabilidade dos resultados (OSTROSKY et al. 2008). A determinação da CIM através deste método pode avaliar quantitativamente o potencial antimicrobiano de uma planta, pois é possível comparar as respostas de diferentes amostras como extratos, frações e substâncias puras obtidas da mesma (BUGNO et al. 2007).

Como revelador do crescimento bacteriano foi utilizado a resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) de cor azul que, na presença de células viáveis, é oxidada à resofurina, substância de coloração vermelha, facilitando a verificação da presença de crescimento microbiano com a coloração azul indicando ausência de crescimento visível (PALOMINO et al. 2002; STOPPA et al. 2009).

A tabela 6 e figuras 10, 11 e 12 mostram a CIM dos extratos frente aos micro-organismos. Para a *E. plicata* o EEB teve CIM de 250 $\mu\text{g/mL}$ e para a FD a CIM foi de 125 $\mu\text{g/mL}$ frente a *S. aureus*. A planta *G. vellosii* revelou CIM de 125 $\mu\text{g/mL}$ frente a *S. aureus* tanto para o EEB como para FA. As frações FAE e FHA de *P. pilosa* revelaram CIM de 250 $\mu\text{g/mL}$ para todas as cepas de *P. aeruginosa*. As respectivas CIM dos produtos foram usadas para estudos da interação com drogas antimicrobianas frente às bactérias selecionadas

Tabela 6 – Determinação da concentração inibitória mínima dos produtos vegetais frente às bactérias testadas.

	<i>E. plicata</i>		<i>G. vellosii</i>		<i>P. pilosa</i>	
Micro-organismo	EEB	FD	EEB	FA	FAE	FHA
	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
<i>S. aureus</i> Isolado 1	250	125	125	125	-	-
<i>S. aureus</i> Isolado 2	250	125	125	125	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	250	125	125	125	-	-
<i>P. aeruginosa</i> Isolado 1	-	-	-	-	250	250
<i>P. aeruginosa</i> Isolado 2	-	-	-	-	250	250
<i>P. aeruginosa</i> Isolado 3	-	-	-	-	250	250
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	250	250

EEB (Extrato Etanólico Bruto); FD (Fração Diclorometano); FA (Fração alcaloídica); FAE (Fração aceto de etila); FHA (Fração hidroalcoólica).

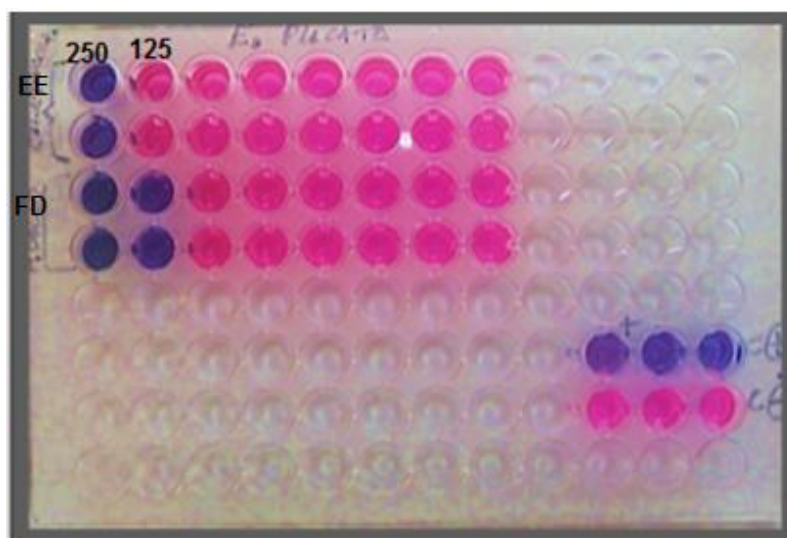


Figura 10 - Determinação da concentração inibitória mínima do EE e FD da *Eleutherine plicata* frente a *S. aureus* cepa 1

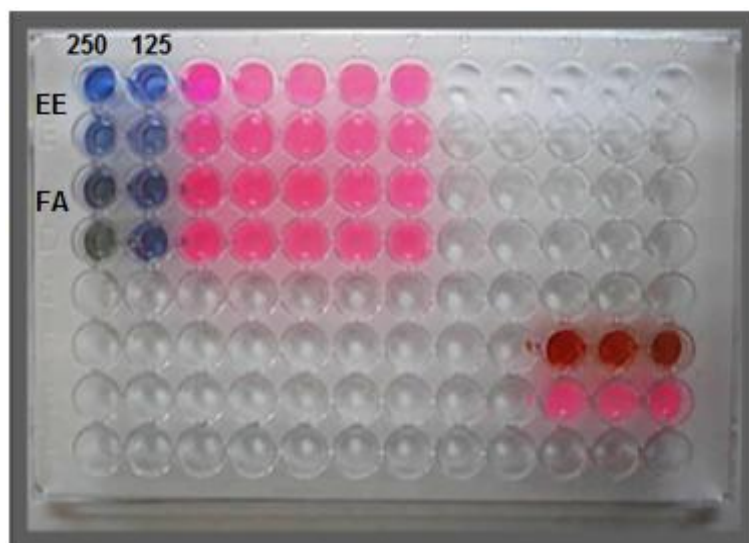


Figura 11 - Determinação da concentração inibitória mínima do EE e FA do *Geissospermum vellosii*, frente a *S. aureus* cepa 1.

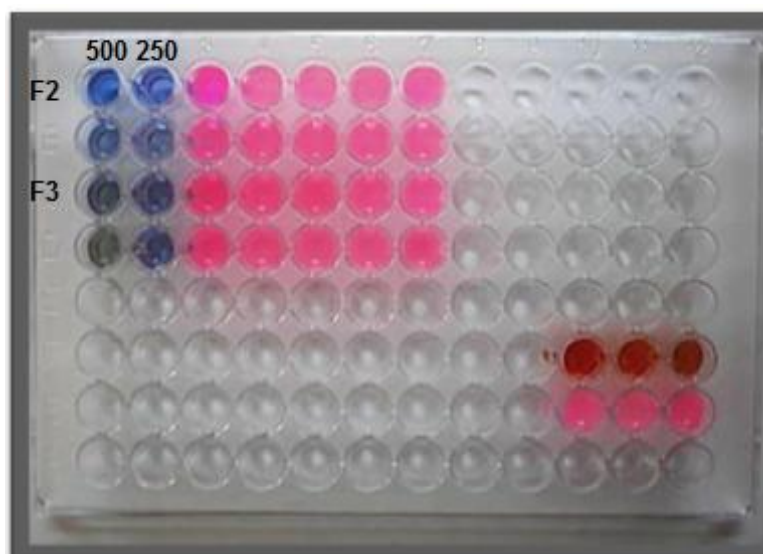


Figura 12 - Determinação da concentração inibitória mínima de FAE (F2) e FHA (F3) da *Portulaca pilosa* frente a *P. aeruginosa* cepa 2

Para *E. plicata* a fração diclorometano foi mais ativa (CIM 125 µg/mL) que o extrato etanólico bruto, sugerindo que a substância ativa esteja em maior concentração na referida fração.

IFESAN, (2009) verificou que o extrato etanólico bruto de planta do gênero *Eleutherine* apresentou CIM de 62,5 mg/ mL para *S. aureus* MRSA, enquanto que a CIM de cepa sensível foi de 250 mg/ mL.

ALVES et al. (2003) obtiveram de *E. bulbosa* (Miller) o isolamento da naftoquinona denominada eleuterinona além das demais já isoladas anteriormente como: eleuterina, isoeleuterina, e eleuterol e após ensaio bioautográfico detectou forte atividade contra o fungo fitopatogênico *Cladosporium sphaerospermum*.

Tanto o extrato etanólico bruto como a fração alcaloídica de *G. vellosii* revelaram CIM de 125 µg/mL para todos os isolados e a cepa ATCC de *S. aureus*. Seria esperado que a fração alcaloídica tivesse uma atividade mais intensa. Entretanto, especula-se que a eficácia da atividade antimicrobiana de extratos vegetais brutos pode ser devido à interação dos diferentes compostos químicos presentes nas plantas, e não pela atividade de compostos isolados, o que pode explicar estes resultados (RIOS et al. 1987; BIRDI et al. 2010). Esta CIM caracteriza uma forte atividade antibacteriana (FABRY et al. 1998; ALIGIANIS et al. 2001; SARTORATTO et al. 2004), o que é particularmente interessante quanto à ação sobre *S. aureus* multirresistentes, já que a disseminação de cepas ORSA tem sido frequentemente relatada em todo o mundo, provocando um aumento de custos associados a infecções desta bactéria em hospitais, onde decorrem de internação prolongada, necessidade de antimicrobianos mais caros e gastos indiretos com medidas de controle da infecção (ROSSI e ANDREAZZI, 2005; VINCENT et al. 2009; PADOVESE et al. 2010).

As frações FAE e FHA de *P. pilosa* demonstraram CIM de 250 µg/mL contra *P. aeruginosa*. Este resultado é de grande valor, sobretudo porque a bactéria, segundo ROSSI e ANDREAZZI (2005), pode expressar uma série de mecanismos de resistência, como a produção da beta-lactamase, permeabilidade bastante reduzida à entrada de antibióticos e a presença de bombas de efluxo, levando à resistência intrínseca a múltiplos antibióticos. As frações tiveram ação sobre os isolados selvagens que foram resistentes á todos os antibióticos testados, comprovando que a planta é de interesse para estudos fitoterápicos e de novas drogas antimicrobianas.

A CIM de *P. pilosa* frente à *P. aeruginosa* de 250 ug/mL encontrada no presente trabalho para frações foi também relatada por MENDES et al. (2011) para o

extrato bruto da planta. Entretanto, estes autores não trabalharam com cepas multirresistentes.

5.5. Interferência dos extratos sobre o efeito das drogas antimicrobianas.

Do total das 120 combinações testadas entre os extratos das plantas e as drogas antimicrobianas, ocorreram 25% de interações com sinergismo, indicando que houve potencialização da ação da droga frente à bactéria testada (Tabela 7). Outros autores encontraram valores superiores, tais como BRAGA et al. (2005) com 73% de interações sinérgicas do extrato metanólico de *Punica granatum* com 6 antibióticos (cloranfenicol, gentamicina, ampicilina, tetraciclina e oxacilina) contra isolados clínicos de *S. aureus* MRSA e *S. aureus* MSSA; ALEGORO et al. (2009a) com 61,7% de sinergismo dentre as combinações testadas do extrato de *Helichrysum longifolium* com seis antibióticos (penicilina G, amoxicilina, cloranfenicol, oxitetraciclina, eritromicina e ciprofloxacina) frente a várias bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e ALEGORO et al. (2009b) que relataram 60% de interações sinérgicas entre todas as combinações do extrato metanólico bruto das folhas de *Helichrysum pedunculatum* com oito antibióticos frente a várias bactérias Gram positivas e Gram-negativas. Estes resultados demonstram que as plantas medicinais podem se tornar um importante adjuvante das drogas antibacterianas já conhecidas, no tratamento das doenças infecciosas e no controle da resistência bacteriana.

Tabela 7 – Interação entre extratos de plantas e antibióticos sobre *S. aureus* e *P. aeruginosa*

Interferência	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	Total
	<i>E. plicata</i>	<i>G. vellosii</i>	<i>P. pilosa</i>	
Sinergismo	9 (25%)	5 (13,9%)	16 (33,3%)	30 (25%)
Antagonismo	1 (2,8%)	1 (2,8%)	4 (8,3%)	6 (5 (%))
Indiferente	26 (72,2%)	30 (83,3%)	28 (58,4%)	84 (70%)
Total	36 (100%)	36 (100%)	48 (100%)	120 (100%)

Na interação da planta *P. pilosa* com os antibióticos frente a *P. aeruginosa* houve o maior número de casos de sinergismo (33,3%), mas também foi onde houve a maior ocorrência de antagonismo (8,3%). Na maioria das combinações testadas (70%) os extratos não interferiram na ação do antibiótico e em apenas 5% houve antagonismo, isto é, os extratos diminuíram a ação dos antibióticos. AYGORO et al. (2011) também relataram baixa ocorrência de antagonismo (11%) e AYGORO et al. (2009b) não encontraram nenhum caso de antagonismo nas várias combinações testadas entre extratos vegetais de *Helicrysum longifolium* e 8 antibióticos frente a 7 bactérias Gram positivas e 2 Gram negativas.

Apesar destes resultados promissores, convém ressaltar que, como as plantas medicinais são bastante utilizadas pela população, há necessidade de mais estudos que visem elucidar os efeitos prejudiciais que podem ocorrer com a interação dos antibióticos e plantas medicinais. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (CANTON e ONFRE, 2010).

As tabelas 8, 9 e figuras 13 e 14 mostram os resultados da interação dos extratos e frações de *E. plicata* e de *G. vellosii* frente a *S. aureus*.

Tabela 8 – Resultados da Interação do EEB e FD de *Eleutherine plicata* com antibióticos frente a *S.aureus*

Antibiótico	Cepa ATCC			Isolado 1			Isolado 2		
	Ab (mm)	Ab+EEB (mm)	Ab+FD (mm)	Ab (mm)	Ab+EEB (mm)	Ab+FD (mm)	Ab (mm)	Ab+EEB (mm)	Ab+FD (mm)
Cefoxitina	30	I (30)	S (32)	16	A (14)	I (15)	0	I (0)	I (0)
Ciprofloxacina	30	I (30)	I (30)	28	S (30)	S (31)	9	S (11)	I (8)
Clindamicina	29	I (30)	I (30)	23	I (23)	S (26)	0	I (0)	I (0)
Eritromicina	28	S (30)	S (30)	28	I (29)	I (29)	0	I (0)	I (0)
Oxacilina	21	I (21)	I (21)	0	I (0)	I (0)	0	I (0)	I (0)
Vancomicina	22	I (22)	I (22)	21	I (20)	I (20)	19	S (22)	S (22)

Ab: Antibiótico; EEB: Extrato Etanólico Bruto; FD: Fração Diclorometano; S: Sinergismo; A: Antagonismo; I: indiferente; mm: milímetros.

Tabela 9 – Resultados da Interação do EEB e da FA de *G. vellosii* com antibióticos frente a *S. aureus*.

Antibiótico	Cepa ATCC			Isolado 1			Isolado 2		
	Ab (mm)	Ab+EEB (mm)	Ab+FA (mm)	Atb (mm)	Ab+EEB (mm)	Ab+FA (mm)	Ab (mm)	Ab+EEB (mm)	Ab+FA (mm)
Cefoxitina	30	I (30)	I (30)	15	I (15)	I (15)	0	I (0)	I (0)
Ciprofloxacina	31	I (31)	I (30)	31	I (31)	I (32)	09	S (11)	I (8)
Clindamicina	28	I (28)	I (29)	22	S (24)	S (25)	0	I (0)	I (0)
Eritromicina	29	I (29)	I (29)	30	I (31)	I (31)	0	I (0)	I (0)
Oxacilina	21	I (21)	I (20)	0	I (0)	I (0)	0	I (0)	I (0)
Vancomicina	23	I (23)	A (21)	21	I (21)	I (21)	19	S (21)	S (21)

Ab: Antibiótico; EEB Extrato Etanólico Bruto; FA: Fração Alcaloídica; S: Sinergismo; A: Antagonismo; I: indiferente; mm: milímetros.

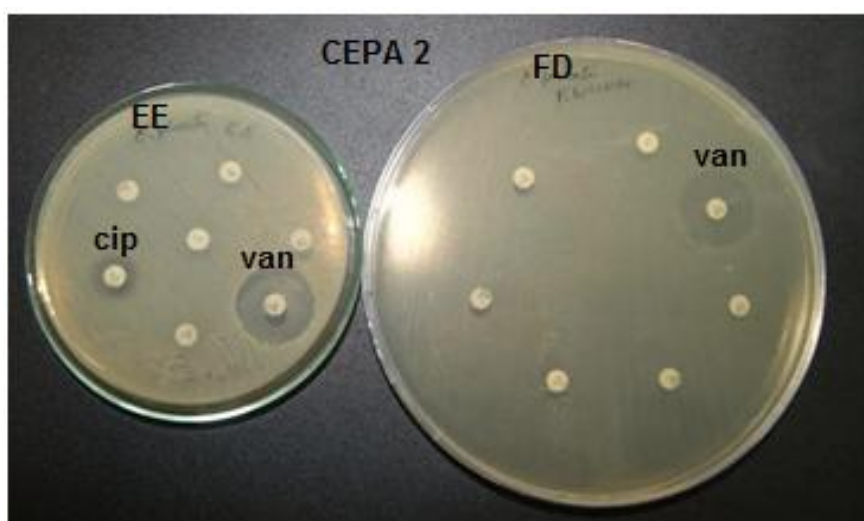


Figura 13 - Demonstração da interação do Extrato etanólico bruto (EEB) e da Fração Diclorometano (FD) de *Eleutherine plicata* + Antibióticos frente ao isolado 2 de *S. aureus* oxacilina-resistente (ORSA).

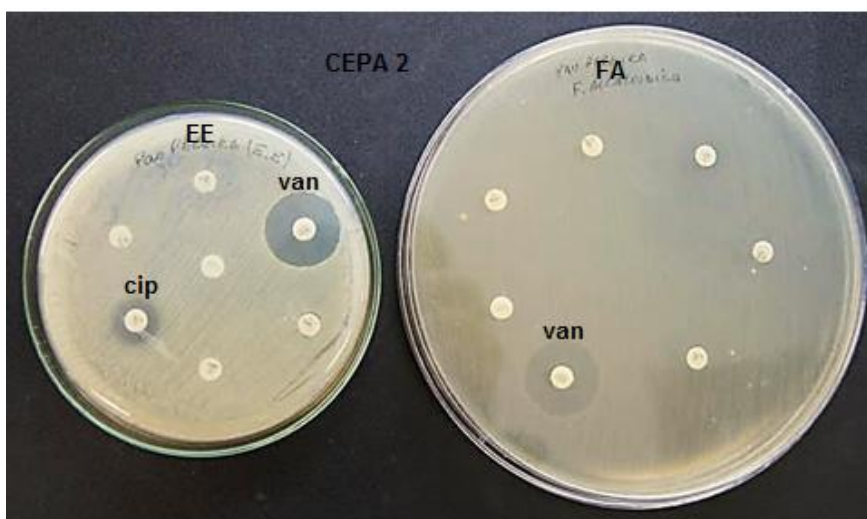


Figura 14 – Demonstração da interação do Extrato Etanólico Bruto (EEB) e da Fração Alcalóidica (FA) do *Geissospermum vellosii* + Antibióticos frente ao isolado 2 de *S. aureus* oxacilina-resistente (ORSA).

Todas as interações do EEB de *G. vellosii* com as drogas foram indiferentes quando testadas frente à cepa ATCC de *S. aureus* sensível, isto é, não interferiram na ação do antibiótico. A fração FA desenvolveu antagonismo na interação com vancomicina, sendo indiferentes quando associada as demais drogas testadas.

Frente aos isolados multirresistentes (ORSA) o EEB potencializou a ação da ciprofloxacina, clindamicina e da vancomicina, enquanto que a fração FA desenvolveu sinergismo com clindamicina e vancomicina. Não ocorreu nenhum caso de antagonismo com os antibióticos frente aos isolados multirresistentes.

Resultado relevante é a potencialização da vancomicina pelo EEB e FA de *G. vellosii* e EEB e FD de *E. plicata* frente aos isolados ORSA, criando uma expectativa de que as plantas apresentam potencial como adjuvantes no tratamento das infecções causadas por estes micro-organismos, pois a vancomicina é uma das poucas alternativas conhecidas atualmente. OLIVEIRA et al. (20011) demonstraram que a tolerância à vancomicina entre as cepas ORSA é elevada. Consequentemente aumentam as chances de falhas no tratamento com vancomicina e o risco da emergência de *Staphylococcus aureus* vancomicina-intermediário (VISA). Além do que, o tratamento por tempo prolongado e o uso em larga escala da vancomicina são considerados os principais fatores relacionados com a emergência de cepas VISA (HIRAMATSU, 1998; SMITH et al. 1999; OLIVIEIRA et al. 2000). A vigilância constante dos níveis de sensibilidade à vancomicina é necessária, com vistas à prevenção da emergência de cepas VISA e VRSA, assim como a procura por novas alternativas terapêuticas, menos agressiva ao homem.

A tabela 9 e figuras 15 e 16 demonstram os resultados da interação das frações de *P. pilosa* com as drogas antimicrobianas frente a *P. aeruginosa*.

Tabela 10 – Resultados da Interação do extrato de *Portulaca pilosa* com antibióticos frente à *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiótico	Cepa ATCC (mm)			Isolado 1 (mm)			Isolado 2 (mm)			Isolado 3 (mm)		
	Ab	Ab+ FAE	Ab+ FHA	Ab	Ab+ FAE	Ab+ FHA	Ab	Ab+ FAE	Ab+ FHA	Ab	Ab+ FAE	Ab+ FHA
Aztreonam	22	S(29)	S(29)	0	I (0)	I (0)	18	A(16)	I (18)	16	S(22)	I (17)
Ceftazidima	27	I (28)	S(29)	0	I (0)	I (0)	0	I (0)	I (0)	0	I (0)	I (0)
Cefepime	30	S(32)	S(32)	9	I (10)	S(12)	12	S(14)	S(17)	0	I (0)	I (0)
Ciprofloxacina	32	S(37)	S(36)	8	I (8)	I (08)	0	I (0)	I (0)	0	I (0)	I (0)
Imipenem	23	I (22)	A(19)	11	I (11)	I (10)	10	I (10)	I (11)	0	I (0)	I (0)
Piperacilina Tazobactam	31	S(33)	S(34)	12	A (8)	A (7)	20	I (21)	S(22)	11	S(15)	S(16)

Ab: Antibiótico; FAE: Fração Acetato de Etila; FHA: Fração Hidroalcoólica, S- sinergismo; A - antagonismo; I- indiferente; mm (halo em milímetros).

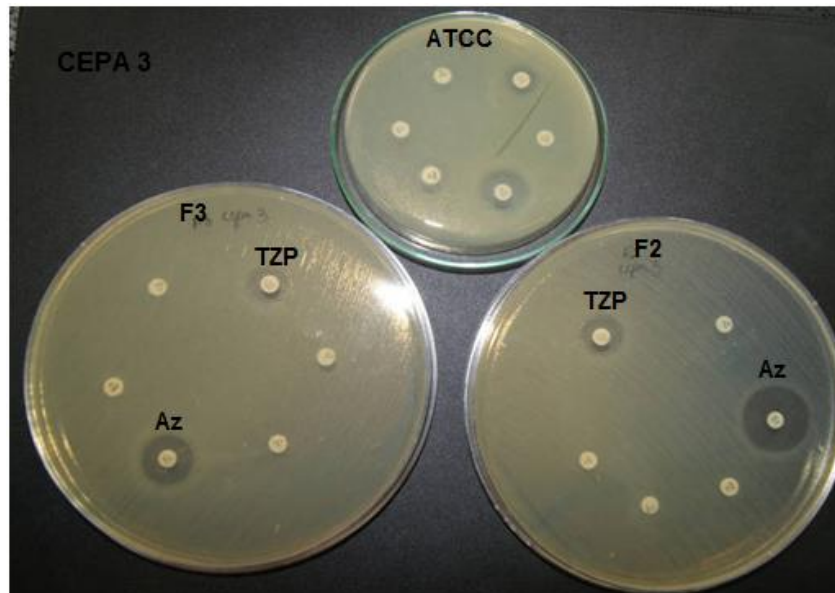


Figura 15 - Demonstração da interação da Fração Acetato de Etila (FAE) e da Fração Hidroalcoólica (FHA) da *Portulaca pilosa* + Antibióticos frente ao isolado 3 de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.

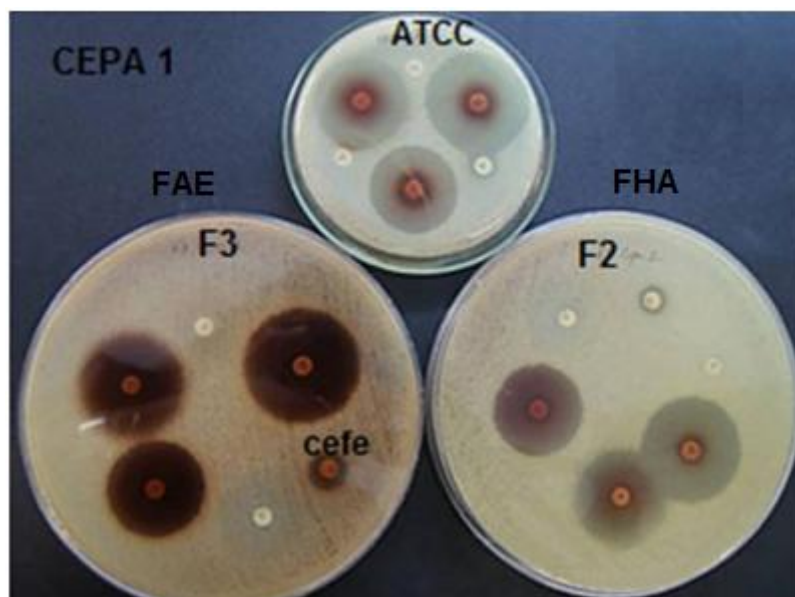


Figura 16 - Demonstração da interação da (FAE) (F2) e da (FHA) (F3) da *Portulaca pilosa* + Antibióticos frente ao isolado 1 de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.

Na associação das Frações FAE e FHA de *P. pilosa* com os antibióticos testados frente à cepa ATCC de *P. aeruginosa* não multirresistente verificou-se o maior número de casos de sinergismo, tendo a FAE potencializado a ação de cinco antibióticos (aztreonam, cefepime, ciprofloxacina e piperacilina+tazobactam), enquanto a fração FHA potencializou também a ceftazidima, além dos outros cinco citados para a fração FAE. Mesmo sendo para cepa sensível aos anti-*Pseudomonas*, é um resultado relevante, considerando o potencial desta bactéria para causar infecções diversas e que as associações com sinergismo ocorreram com antibióticos de classes variadas e mecanismos de ação diferentes.

No estudo da interação da FAE com antibióticos frente a isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes, ocorreu sinergismo com cefepime e piperacilina+tazobactam e antagonismo com aztreonam e imipinem. A FHA quando associada aos antibióticos provocou sinergismo com cefepime e piperacilina-tazobactam e antagonismo com piperacilina+tazobactam.

Corroborando com os nossos resultados de que a associação de plantas com antibióticos é alternativa viável na terapêutica de *P. aeruginosa* multirresistentes, ADWAN et al. (2010) mostraram que o extrato da planta *R. coriaria*, além de possuir forte ação bactericida sobre todas as cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes testadas, a sua associação com os antibióticos penicilina G e cefalexina mostraram

efeitos sinérgicos com redução significativa de mais de 2000 vezes das CIM destes antibióticos frente a esta espécie bacteriana. Os autores sugeriram que as combinações entre o extrato da planta e os antibióticos podem ser úteis no combate das emergentes *P. aeruginosa* multirresistentes, e que o extrato de *R. coriaria* pode conter inibidores naturais trabalhando por diferentes mecanismos ou inibidores de bombas de efluxo. Recomendaram, entretanto, que trabalhos futuros são necessários, para identificar as moléculas ativas presentes no extrato, assim como estudos *in vivo* para confirmar a proteção anti-pseudomonas.

Outros autores também comprovaram a possível utilização dos extratos de plantas medicinais associados aos antibióticos, no controle de infecções bacterianas envolvendo fenótipos MDR (multi-drogas resistentes), tais como COUTINHO et al. (2009b), FANKAM et al. (2011), SOUSA et al.(2011) e FERNANDES et al. (2012).

6. CONCLUSÃO

- Foi comprovado o potencial antibacteriano das plantas *E. plicata* (marupazinho) e *G. vellosii* (pau-pereira) frente a *S. aureus* ORSA e da *P. pilosa* (amor-crescido) contra *P. aeruginosa* multirresistente.
- As frações de *E. plicata* e *G. vellosii* demonstraram a mesma eficácia contra *S. aureus* considerando as suas CIMs (125 ug/mL).
- As frações acetato de etila e hidroalcoólica de *P. pilosa* tiveram a mesma CIM (250 ug/mL) frente a *P. aeruginosa* multirresistente.
- O DMSO teve ação tóxica para *P. aeruginosa* na concentração de 20% sendo inerte para *S. aureus* nas concentrações testadas (2,5, 5, 10 e 20%).
- Para testes da atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas com *S. aureus* e *P. aeruginosa*, sugere-se a concentração do DMSO a 10%.
- As interações dos extratos das plantas com os antibióticos demonstraram a ocorrência de sinergismo em 25% das interações testadas.
- Os extratos e frações de *E. plicata* e de *G. vellosii* potencializaram a atividade *in vitro* das drogas antibacterianas ciprofloxacina, clindamicina e vancomicina frente a cepas ORSA.
- A interação das frações de *P. pilosa* com as drogas aztreonam, cefepime e piperacilina+tazobactam quando testadas contra *P. aeruginosa* multirresistente provocaram sinergismo, resultando na potencialização da atividade *in vitro* das drogas.
- Os resultados do trabalho indicam que extratos de *E. plicata*, *G. vellosii* e de *P. pilosa*, principalmente quando em interação com as drogas antibacterianas conhecidas, representam uma alternativa terapêutica no combate de bactérias multirresistentes emergentes. São necessários, entretanto, outros estudos para a verificação da toxicidade das plantas e do isolamento e identificação de compostos ativos responsáveis por estas atividades. Além disso, a compreensão do mecanismo de sinergismo é fundamental, para o uso com sucesso, das plantas medicinais no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABASCAL, K. & YARNNELL, E.: Herbs and drug resistance. Potential of botanical in drug-resistant microbes. **Alternative Complementary Therapies**, v. 1, p. 237-241, 2002.
- ABD AZIZ, S.M.; LOW, C.N.; CHAI, L.C.; ABD RAZAK, S.S.N.; SELAMAT, J.; SON, R.; SARKER, M.Z.I.; KHATIB, A. Screening of selected Malaysian plants against several food borne pathogen bacteria. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 3, p. 1195-1201, 2011.
- ABU-HIJLEH, A.; JARRAR, N.; ADWAN, K. Antibacterial activity of common *Verthermia*, *Varthemia iphinoides* ethanol extracts alone and in combination with cefotaxime. **Advances in Biological Research**, v. 3, n. (5-6), p. 144-147, 2009.
- ADIKWU, M.; JACKSON, C.; ESIMONE, C. Evaluation of *in vitro* antimicrobial effect of combinations of erythromycin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Staphylococcus aureus*. **Research in Pharmaceutical Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 22-24, 2010.
- ADWAN, D. & MHANNA, M. Synergistic Effects of Plant Extracts and Antibiotics on *Staphylococcus aureus*. Strains Isolated from Clinical Specimens. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 3, n. 3, p. 134-139, 2008.
- ADWAN, G.M.; ABU-SHANAB, B.A.; ADWAN, K.M. In vitro activity of certain drugs in combination with plant extracts against *Staphylococcus aureus* infections. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 24, n. 4, p. 541–544, 2008.
- ADWAN, G.; ABU-SHANAB, B.; ADWAN, K. Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobials against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 1, p. 266-269, 2010.
- ADWAN, G.M.; ABU-SHANAB, B.A.; ADWAN, K.M. *In vitro* activity of certain drugs in combination with plant extracts against *Staphylococcus aureus* infections. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 4239-4241, 2009.
- AHMED, F.; SELIM, M.S.T.; SHILPI, J.A. Antibacterial activity of *Ludwigia adscendens*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 473– 475, 2005.
- AHMED, Z.; KHAN, S.S.; KHAN, M. TANVEER, A.; LONE, Z.A. Synergistic effect of *Salvadora persica* extracts, tetracycline and penicillin against *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Basic and Applied Sciences**, v.2, n. (1-2), p. 25-29, 2010.
- AIYEGORO, O.; ADEWUSI, A.; OYEDEMI, S.; AKINPELU, D.; OKOH, A. Interactions of Antibiotics and Methanolic Crude Extracts of *Afzelia Africana* (Smith.) Against Drug Resistance Bacterial Isolates. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 12, p. 4477-4487, 2011.

AIYEGORO, O.; AFOLAYAN, A. J.; OKOH, A.I. Synergistic interaction of *Helichrysum pedunculatum* leaf extracts with antibiotics against wound infection associated bacteria. **Biol. Res**, v. 42, p. 327-338, 2009b.

AIYEGORO, O.A.; AFOLAYAN, A.J.; OKOH, A.I. *In vitro* antibacterial activities of crude extracts of the leaves of *Helichrysum longifolium* in combination with selected antibiotics. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 3, p. 293-300, 2009a.

AKPAKA, P. E., W. H. SWANSTON, H. N. IHEMERE, A. CORREA, J. A. TORRES, J. D. TAFUR, M. C. MONTEALEGRE, J. P. QUINN, AND M. V. VILLEGAS.. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 2670–2671, 2009.

ALBUQUERQUE, J.M. **Plantas Medicinais de Uso Popular**. Brasília, ABEAS/MEC, 100pp, 1989.

ALEGRE, J.L. Infecciones nosocomiales en niños Antecedentes en hospitales del tercer nivel de atención. **Rev. Med. IMSS**, v. 38, n. 6, p. 497-505, 2000. .

ALMEIDA, M.I.; BEDENDO, J.; CAVASIN, E.D.; TOGNIM, M.C.B. Prevalência e perfil de sensibilidade de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos clínicos de infecções hospitalares. **Rev. Eletr. Enf.**, v. 9, n. 2, p. 489-95. 2007a.

ALMEIDA, M.R.; LIMA, J.A.; SANTOS, N.P.; PINTO, A. Pereirina: O primeiro alcaloide isolado no Brasil, **Ciência Hoje**, v. 1, p. 240-26-31, 2007b.

ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA, M.L.A.; WILSON ROBERTO CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p.1224-1229, 2008.

ALVES, T.M.A.; KLOOS, H.; ZANI, C.L. Eleutherinone, a novel fungitox naphthoquinone from *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 5, p. 709-712, 2003.

ANDRADE, S.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C.; SADER, H.S. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centers: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). **J. Antimicrob. Chemother**, v. 52, n. 1, p. 140-1. 2003.

ANDRADE, D.; LEOPOLDO, V.C.; HAAS, V.J. Ocorrência de Bactérias Multirresistentes em um Centro de Terapia Intensiva de Hospital Brasileiro de Emergências. **RBTI - Revista Brasileira Terapia Intensiva**. v. 18, n. 1, p.27-33. 2006.

ANDRADE, E.; NAVARRO, P.; RODRIGUÉZ, J.; RODRIGUEZ, P.; VILLARROEL, E. Evaluación bacteriológica de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiot. infecc.**, v. 10, n. 1, p. 29-32, 2002.

ANURADHA, S.D.; SIMIT, H.K; SUJATA, M.B. Prevalence of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species in intensive care areas in a tertiary care hospital. **Indian J. Crit. Care Med.**, v. 14, n. 4, p. 217–219, 2010.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Projeto Hospitais sentinela. Brasil. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/audes/sentinela/>. Acesso em 9 de Nov. 2010.

ARAÚJO, N.R.R. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre micro-organismos relacionados à lesão de Mucosite Oral**. 2010. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará. Belém-PA, 2010.

ARRUDA, E.A.; MARINHO, I.S.; BOULOS, M.; SINTO, S.I.; CAIAFFA, H.H.; MENDES, C.M. et al. Nosocomial infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 20, n. 9, p. 620-3, 1999.

AYRES, M.C.C.; BRANDÃO, M.S.; VIEIRA JÚNIOR, G.M.; MENOR, J.C.A.S.; B. SILVA, H.B.; SOARES, M.J.S.; CHAVES, M.H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n.1, p. 90-97, 2008.

BADDOUR, M. M.; ABUELKHEIR, M. A.; FATANI, A. J. Trends in antibiotic susceptibility patterns and epidemiology of MRSA isolates from several hospitals in Riyadh, Saudi Arabia. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 5, p. 30, 2006.

BALUNAS, M.J. & KINGHOM, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.

BARBER M. Staphylococcal infection due to penicillin-resistant strain. **British Medical Journal**, v. 2, p. 863-865, 1947.

BARBOSA, W.L.R.; PINTO, L.N.; QUIGNARD, E.; VIEIRA, J.M.S.; SILVA Jr, J.O.C.; ALBUQUERQUE, S. . *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 43-48, 2008.

BARBOSA, W.L.R.; QUIGNARD, E.; TAVARES, I.C.C.; PINTO, L.N.; OLIVEIRA, F.Q.; OLIVEIRA, R.M. Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais. 2a. Edição revisada. **Revista Científica da UFPA** <http://www.ufpa.br/rcientifica> v. 4, 2004.

BASTOS, M. L. A. **Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro e in vivo e estudo químico biomonitorado de *Piper hayneanum* C.CD.(Piperaceae) e *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae)**. 2008. 254f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 2008.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibilities testing by standard single disc diffusion method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p.493-496, 1966.

BAURIN, N.; ARNOULT, E.; SCIOR, T.; DO, Q.T.; BERNARD, P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. **J Ethnopharmacol**, v. 82, n.23, p.155-158, 2002.

BAYDAR, H; SAĐDIĐO; ÖZKAN, G; KARADOĐAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v.15, p. 169-172, 2004.

BECKER, K.; HU, Y.; BILLER-ADORNO, N. Infectious diseases – a global challenge. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 179-185, 2006.

BERNARDES, R.C.; CARDOSO, A.O.; LEÃO, M. V. P. Sensibilidade à oxacilina, vancomicina e teicoplanina. Taubaté. **Revista de Biociência**, v.10, p. 73-78, 2004.

BERTINI, L.M.; PEREIRA, F.A.; OLIVEIRA, C.L.L.; MENEZES, E.A.; MORAIS, S.M.; CUHA, F.A.; CAVALCANTI, E. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v. 17, n. (3/4), p.80-83, 2005.

BETONI, J.E.; MANTOVANI, R.P.; BARBOSA, L.N.; DE-STASI, L.C. and JUNIOR, F.A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus* diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, n.4, p. 387-390, 2006.

BIRDI, T.; DASWANI, P.; BRIJESH, S.; TETALI, P.; NATU, A.; ANTIA, N. Newer insights into the mechanism of action of *Psidium guajava* L. leaves in infectious diarrhea. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, p. 33, 2010.

BITU, V.B.; BOTELHO, M.A.; COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, F.F.G.; VERAS, H.N.H.; MARTINS, K.T.; LYRA, A.; COLUCHI, G.G.; RONALDO SOUSA RUELA, R.S.; QUEIROZ, D.B.; SIQUEIRA, J.S.; QUINTANS-JUNIOR, L.J. Screening and antimicrobial activity phytochemical of essential oil from *Lippia gracillis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 69-75, 2012.

BOLZANI, W. S.; SERUR, L.M.; MATOS, F. J.A.; GOTTLIEB, O. R. Indole alkaloids evolution in *Aspidosperma*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 15, n. 187-200, 1987.

BOTSARIS, A. **Cresce o interesse pela fitoterapia**. Disponível em [http://www.nucleoalquimico.com.br/pdf/artigos/cresce interesse pela fitoterapia.pdf](http://www.nucleoalquimico.com.br/pdf/artigos/cresce%20interesse%20pela%20fitoterapia.pdf). Acesso em 18 de agosto de 2010.

BOUCHILON, S.K.; JOHNSON, B.M.; HOBAN, D.J.; JOHNSON, J.L.; DOWZICKY, M.J. Determining incidence of extended spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 centres from 17 countries: The PEARLS study 2001-2002. **Int. J. Antimicrobiol. Agents**, v. 24, p. 119-124, 2004.

BORGES, E.S. **Estudos Farmacognósticos, Fitoquímicos e Atividades Biológicas de *Eleutherine plicata* Herb.**- 2012. 110 fls Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, 2012

BOYLE-VAVRA, S.; LABISCHINSKI, H.; EBERT, C.C.; EHLERT, K.; DAUM R.S. A spectrum of changes occurs in peptidoglycn composition of glycopeptide-intermediate clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 280-287, 2001.

BRAGA, L.C; LEITE, A.A.M.; XAVIER, K.G.S.; TAKAHASHI, J.A.; BEMQUERER, M.P.; CARTONE- SOUZA, E. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus* **Can. J. Microbiol/Rev. Can. Microbial**. v. 51, p. 541-547, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 04 de maio de 2006a.

BRASIL. Decreto nº. 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 de junho de 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos- Formulário Terapêutico Nacional: Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS **RENISUS**. Fev 2009. Disponível em: < <http://www.saude.gov.br/bvs> >. Acessado em junho de 2009.

BRATU, S.; QUALE, J.; CEBULAR, S.; HEDDURSHETTI, R. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, New York: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B. **European J. Clin. Microbiol. & Infect. Dis**, v. 24, n. 3, p. 196-201, 2005.

BRITO, A.; LANDAETA, J.; ROLDÁN, Y. Resistencia da *Pseudomonas aeruginosa* a la gentamicina, tobramicina amikacina em Venezuela. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiologia**, v. 20, n. 1, p. 42-45, 2000.

BRUNI, R.; MEDICI, A.; ANDREOTTI, E.; FANTIN, C.; MUZZOLI, M.; DEHESA, M. Chemical composition and biological activities of Isphingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) *Kosterm.* (Lauraceae) flower calices. **Food Chem**, v. 85, p. 415-421, 2004.

BUGNO, A.; NICOLETTI, M.A.; ALMODOVAR, A.R.; PEREIRA, T.C.; AURICCHIO, M.T. Antimicrobial efficacy of *Durcuma zedoaria* extract as assessed by linear regression compared with commercial mouthrinses. **Braz. J. Microbiol**, v. 38, p. 440-445, 2007.

BUSH, K. Characterization of β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 33, p. 259-276, 1989.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALLOU, M.J.A.; MIRANDA, R.C.M.; FEITOSA, T.R.; ARRUDA, V.F.V.; NASCIMENTO, M.S.; GUSMÃO, N.B. Avaliação da atividade antimicrobiana da casca de *Mimosa Caesalpinifolia* Benth (Sabiá). **Scientia Plena**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2012.

CAMELO, S.R.P.; COSTA, R.S.; RIBEIRO-COSTA, R.M.; BARBOSA, W.R.L.; VASCONCELOS, F.; VIEIRA, J.M.S.; SILVA JUNIOR, J.O.C. Phytochemical evaluation and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Vismia guianensis* (aubl.) Choisy. **IJPSR**, v. 2, n. 12, p. 3224-3229, 2011.

CANTON, M. & ONOFRE, S.B. Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 348- 354, 2010.

CAROLIN, R.C. K.; KUBITZKI, J.B. **The Families and Genera of Vascular Plants. Flowering Plants -Dicotyledons (2)**, RHOWER & V. BITTRICH (eds.). Berlin, Ed. Springer Verlag. Portulacaceae. p. 544-555, 1993.

CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; SHUQAIR, N.S.M.; NETTO, E.M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v.5, n.11, p. 26-32, 2007.

CARVALHO, C.A. **Avaliação do potencial antifúngico, antioxidante e citotóxico dos extratos de Jacaranda decurrens cham. (carobinha)**. 2007. 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de Ribeirão Preto, 2007.

CHAMBERS, H.F. Methicillin-resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, p. 781-91, 1997.

CHANDA, S. & RAKHOLIYA, K. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. **Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. v. 1, n. 13, p. 520-529, 2011.

CHATTERJEE, S.K.; BHATTACHARJEE, I.; CHANDRA, G. *In vitro* synergistic effect of doxycycline & ofloxacin in combination with ethanolic leaf extract of *Vangueria spinosa* against four pathogenic bacteria. **Indian Journal of Medicinal Research**, v. 130, p. 475-478, 2009.

CHEN, C.C.; CHEN, Y.P.; HSU, H.Y.; CHEN, Y.L. New flavones from *Bauhinia championii* Benth. **Chem. Pharm. Bull**, v. 32, n. 166-169, 1984.

CHEN-LUNG, H.; PEI-CHUN, L.; YU-CHANG, S. Composition and antimicrobial activities of the leaf essential oil of *Machilus zuihoensis* from Taiwan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n.2, p. 277-283, 2012.

CHUANCHUEN, R.; NARASAKI, C. T.; SCHWIZER, H. P. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. **J. Bacterial**, v. 184, p. 5036-5044, 2002.

CLEELAND, L & SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal infections. In: Lorian VMD. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Baltimore: Williams & Wilkins p. 739-788, 1991.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard-tenth edition M02-A10. v. 29, n. 1. 2009a.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial Susceptibility Testing. Nineteenth Information Supplement. M100-S19. v. 29, n. 3. 2009b.

CORDOVA, S.M.; BENFATTI, C.S.; MAGINA, M.D.A.; GUEDES, A.; CORDOVA, C.M. Análise da atividade antimicrobiana de extratos isolados de plantas nativas da flora brasileira frente a *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. **RBAC**, v. 42, n. 4, p. 241-244, 2010.

CORREIA, A. F.; SEGOVIA, J. F. O.; GONÇALVES, M. C. A.; OLIVEIRA, V. L. DE; SILVEIRA, D.; CARVALHO, J. C. T.; KANZAKI, L. T. B. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 12, p. 369-380, 2008.

COSTA, J.P.R.; ALMEIDA, A.C.; MARTINS, E.R.; RODRIGUES, M.N.; SANTOS, C.A.; MENEZES, I.R. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-pimenta e do extrato bruto seco do barbatimão diante de bactérias isoladas do leite. **Biotemas**, v. 24, n. 4, p. 1-6, 2011.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P. *In vitro* interference of *Hyptis martiusii* Benth. & chlorpromazine against an aminoglycoside-resistant *Escherichia coli*. **Indian J Med Res.**, v. 129, p. 566-568, 2009a.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, n. 13, 2009b.

COUTO R. Bactérias Multirresistentes. In: COUTO RC; PEDROSA TMG; NOGUEIRA JM, editors. **Infecção Hospitalar e Outras Complicações não Infeciosas da Doença**. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2003. P. 557-88

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p.564-582. 1999.

DALMARCO, E.M.; GUIMARÃES, C.L.; GUEDES, A.; CALDERARI, M.T. Análise da atividade antibacteriana (in vitro) de plantas da flora brasileira utilizados pela medicina popular. **Revista Ciências da Saúde**, v. 25, n. 133-142, 2007.

DANTAS, J.P.; BENVINDO, S.F.; DE SOUZA, J.H.; DE ALMEIDA, J.M.; FIGUEIREDO, M.C.; PEQUENO, A.S.; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, P.M.; CATÃO, R.M. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcoólico de *angico* sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. **RBAC**, v. 42, n. 1, p. 33-37, 2010.

DE SMET, P.A.G.M. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs**, v. 54, p. 801-840, 1997.

DEL FIOL, F.S.; LOPES, L.C.; TOLEDO, M.I.; BARBERATO-FILHO, S. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 43, n. 1, p. 68-72, 2010.

DI STASI, L.C. & HURAMA-LIMA, C.A. Plantas **Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2ª ed. São Paulo: Editora UNESP, 2002.

DIJPA, C.D.; DELMÉE, M.; QUETIN-LECLERC, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (*Myrtaceae*). **Journ al of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 307-313, 2000.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **MultiCiências**, v.7, 2006.

ELBASHITI, T.A.; ELMANAMA, A.A.; MASAD, A.A. Antibacterial and synergistic effects of some Palestinian plant extract on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Funcional Plant Science and Biotechnology**, v. 5, n. 5, p. 57-62, 2011.

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

FABRICANT, D.S. & FARNSWORTH, N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 1, p. 69-75, 2001.

FABRY, W.; OKEMO, P.O.; ANSORG, R. Antibacterial activity of East African medicinal plants. **J Ethnopharmacol**, v. 60, p. 79-84, 1998.

FANKAM, A.G.; KUETE, V.; VOUEKENG, I.K.; KUIETE, J.R.; PAGES, J-M. Antibacterial activities of selected Cameroonian spices and their synergistic effects with antibiotics against multidrug-resistant phenotypes. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 104, 2011.

FARNSWORTH, N. R. **Ethnobotany and the search for new drug**. Wiley, 1994.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES S.M.R.; Plantas utilizadas na Medicina popular brasileira com potencial antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 369-394, 2006.

FERNANDES, T.G.; MESQUITA, A.R.C.; RANDAU, K.P.; FRANCHITTI, A.A.; XIMENES, E.A. *In vitro* synergistic effect of *Psidium guineense* (Swartz) in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **The Scientific World Journal**, v. 1, p-1-7, 2012.

FERRAREZE, M.V.G.; LEOPOLDO, V.C.; ANDRADE, D.; SILVA, M.F.I.; HAAS, V.J. Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among patients from an intensive care unit: persistent challenge? **Acta Paul. Enferm**, v. 20, n. 1, p. 7-11, 2006.

FIGUEIREDO, D.Q.; CASTRO, L.F.S.; SANTOS, K.R.N.; TEIXEIRA, L.M.; MONDINI, S.S.B. Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 45, n. 3, p. 177-184, 2009.

FLEMING, A. 1945. Penicillin. Nobel Prize Lecture. Disponível em http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.pdf. Acesso em 30/07/2012.

FLORÃO, A. **Avaliação de atividades biológicas de óleos essenciais de quatro espécies de *baccharis*, Asteraceae**. 2006. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). – Universidade Federal do Paraná, 2006.

FLUEGGE, K.; ADAMS, B.; LUETKE VOLKSBECK, U.; SERR, A.; HENNEKE, P.; BERNER, R. Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a South Western region of Germany. **European journal of pediatrics**, v. 165, n. 10, p. 688-690, 2006.

FREBOURG, N.B.; CAULIEZ, B.; LEMELAND, J.F. et al. Evidence for nasal carriage of methicillin-resistant Staphylococci colonizing intravascular devices. **J. Clin. Microbiol**, v. 37, p. 1182-1185, 1999.

GALES, A. C.; MENEZES, L.C.; SILBERT, S.; SADER, H.S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem- resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 52, p. 699-702, 2003.

GALES, A.C; TORRES, P.L; VILARINHO, D.S.O; MELO, R.S, SILVA, C.F.L; CEREDA, R.F. Carbapenem-resistance *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in an intensive care unit of a teaching hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 8, n. 4, p. 267-271. 2004.

GE, C.; WEI, Z.; JIANG, Y.; SHEN, P.; YU, Y.; LI, L.. Identification of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 3, p. 1-2, 2011.

GUR, S.; TURGUT-BALIK, D.; GUR, N. Antimicrobial activities and some fatty acids of turmeric, ginger root and linseed used in the treatment of infectious diseases. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 2, p. 439-442, 2006.

HABBAL, O.; HASSON, S.S.; EL-HAG, A.H.; AL-MAHROOQI, Z.; AL-HASHMI, N.; AL-BIMANI, Z.; AL-BALUSHI, M.S.; AL-JABRI, A.A. Antibacterial activity of *Lawsonia inermis* linn (Henna) against *Pseudomonas aeruginosa*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, p. 173-176, 2011.

HALBERSTEIN, R.A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, v.15, p. 680-699, 2005.

HANBERGER, H.; DIEKEMA, D.; FLUIT, A.; JONES, R.; STRUELENS, M.; SPENCER, R.; WOLFF, M Surveillance of antibiotic resistance in european ICUs. **J. Hosp.Infect**, v. 48, p. 161-176, 2001.

HIRAMATSU, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 40, p. 135-6, 1997.

HIRAMATSU, K. Vancomycin resistance in *Staphylococci*. **Drug Resistance Updates**, v. 1, p. 135-50, 1998.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HORIUCHI, K.; SHIOTA, S.; KURODA, T.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; TSUCHIYA, T. Potentiation of Antimicrobial Activity of Aminoglycosides by Carnosol from *Salvia officinalis*. **Biol. Pharm. Bull**, v. 30, n. 2, p. 287-290, 2007.

HUSSIN, W.W. & EL-SAYED, W.M. Synergic interactions between selected botanical extracts and tetracycline against Gram positive and Gram positive bacteria. **Journal of Biological Science**, v. 11, n. 7, p. 433-441, 2011.

IFESAN, B.O.T.; IBRAHIM, D.; VORAVUTHIKUNCHAI, V.P. Antimicrobial activity of crude ethanolic extract from *Eleutherine Americana*. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 8, n. (3-4), p. 1233-1236, 2010.

JACOBS, M.R.; GOOD, C.E.; BEALL, B.; BAJAKSOUZIAN, S.; WINDAU, A.R.; WHITNEY, C.G. Changes in serotypes and antimicrobial susceptibility of invasive *Streptococcus pneumoniae* strains in cleveland: a Quarter Century of Experience. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 982-990. 2008.

JÁCOME, R.L.R.P.; OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S.; WAGNER, H. Estudo químico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. ("Pau-pereira"). **Quim. Nova**, v. 27, p. 897-900, 2004.

JÁCOME, R.L.R.P.; SOUZA, R.A.; OLIVEIRA, A.B. Comparação cromatográfica entre o extrato de *Aspidosperma parvifolium* e o fitoterápico "Pau-pereira". **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 13, p. 39-41, 2003.

JARVIS, W.R. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, p. 493- 501, 1999.

JEONG, H.; LEE, J.; CHOI, B.; SEO, K.; PARK, S.; KIM, Y.; BAEK, K.; LEE, K.; RHEE, D. Epidemiology Community-Associated Antimicrobial-Resistant *Staphylococcus aureus* in Seoul, Korea (2003): Pervasiveness of Multidrug Resistant SCCmec-Typell Methicillin-Resistant *S. aureus*. **Microbial Drug Resistance**. v. 13 n. 3, p. 178-185, 2007.

JEVONS, M.P. "Celbenin"-resistant Staphylococci. **British Medical Journal**, v. 1, n. 5219, p. 124-125, 1961.

KELMANSON, J.E.; JAGER, A.K.; VAN STADEN, J. Zulu medicinal plants with antibacterial activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 69, p. 241–246. 2000.

KHAN, R.; ISLAM, B.; AKRAM, M.; SHAKIL, S.; AHMAD, S.A.; ALI, S.M., SIDDIQUI M.; KHAN, A.U. Antimicrobial Activity of Five Herbal Extracts Against Multi Drug Resistant (MDR) Strains of Bacteria and Fungus of Clinical Origin. **Molecules**, v. 14, p. 586-597, 2009.

KIM, E.S., SEUNG-IL, J.; JUNG-HOON, K.; CHANNY, P.; SHIN-MOO, K.; JIN-KYUNG. K.; KANG-MIN, L.; SANG-HEON, L.; HONGSEOB, S.; RAKIL, P. Synergistic effects of the combination of 20-Hydroxyecdysone with ampicillin and gentamicin against methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 19, n. 12, p. 1576–1581, 2009.

KUETE, V.; POUMALE, H.M.; GUEDEM, A.N.; SHIONO, Y.; RANDRIANASOLO, R.; NGADJUI, B.T. Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of the methanol extract and compounds from *Thecacoris annobonae* (Euphorbiaceae). **S. Afr. J. Bot.**, v. 76, p. 536-542, 2010.

KUMAR, A.S.; VENKATESHWARAN, K.; VANITH, J.; SARAVANAN, V. S.; GANESH, M.; VASUDEVAN, M.; SIVAKUMAR, T. Synergistic activity of methanolic extract of *Thespesia populnea* (Malvaceae) flowers with oxytetracycline. **Bangladesh J. Pharmacol.**, v. 4, p. 13-6, 2009.

LEHMAN, D.C. & THOMAS, J.G. Biofilms: Architects of disease. Textbook on diagnostic microbiology. 3rt ed. St Louis: Saunders **Elsevier**. p. 884-95, 2007.

LEITE, G.B. **Análise de portadores assintomáticos de *Staphylococcus aureus* no Hospital Universitário de Brasília**. 2008. 101f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Universidade de Brasília, 2008.

LEVY, S.B. Antibiotic resistance – the problem intensifies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1446-1450, 2005.

LHPA. 2007. Antimicrobial resistance in England, Wales and Northern Ireland, 2006. **LHPA report.** Disponível em http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb_C/1216798080469. Acesso em 10/02/010.

LI, X.Z.; LIVERMORE, D. M.; NIKAIDO, H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 38, p. 1732-1741, 1994.

LIMA, M.R.F.; LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; ANDRADE, M.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; GENET, J.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, p. 137-147, 2006.

LIN, J.; OPOKU, A.R.; GEHEEB-KELLER, M.; HUTCHINGS, A.D.; TERBLANCHE, S.E.; JAGER, A.K.; VAN STADEN, J. Preliminary Screening of Some Tradicional Zulu Medicinal Plants for Anti-Inflammatory and anti-microbial activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, n. 267-274, 1999.

LIVERMORE, D.M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **J. Antimicrob Chemotherapy**, v. 47, p. 247-250, 2001.

LÔBO, K.M.S.; ATHAYDE, A.C.R.; SILVA, A.M.A.; RODRIGUES, F.F.G.; LÔBO, I.S.; BEZERRA, D.A.C.; COSTA, J.G.M. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v. 12, n. 2, p. 227-233, 2010.

LORENZI, H. Árvores brasileiras. **Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas no Brasil**, Ed. Plantarum: São Paulo, p.24. 1992.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: **manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum. v. 2, 368 p, 1998.

LORENZI, H; MATOS, F.JA> **Plantas medicinais do Brasil – Nativas e Exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarium de Estudo da Flora LTDa. p. 233-234, 2002.

LOW, D. E. & NADLER, H.L. A review of in-vitro antibacterial activity of quinupristin/dalfopristin against methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 39. N. (Suppl. A), p. 53-58, 1997.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. **N. Engl. J. Med**, v. 339, p. 520-32, 1998.

LUSTOSA, A. K. M. F. **Avaliação do potencial farmacológico da manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de forma farmacêutica de uso tópico com ela desenvolvida** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). 2012. 125p. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012.

LUZ NETTO Jr., N. **Memento terapêutico fitoterápico do Hospital das Forças Armadas**. Brasília: EGGCF, 1998. 15 p.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MALHEIROS, L.C.S. **Isoleuterol e Isoleuterina: Potenciais marcadores químicos da tintura de *Eleutherine plicata* Herb (Iridaceae) e atividades microbiológicas e antioxidantes**. 2008. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Pará, 2008.

MARRA, R.A.; BAR, K.; BEARMAN, G.M.L.; WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. Systemic inflammatory response syndrome in adult patients with nosocomial blood of infection due to *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of infection**, v. 53, p. 30-35, 2006.

MARTINS, S.T.; MOREIRA, M.; FURTADO, G.H.C.; MARINO, C.G.J.; MACHADO, F.R.; WEY, B.S.; MEDEIROS, E.A.S. Application of control measures for infections caused by multi-resistant gram-negative bacteria in intensive care unit patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 331-334, 2004.

MELO, M.A.C.; MONTEIRO, R.C.S.; VIEIRA, A.B.R.; BRAZÃO M. A. B.; VIEIRA, J.M.V. Bactérias Isoladas de Ponta de cateter venoso central e suscetibilidade antimicrobiana em um hospital público de Belém-PA. **RBAC**, v. 39, n. 2, p. 115-118, 2007.

MENDES, L.P.M.; MACIEL, K.M.; VIEIRA, A.B.R.; MENDONÇA, L.C.V.; SILVA, R.M.F.; ROLIM NETO, P.J.; BARBOSA, W.L.R.; VIEIRA, J.M.S. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Ver. Ciênc. Farm. Básica Apl**, v. 32, n. 1, p. 121-125, 2011.

MENEGOTTO, F.R. & PICOLI, S.U. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **Ver. Bras. Anal Clin.**, v. 39, n. 2, p. 147-50, 2007.

MENEZES, T.O.A.; ALVES, A.C.B.A.; VIEIRA, J.M.S.; MENEZES, S.A.F.; ALVES, B.P.; MENDONÇA, L.C.V. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n. 3, p. 184-91, 2009.

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, p. 316-320, 2005.

MINGEOT-LECLERCQ, M.P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P.M. Aminoglycosides: activity and resistance. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 43, p. 727-737, 1999.

MOERMAN, D.E. The medicinal flora of native North America: an analysis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 31, p. 1-42, 1991.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A.F.; ASENSI, M.D.; PEIRANO, G.; GALES, A.C. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 1, p. 333-4, 2009.

MOORE, N.M. & FLAWS, M.L. [Antimicrobial resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*](#). **Clin. Lab. Sci.**, v. 24, n. 1, p. 47-51, 2011.

MOREIRA, M.R. & GONTIJO FILHO, P.P. Relationship between antibiotic consumption, oropharyngeal colonization, and ventilator-associated pneumonia by *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit of a Brazilian teaching hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 106-111, 2012.

MORS, W.B.; RIZZIN, I C.T.; PEREIRA, N.A. Medicinal Plants of Brazil. Reference Publications, **Inc. Algonac**, Michigan, 2000.

[MULYANINGSIH, S.](#); [SPORER, F.](#); [REICHLING, J.](#); [WINK, M.](#) Antibacterial activity of essential oils from Eucalyptus and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. **Pharm. Biol.**, v. 49, n. 9, p. 893-9, 2011.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant Bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.

NASCIMENTO, M.S.; VIEIRA, J.M.S.; MALHEIROS, L.C.S.; J. O. C. SILVA JÚNIOR, J.O.C.; L. C. S. RODRIGUES, L.C.S.; BARBOSA, W.L.R. Characterisation of isoeleutherine in aqueous extract of *Eleutherine plicata* herb, iridaceae, active against *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* in-vitro. **IJPSR**, v. 3, n. 4, p. 1096-1100, 2012.

NEGI, B.S. & DAVE, B.P. Evaluation of *in vitro* antimicrobial activity from the leaves extract of *Cassia fistula* Linn. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 4, p. 557-564, 2010.

NGWOKE, K.G.; ODIMEGWU, D.C.; CHARLES O. ESIMONE, C.C. Antimicrobial natural products. In: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. A. Méndez-Vilas (Ed.). **FORMATEX. Microbiology Series** Nº 3. v. 2, n. 3, p.1011-1026, 2011.

NOSTRO, A.; BLANCO, A.R.; CANNATELLI, M.A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A.S.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 2, p. 191–195, 2004.

NOVAIS, T.S.; COSTA J.F.O.; DAVID, J.P.L.; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P. FRANÇA F.; GIULIETTI, A.M.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 13, n. (Supl. 2), 2003.

NWEZE, E.I. & EZE, E.E. Justification for the use of *Ocimum gratissimum* L in herbal medicine and its interaction with disc antibiotics. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, n. 37, p. 1-6, 2009.

ODUNBAKU, O.A.; ILUSANYA, O.A.; AKASORO, K.S. Antibacterial activity of ethanolic leaf extract of *Ficus exasperata* on *Escherichia coli* and *Staphylococcus albus*. **Scientific Research and Essay**, v. 3, p. 562-564, 2008.

OLIVEIRA G.A.; LEVY, C.E.; MAMIZUKA, E.M. Estudo do perfil de resistência de 626 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de 25 hospitais brasileiros entre setembro de 1995 e junho de 1997. **J. Bras. Pat**, v. 36, p. 147-56, 2000.

OLIVEIRA, G.A.; OKADA, S.S.; GUENTA, R.S.; MAMIZUKA, E.M. Avaliação da tolerância à vancomicina em 395 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 37, n. 4, 2001.

OLIVEIRA, S.M.S.; FALCAO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; COSTA, M.J.; DINIZ, M.F.M. Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by extract of mango (*Mangifera indica*) peel. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, p. 190-193, 2011.

OPLUSTIL, C.P.; ZOCCOLI, C.M.; TOBOUTI, N.R. et al. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. São Paulo: Sarvier. 3ª. Ed. V. 1. 544p. 2010.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SAÚDE (OMS). Estratégias de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. **Genebra 2002. 67p. <Disponível em: http://www.opas.org.br/medicamentos/site/UploadArq/trm_strat_spam.pdf>**. Acesso em junho 2010.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PADOVESE, M.C.; ASSIS, D.B.; FREIRE, M.P.; MADALOSSO, G.; FERREIRA, S.A.; VALENTE, M.G.; FORTALEZA, C.M. Surveillance programme for Healthcare Associated Infections in the State of Sao Paulo, Brazil. Implementation and first three years' results. **J Hosp Infect**, v. 76, p. 311-315, 2010.

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

PAREKH, J.; CHANDA, S.V. *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. **Turk J. Biol.**, v. 31, p. 53-58, 2007.

PATEL, D. & MADAN, I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Multidrug Resistant Tuberculosis: Part 1. **Occupational Medicine**, v. 50, n. 6, p. 392-394, 2000.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 53, n. 6, p. 2702, 2009.

PEIRANO, G.; SEKI, L.M.; VAL PASSOS, V.L.; PINTO, M.C.; GUERRA, L.R.; ASENSI, M.D. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 63, n. 2, p. 265-8.

PELLEGRINO, F. L., TEIXEIRA, L. M.; CARVALHO, G., ARANHA NOUER, S.; PINTO DE OLIVEIRA, M.; MELLO SAMPAIO, J. L.; D'AVILAS FREITAS, A.; FERREIRA, A. L.; AMORIM, L.; RILEY, L. W. AND B. M. MOREIRA. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 7, p. 2420-4, 2002.

PEREIRA, M.M.; JÁCOME, R.L.R.P.; ALCÂNTARA, A.F.C.; ALVES, R.B.; RASLAN, D.S. alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (apocynaceae). **Revista Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 970-983, jul./ago. 2007.

PINTO, L.N. **Plantas medicinais utilizadas por comunidades do município de Igarapé Miri-Pará. Etnofarmácia do município de Igarapé Miri. 2008.** 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2008.

PIO, C.M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Brasília: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. DF, vol. I 747 pp. 1984.

POIREL, L.; MAGALHAES, M.; LOPES, M.; NORDMANN, P. Molecular analysis of metallo-beta-lactamase gene bla (SPM-1)-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 4, p. 1406-1409, 2004.

POIREL, L.; COLLET, L.; NORDMANN, P. Carbapenem-hydrolyzing metallo-β-lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 6, n. 1, p. 84-5, 2000.

POIREL, L.C.; FRENEAUX, C.; BERNABEU, S.; NORDMANN, P. Global spread of New Delhi metallo-β-lactamase 1. **Lancet Infect. Dis**, v. 10, p. 597-602, 2010.

POOLE, K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 49, p. 479-487, 2005.

PORFÍRIO, Z.; MELO FILHO, G.C.; ALVINO, V.; LIMA, M.R.F.; SANT'ANA, A.E.G. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., *Lythraceae*, frente a bactérias multirresistentes de origem hospitalar. **Ver. Bras. Farmacogn.**, v. 19, n. 3, p. 785-89, 2009.

PROBST, I.S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012. 102f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 2012.

QUESADA, R.M.B.; CARRARA, F.E.; ROSS, C.; CALIXTO, L.A.; ROGERI, L.M.S.; PELAYO, S. Culturas de ponta de cateteres venosos centrais e perfil de resistência aos antimicrobianos de uso clínico. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, n. 1, p. 45-48, 2005.

RABE, T. & VAN STADEN, J. Antimicrobial activity of South African Plants Used for Medicinal Purposes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, p.81-87. 1997.

REYNOLDS, R. Antimicrobial resistance in the UK and Ireland. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 64 n. (Suppl 1), p. 19-23, 2009.

RIBEIRO, A.Q.; MOURA, C.S. Informações sobre plantas medicinais e fitoterápicos no contexto da farmacoterapia. In: **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**, 328 p. 2009.

RIBEIRO, C. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas medicinais da Amazônia**. 2008. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2008.

RIBEIRO, C.M.; SOUZA, G.S.; RIBEIRO, T.A.C.; VIEIRA, A.B.R.; MENDONÇA, C.L.V.; BARBOSA, W.L.R., VIEIRA, J.M.S. Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na medicina popular da Amazônia. **Infarma**, v. 21, n. (1/2), p. 45-49, 2009.

RIBEIRO, J. **Caracterização Microbiológica e Epidemiológica de Amostras Clínicas de *Pseudomona aeruginosa* Resistentes aos Carbapenems Isoladas no Hospital de Base do Distrito Federal, 2001-2002**. 101f. 2004. Tese (Doutorado em Patologia). Universidade de Brasília, 2004.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, p. 124–149, 1987

ROCHA, M.J.; FULGENCIO, S.F.; RABETTI, A.C.; NICOLAU, M.; POLI, A.; SIMÕES, C.M.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Effects of hydroalcoholic extracts of *Portulaca pilosa* and *Achyrocline satureioides* on urinary sodium and potassium excretion. **J. Ethnopharmacol.**, v. 43, n. 3, p. 179-83, 1994.

ROLINSON, G.N. & GEDDES, A.M. The 50th anniversary of the discovery of 6-aminopenicillanic acid (6-APA). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, n. 1, p. 3-8, 2007.

ROSSI, F. & ANDREAZZI, D. **Resistência bacteriana: Interpretando o antibiograma**. Ed. Atheneu. São Paulo, 2005.

RUPP, M.E. & FEY, P.D. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. **Drugs**, v. 63, n. 4, p. 353-65, 2003.

SADER, H. S.; REIS, A.; SILBERT, S.; GALES, A. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. **Clin Microbiol Infect**, v. 11, n. 1, p. 73-6, 2005.

SADOYAMA, G.; GONTIJO FILHO, P.P. Colonizações do sítio de inserção e da ponta do cateter vascular central: Experiência de 96 pacientes no hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. **NewsLab**, v. 54, p. 160-168, 2002.

SALVAT, A, ANTONNACCI, L.; FORTUNATO, R.H, SUAREZ, E.Y.; GODOY, H.M. Screenig of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 297-293, 2001.

SANTOS FILHO, L.; SANTOS, I.B.; ASSIS, A.M.L.; XAVIER, D.E. Determinação da produção de metalo- beta- lactamase em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 4, p. 291-296, 2002.

SANTOS, S.C.; FERREIRA, F.S.; ROSSI-ALVA, J.C.; FERNANDEZ, L.G. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochiliocarpos* (Gomes) Barnaby & Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 215-219, 2007.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.. DUARTE, M. C. T.; REHDER, V.L.G. "Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil," **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275–280, 2004

SCHULTES, R.E. & RAFFAUT, R.E. The Healing Forest. Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazônia. **Dioscorides Press. Portland, OR**, 1990.

SHARMA, L. & KUMAR, A. Antimicrobial activity of *Ageratum conyzoides* Linn. a plant with extra-medicinal value. **Asian Journal of Experimental Sciences**, v. 20, p. 41-46, 2006.

SILVA, H.A.; ABDALLAH, V.O.S.; CARNEIRO, C.L.; GONTIJO FILHO, P.P. Infection and colonization, by *Staphylococcus aureus* in a high risk nursery of a Brazilian teaching hospital. **Braz. J. Infect. Dis**, v. 7, n. 6, p. 381-386, 2003.

SMAC. 1998. The part to least resistance. **UK standing medical advisory committee** report. Disponível em http://www.dh.gov.uk/en/Publicationsandstatistics/Publications/PublicationsPolicyAndGuidance/DH_4009357?ssSourceSiteId=ab. Acesso em 50 de julho de 2012.

SOUSA, E.O; BARRETO, F.S.; RODRIGUES, F.F.G.; COSTA, J.G.M. Atividade antibacteriana e interferência de *Lantana camara* L. e *Lantana montevidensis* (Spreng.) Briq. na resistência de aminoglicosídeos. **R. Bras. Bioci**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2011.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

STEFANOVIĆ, O. & COMIE, L. Synergistic antibacterial interaction between *Melissa officinalis* extracts and antibiotics. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2 n. 01, p. 01-05, 2012.

STOPPA, M. A.; CASEMIRO, L. A; VINHOLIS, A. H. C; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A; MARTINS, C. A. G. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Quim. Nova**, v. 32, n. 2, p. 498-502, 2009.

STRATTON, C.W. Nuances in antimicrobial susceptibility testing for resistant gram-positive organisms. **Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter**, v. 18, p. 57-64, 2000.

SUFFREDINI, I.B.; PACIENCIA, M.L.B.; NEPOMUCENO, D.C.; YOUNES, R.N.; VARELLA A.D. Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts - Clusiaceae. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 3, p. 287-290, 2006.

TACCONELLI, E.; DE ANGELIS, G.; CATALDO, M.A.; MANTENGOLI, E.; SPANU, T.; PAN, A.; CORTI, G.; RADICE, A.; STOLZUOLI. L.; ANTINORI, S.; PARADISI, F.; CAROSI, G.; BERNABEI, R.; ANTONELLI, M.; FADDA, G.; ROSSOLINI, G.M.; CAUDA, R. Antibiotic Usage and Risk of Colonization and Infection with Antibiotic-Resistant Bacteria: a Hospital Population-Based Study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 10, p. 4264 – 4265, 2009.

TADEG, H.; MOHAMMED, E. ASRES.; GEBRE-MARIAN, T. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in treatment of skin disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 168-175, 2005.

TAVARES, W. **Manual de antibioticos e quimioterapicos antiinfeciosos**. 3a ed. Sao Paulo: Atheneu, 2001

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **Am. J. Med.**, 119 (Suppl. 1), p. S3-S10, 2006.

TIWARI, H. K.; SEN, M. R. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. **BMC Infect. Dis.**, v. 6, n. 156, 2006.

TOMASZ, A., H. B. DRUGEON, H. M. DE LENCASTRE, D. JABES, L. MCDUGAL, AND J. BILLE. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 33, p.1869-74, 1989.

URZUA, A.; CAROTI, M.; VASQUEZ, L.; MENDONZA, L.; WILKENS, M.; TOJO, E. Antimicrobial study of the resinous exudate and of Diterpenoids Isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology** v. 46, p. 31- 47, 1998.

VAN DEN BERGHE, D.A. & VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. **Methods Plant Biochem.**, v. 6, p. 47-49, 1991.

VIEIRA, L.S. **Fitoterapia da Amazônia- Manual de Plantas Medicinais**. Ed. Agr. Ceres, São Paulo. 350pp. 1992.

VILLEGAS, M.V; LOLANS, K; CORREA, A; KATTAN, J.N.; LOPEZ J.A & QUINN, J.P. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC- type carbapenem - hydrolyzing beta- lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 51, p. 1553-1555, 2007.

VINAGRE, N.P.L.; FARIAS, C.G.; ARAÚJO, R.J.G.; VIEIRA, J.M.S.; SILVA JÚNIOR, J.O.C.; CORRÊA, A.M. Efetividade clínica de um enxaguatório bucal fitoterápico com tintura padronizada de *Calendula officinalis* na manutenção da saúde periodontal. **Rev. Odontol. UNESP**, v. 40, n. 1, p. 30-35, 2011.

[VINCENT, J. L.](#); [RELLO, J.](#); [MARSHALL, J.](#); [SILVA, E.](#); [ANZUETO, A.](#); [MARTIN, C. D.](#); [MORENO, R.](#); [LIPMAN, J.](#); [GOMERSALL, C.](#); [SAKR, Y.](#); [REINHART, K.](#) International Study of the Prevalence and Outcome of Infection in Intensive Care Units. **JAMA**, v. 302, p. 2323-2329, 2009.

VLIETINCK, A.J.; VAN HOOFF, L.; TOTTE, J.; LASURE, A.; VANDEN BERGHE D.; RWANGABO, P.C.; Mvukiyumwami J Screening of a Hundred Rwandese Medicinal Plants for Antimicrobial and Antiviral properties. **Journal of Ethnopharmacology** v. 46, n. 31-47, 1995.

WALDVOGEL, F.A. New resistance in *Staphylococcus aureus*. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 7, p. 556-557, 1999.

WELTE, T. & PLETZ, M.W. Antimicrobial treatment of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pneumonia: current and future options. **Internat. J. Antimicrob. Agents**, v. 36, p. 391-400, 2010.

WENIGER, B.; HAAG-BERRURIER, M.; ANTON, R. Plants of Haiti used as antifertility agents. **J. Ethnopharmacol.**, v. 6, p. 67-84, 1982.

ZAVASCKI, AP; MACHADO AB; DE OLIVEIRA KR; SUPERTI SV; PILGER DA, CANTARELLI VV; PEREIRA PR; LIEBERKMECHT AC, BARTH AL. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 3, p. 286-288, 2009.

ZHANEL, G.G.; DECORBY, M.; LAING, N.; WESHNOWESKI, B.; VASHISHT, R.; TAILOR, F.; NICHOL, K.A.; WIERZBOWSKI, A.; BAUDRY, P.J.; KARLOWSKY, J.A.; LAGACE-WIENS, P.; WALKTY, A.; MCCRACKEN, M.; MULVEY, M.R.; JOHNSON, J.; HOBAN, D.J. Antimicrobial-Resistant Pathogens in Intensive Care Units in Canada: Results of the Canadian national intensive care unit (CAN-ICU) Study, 2005-2006. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1430-1437, 2008.