



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS – DOUTORADO

Thúlio Antunes de Arruda

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Mentha x villosa Hudson, ROTUNDIFOLONA E ANÁLOGOS
SOBRE MICRORGANISMOS E PLASMÍDIOS DE
RESISTÊNCIA

João Pessoa – PB

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Thúlio Antunes de Arruda

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Mentha x villosa Hudson, ROTUNDIFOLONA E ANÁLOGOS
SOBRE MICRORGANISMOS E PLASMÍDIOS DE
RESISTÊNCIA

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

Orientadores: Prof^a Dr^a Edeltrudes de Oliveira Lima

Prof^o Dr. José Maria Barbosa Filho

Co-orientadora: Prof^a Dr^a M^a do Socorro Vieira Pereira

João Pessoa – PB

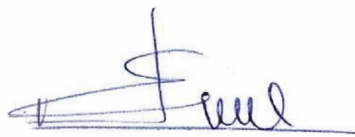
2007

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha x villosa*
Hudson, ROTUNDIFOLONA E ANÁLOGOS SOBRE
MICROORGANISMOS E PLASMÍDIOS DE RESISTÊNCIA

Thúlio Antunes de Arruda

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/CCS/LTF da Universidade Federal da Paraíba. Como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor.

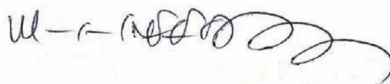
Aprovada por:



Profª Drª Edeltrudes de Oliveira Lima



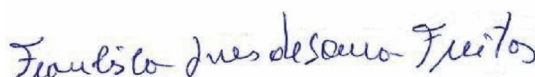
Profº Dr. Alexandre José Alves



Profª Drª Margareth de Fátima F. M. Diniz



Profª Drª Tereza Helena C. de Vasconcelos



Profª Drª Francisca Inês de S. Freitas

Tempos atrás li numa revista, uma frase da cozinheira Leila Kuczynski. Achei-a bela. Acrescento a palavra **medicar**, pois sei que a frase ficará mais justa para esta epígrafe.

**Dos afagos que um ser humano
pode fazer ao outro, dar de comer e
medicar são os mais genuínos.**

Leila Youssef Kuczynski

DEDICATÓRIA

Ao Ser que detém todos os nomes, de onde flui o tangível e o intangível, o visível e o invisível. Fonte de todos os sons e todo o silêncio e que, juntando o amor à forma, nos teceu e nos conectou com todo o universo.

Aos meus parentes que hoje habitam o Encantado. Aos meus pais, irmã, mulher, filhos e amigos: companheiros dessa viagem. E a Lucas, meu sobrinho, pelo amanhã.

À minha primeira professora, Sr^a M^a do Socorro Tavares Meira, por me apresentar o alfabeto. Com ele, construí palavras, frases e histórias. Com as palavras me vesti e cobri meu mundo, meus caminhos.

Ao professor Adonhiran Ribeiro dos Santos, meu professor de História no 1º ano científico, cujo encantamento e paixão por ensinar me inspiraram a ser, um dia, também professor. Sua visão libertária me aproximou do Divino, da Arte.

À professora Dr^a Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, professora da disciplina Farmacodinâmica II, no curso de Farmácia Industrial, pela sua eterna atenção, carinho e dedicação ao me apresentar uma Farmácia que nunca tinha visto.

AGRADECIMENTOS

O sincero reconhecimento às pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Particularmente grato:

À Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, pela orientação e confiança neste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho, pelo apoio e devidas orientações.

À professora Dr^a Maria do Socorro Vieira Pereira, pela contribuição, muito obrigada.

Aos Colaboradores deste trabalho, Xirley P. Nunes pela extração do óleo essencial, Prof^o Dr. Damião P. de Sousa pela síntese dos compostos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, com a bolsa de estudos e o custeio do doutorado, através do Programa de Qualificação Institucional – PQI.

À Profa. Dra. Bagnólia de Araújo Costa, Coordenadora do PQI/ UFPB, pelo incentivo, apoio, disponibilidade e principalmente, pelos seus ensinamentos tão enriquecedores durante a minha estada nesta instituição.

À Prof^a Dr^a Lindomar Farias Belém, Coordenadora PQI/ UEPB, pela amizade, apoio e competência nos relacionamentos inter-institucionais e com a CAPES.

Aos amigos e parceiros do PQI/UEPB, Raïssa, Alessandra, Josimar e Vanda.

À Prof^a Dr^a Raïssa Mayer Ramalho Catão, pela insistência em fazer acontecer o PQI/UEPB. Pelos ensinamentos na área de microbiologia, sem os quais teria sido mais difícil chegar até aqui.

A todos os demais professores, colegas e funcionários do programa de doutorado do LTF.

Ao Laboratório DIAGNOSE, na pessoa da prof^a Raïssa Mayer Ramalho Catão.

Aos professores e funcionários da Pró-Reitoria de Pós-graduação da UEPB. A todos os professores e funcionários do Laboratório de Análises Clínicas – LAC/ UEPB, onde funciona o laboratório de pesquisa em microbiologia do PQI/UEPB, meu agradecimento.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE QUADROS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE GRÁFICOS.....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT.....	XVIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivo Geral	10
2.2. Objetivos específicos	10
3. REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1. Generalidades sobre microrganismos	12
3.2. Patogênese microbiana	14
3.2.1. Gênero <i>Staphylococcus</i>	15
3.2.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	16
3.2.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Metacilina – MRSA	19
3.2.2. Gênero <i>Escherichia</i>	20
3.2.2.1. <i>Escherichia coli</i>	20
3.2.3. Gênero <i>Pseudomonas</i>	22
3.2.3.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
3.2.4. Fungos leveduriformes	24
3.2.4.1. Gênero <i>Candida</i>	26
3.2.4.1.1. <i>Candida albicans</i>	26
3.3. Antimicrobianos	28
3.3.1. Mecanismo de ação de agentes antimicrobianos	29
3.3.1.1. Antibacterianos	29
3.3.1.1.1. Antibacterianos que atuam na parede	29
3.3.1.1.2. Antibióticos que atuam nos ribossomos	31

3.3.1.1.3. Antibacterianos que atuam no DNA	32
3.3.2. Mecanismo de ação de agentes antifúngicos	32
3.3.2.1. Fármacos que afetam a membrana celular	33
3.3.2.1.1. Derivados poliênicos	33
3.3.2.1.2. Derivados azólicos	34
3.3.2.2. Fármacos que atuam intracelularmente	34
3.4. Resistência aos antimicrobianos	35
3.4.1. Tipos de resistência	37
3.4.1.1. Natural ou intrínseca	37
3.4.1.2. Resistência adquirida	37
3.4.2. Resistência bacteriana	38
3.4.2.1. Mecanismos genéticos da resistência bacteriana	38
3.4.2.1.1. Mecanismos mediados por plasmídios	39
3.4.2.1.2. Mecanismos mediados por transposons	41
3.4.2.2. Mecanismos bioquímicos da resistência bacteriana	42
3.4.2.2.1. Resistência aos β -lactâmicos	42
3.4.2.2.2. Resistência a aminoglicosídeos	44
3.4.2.2.3. Resistência às fluorquinolonas	45
3.4.3. Resistência aos antifúngicos	45
3.4.3.1. Resistência antifúngica em fungos filamentosos e leveduras ..	46
3.5. Generalidades sobre o uso de plantas medicinais	48
3.5.1. Aspectos botânicos	49
3.5.2. Sinonímia	51
3.5.3. Descrição e propagação	52
3.6. Aspectos etnobotânicos	52
3.7. Aspectos fitoquímicos e atividade biológica da <i>Mentha x villosa</i> Hudson	52
3.8. Considerações sobre óleos essenciais	53
3.8.1. Constituintes químicos e atividade biológica do óleo essencial da <i>Mentha x villosa</i> Hudson	59
3.8.1.1. Rotundifolona e seus análogos sintéticos	61
4. MATERIAL E MÉTODOS	64
4.1. Local da pesquisa	65
4.2. Produtos testados	65

4.2.1. Material botânico	65
4.2.2. Processamento do material vegetal	65
4.2.3. Obtenção do óleo essencial de <i>Mentha x villosa</i> Hudson	66
4.2.4. Isolamento da rotundifolona a partir do óleo essencial de <i>Mentha x villosa</i> Hudson	66
4.2.5. Obtenção dos Análogos da rotundifolona	66
4.2.6. Preparação dos produtos	67
4.3. Substâncias	67
4.4. Espécies microbianas	67
4.4.1. Isolamento e identificação de microrganismos	68
4.4.2. Preparo da suspensão microbiana	69
4.5. Meios de cultura	69
4.6. Metodologia	70
4.6.1. Determinação da atividade antimicrobiana – <i>screening</i>	70
4.6.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	71
4.6.3. Determinação da cinética bacteriana	72
4.6.4. Determinação da cinética fúngica	74
4.6.5. Determinação da caracterização fenotípica dos padrões de resistência aos antimicrobianos	76
4.6.6. Avaliação da atividade curagênica	76
4.6.7. Avaliação da relação estrutura-atividade	78
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
5.1. Avaliação da atividade antimicrobiana	80
5.2. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	80
5.3. Cinética bacteriana	91
5.4. Cinética fúngica	103
5.5. Eliminação de resistência a drogas pelo óleo essencial de <i>Mentha x villosa</i> Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos	106

6. CONCLUSÕES	111
REFERÊNCIAS	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Micromorfologia de <i>Staphylococcus aureus</i>	16
Figura 2: Micromorfologia <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	19
Figura 3: Micromorfologia <i>Escheria coli</i> a) sem fímbrias e b) com fímbrias	21
Figura 4: Micromorfologia a) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> b) <i>P. aeruginosa</i> realizando conjugação através de <i>pilus</i> sexuais	23
Figura 5: Micromorfologia <i>Candida albicans</i> apresentando células leveduriformes com brotamento	27
Figura 6: Principais alvos dos antibióticos	29
Figura 7: Anel β -lactâmico (vermelho) em molécula de penicilina	30
Figura 8: Modificações genéticas nos alvos dos antibióticos	41
Figura 9: Representação esquemática dos mecanismos de resistência dos fungos frente os azóis	48
Figura 10: Exemplos de espécies de <i>Mentha</i>	50
Figura 11: <i>Mentha spicata</i> L.	51
Figura 12: <i>Mentha suaveolens</i> L.	51
Figura 13: <i>Mentha x villosa</i> Hudson	51
Figura 14: a) Estruturas glandulares secretoras de óleos essenciais em plantas aromáticas b) Estrutura secretora mais comum no gênero <i>Mentha</i>	56
Figura 15. Microfotografia de estruturas glandulares secretoras de óleos essenciais em <i>Mentha piperita</i>	57
Figura 16. Estudos de desenvolvimento da folha de <i>Mentha arvensis</i> em diferentes estágios da glândula secretora de óleo essencial	58
Figura 17: Rotundifolona	61
Figura 18: a) Rotundifolona, b) Epoxi-limoneno, c) Epoxi-pulegona, d) Epoxi-carvona e e) (+)-Pulegona	62
Figura 19. Técnica de difusão em meio sólido, processo cavidade-placa	70

Figura 20. Fluxograma da cinética bacteriana	73
Figura 21. Fluxograma da cinética fungica	75
Figura 22. Fluxograma da avaliação da atividade curagênica	77
Figura 23: Atividade antimicrobiana e avaliação da CIM e CBM do óleo essencial de <i>M. x villosa</i> Hudson (E) e Rotundifolona (D) nas concentrações: “in natura” (1), 200 (2), 100 (3), 50 (4) e 25µl/ mL (5) sobre <i>S. aureus</i> ATCC 25923	87
Figura 24: Cinética bacteriana da cepa <i>S. aureus</i> ATCC 25923 para a rotundifolona nos tempos 2h (A), 4h (B), 6h (C), 8h (D), 10h (E), 24h (F) e 48h (G).....	96

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Exemplos de mecanismos de resistência pelos quais as bactérias resistem aos antibióticos e suas bases genéticas	39
Quadro 2: Compostos encontrados no óleo essencial de <i>M. x villosa</i> Hudson	60
Quadro 3. Comportamento das cepas de <i>S. aureus</i> frente aos antimicrobianos	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>M. x villosa</i> Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos, frente a microrganismos de origem ambulatorial e cepas ATCC	83
Tabela 2. Avaliação da CIM e da CBM do óleo essencial de <i>M. x villosa</i> Hudson, rotundifolona e análogos sintéticos frente à bactérias	89
Tabela 3. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de <i>M. x villosa</i> Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos.....	90
Tabela 4. Cinética bacteriana do óleo essencial de <i>M. x villosa</i> Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre MRSA (171C).....	93
Tabela 5. Cinética bacteriana do óleo essencial de <i>M. x villosa</i> Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	95
Tabela 6. Avaliação da cinética bacteriana do óleo essencial de <i>M. x villosa</i> Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre <i>S. aureus</i> ATCC 25923, após 15 dias de preparação destes, para verificação da estabilidade.....	98
Tabela 7. Avaliação da cinética bacteriana do óleo essencial de <i>M. x villosa</i> Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre <i>S. aureus</i> 122U	100
Tabela 8. Avaliação da cinética bacteriana do óleo essencial de <i>M. x villosa</i> Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre <i>S. aureus</i> 319U	102
Tabela 9. Avaliação da cinética fungica do óleo essencial de <i>M. x villosa</i> Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre <i>C. albicans</i> ATCC 76645	105
Tabela 10. Frequência de cura da marca de resistência plasmidial à Penicilina pelo óleo essencial de <i>M. x villosa</i> Hudson, rotundifolona e análogos sintéticos em linhagens de <i>S. aureus</i>	107
Tabela 11. Frequência de cura da marca de resistência plasmidial à Eritromicina pelo óleo essencial de <i>M. x villosa</i> Hudson, rotundifolona e análogos sintéticos em linhagens de <i>S. aureus</i>	107

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Cinética bacteriana do óleo essencial de <i>M. x villosa</i> Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre MRSA (171C)	93
Gráfico 2. Cinética bacteriana do óleo essencial de <i>M. x villosa</i> Hudson, rotundifolona e análogos sintéticos sobre <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	95
Gráfico 3. Avaliação da cinética bacteriana do óleo essencial de <i>M. x villosa</i> Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre <i>S. aureus</i> ATCC 25923, após 15 dias de preparação destes, para verificação da estabilidade	98
Gráfico 4. Avaliação da cinética bacteriana do óleo essencial de <i>M. x villosa</i> Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre <i>S. aureus</i> 122U	100
Gráfico 5. Avaliação da cinética bacteriana do óleo essencial de <i>M. x villosa</i> Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre <i>S. aureus</i> 319U	102
Gráfico 6. Avaliação da cinética fungica do óleo essencial de <i>M. x villosa</i> Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre a cepa <i>C. albicans</i> ATCC 76645	105

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	- Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida
AMH	- Agar Mueller-Hinton
AS	- Agar Sangue
ASD	- Agar Sabouraud Dextrose
ATCC	- American type Culture Collection
ATP	- Trifosfato de Adenosina
BAB	- Blood Agar Base
BHI	- Brain Heart Infusion
CBM	- Concentração Bactericida Mínima
CCDP	- Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDR	- Bomba de eliminação ativa em fungos
CFM	- Concentração Fungicida Mínima
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
DIANA	- 14- α esterol demetilase
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
EHEC	- <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	- <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva
EPEC	- <i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica
ETEC	- <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica
EXPEC	- <i>Escherichia coli</i> Patogênica Extraintestinal
Gene R	- Gene de Resistência
ISO	- International Standard Organization
AMS	- Agar Manitol Salgado
MDR	- Bomba de eliminação ativa em fungos
MEV	- Microscopia eletrônica por Varredura
MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> Resistentes à Meticilina
MSSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> Sensíveis à Meticilina
NCCLS	- National Committee for Chemical Laboratory Standards

PBP	- Proteínas Fixadoras de Penicilina
RNA	- Ácido Ribonucléico
RTF	- Fator de Transferência de Resistência
SAP	- Proteinases Aspartil Secretadas
SENTRY	- Antimicrobial Surveillance Program
TSA	- Teste de Sensibilidade à Antibióticos
t-RNA	- Transportadores de RNA
WHO	- World Health Organization

RESUMO

ARRUDA, T. A. Atividades biológicas do óleo essencial de *Mentha x villosa* Hudson, rotundifolona e análogos sobre microrganismos e plasmídios de resistência. [Tese-Doutorado]. Programa de Pós-graduação em Sintéticos Bioativos/CCS/LTF, João Pessoa (PB): UFPB, Universidade Federal da Paraíba, 138p., 2007.

A resistência microbiana é um problema emergente tanto para a medicina humana como para animais e o meio ambiente. Apesar da síntese de novos agentes antimicrobianos, linhagens de microrganismos resistentes ou super-resistentes estão a cada dia surgindo e impondo a necessidade da pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos. Neste contexto, estudou-se as atividades biológicas do óleo essencial de *Mentha x villosa* Hudson, rotundifolona e análogos (epoxilimoneno epoxipulegona, epoxicarvona e (+) - pulegona) sobre microrganismos e transferência de plasmídios de resistência, frente a *S.aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *C.albicans* ATCC 76643, duas cepas de *S. aureus* de origem animal, uma cepa MRSA ambulatorial e dez leveduras de origem ambulatorial. Como método, foi utilizada a difusão em placas com meio sólido. A CIM, a CBM, a CFM e a curva de morte foram realizadas frente aos microrganismos sensíveis. Um estudo de estrutura-atividade frente aos microrganismos também foi realizado, bem como uma investigação sobre a atividade curagênica frente à bactérias com perfil plasmidial conhecido. Os resultados mostraram que todos os produtos apresentaram atividade antimicrobiana para *S. aureus* ATCC 25923 e para *C. albicans* ATCC 76645. Nenhum dos produtos apresentou atividade antibacteriana para as cepas de *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, representantes das bactérias Gram negativas. O óleo de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona, epoxilimoneno e (+) - pulegona, apresentaram atividade antimicrobiana semelhante para as cepas de *S. aureus* e as leveduras testadas. Em relação à estrutura-atividade antimicrobiana da rotundifolona e análogos, o epoxi-limoneno e (+)-pulegona apresentaram atividade antimicrobiana similares. Em relação à cinética bacteriana, todos os produtos testados inibiram *S. aureus* ATCC 25923 em tempos diferentes, sendo considerados bactericidas. No entanto, na avaliação da cinética fungica de *C. albicans* ATCC 76645, verificou-se que o óleo de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona, (+)-pulegona e o epoxi-limoneno foram os produtos considerados fungicidas. A epoxi-pulegona e a epoxi-carvona se comportaram como fungistáticos. Verificou-se que os produtos testados não apresentaram efeito frente à cepa *S. aureus* 122U e *S. aureus* 319U para a marca de resistência à penicilina e à eritromicina. Os produtos, mesmo em concentrações reduzidas (1/2 CIM) ainda conseguiram inibir o crescimento visível das cepas ensaiadas, não obtendo porém o efeito curagênico esperado. Os resultados estimulam o aprofundamento das pesquisas em microbiologia bem como para outras atividades biológicas dessas substâncias.

Palavras-chave: Óleo essencial de *Mentha x villosa* Hudson, rotundifolona/ análogos, atividade antimicrobiana

ABSTRACT

ARRUDA, T. A. Atividades biológicas do óleo essencial de *Mentha x villosa* Hudson, rotundifolona e análogos sobre microrganismos e plasmídios de resistência. [Tese-Doutorado]. Programa de Pós-graduação em Sintéticos Bioativos/CCS/LTF, João Pessoa (PB): UFPB, Universidade Federal da Paraíba, 138p., 2007.

The microbial resistance is an emerging problem for the human medicine as for animals and the environment. In spite of the synthesis of new antimicrobial agents, lineages of resistant microorganisms or super-resistant are every day appearing and imposing the need of the research and the development of new drugs. In this context, it was studied the biological activities of the essential oil of *Mentha x villosa* Hudson, rotundifolone and analogues (epoxilimonene epoxipulegone, epoxicarvone e (+) - pulegone) on microorganisms and plasmid of resistance transfer, front *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *C.albicans* ATCC 76643, two strains of *S. aureus* of animal origin, one strain MRSA ambulatorial and ten yeasts of ambulatorial origin. As method, the diffusion was used in plates with solid medium. MIC, MBC, MFC and the death curve were accomplished front to the sensitive microorganisms. A study of structure-activity front to the microorganisms was also accomplished, as well as an investigation about the curagenic activity front to bacteria with plasmidial profile known. The results showed that all of the products presented antimicrobial potential with antibacterial activity for *S. aureus* ATCC 25923 and antifungic activity for *C. albicans* ATCC 76645. None of the products presented antibacterial activity for the strains of *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853, representatives of the Gram negatives bacteria. The essential oil of *M. x villosa* Hudson, rotundifolone, epoxilimonene and (+) - pulegone, are similar in function of the antimicrobial activity for the strains of *S. aureus* and tested yeasts. In relation to the antimicrobial structure-activity of the rotundifolone and analogues, epoxilimonene and (+)-pulegone presented antimicrobial activity similar. In relation to the bacterial kinetics, all of the products inhibited the strain *S. aureus* ATCC 25923 in different times, being considered bactericidal. However, for the evaluation of the fungic kinetics on the strain *C. albicans* ATCC 76645, it was verified that the oil of *M. x villosa* Hudson, rotundifolone, (+)-pulegone and the epoxilimonene, were the products considered fungicides. The epoxipulegone and the epoxicarvone got to interfere in the microbial growth and they behaved as fungistatics. It was verified that the tested products didn't present effect front to the strain of *S. aureus* 122U and *S. aureus* 319U for the resistance mark to the penicillin and the eritromicina. The products, even in reduced concentrations (1/2 CIM) they still got to inhibit the visible growth of the rehearsed strains, not obtaining like this the effect curagenic expected. The results stimulate the researches in microbiology as well as for other biological activities of those substances.

Key-words: Essential oil of *Mentha x villosa* Hudson, rotundifolona / analogues, antimicrobial activity.

1. INTRODUÇÃO

O bem estar da humanidade depende em grande parte da capacidade do homem em controlar a população dos microrganismos, visando prevenir a transmissão de doenças, evitar a decomposição de alimentos e a contaminação da água e do ambiente. Esse controle é possível pela ação de agentes físicos e químicos, que possuem propriedades de matar a célula microbiana, ou de impedir a sua reprodução. De um modo geral, os microrganismos são capazes de sobreviver em ambientes de diversas condições físicas. Entretanto, existe uma limitação da capacidade de sobrevivência de determinado microrganismo, em um meio ambiente desfavorável (CDC, 1997; MOULIN, 2003).

Nas últimas décadas, ocorreram grandes mudanças que atuaram na relação do homem com a natureza: O crescimento demográfico de forma desordenada criou problemas de saneamento básico e de meio ambiente que favoreceram a dispersão dos microrganismos; O desenvolvimento da medicina, que pode interferir na seleção natural, possibilitando maior sobrevivência, porém superlotou hospitais de pacientes debilitados, invadidos por sondas e cateteres, sob ventilação mecânica e imunossuprimidos; Com o surgimento da AIDS, dos transplantes, da radioterapia e da quimioterapia, os microrganismos passaram a ser favorecidos, resultando nas infecções ditas oportunistas; O uso indiscriminado de antibióticos, permitiram o aparecimento de resistência microbiana (CDC, 1997; MOULIN, 2003).

A resistência microbiana é um problema emergente tanto para a medicina humana como para animais e o meio ambiente, exigindo uma mudança na terapia e revisão das estratégias dos procedimentos de testes. A velocidade na qual se desenvolvem os microrganismos está relacionada à sua exposição aos agentes antimicrobianos. Vários são os mecanismos pelos quais os microrganismos podem escapar dos efeitos dos antimicrobianos, entre eles incluem-se: alteração da estrutura molecular de antimicrobianos ou produção de enzimas que inativam o fármaco (por exemplo β -lactamases ou enzimas produtoras de aminoglicosídeos), alteração das proteínas ligantes da penicilina ou outros pontos-alvo nas paredes das células, alvos modificadores da DNA-girase, mutações de permeabilidade e modificações ribossômicas (FILE Jr., 2000).

A resistência a antimicrobianos pode ser transferida entre bactérias pelos plasmídios que são moléculas extracromossomiais de DNA, transposons que são segmentos móveis de DNA ou pelos mecanismos de inserção seqüencial. Os plasmídios transferíveis podem possuir genes que apresentam código de transferência em relação a uma ampla gama de fármacos antimicrobianos. Assim, para os microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, uma única transferência pode resultar na aquisição de vários determinantes de resistência. A resistência mediada por plasmídios, pode ser simples, porém na maioria das vezes é múltipla, tornando a bactéria resistente a dois ou mais antimicrobianos. Isto se deve à presença de genes de resistência para diferentes antimicrobianos, num só plasmídio. A pressão ambiental proveniente do uso excessivo de agentes antimicrobianos evidentemente contribuiu para disseminar os determinantes de resistência. Praticamente todas as bactérias patogênicas adquiriram genes de resistência aos antimicrobianos (TRABULSI et al., 1999; TENOVER, 2000).

Entre as diversas propriedades mediadas pelos plasmídios estão as relacionadas com a resistência aos antibióticos e aos fatores de virulência. Os plasmídios podem ser “curados” ou removidos da célula, depois de serem submetidos a diferentes condições de stress, como mudanças na temperatura e presença de determinados substratos. Uma variedade de compostos tais como corantes de acridina, brometo de etídio, rifampicina, sal de bis-amônio e mais recentemente a tioridazina (uma fenotiazina), assim como antibióticos inibidores da sub-unidade β da DNA-girase, novobiocina e courmermicina tem sido reportada para eliminar plasmídios (PEREIRA, 2000).

Dentre os vários microrganismos frequentemente isolados em infecções humanas que apresentam elevada resistência aos antimicrobianos, destacam-se: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Entretanto, outros organismos considerados emergentes como fungos leveduriformes, também têm sua importância devido à gravidade de seus processos infecciosos, principalmente, quando atingem paciente imunossuprimidos fisiológica ou patologicamente. Entre os fungos leveduriformes, *Candida albicans* é isolada com maior frequência (SCHAECHETER et al., 2002).

Grande parte da resistência que o gênero *Staphylococcus* adquire às drogas é de natureza extracromossômica, isto é, determinada por plasmídios

portadores de genes de resistência. *S. aureus* são patógenos amplamente encontrados na biota humana, podendo causar diversos processos infecciosos e piogênicos. Além disso, podem produzir enfermidades mórbidas distintas por meio da produção de toxinas específicas. Em *S. aureus*, a transferência pode ocorrer por transformação, por transdução e por processos que envolvam contato físico celular como conjugação ou mediada por fagos. Durante o processo evolutivo o *S. aureus* adquiriu resistência a diversos antimicrobianos e, após a década de 60 do século XX, surgiram cepas expressando multiresistência sendo denominadas de *S. aureus* resistente à meticilina ou MRSA, possuindo resistência a todos os β -lactâmicos (REMONATTO et al., 2007).

P. aeruginosa são reconhecidos como organismos ubíquos, de comportamento oportunista, relacionados às várias manifestações clínicas no homem e em animais. No homem, a ocorrência de *P. aeruginosa* está relacionada principalmente a distúrbios entéricos, dermatites pós-queimaduras e osteomielites. Infecções por *P. aeruginosa* assumem alta gravidade em crianças, pacientes com neoplasias, e em anos recentes, em indivíduos acometidos pela síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Paralelamente, o microrganismo é considerado como um dos principais agentes na gênese de infecções hospitalares, apresentando multi-resistência aos antimicrobianos convencionais e mutações que determinam amostras resistentes às drogas derivadas do anel b-lactâmico e das quinolonas (TANAKA et al., 2002).

Do gênero *Escherichia*, a *E. coli* é a mais comumente isolada em espécimes humanos. Ela faz parte da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis. No entanto, certas linhagens podem causar infecções intestinais e extraintestinais, sendo as infecções do trato urinário, bacteremia, meningites em neonatos e doenças diarreicas, as síndromes clínicas mais comuns causadas pela *E. coli*. O desenvolvimento de resistência pela *E. coli* tem colocado em risco a utilização clínica de alguns antimicrobianos, em especial as quinolonas (SILVA; SILVA, 2005).

As doenças causadas por fungos leveduriformes, expressam a variedade de relações que ocorrem entre hospedeiro e microbiota autóctone, isto é, do comensalismo à doença sistêmica fatal. Leveduras do gênero *Candida* são responsáveis pela colonização, por infecções fúngicas superficiais em imunocompetentes e por infecções sistêmicas em imunodeprimidos. *C. albicans* é a

mais freqüente, responsável por 50 a 70% de todas as infecções invasivas pelo gênero *Candida*. Na candidemia, a disseminação pode ocorrer aos múltiplos órgãos resultando na formação de microabscessos, lesões cutâneas embólicas, abscessos renais e hepatoesplênicos, endocardite, meningite, artrite, osteomielite e outros. Com a introdução dos antifúngicos azólicos, especialmente o fluconazol e itraconazol, que possuem boa biodisponibilidade via oral e baixa incidência de efeitos adversos, uma nova era no tratamento das infecções fúngicas se iniciou. Tem sido observado, com maior freqüência, o isolamento de cepas de leveduras com suscetibilidade diminuída ou resistentes aos antifúngicos. É consenso que a resistência ao fármaco depende da interação entre o hospedeiro, o fármaco e o fungo, porém os fatores do paciente são os mais importantes para o surgimento da resistência.

Na tentativa de pesquisar novos compostos capazes de debelar o fenômeno da resistência aos antimicrobianos, atualmente em todo mundo, são aproveitados os recursos naturais com bons resultados. Sob este aspecto, a flora se torna o campo para a investigação de soluções criativas e satisfatórias para a pesquisa de produtos de origem natural. Emergem a todo o momento, trabalhos científicos cujo objeto de estudo é o manejo dos agentes microbianos através de extratos vegetais, produtos naturais isolados e/ou óleos essenciais (SIMÕES; SPITZER, 2003; SILVA; ALBUQUERQUE, 2005).

A utilização de plantas medicinais é tão antiga quanto à própria civilização. Registros dessa prática são encontrados em muitas civilizações, sejam no antigo oriente como nas culturas indígenas das Américas. O emprego de plantas medicinais reforçado pelo conjunto de signos, símbolos e religiosidade, particulares de cada cultura, expandiram as práticas durante o curso da história. Isso levou a uma ampla utilização das plantas por parte da população, com as plantas se tornando não somente matéria prima de utilização direta, mas também ponto de partida para a produção de medicamentos padronizados, tendo no isolamento dos princípios ativos e a síntese a partir destes compostos naturais, o crescente estímulo da indústria farmacêutica (DI STASI, 1996, GOTTLIEB et al., 1996; YAMADA, 1998; VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL; 2005; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

O vegetal possui um mecanismo regulador que o ajuda a desempenhar suas funções vitais. Por meio desse mecanismo - o metabolismo secundário, a

planta consegue elaborar substâncias que desempenharão papéis específicos em casos de stress, crescimento, reprodução, repelência de organismos invasores, atração de insetos ou pássaros necessários para a polinização e adaptação às mudanças fisicoquímicas do meio externo. Encontram-se também entre as novas investigações, as interações que envolvem planta-planta que resultam algumas vezes na produção de compostos aleloquímicos. Estes compostos são responsáveis pela inibição do crescimento de outras espécies vegetais, possivelmente pela competição por melhor território para crescimento, pela escassez de nutrientes do solo, da luz ou de água. Este fenômeno pode ocorrer inclusive, em plantas da mesma espécie (HARBONE; WILIANS, 1995; MACHADO; PALMA; COSTA, 1995; DI STASI, 1996; SALLÉ, 1996; MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Nas últimas décadas, devido ao desenvolvimento de técnicas analíticas de isolamento e elucidação estrutural, conhecem-se cerca de 50.000 metabólitos secundários isolados de plantas, muitos deles sem qualquer avaliação com relação ao seu potencial farmacológico. Esta vertente na pesquisa de novos compostos vegetais com ação antimicrobiana, se apresenta como um modelo ecologicamente correto de produzir substâncias que sejam eficazes e menos agressivas ao meio ambiente e aos homens, contribuindo para uma melhor qualidade de vida, conforme estabelece a Carta Européia do Ambiente e da Saúde, publicada pela OMS em 1989 (DEOUX; DEOUX, 1998).

A utilização de plantas medicinais pela medicina popular, tem sido campo de pesquisa para a obtenção de novas substâncias com potencial terapêutico que possibilitem sua utilização futura, como modelo para a síntese de moléculas de interesse medicinal. A presença de substâncias, nos vegetais, com atividade biológica não é algo novo, mas a pesquisa acentuou-se a pós a descoberta da penicilina (ALVIM et al., 2006; ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2006).

Apesar da síntese de novos agentes antimicrobianos, linhagens de microrganismos resistentes ou super-resistentes estão a cada dia surgindo e impondo a necessidade da pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos. Neste sentido as pesquisas mais recentes envolvem o *screening* de extratos vegetais e óleos essenciais, para desta forma, conhecer os metabólitos secundários com relevante atividade biológica (ALVES et al., 2000; YUNES; PEDROSA; CECHINEL-FILHO, 2001; KNIGHT et al., 2003).

Um estudo de Silveira et al (2006), mostrou que as drogas de última geração podem não estar disponíveis para tratar as novas linhagens de bactérias resistentes que estão surgindo. Novos compostos como o benzoin e a emetina foram isolados de plantas e podem inibir bactérias por um mecanismo diferente dos antibióticos existentes. Machado, Palma e Costa (1995) e Roel (2001) citam que estes ativos podem causar intoxicação na parede celular bacteriana, podendo ter valor no tratamento de microrganismos resistentes.

Dentre os inúmeros grupamentos vegetais estudados, destacamos a família Lamiaceae, cujo gênero *Mentha* abrange cerca de 25 espécies. Este gênero tem sido alvo de pesquisas tanto por suas atividades biológicas como pelo teor de óleos essenciais encontrados (DINIZ et al., 1998; GRAYSON, 2000; MONTE; OLIVEIRA; BRAZ-FILHO, 2001; PEREIRA; SIQUEIRA-JÚNIOR; TAKAKI, 2004).

As informações etnofarmacobotânicas de diversos estudos da medicina popular atestam a utilização de *M. villosa* nas afecções bucais (halitoses, como analgésico e antiinflamatório) (XAVIER et al., 1995), diarreias, cólicas intestinais, cólicas menstruais (OLIVEIRA; SILVA, 1994; MATOS, 1998) e nos tratamentos das amebíases, giardíases, tricomoníases e schistosomíases (SILVEIRA; JORDÃO, 1992; OLIVEIRA; SILVA, 1994; DINIZ et al., 1998; MATOS, 1999; MONTE; OLIVEIRA; BRAZ-FILHO, 2001; AZEVEDO; SILVA, 2006).

Para o óleo essencial da *M. x villosa* Hudson, foi detectado a atividade antibacteriana em testes com *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* e *Aspergillus parasiticus* (GUEDES, 2002; SARTORATTO et al., 2004). Foi observado o envolvimento do componente majoritário do óleo, a rotundifolona, em mecanismos antinociceptivos opióides (LIMA et al., 1994a, LIMA et al., 1994b; ALMEIDA; BARBOSA-FILHO, 1996). Um efeito vaso-relaxante, hipotensor e braquicárdico da rotundifolona foi observado em ratos não anestesiados, normotensos e hipertensos produzidos tanto pelo óleo essencial como pela rotundifolona (LAHLOU et al., 2000; GUEDES, 2002; GUEDES et al., 2002; LAHLOU et al., 2002).

Tendo em vista o potencial terapêutico apresentado pelo óleo essencial da *M. x villosa* Hudson, seu constituinte majoritário rotundifolona e seus análogos sintéticos (epóxi-limoneno, epóxi-pulegona, epóxi-carvona e (+)-pulegona), são objetos desta pesquisa verificar a atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas, leveduras, avaliar a interferência dos produtos sobre a

curva de crescimento microbiano, verificar a relação estrutura-atividade dos produtos e pesquisar aspectos relacionados ao fenômeno da resistência bacteriana.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Submeter o óleo essencial da *Mentha x villosa* Hudson, seu componente majoritário rotundifolona e seus 04 análogos epoxi-limoneno, epoxi-pulegona, epoxi-carvona e (+)-pulegona, à análise de atividade antimicrobiana

2.2. Específicos

- I) Realizar um *Screening* para verificar a atividade antimicrobiana das substâncias.
- II) Avaliar a atividade antimicrobiana através da Concentração Inibitória Mínima – CIM, Concentração Bactericida Mínima – CBM e Concentração Fungicida Mínima – CFM dos produtos ativos.
- III) Avaliar a interferência dos produtos sobre a curva de crescimento microbiano.
- IV) Avaliar a estabilidade dos produtos após 15 dias de preparação das respectivas emulsões.
- V) Verificar a relação estrutura-atividade dos produtos.
- VI) Avaliar a influência dos produtos sobre a eliminação de resistência a antibióticos (cura de plasmídios).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Generalidades sobre microrganismos

O homem só está livre de microrganismos no útero em condições normais de gestação, enquanto as estruturas placentárias permanecem intactas. Quinze dias após o nascimento já está presente na criança a mesma quantidade de microrganismos de um adulto. Estima-se que nos seres humanos o número de células bacterianas que fazem parte da microbiota normal ultrapasse em 10 vezes o número de células do próprio organismo (SANTOS; 2004; SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005).

O uso de substâncias com poder antibacteriano já era utilizado há mais de 2.500 anos quando médicos chineses utilizavam bolores para tratar inflamações e feridas infeccionadas. O homem, ao utilizar os antimicrobianos para a cura, acelerou também o processo natural da evolução dos microrganismos favorecendo o surgimento de linhagens que adquiriram resistência com o passar dos anos, causando inclusive um desequilíbrio na própria flora interna do organismo. A pessoa colonizada com microrganismos resistentes pode ser fonte de contaminação para outros pacientes. Sem dúvida, é impossível pensar em Infecção Hospitalar sem pensar em resistência microbiana. Apesar de avanços em ciência e tecnologia, a doença infecciosa ainda é uma ameaça para a vida humana. A descoberta dos antibióticos no início do século XX, desencadeou uma revolução nos cuidados à saúde: salvaram a vida de milhões, reduziram complicações de enfermidades infecciosas e permitiram o desenvolvimento de procedimentos cirúrgicos complexos, considerados muito perigosos, devido ao risco de infecção pós-operatório. Porém, já na metade do século XX logo após a introdução da penicilina no mercado, os cientistas começaram a notar o aparecimento de uma linhagem bacteriana resistente à penicilina, desde então o problema da resistência microbiana tem sido uma grande preocupação para a saúde pública (SANTOS; 2004; SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005).

Nas bactérias, verificou-se que a espessura e os compostos formadores da parede celular podem afetar a sua virulência. A parede celular bacteriana é uma estrutura rígida que recobre a membrana citoplasmática e confere forma às

bactérias. Ela é constituída por ácido diaminopimérico (DPA), ácido murâmico e ácido teicóico além de aminoácidos, carboidratos e lipídeos. Todos esses compostos estão reunidos para formar substâncias poliméricas complexas que por sua vez estruturam a parede celular. Uma macromolécula complexa denominada peptideoglicano (mucopeptídeo ou mureína) forma a estrutura rígida da parede. Além disso, a parede celular protege a célula, mantém a pressão osmótica intrabacteriana, impedindo o rompimento da célula devido à entrada de água, e funciona como suporte de antígenos somáticos bacterianos. A divisão das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, de acordo com sua resposta à coloração de Gram é decorrente das diferenças na composição e estrutura da parede celular (SANTOS, 2004; SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005).

As bactérias Gram-positivas possuem uma quantidade maior de peptideoglicano em sua parede celular, o que torna a parede dessas bactérias mais espessa e rígida do que a das bactérias Gram-negativas. Composta de proteínas, lipídeos, peptideoglicano e ácidos teicóicos (cadeias de polifosfato com resíduos de ribitol e glicerol), essas bactérias são sensíveis a lisozima e sua parede constitui o local de ação de alguns antibióticos além de apresentar elementos básicos para identificação sorológica (SANTOS, 2004; SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005).

A parede celular das bactérias Gram-negativas é menos espessa e elas são mais complexas do que as Gram positivas por apresentarem uma membrana externa cobrindo a fina camada de peptídeoglicano. A membrana externa é o que distingue as bactérias Gram negativas, servindo como uma barreira seletiva para a entrada e saída de algumas substâncias da célula e podendo ainda causar efeitos tóxicos sérios em animais infectados. A estrutura da membrana externa é composta por fosfolipídios, lipoproteínas e lipopolissacarídeos (LPSs). Os lipopolissacarídeos estão localizados exclusivamente na camada externa da membrana, enquanto que os fosfolipídeos estão presentes quase completamente na camada interna. Os LPSs são compostos por três segmentos ligados covalentemente: (1) lipídeo A, firmemente embebido na membrana; (2) cerne do polissacarídeo, localizado na superfície da membrana; e (3) antígenos O, que são polissacarídeos que se estendem como pêlos a partir da superfície da membrana em direção ao meio circundante. A porção lipídica do LPSs é também conhecida como endotoxina e pode atuar como um veneno, causando febre, diarreia, destruição das células

vermelhas do sangue e um choque potencialmente fatal (SANTOS, 2004; SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005).

Quanto aos fungos, incluídos no reino *Fungi*, são encontrados em vegetais, em animais, no homem, em detritos e em abundância no solo, participando ativamente do ciclo dos elementos. Sua dispersão na natureza é feita por várias vias, principalmente pelo ar atmosférico, através dos ventos (FURLETTI, 2006; LOGUERCIO-LEITE et al, 2006).

Todas as células fúngicas são eucarióticas, isto é, possuem núcleo com membrana nuclear. Os fatores de virulência têm sido pouco estudados. Como possíveis fatores citam-se a variabilidade fenotípica, aderência nos tecidos dos hospedeiros, produção de toxinas e enzimas, a exemplo das proteinases, lipases e fosfolipases. Estas enzimas hidrolíticas extracelulares são importantes na patogenicidade dos fungos, causando danos às células do hospedeiro. A proteinase ácida de *Candida albicans* tem sido investigada como fator de virulência, assim como a fosfolipase. Entretanto, pouco se conhece sobre enzimas como condroitin-sulfatase e hialuronidase nas demais espécies do gênero *Candida* e em outros fungos patogênicos (FURLETTI, 2006; LOGUERCIO-LEITE et al, 2006).

3.2. Patogênese microbiana

Os microrganismos estão em todos os lugares: no solo, na água doce e na água do mar, no fundo do oceano e no ar. Diariamente, comemos, bebemos e respiramos esses microrganismos. Não obstante, apesar de sua aparente presença, raramente os microrganismos invadem, multiplicam-se e produzem infecção em seres humanos. E mesmo quando eles o fazem, a infecção é algumas vezes tão discreta que não produz sintomas. Na realidade, uma quantidade relativamente pequena de microrganismos é capaz de causar doença. Muitos deles vivem normalmente na pele, na boca, nas vias respiratórias, no intestino e nos órgãos genitais (particularmente na vagina). O fato de o microrganismo permanecer como um companheiro inofensivo em seu hospedeiro humano ou invadí-lo e causar doença depende de sua natureza e das defesas do corpo humano (SORIANO et al., 2006).

A compreensão das interações entre um hospedeiro e um microrganismo é essencial para a prevenção e controle eficaz da maioria dos processos infecciosos

em humanos. Em 2003, Casadevall e Pirofski propuseram o termo “damage-response” que seria a resposta ao dano para desenvolver a patogênese microbiana, que se baseia em a) a patogenia microbiana é o resultado da interação entre hospedeiro-microrganismo, b) o resultado patológico no hospedeiro, devido a interação hospedeiro-microrganismo se determina pela quantidade do dano produzida no hospedeiro e c) o dano no hospedeiro resulta de fatores microbianos e da resposta imune do hospedeiro (CASADEVALL; PIROFSKI, 2003a; CASADEVALL; PIROFSKI, 2003b; SORIANO et al., 2006).

A invasão pela maioria dos microrganismos começa quando eles aderem a células do indivíduo. A aderência é um processo muito específico, envolvendo conexões do tipo “chave–fechadura” entre a célula humana e o microrganismo. A permanência do microrganismo próximo do local de invasão ou a sua disseminação a locais distantes depende de fatores como, por exemplo, a produção de toxinas, enzimas ou outras substâncias. Alguns microrganismos que invadem o corpo produzem toxinas, que são venenos que afetam células próximas ou distantes (CASADEVALL; PIROFSKI, 2003b; SORIANO et al., 2006).

A maioria das toxinas contém componentes que se ligam especificamente a moléculas presentes em determinadas células-alvo, onde causam doença. As infecções nas quais as toxinas têm um papel central incluem o tétano, a síndrome do choque tóxico e cólera. Algumas doenças infecciosas são causadas por toxinas produzidas pelos microrganismos fora do corpo como, por exemplo, a intoxicação alimentar causada por *Staphylococcus* spp. (SORIANO et al., 2006).

3.2.1. Gênero *Staphylococcus*

Os *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos que tendem a formar grupamentos semelhantes a cachos de uva. São amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosa de mamíferos e aves. Atualmente, o gênero *Staphylococcus* é formado por cerca de 27 espécies, sendo algumas frequentemente associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista, em seres humanos e animais. São divididos em duas categorias: coagulase positivos e coagulase negativos. Essa classificação é baseada na capacidade de coagular o plasma. Esta propriedade é um importante marcador de patogenicidade (MARTINS, 1999; MACHADO et al., 2001).

As principais espécies de *Staphylococcus* encontradas em seres humanos são *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*. O *S. epidermidis* é encontrado primariamente na pele, possuindo um baixo potencial patogênico, assim como *S. saprophyticus*, que faz parte da microbiota normal da região periuretral do homem e da mulher e da pele (MARTINS, 1999; BREMER et al., 2004).

3.2.1.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é um patógeno em potencial e pode ser encontrado na região da nasofaringe e também nas fossas nasais ou associado a diversas partes do corpo humano e no meio ambiente, incluindo poeira, água, ar, fezes, roupas ou utensílios domésticos (BERETTA, 2004; BREMER et al., 2004). Muitas pessoas saudáveis possuem esta bactéria como parte da população normal dos microrganismos associados à microbiota nasal, garganta, região perianal e pele. A taxa de portadores são varia em diferentes populações, variando de 25 a 30% na população saudável (MARTINS et al., 2002; SANTOS; DARINE, 2002; BREMER et al., 2004; GRUNDMANN et al., 2006).

S. aureus é uma bactéria pertencente à família Micrococcaceae (Figura 1), medindo cerca de 0,5 a 1,0 μm de diâmetro, apresentando suas características morfológicas e tintoriais como cocos Gram positivos e agrupados em tétades ou cachos de uva. São anaeróbios facultativos, não possuem motilidade, não formam esporos e incluem-se entre os cocos de catalase positiva (MARTINS, 1999; BERETTA, 2004).



Figura 1: Micromorfologia de *Staphylococcus aureus* Fonte: http://education.denniskunkel.com/catalog/product_info.php?products_id=1404

O diagnóstico laboratorial dos *S. aureus* é realizado através de bacterioscopia e da análise das características culturais das colônias e da hemólise em meio de cultura como o ágar-sangue. Vários meios seletivos-indicadores, entre os quais se inclui o ágar manitol-salgado, podem ser empregados com a finalidade de isolamento. Para diferenciá-los das outras espécies, é necessário o teste de produção de coagulase (BERETTA, 2004).

O agente mais comum em infecções piogênicas é *S. aureus*. Estas infecções podem se localizar na pele ou em regiões mais profundas. Quando na pele recebem denominações como foliculite, furunculose e impetigo, de acordo com a localização e características da região afetada. Em indivíduos debilitados por doenças crônicas, traumas físicos, queimaduras ou imunossupressão, esses microrganismos podem causar infecções de caráter mais grave. Entre as infecções profundas destacam-se a osteomielite, a bacteremia, a endocardite, a pneumonia e, ocasionalmente, a meningite e a artrite bacteriana (MARTINS, 1999; FREITAS et al., 2003; SANTOS et al., 2003).

Além dessas infecções, *S. aureus* pode causar vários tipos de intoxicações, seja na vigência de um processo infeccioso ou não. A primeira possibilidade pode ser exemplificada pela síndrome da pele escaldada ou doença de Ritter e é caracterizada pelo deslocamento de extensas áreas de epiderme, sendo determinado por uma toxina denominada esfoliatina que é produzida na área da infecção e levada para áreas distantes pela corrente sanguínea. As intoxicações que ocorrem na ausência dos processos infecciosos são de dois tipos: intoxicação alimentar e síndrome do choque tóxico. A primeira é provocada pela ingestão de toxinas previamente formadas no alimento contaminado pelo *S. aureus*. Estas toxinas chamadas enterotoxinas, se comportam como antígenos e são termoestáveis e dessa forma, a intoxicação pode ser veiculada por alimentos cozidos. A síndrome do choque tóxico é atribuída à toxina TSST-1. Nela o paciente é geralmente mulher no período menstrual, sem sinais de infecção estafilocócica. A doença também tem sido registrada em pacientes com infecções de pele, ossos e pulmões. O quadro clínico apresenta febre alta, eritema com descamação na pele, insuficiência renal e outras manifestações (MARTINS, 1999; GRUNDMANN et al., 2006).

As técnicas fenotípicas e moleculares desenvolvidas na atualidade são importantes para estudar a epidemiologia das infecções estafilocócicas. Dessa forma conduzindo a melhor terapêutica para cada caso (FISHBAN et al, 2003; McDOUGAL et al., 2003; BERETTA, 2004).

A patogênese de *S. aureus* ocorre devido a fatores de virulência como toxinas, enzimas e outras proteínas associadas à parede celular mediadas por genes plasmidiais ou cromossomiais que combinados, conduzem à doença (MARTINS, 1999).

S. aureus apresenta alguns componentes de superfície da parede celular como a proteína A, que atua localmente na resistência à fagocitose assim como também produzem várias substâncias extracelulares, que contribuem para sua virulência. Entre as substâncias extracelulares as adesinas que participam na patogênese das infecções causadas por esse microrganismo. As adesinas têm sido bastante estudadas no que diz respeito ao mecanismo de sua adesão às células do organismo, tornando o *S. aureus* mais adaptável ao ambiente (AIRES et al, 2003; LOWY, 2003 ; BERETTA, 2004; SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005).

Embora o *Staphylococcus aureus* possa ser suscetível à ação de várias drogas ativas contra bactérias Gram-positivas tais como penicilinas, cefalosporinas, eritromicina, aminoglicosídeos, tetraciclina e clorafenicol, é também conhecido pela sua elevada capacidade de desenvolver resistência a diversas delas. Portanto, a antibioticoterapia adequada das infecções por *S. aureus* deve ser precedida da escolha da droga com base nos resultados de testes de suscetibilidade. A penicilina é a droga de escolha se a linhagem for sensível. O emprego de meticilina e outras penicilinas semi-sintéticas (tais como a oxacilina, nafcilina e cloxacilina), resistentes à ação das penicilinas, iniciada em 1959, representou uma etapa significativa na terapêutica. Porém a resistência a esses antibióticos foi detectada dois anos após o início da sua utilização. Percebe-se em alguns casos uma boa atuação da vancomicina e da teicoplanina (SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005).

3.2.1.2. *Staphylococcus aureus* Resistente à Metacilina - MRSA

Após a descoberta da penicilina em 1928, Fleming foi também o primeiro a observar a resistência natural de microrganismos aos antibióticos, descrevendo que bactérias do grupo coli-tifóide não eram inibidas pela penicilina. Na década de 40 do séc. XX, a maioria dos *S. aureus* era sensível à penicilina. No fim dos anos 50 do mesmo século, a espécie tinha adquirido resistência a praticamente todos os antibióticos de uso parenteral, incluindo a eritromicina e a tetraciclina. A introdução das penicilinas resistentes a penicilinasas, na década de 60, possibilitou um avanço na terapêutica antiestafilocócica. Com o uso das penicilinas semi-sintéticas, como a meticilina empregada no tratamento de infecções estafilocócicas, surgiram cepas resistentes à meticilina denominadas Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* – MRSA (Figura 2), cujo padrão de resistência se estende a outros antibióticos beta-lactâmicos (FREITAS et al., 2003; SOUZA et al., 2005; GRUNDMANN et al., 2006).

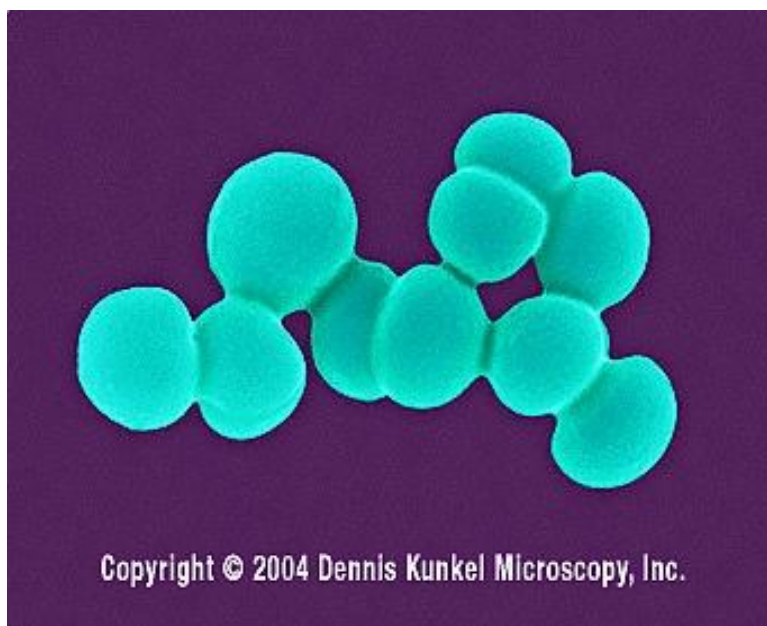


Figura 2: Micromorfologia de *Staphylococcus aureus* MRSA

Fonte: http://education.denniskunkel.com/catalog/product_info.php?products_id=512

No início dos anos 1980, uma nova espécie de MRSA resistente à gentamicina foi encontrada em diversos países incluindo Estados Unidos, Irlanda e Reino Unido. Na Austrália, essa cepa foi encontrada em ambiente hospitalar, sendo

disseminada por profissionais de saúde. Durante os anos 90, só as cepas UK MRSA-3, UK MRSA-15 e UK MRSA-16 eram ainda encontradas e pesquisadas. Dessas, as linhagens MRSA-15 e UK MRSA-16 eram a que apresentavam o comportamento mais dinâmico. Ao mesmo tempo, seis linhagens epidêmicas foram identificadas na Europa Central e meses depois, encontradas em todos os continentes. Daí a importância destes microrganismos em investigações de resistência bacteriana (COOPER et al., 2004; SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005; GRUNDMANN et al., 2006).

Para o tratamento, a droga de escolha é a gentamicina. Novos compostos, tais como a quinupristina – dalbapristina e linezolida têm sido utilizados, sendo que a linezolida é viável na forma de administração oral (PEREIRA, 2000; RIVERON et al, 2003; WICKENS & WADE, 2005; GRUNDMANN et al, 2006).

3.2.2. Gênero *Escherichia*

O gênero *Escherichia* compreende as espécies *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* e *E. vulneris*. Entretanto, a única espécie de maior importância prática é a *E. coli* (CAMPOS & TRABULSI, 1999).

3.2.2.1. *Escherichia coli*

A *E. coli* (Figura 3) é uma bactéria comensal, anaeróbia facultativa, encontrada em maior quantidade no intestino grosso (cerca de 10^{12} bactérias). Este microrganismo coloniza o trato gastrointestinal de recém-nascidos com algumas horas de vida, trazendo para a relação homem-microrganismo, benefícios mútuos (NATARO; KAPER, 1998; SILVA; SILVA, 2005).

Esta espécie compreende um grande número de grupos e tipos sorológicos, identificados por meio de anti-soros preparados contra as três variedades de antígeno que ocorrem na espécie (O, K e H). Nem todas as amostras de *E. coli* provenientes do intestino humano ou de qualquer outro local do organismo, apresentam os três tipos de antígenos ao mesmo tempo. O estudo sorológico de amostras de *E. coli*, utilizando-se todos os soros anti-O, anti-K e anti-H, somente é utilizado quando se procura conhecer a associação de sorogrupos e

sorotipos com determinadas patologias ou com outras condições ecológicas (CAMPOS & TRABULSI, 1999).

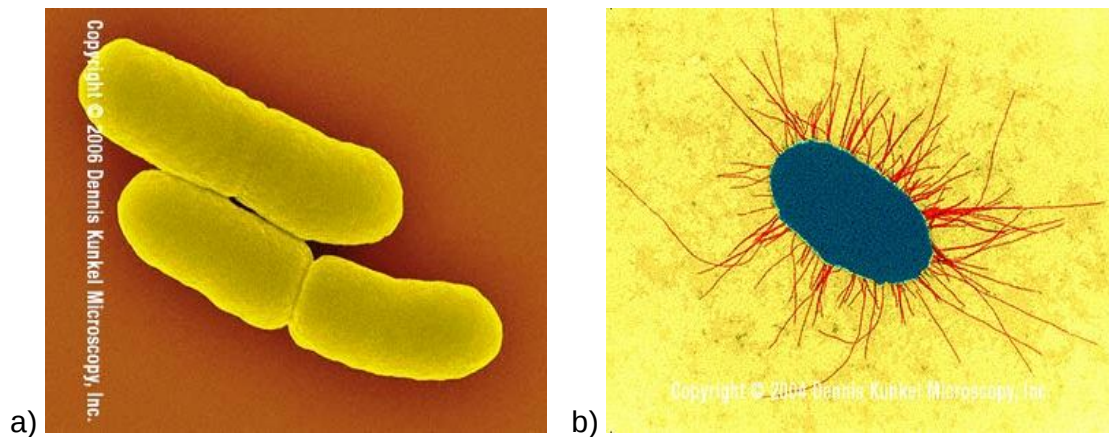


Figura 3: Micromorfologia de *Escheria coli* a) sem fímbrias; b) com fímbrias
 Fontes: http://education.denniskunkel.com/catalog/product_info.php?products_id=125
http://education.denniskunkel.com/catalog/product_info.php?products_id=9120

Hoje são conhecidas variantes de *E. coli* que adquiriram virulência: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* patogênica extraintestinal (EXPEC). A EPEC é importante causadora de diarreia infantil nos países em desenvolvimento e mesmo nos países desenvolvidos continua a ser um problema de saúde pública. Diarréias causadas por EPEC em geral são mais severas do que as causadas por outros patógenos, com prevalência de óbito superior a 30% e podem estar associadas a deficiências nutricionais (NATARO; KAPER, 1998; BALLESTER et al., 2002; SILVA; SILVA, 2005).

A EXPEC causa infecções extra-intestinais por ser encontrada em qualquer órgão ou tecido do corpo humano, além dos intestinos. Sendo originária da microbiota intestinal, a *E. coli* coloniza a mucosa genital e também pode penetrar no sistema urinário. Uma vez nesse sítio, ela adere e coloniza a mucosa urogenital por meio de fímbrias e adesinas. Essa aderência faz com que a bactéria seja capaz de resistir à eliminação pelo fluxo urinário e, assim, colonizar a mucosa urogenital causando uma bacteriúria significativa, geralmente $\geq 10^5$ bactérias/mL. A infecção urinária geralmente se dá por via ascendente, ou seja, a *E. coli* presente nas fezes coloniza a uretra e a bexiga, causando respectivamente uretrite e cistite. Embora a maioria das infecções urinárias seja de natureza aguda e de curta duração, elas

contribuem para uma taxa significativa de morbidade na população (CAMPOS & TRABULSI, 1999; CAMARGO, et al, 2002; ESMERINO, GONÇALVES & SCHELESKY, 2003; STEIN et al, 2004; MENEZES et al, 2005).

Outra infecção atribuída à EXPEC é a meningite do recém-nascido, sendo uma das principais causas. As amostras associadas a esta infecção geralmente transportam o antígeno K1 (80% das vezes), embora possam pertencer a diferentes sorogrupos O. A idade do neonato também pode sugerir a forma de aquisição e o agente etiológico da meningite. Na primeira semana de vida e particularmente nos primeiros dois dias, considera-se fortemente a possibilidade de doença de transmissão vertical causada por *E. coli* (CAMPOS; TRABULSI, 1999; HAUSSEN et al., 2005).

O antimicrobiano a ser utilizado no tratamento deve ser selecionado tendo-se por base não apenas a sensibilidade do agente etiológico, mas, também a concentração que atinge no local da infecção. As opções terapêuticas para o tratamento das infecções por *E. coli* são a aminopenicilina, cefalosporinas, quinolonas, estreptomicina e/ou cotrimazole. A escolha do antibiótico é feita por testes in vitro de susceptibilidade (CAMPOS; TRABULSI, 1999; HAUSSEN et al., 2005).

3.2.3. Gênero *Pseudomonas*

O gênero *Pseudomonas* compreende mais de 100 espécies de bacilos Gram-negativos, normalmente diferenciados por meio de provas bioquímicas, testes de sensibilidade a antibióticos, formação de pigmentos, número e localização dos flagelos. As espécies relacionadas ao homem são em torno de 25, a maioria sendo raramente encontrada. Na clínica, 90% do material isolado correspondem a *P. aeruginosa*, *P. maltophilia* e *P. cepacia*. A *P. aeruginosa* é a mais freqüente, sendo encontrada em 70% das infecções (TOLEDO & TRABULSI, 1999).

3.2.3.1. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é um bacilo Gram-negativo não-fermentador, medindo 0,5 µm de largura por 1,5 µm de comprimento, possui um flagelo polar, móveis, não apresenta esporos (Figura 4). São bactérias que sobrevivem nos mais variados

ambientes, podendo ser encontrada na água, no solo, nos alimentos, em plantas e colonizando a pele e o intestino de humanos e animais. Clinicamente, têm sido isoladas de feridas, queimaduras e infecções do trato urinário e é prevalente em infecções hospitalares do mundo inteiro (HOLLANDA, 2002; ÁLVAREZ et al., 2005).

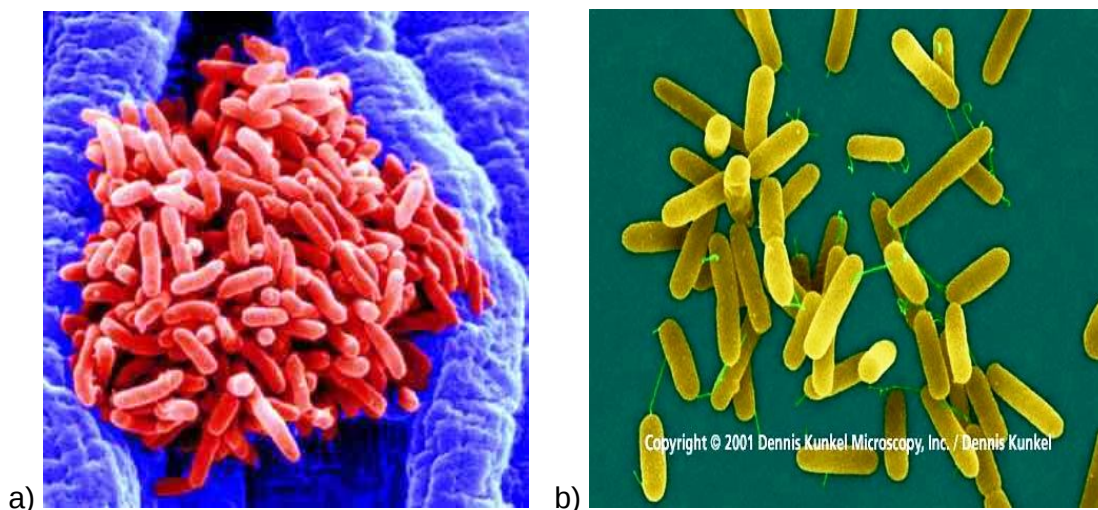


Figura 4: a) Micromorfologia de *P. aeruginosa* b) *P. aeruginosa* realizando conjugação através de *pilus* sexuais.

Fontes: <http://www.arvanitakis.com/en/bio/images/Gallery/pseudomonas1.jpg>
http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/obr/pseudomonas_aeruginosa_1.htm

P. aeruginosa caracteriza-se por sua incapacidade de fermentar os açúcares, embora utilize a glicose por via oxidativa. Seu requerimento nutricional é mínimo e adapta-se a uma variedade de condições físicas. A bactéria produz diversos pigmentos como a piocianina (azul), pioverdina (amarelo-esverdeado), piorrubina (vermelho) e piomelanina (marrom até preto). Estes pigmentos também podem caracterizar a virulência da cepa (ÁLVAREZ et al, 2005).

É considerada uma bactéria oportunista, sendo de alto risco para pacientes debilitados, imunodeprimidos ou em unidades de terapia intensiva. Um estudo de vigilância antimicrobiana (SENTRY – Antimicrobial Surveillance Program) realizado entre 1997 e 1999, constatou que a prevalência de infecção por *P. aeruginosa* foi maior na América Latina e Ásia do que na Europa, Estados Unidos e Canadá (GALES et al., 2001). As razões para este fato podem estar relacionadas à falhas nas práticas do controle de infecção hospitalar (MARTINS, 2005). Um dos maiores problemas dessas infecções tem sido a efetividade da terapia, visto que a *P. aeruginosa* pode expressar diversos mecanismos de resistência. Muitos dos

mecanismos estão relacionados à exposição freqüente deste microrganismo aos antimicrobianos, o que é comum no ambiente hospitalar, promovendo a emergência e a disseminação de resistência (PAVIANI et al., 2004).

Trata-se de uma bactéria bastante incomum como causa de infecções adquiridas na comunidade, com notável exceção de osteomielite de pé e otite externa invasiva. Pacientes com AIDS têm sido identificados, nos últimos anos, como um novo grupo de pacientes de risco para infecções adquiridas na comunidade por *P. aeruginosa*. Além dos fatores de virulência, lipossacarídeos, exotoxina A, leucocidina, proteases, fosfolipase e várias outras enzimas, a *P. aeruginosa* produz substâncias que facilitam a colonização e infecção do hospedeiro, tornando-a a bactéria de maior significado clínico entre os bacilos Gram-negativos não-fermentadores (MARTINS, 2005).

As opções terapêuticas para tratamento das infecções por *P. aeruginosa* incluem aminoglicosídeos, fluorquinolonas, penicilinas de amplo espectro, monobactâmicos, cefalosporinas de terceira e quarta geração e carbapanêmicos. Entretanto, um dos grandes problemas no tratamento destas infecções, está no que diz respeito ao alto nível de resistência desta bactéria aos antibióticos (HOLLANDA, 2002; ÁLVAREZ et al., 2005; MARTINS, 2005).

3.2.4. Fungos leveduriformes

Os fungos, os vegetais e os animais divergiram de um ancestral comum há cerca de 01 bilhão de anos. No entanto, quando comparamos plantas e animais, grupo de indivíduos diplóides e de crescimento limitado, aos fungos constata-se o contrário, que estes são em sua maioria, haplóides e capazes de crescimento ilimitado. O reino *Fungi* está delimitado com base em certas características peculiares, que incluem aspectos morfológicos e fisiológicos. Constata-se que a fase vegetativa se apresenta como duas unidades morfológicas básicas, a leveduriforme e a hifal. As células únicas, delimitadas e pequenas, são denominadas leveduriformes. Ao contrário das hifas que são células extremamente polarizadas na forma de tubos que se estendem, continuamente, em suas extremidades (SELITRENNIKOFF, 2001; CARRILLO-MUÑOZ, et al, 2006; LOGUERCIO-LEITE et al., 2006).

As leveduras são fungos oportunistas responsáveis pela maior parte das infecções fúngicas nos seres humanos. Durante as últimas décadas, a incidência de infecções causadas por leveduras em humanos sofreu um grande aumento, especialmente em doentes com o sistema imunitário comprometido. Os fatores de risco que predispõem os doentes a este tipo de infecções incluem o uso de antibióticos de largo espectro, tratamentos de quimioterapia de duração prolongada, imunossupressão, procedimentos cirúrgicos resultantes de tratamentos hospitalares intensivos e prolongados, hemodiálise e diálise interperitoneal em pacientes imunocomprometidos. As infecções por leveduras ainda podem estar associadas à utilização de dispositivos médicos como implantes, cateteres vasculares, próteses dentárias, lentes de contato, entre outros (MARTIN, 1999; WEISSMAN et al., 2000; CARDOSO, 2004).

As leveduras são organismos eucarióticos unicelulares e a sua membrana plasmática é semelhante à dos outros organismos. É uma estrutura dinâmica cujas substâncias constituintes estão em constante alteração. É quimicamente constituída na sua maioria por lipídios e proteínas, sendo que a maior classe de lipídios presentes são os esteróis. O esterol predominante é o ergosterol, análogo do colesterol das células dos mamíferos. Esta molécula contribui para diversas funções celulares, sendo importante para a integridade e fluidez da membrana, permitindo que muitas das enzimas da membrana possam exercer corretamente sua função, incluindo a síntese de quitina, muito importante para a divisão e crescimento celular (CARDOSO, 2004).

Já a parede celular das leveduras exerce um papel fundamental para a patogenicidade celular. Age como uma barreira de permeabilidade e é a sua estrutura que mantém a forma de levedura e desempenha um papel mediador nas interações que se estabelecem entre microrganismo e o ambiente que o rodeia. Os dois principais aspectos dessa interação são a sua capacidade de adesão às células, tecidos e dispositivos médicos implantados no hospedeiro e a imunomodulação da resposta imune do hospedeiro. A adesão das células do hospedeiro é um pré-requisito para a colonização e um passo para a infecção (BORIOLLO et al, 2005).

3.2.4.1. Gênero *Candida*

O gênero *Candida* pertence à divisão Eumycota, subdivisão Deuteromycota, Classe Blastomycetes e à Família Cryptococcaceae, apresentando predominantemente desenvolvimento unicelular e geralmente reproduzindo-se por brotamento unilateral. No entanto, espécies de *Candida* podem desenvolver estrutura micelial em resposta a diferentes fatores ambientais e apresentar hifas verdadeiras ou pseudo-hifas. Este gênero possui mais de 200 espécies. Algumas espécies fazem parte da microbiota normal da pele, da cavidade bucal e do trato gastrointestinal, além de secreções brônquicas e do trato geniturinário, vivendo como organismos comensais. Entretanto, comportam-se como patógenos oportunistas, produzindo infecções que vão desde lesões de mucosas superficiais até disseminações sistêmicas graves e invasivas. Os quadros clínicos mais reportados relacionados à candidíase são a do tipo cutâneo-mucosa, sistêmica/visceral e alérgica. As espécies de *Candida*, principalmente *C. albicans*, são as principais responsáveis pelas infecções fúngicas, sendo *C. albicans* o patógeno de maior incidência (ODDS, 1989; ODDS, 1990; MOREIRA, 2003; SUDBERY, 2004; VUCKOVIC et al., 2004; BORIOLO et al., 2005; LIMA et al., 2006; LOGUERCIO-LEITE et al., 2006; FURLETTI, 2006).

3.2.4.1.1. *Candida albicans*

Cada vez mais se estudam os fatores de virulência dos fungos e no caso de *C. albicans*, pode-se destacar: dimorfismo (variação de antígenos da parede), adesinas, produção de enzimas (proteínases e fosfolipases) e *switching* (variações fenotípicas), atividade extracelular lipolítica ou proteolítica e toxinas. Os fatores de virulência expressados por *C. albicans* podem causar infecções de diversas maneiras, dependendo do tipo de infecção e da natureza da resposta do hospedeiro (ODDS, 1994; GOMPERTZ et al., 1999a; GOMPERTZ et al., 1999b; HUBE; NAGLIK, 2001; BORIOLO et al., 2005; MARDEGAN et al., 2006).



Figura 5: Micromorfologia de *Candida albicans* apresentando células leveduriformes com brotamento.

Fonte: http://education.denniskunkel.com/catalog/product_info.php?products_id=1191

Para colonizar, infectar e evadir-se das defesas do hospedeiro, aumentando assim sua virulência, *C. albicans* inclui uma variedade de enzimas, cujos principais representantes são as Proteinases Aspartil Secretadas (SAPs) e as fosfolipases. As SAPs são codificadas e reguladas por genes (SAP1 – SAP10). A existência destes genes e sua ativação temporal durante os diferentes estágios da infecção, promovem uma maior adaptação de *C. albicans* ao meio ambiente e ao hospedeiro. Por exemplo, as SAPs podem contribuir para a adesão e invasão nos tecidos do hospedeiro por degradar ou modificar as suas estruturas da superfície ou as substâncias intracelulares. Pode ocorrer ainda a destruição das células ou moléculas do sistema imune do hospedeiro, aumentando consideravelmente a proliferação. O estudo dessas enzimas como fator de virulência é relativamente recente e está em rápida evolução (GHANNOUM; ABU-ALTEEN, 1986; OLLERT et al., 1995; CALDERONE; FONZI, 2001; HUBE; NAGLIK, 2001; BARROS, 2005; MARDEGAN et al., 2006).

A habilidade de se modificar morfológicamente de levedura para formas filamentosas também é um outro fator de virulência importante. Condições que

promovem o crescimento hifal *in vitro* incluem crescimento em temperaturas elevadas e em meios específicos. Estas condições podem ser encontradas pelo patógeno, durante o seu crescimento no tecido humano (GIUSANI et al., 2002; MARTINS; KOGA-ITO; JORGE, 2002; SUDBERY, 2004).

3.3. Antimicrobianos

Antimicrobianos são fármacos capazes de destruir microrganismos ou de suprimir sua multiplicação ou crescimento. São produzidos naturalmente por seres vivos (fungos, bactérias, plantas) ou através de síntese, podendo ser utilizados com finalidades profiláticas ou curativas. Além da extensiva utilização em humanos, os antimicrobianos são empregados em animais e plantas (MOREIRA, 2004; HOEFLER, 2006).

Fatores do hospedeiro, do meio ambiente e do microrganismo estão envolvidos no estabelecimento de uma infecção. Quando tecidos são lesados, quebrando a barreira local como pele e mucosa, há mobilização de fatores humorais (imunoglobulina e complemento) e celulares (linfócitos e fagócitos) de proteção que geralmente são suficientes para conter os patógenos, não sendo necessário a utilização de antimicrobianos. Porém, o surgimento de sinais e sintomas é indicativo da necessidade de tratamento específico, que incluem os antimicrobianos (MOREIRA, 2004).

As aplicações dos antimicrobianos são definidas, essencialmente, com base no conhecimento do microrganismo infectante e no tipo de atividade pretendida, se curativa ou profilática. O uso profilático é aceito quando se deseja prevenir uma infecção em situações onde há risco elevado, obedecendo a critérios bem definidos de análise de benefício para sua utilização. A terapia antimicrobiana pode ser utilizada de duas formas: especificamente ou empiricamente. A específica é executada mediante a identificação do microrganismo por meio de testes laboratoriais ou quando a manifestação clínica é característica deste microrganismo. A empírica é guiada pelo possível agente infeccioso que é prevalente naquele tipo de manifestação clínica, devendo estar baseada em dados epidemiológicos, potencial patogênico e padrão de susceptibilidade microbiana (HOEFLER, 2006).

3.3.1. Mecanismo de ação de agentes antimicrobianos

3.3.1.1. Antibacterianos

Os antibióticos e quimioterápicos interferem com diferentes atividades da célula bacteriana, causando a sua morte ou somente inibindo o seu crescimento. Os primeiros são chamados bactericidas e os segundos bacteriostáticos. Embora os antibacterianos sejam normalmente divididos nessas duas categorias, deve-se lembrar que alguns fármacos, tipicamente bacteriostáticos, podem ser bactericidas para determinadas cepas bacterianas. As interações dos antibióticos com a célula bacteriana podem ocorrer no nível da parede, membrana citoplasmática, ribossomos, DNA e metabolismo intermediário (TRABULSI, 1999). A Figura 6 mostra os principais sítios de ação para os antibióticos na célula bacteriana.

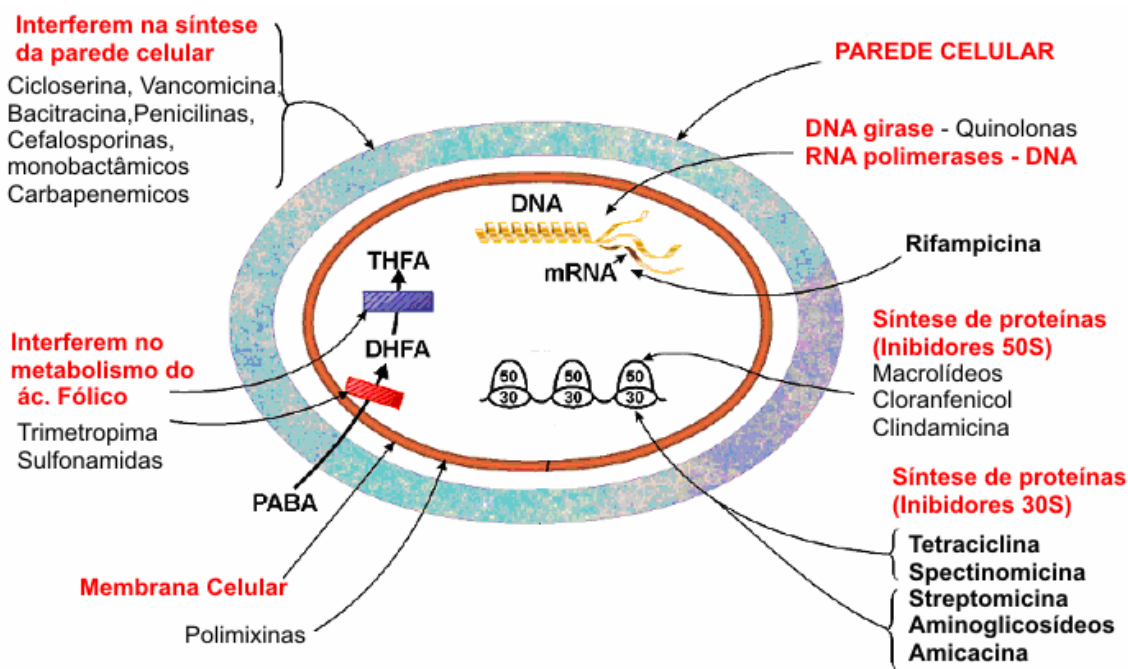


Figura 6: Principais alvos dos antibióticos. Adaptado de (ANDERSSON, 2005)

3.3.1.1.1. Antibacterianos que atuam na parede

Dos antibacterianos que atuam neste nível, os mais empregados são os β -lactâmicos. Na categoria dos β -lactâmicos estão incluídas as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactâmicos e as carbapenemas. Todos esses possuem em comum o anel β -lactâmico (Figura 7), que é um composto de três átomos de carbono

e um de nitrogênio (ALTHERTUM, 1999; TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 1999). A inibição da parede celular se dá através da interrupção do processo de transpeptidação. Podem atuar mais facilmente nas bactérias Gram-positivas (NEU, 1994b; MACEDO et al., 2005).

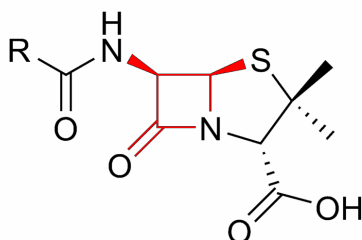


Figura 7: Anel β -lactâmico (vermelho) em molécula de penicilina

A síntese da camada de peptídeoglicano ocorre em três etapas: uma acontecendo no citoplasma, outra na membrana citoplasmática e a terceira externamente a esta membrana. Os antibióticos β -lactâmicos interferem com a terceira etapa da síntese. Com a descoberta das proteínas fixadoras de penicilina (PBP), verificou-se que a transpeptidação era uma entre várias outras ações existentes. As PBP são proteínas existentes na parte externa da membrana citoplasmática e participam da terceira etapa da síntese de peptidoglicano e possuem capacidade de fixação tanto para as penicilinas como para as cefalosporinas (TRABULSI, 1999).

A penicilina foi o primeiro antibiótico isolado do fungo *Penicillium notatum* em 1929 por Fleming. Desde então, os antibióticos β -lactâmicos se tornaram a classe de antibióticos mais utilizada. A diferença química existente entre as várias penicilinas está no radical R ligado ao ácido 6-amino-penicilânico. Algumas penicilinas são produzidas integralmente por fungos do gênero *Penicillium*, como as penicilinas G e V. Outras são sintetizadas em laboratório a partir do ácido 6-amino-penicilânico previamente produzidos pelo fungo e posteriormente modificado. As penicilinas semi-sintéticas apresentam vantagens sobre as naturais, sendo mais prontamente absorvidas e mais estáveis. Algumas penicilinas podem ser inativadas por enzimas bacterianas chamadas penicilinasas ou β -lactamases. Estas rompem o anel β -lactâmico, tornando o produto (ácido penicilínico) inativo (do ponto de vista antibacteriano) (ALTHERTUM, 1999).

3.3.1.1.2. Antibióticos que atuam nos ribossomos

Os antibióticos que atuam no nível dos ribossomos são os aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, lincomicina e clindamicina. Os aminoglicosídeos e as tetraciclina se fixam às subunidades 30S. Ao se fixarem, inibem a síntese protéica por diferentes mecanismos. Os aminoglicosídeos provocam vários tipos de alteração, sendo a mais importante a formação de ribossomos não-funcionais. O primeiro antibiótico do grupo dos aminoglicosídeos é a estreptomicina produzida a partir de culturas de *Streptomyces griseus*. A estreptomicina se fixa apenas a uma proteína da fração 30S do ribossomo, enquanto que a canamicina, gentamicina e os demais se fixam a várias proteínas. Esta característica explica a elevada taxa de mutação para resistência à estreptomicina (NEU, 1994c; TRABULSI, 1999).

As tetraciclina são produzidas por bactérias do gênero *Streptomyces* e a sua principal característica é o tetranel e os grupamentos ligados a ele (ALTHEERTUM, 1999). As tetraciclina bloqueiam a síntese protéica porque quando fixadas à subunidade 30S, impedem a fixação dos RNA transportadores (t-RNA) ao ribossomo. Desta forma não ocorre a incorporação de novos aminoácidos e a cadeia peptídica não se forma (NEU, 1994c; TRABULSI, 1999).

Cloranfenicol, lincomicina e clindamicina aparentemente possuem o mesmo mecanismo de ação que seria o de impedir, a união dos aminoácidos pela inibição da peptidiltransferase. Já os macrolídeos, que tem como principal representante a eritromicina, bloqueiam a síntese protéica porque, quando fixadas à subunidade 50S, impedem os movimentos de translocação (NEU, 1994c; TRABULSI, 1999).

Os aminoglicosídeos (estreptomicina, canamicina, gentamicina, neomicina, amicacina, espectinomicina, tobramicina e netilmicina), são fármacos ativos contra bactérias Gram negativas aeróbias e contra os *Staphylococcus*. São inativos frente às bactérias anaeróbias estritas porque não são transportados através da membrana citoplasmática ao interior da célula bacteriana. Também não são efetivas isoladamente contra os *Streptococcus*. Porém apresentam sinergismo de ação com as penicilinas frente ao *S. viridans* e contra os enterococos. Este sinergismo se deve ao fato das penicilinas bloquearem a síntese do peptidoglicano,

facilitando a entrada dos aminoglicosídeos para o interior da bactéria (NEU, 1994c; TRABULSI et al., 1999).

3.3.1.1.3. Antibacterianos que atuam no DNA

Os fármacos que atuam neste nível são o metronidazol, os derivados quinolônicos e as rifampicinas. Os derivados quinolônicos compreendem os ácidos nalidíxico e oxolínico, bem como os derivados de flúor (norfloxacino e ciprofloxacino), os quais agem por inibição da enzima alvo, a DNA girase, uma topoisomerase tipo II, responsável primariamente pela introdução da super helicoidização negativa do DNA, na presença de ATP. Essas alterações no estado topológico do DNA desempenham funções nos processos de replicação, transcrição, recombinação e reparação celular (GALES et al., 1997; FREITAS, 2003; PEREIRA et al., 2004).

As quinolonas fluoradas (fluorquinolonas) têm grande atividade sobre bactérias Gram-negativas, inclusive *P. aeruginosa* e também atividade sobre *Staphylococcus*, *Haemophilus* e *Neisseria*. A resposta terapêutica na clínica e o espectro de sensibilidade *in vitro* de cada uma das drogas deste grupo de quinolonas dependem de sua farmacocinética, eficácia individual e toxicidade (TRABULSI et al., 1999; LAMBERT, 2002).

3.3.2. Mecanismo de ação de agentes antifúngicos

Para o controle das diversas infecções causadas por fungos, existe um número reduzido de fármacos utilizáveis na prática clínica. Tendo atividade limitada a poucos agentes, as dulfonamidas abriram, por volta de 1940, à terapia dos doentes com micoses sistêmicas. Na década seguinte, foi disponibilizada a anfotericina B, cujo espectro antifúngico e eficácia a colocaram na posição de droga de referência no controle de infecções viscerais e disseminadas. A 5-fluorocitosina, pouco útil em uso localizado, foi considerado como fármaco sinérgico da anfotericina B, principalmente contra *Cryptococcus* (NOBRE et al., 2002; CARRILLO-MUÑOZ, et al., 2006).

A lista de substâncias químicas com ação antifúngica é bastante extensa, mas ainda muito restrita se comparada com o número de drogas antibacterianas disponíveis. Como consequência das infecções por fungos representarem o parasitismo de um organismo eucariótico sobre um outro eucariótico, com diferenças fisiológicas muito pequenas (quando comparado a infecções bacterianas), é necessário que as drogas antifúngicas tenham aplicação clínica adequada, com o mínimo de efeitos colaterais importantes (NOBRE et al., 2002; CARRILLO-MUÑOZ, et al., 2006).

No tratamento das micoses devem ser levados em consideração os tipos de micose e seu agente etiológico, estado geral do paciente e arsenal antimicótico. Quanto aos antimicóticos, deve-se conhecer seu mecanismo de ação, espectro, vias de administração e efeitos colaterais (GOMPERTZ et al., 1999; MIZUTANI et al., 2000; CAPOOR et al., 2005).

Os fármacos antifúngicos podem ser divididos em duas categorias: fármacos que afetam a membrana celular e fármacos que atuam intracelularmente, interrompendo processos celulares vitais como a síntese de DNA, RNA ou proteínas. Os mais utilizados são os derivados poliênicos, azólicos, pirimídicos, sulfamídicos, benzofurânicos e outros compostos como iodetos, tiosulfatos, sulfetos e tolnaftatos (GOMPERTZ et al., 1999; SELITRENNIKOFF, 2001; SANTOS-JR et al., 2005; MARTINEZ, 2006).

3.3.2.1. Fármacos que afetam a membrana celular

3.3.2.1.1. Derivados poliênicos

Os derivados poliênicos são constituídos de um anel macrolídeo com 26-28 átomos de carbono contendo várias insaturações, acrescidos de um radical éster ou lactona, onde os grupos hidroxila conferem característica anfipática à molécula. Os derivados poliênicos são antimicóticos produzidos por várias espécies de *Streptomyces*, altamente tóxicos para a membrana citoplasmática dos fungos, ligando-se à mesma de forma irreversível. Estas substâncias combinam-se com esteróides da membrana, rompendo a mesma ou tornando-a incapaz de efetuar suas funções normais, causando alterações na permeabilidade celular e levando á

perda de constituintes essenciais das células como potássio, açúcares, proteínas, fosfatos inorgânicos, ácidos carboxílicos e ésteres de fosfatos. A sensibilidade de um organismo aos derivados poliênicos está estreitamente ligada à presença de esteróis na sua membrana. Quanto menor o seu conteúdo de esterol, maior será sua resistência a esses compostos. Os agentes poliênicos mais utilizados são a anfotericina B e a nistatina (GOMPERTZ et al., 1999; SELITRENNIKOFF, 2001; CARRILLO-MUÑOZ et al., 2004; CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006).

3.3.2.1.2. Derivados azólicos

Os azólicos são quimioterápicos antifúngicos caracterizados por um anel pentagonal na estrutura molecular, o qual contém três átomos de carbono e dois de nitrogênio (imidazólicos) ou dois átomos de carbono e três de nitrogênio (triazólicos). Considerando as drogas de uso sistêmico, o primeiro subgrupo compreende o miconazol e o cetoconazol e o último, o fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravucinazol. Os azólicos atuam sobre a enzima do citocromo P450 dos fungos, bloqueando a demetilação do lanosterol e a síntese do ergosterol, o que altera a permeabilidade da membrana e a viabilidade fúngica. Também agem modificando a síntese dos lipídeos e inativando enzimas do processo oxidativo dos fungos. Os imidazólicos exercem ação apenas fungistática (GOMPERTZ et al, 1999; MARTIN, 1999; NOBRE et al, 2002; CAPOOR et al, 2005; SANTOS-JR et al, 2005).

3.3.2.2. Fármacos que atuam intracelularmente

A griseofulvina é um antimicótico pertencente a este grupo, produzida a partir do *Penicillium griseofulvum*. Já foi o fármaco de escolha para o tratamento das dermatofitoses, especialmente nos casos crônicos. Atualmente concorre com os derivados imidazólicos. É empregada por uso oral e o tratamento varia de acordo com a forma clínica da micose (MOORE et al., 2000; GROL; WALSH, 2002; BAGINSKI et al., 2005).

Para o tratamento das dermatofitoses provocadas por fungos zoofílicos e geofílicos é suficiente medicação local, como formulações com iodo, ácido salicílico e ácido benzóico ou mesmo antifúngicos, como o miconazol, tolnaftato, tolclolato, clotrimazol, oxiconazol ou cetoconazol, pois a reação inflamatória intensa à presença do fungo auxilia bastante na cura. Já as dermatofitoses antropofílicas, ou seja, aquelas causadas por fungos mais bem adaptados ao homem, são bastante resistentes às medicações. Entre as medicações orais utilizadas estão griseofulvina, cetoconazol, terbinafina, amorolfina, fluconazol e o itraconazol. Os iodetos podem ser considerados como os compostos mais antigos empregados no combate às infecções fúngicas. O iodeto de potássio é o fármaco de escolha no tratamento da esporotricose (NEU, 1994e; GOMPERTZ et al., 1999; DISMUKES, 2000).

Os derivados sulfamídicos apresentam ação antifúngica, sendo utilizados na terapêutica para os casos de paracoccidioidomicose. Mas nem sempre os resultados são satisfatórios, principalmente pela dosagem ideal que é próxima da dose tóxica para o homem (GOMPERTZ et al., 1999; DISMUKES, 2000; CARDOSO, 2004).

3.4. Resistência aos antimicrobianos

A partir de 1928, quando Fleming descobriu a penicilina, começou a chamada era dos antibióticos e, desde então, nas décadas seguintes, se produziu um incremento de forma exponencial na criação de novas classes destes agentes, em especial nos países desenvolvidos. Nas últimas décadas, a produção de novos antibióticos diminuiu de forma considerável e surgiu, como um problema de severas conseqüências, a resistência de bactérias, fungos, vírus e protozoários que desenvolveram mecanismos de defesa com a finalidade de impedir a ação destrutiva destas substâncias (TAVARES, 2000; BAMBEKE et al., 2003; RIVERÓN et al., 2003).

Considera-se resistência microbiana, como a perda da sensibilidade de um microrganismo a um antimicrobiano ao que originalmente era susceptível. De outra maneira, a resistência aos antimicrobianos é um fenômeno relacionado à

formação de cepas não sensíveis, capazes de se multiplicar na presença de concentrações de antimicrobianos mais elevadas do que as provenientes de doses terapêuticas habituais (WANNMACHER, 2004; HOEFLE et al., 2006).

Do ponto de vista clínico, se considera que uma bactéria é sensível a um antibacteriano quando a concentração deste no local da infecção é pelo menos quatro vezes superior a da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Uma concentração inferior à CIM, qualifica a bactéria de resistente e os valores intermediários como de moderadores sensíveis. Os conceitos de sensibilidade e resistência são absolutamente relativos e dependem tanto da localização da infecção como das doses e vias de administração do antibiótico. No universo das micoses oportunistas este tipo de resistência se manifesta fundamentalmente em pacientes com defeitos imunológicos profundos e persistentes que receberam vários tratamentos antifúngicos, em portadores de próteses (válvulas, cateteres, etc.) e em doentes com baixos níveis plasmáticos do fármaco, devido a interações dos próprios fármacos entre si ou com outros compostos (SMITH; COAST, 2002; RIVERÓN et al., 2003; BRONZWAER; LÖNNROTH; HAIGH, 2004).

Este processo envolve necessariamente a aparição de uma mudança permanente no material genético do microrganismo que se transmite aos seus descendentes, os quais por este motivo também se comportarão como insensíveis ao antimicrobiano em questão. Ainda que a resistência não seja um fenómeno universal, diversos estudiosos afirmam que cedo ou tarde, os microrganismos e em especial as bactérias e os fungos, desenvolverão resistência a qualquer antimicrobiano. A resistência microbiana constitui um problema de grandes implicações clínicas, pois obriga o desenvolvimento e a utilização de novos agentes antimicrobianos mais complexos, mais caros e, muitas vezes, mais tóxicos que os empregados habitualmente no tratamento das infecções (CLOUTIER, 1995; SHLAES et al., 1997; WICKENS; WADE, 2005).

A resistência aos antimicrobianos é um fenómeno genético, relacionado à existência de genes contidos no microrganismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas. A resistência pode ser originada em mutações que ocorrem no microrganismo durante seu processo reprodutivo e resultam em erros de cópia na sequência de bases que formam o DNA

cromossômico, responsáveis pelo código genético. A outra origem da resistência é a importação de genes causadores do fenômeno, consistindo na resistência transferível (LIU, 1999; SHLAES et al., 1997; TAVARES, 2000).

3.4.1. Tipos de Resistência

3.4.1.1. Natural ou Intrínseca

Em inúmeros microrganismos o fenômeno da resistência é natural. Em particular, a resistência é necessariamente específica contra um determinado antibiótico naqueles microrganismos produtores desta mesma substância. Como exemplo tem-se o *Streptomyces erythraeus* produtor da eritromicina e naturalmente resistente a este antibiótico por possuir uma estratégia de sobrevivência que impede sua auto-intoxicação. Essa estratégia consiste em possuir uma subunidade 50S ribossomal à qual a eritromicina não se fixa e dessa maneira, não exercendo sua ação. Em outras bactérias e fungos produtores de antibióticos existem mecanismos de autodefesa como este capazes de evitar a autointoxicação (Tavares, 1984).

3.4.1.2. Resistência adquirida

Considerando-se que os microrganismos produtores de antibióticos existentes no meio ambiente apresentam mecanismos de autoproteção codificados geneticamente, admite-se que além da mutação, a origem da resistência adquirida em bactérias e fungos causadores de infecções no homem e em outros mamíferos, esteja relacionada principalmente à transferência de genes de resistência contidos nesses microrganismos. Desta maneira, a existência de determinantes de resistência transferíveis entre os microrganismos precede ao emprego dos antibióticos na terapêutica (TAVARES, 2000).

A resistência adquirida a um determinado antimicrobiano surge em microrganismo originalmente sensível ao mesmo antimicrobiano. Refere-se, portanto, ao surgimento de exemplares de uma espécie de microrganismo que não sofrem mais as ações dos fármacos que são efetivos contra a população original da

bactéria. A resistência adquirida decorre de modificações na estrutura ou no funcionamento da célula do microrganismo que bloqueiam a ação dos antimicrobianos. Este tipo de resistência é o mais importante devido à crescente participação de microrganismos com resistência adquirida na gênese de quadros clínicos infecciosos (SOTO, 2003; HOEFLE et al., 2006; SILVEIRA et al., 2006).

3.4.2. Resistência Bacteriana

3.4.2.1. Mecanismos genéticos da resistência bacteriana

As trocas de material genético que explicam a resistência podem se produzir por vários mecanismos que envolvam o DNA cromossômial, como na mutação ou por aquisição de material genético extracromossômial, por transdução, transformação ou conjugação e frequentemente envolve genes situados em plasmídios e transposons. No processo de transdução, um vírus bacteriófago transfere DNA extracromossômial bacteriano de uma bactéria insensível para uma bactéria sensível, a qual adquire a resistência e a capacidade de transferi-la a seus descendentes (SHLAES et al., 1997; VELÁZQUEZ-MEZA, 2005).

No processo de transformação, as bactérias sensíveis podem incorporar DNA do meio ambiente e, se este possui genes para resistência, a bactéria se converterá em resistente para um ou mais antimicrobianos. A origem do DNA do meio ambiente se explica pela capacidade de algumas bactérias em algumas fases do seu crescimento de excretar o seu DNA (SHLAES et al., 1997; VELÁZQUEZ-MEZA, 2005).

A conjugação é um mecanismo importante de aquisição de resistência e consiste na passagem de genes determinantes de resistência (de uma bactéria resistente para uma sensível), mediante o acoplamento direto entre as mesmas através da formação de um pili sexual (SHLAES et al., 1997; VELÁZQUEZ-MEZA, 2005). No Quadro 1, podem-se observar classes de antibióticos e os mecanismos de resistência pelos quais as bactérias agem para evitar as suas ações.

Quadro 1: Exemplos de mecanismos de resistência pelos quais as bactérias resistem aos antibióticos e suas bases genéticas

Antibióticos	Mecanismos	Bases Genéticas	Exemplo de bactérias
β -lactâmicos	Alterando a ligação das proteínas que se ligam à penicilina	Cromossomial	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
	Reduzindo a permeabilidade	Cromossomial	<i>P. aeruginosa</i>
	Inativação com a enzima β -lactamase	Cromossomial e plasmidial	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>
Fluoroquinolonas	Alterando o alvo da DNA girase	Cromossomial	<i>S. aureus</i>
Aminoglicosídeos	Modificando enzimas responsáveis por ativação e/ou inativação de processos vitais bacterianos	Plasmidial	<i>Staphylococcus spp.</i>
Macrolídeos	Metilação do rRNA	Cromossomial e Plasmidial	<i>Staphylococcus spp.</i>
Tetraciclinas	Efluxo	Plasmidial	<i>Staphylococcus spp.</i>

Adaptado de (SHLAES et al., 1997).

3.4.2.1.1. Mecanismos mediados por plasmídios

Os plasmídios são moléculas extracromossomiais circulares de DNA encontradas em muitas espécies bacterianas e em algumas espécies de eucariontes. São geralmente moléculas de DNA globulares, que são passados aos descendentes durante a divisão celular. Podem ser curados ou removidos das células depois de serem submetidos a diferentes condições de estresse, como mudanças na temperatura, presença de certos corantes ou carência de determinados nutrientes. Os plasmídios não são indispensáveis para a vida celular, mas podem conferir-lhe vantagens seletivas, como por exemplo, possuir informação para degradação de certos substratos, resistência a um ou mais antibióticos ou a um metal pesado (SHLAES et al., 1997; WALSH, 2000).

A replicação do plasmídio pode ocorrer em dois momentos: primeiro, quando a célula bacteriana se divide, o DNA plasmidial também se divide, assegurando que cada célula-filha receba uma cópia deste; segundo, durante o processo de conjugação. Muitos plasmídios possuem a habilidade de conferir a propriedade de fertilidade (conjugativo), enquanto que outros plasmídios são não-conjugativos e não consegue efetuar a própria transferência. Os plasmídios resistentes a antibióticos em bactérias Gram-positivas como o *Staphylococcus*, não podem ser transferidos por processo de conjugação e sim, em processos de transdução (SOUSA-JR; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004).

Os tipos de plasmídios mais observados são a) os plasmídios de tipo sexual, com importância para a transferência de plasmídios para uma célula receptora e b) o plasmídio R que codifica genes para a resistência aos antibióticos. Os plasmídios R possuem dois componentes: o determinante de resistência R e o fator de transferência de resistência (RTF). O RTF é necessário para a transferência dos determinantes. Estes contêm informações para a formação de *pilus* para a transferência do DNA por conjugação em bactéria Gram-negativa (SHLAES et al., 1997; RAMOS, 2002).

As modificações genéticas nas bactérias codificadas por plasmídios causam resistência aos antibióticos em uma ou mais vias como mostra a Figura 8. As mais encontradas são bombas de efluxo e enzimas que degradam ou inativam os antibióticos.

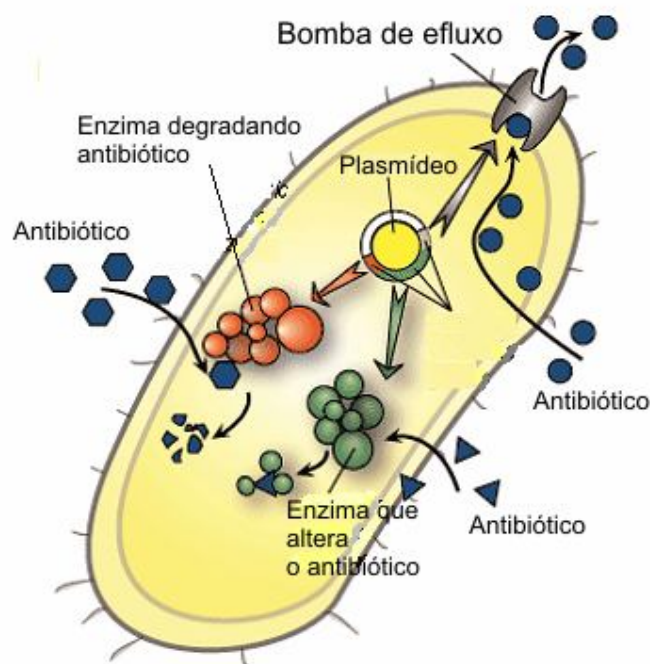


Figura 8: Modificações genéticas nos alvos dos antibióticos mediados por plasmídios (ANDERSSON, 2005).

3.4.2.1.2. Mecanismos mediados por transposons

Transposons são segmentos de DNA reguladores que se deslocam de um sítio a outro (transpostos) do genoma bacteriano e afetam a expressão gênica. Muitos genes R codificados por plasmídios são levados por transposons neles presentes (SEABRA et al, 2004). A frequência de transposição, tanto em procariontes como eucariontes é relativamente baixa, cerca de 10^{-7} por geração, dependendo do elemento em particular.

Sendo o cromossomo uma molécula contínua de DNA, a transposição dos elementos móveis é um processo de intercâmbio de DNA, ou seja, um tipo de recombinação. No entanto, esta difere da recombinação clássica homóloga, uma vez que não existe intercâmbio de material genético entre seqüências homólogas, não sendo necessária a ocorrência de homologia. A recombinação homóloga depende do produto do gene RecA, enquanto que o movimento de transposons ocorre na mesma frequência tanto em células recA⁻ como em recA⁺ (SEABRA et al., 2004).

Existe também a teoria de que os genes de resistência seriam derivados de genes bacterianos que codificam enzimas envolvidas com o metabolismo celular normal e teriam sofrido mutações. Alguns transposons podem se transferir de uma célula para outra sem o auxílio de plasmídios, num processo em que é necessário o contato direto entre a célula doadora e a receptora. Este tipo de transposon é ubiquitário de *Streptococcus* e é conhecido como transposon conjugativo (SHLAES et al, 1997; FERREIRA, 2005).

3.4.2.2. Mecanismos bioquímicos da resistência bacteriana

As mudanças genéticas produzidas dão lugar a diversos tipos de alterações bioquímicas no metabolismo bacteriano, podendo ser de três tipos gerais: mudanças no sítio de ação do antibacteriano, produção de enzimas que modifiquem o fármaco ou diminuição da captação do antibacteriano.

3.4.2.2.1. Resistência aos β -lactâmicos

Estes antibióticos possuem um mecanismo de ação comum. Eles inibem a síntese da parede celular bacteriana, em especial a formação de pontes cruzadas entre as diversas membranas formadas pelo peptidoglicano que, normalmente, configura rigidez à parede celular e protege a membrana celular do ingresso de quantidades excessivas de água para o interior da bactéria, que poderia ocorrer devido a elevada concentração de solutos nestes microrganismos. A formação de pontes cruzadas é efetuada por proteínas com ação de transpeptidases denominadas proteínas fixadoras de penicilinas (PBPs). Quando os antibióticos β -lactâmicos são expostos à enzimas do grupo das β -lactamases, estes se tornam inativos pela destruição (ruptura) do anel β -lactâmico, inativando o antibiótico. Relacionado a este aspecto, tem-se sintetizado antibacterianos que sejam resistentes as β -lactamases do *S. aureus*, como por exemplo, a dicloxacilina. As bactérias Gram-negativas como *E. coli* e *P. aeruginosa*, também “aprenderam” a sintetizar β -lactamases que degradam os antibacterianos que classicamente eram

eficazes frente a bacilos Gram-negativos, como aminopenicilinas, carboxipenicilinas, assim como cefalosporinas de primeira e segunda geração, de monobactâmicos e carbapenems, com a idéia de contra-atacar a resistência microbiana. As bactérias podem desenvolver resistência aos β -lactâmicos através de três mecanismos: a) prevenção da interação entre o antibiótico e a PBP alvo, b) incapacidade do antibiótico de se ligar à PBP e c) hidrólise do antibiótico por β -lactamase (SHLAES et al., 1997); RAMOS, 2002).

As bactérias Gram-negativas possuem no cromossomo um gene (*ampC*) que codifica para uma β -lactamase mais ativa frente a cefalosporinas do que frente a penicilinas. Além disso, muitos bacilos Gram-negativos possuem genes reguladores da produção desta β -lactamase *ampC*. Existem casos, como *E. coli* resistente à ampicilina nos quais a maior produção de β -lactamase *ampC* é devida a modificações na zona promotora do *ampC* que lhe permitem uma expressão genética mais eficaz (GALES et al., 1997; RAMOS, 2002; MACEDO et al., 2005).

A maior parte de resistência aos β -lactâmicos, se deve pela capacidade da bactéria de sintetizar as β -lactamases mediante a intervenção de um plasmídio. Nas bactérias Gram-negativas, as β -lactamases ligadas a plasmídios mais importantes, são a TEM-1 e em menor grau a SHV-1 (em *Klebsiella pneumoniae*) e a PSE-1 (em *P. aeruginosa*). Estas enzimas conferem resistência às bactérias Gram-negativas frente a aminopenicilinas, carboxipenicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração. Tem-se descrito em alguns estudos a existência de uma β -lactamase de espectro ampliado ligada a plasmídio, especialmente em *K. pneumoniae*, que produzem a inativação de cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos. Estas enzimas estão relacionadas a TEM-1 e TEM-2 (16 enzimas) e a SHV-1 (4 enzimas) e elas também possuem variações de um a três aminoácidos em relação às β -lactamases originais TEM-1, TEM-2 e SHV-1 (SILVA, 2000; SOUSA-JR, FERREIRA & CONCEIÇÃO, 2004; MACEDO et al, 2005).

Na maior parte dos casos de cepas de *Staphylococcus* resistentes a meticilina, tal resistência deve-se à produção da enzima PBP2a que mantém a integridade da parede celular bacteriana, apesar de que as proteínas fixadoras de penicilinas normais são inativadas pelo antibiótico. Esta enzima é codificada por um

gene cromossômico adquirido denominado *mecA*, que está ausente quando a bactéria é sensível à meticilina. Este mecanismo explica porque 15% dos *S. aureus* hospitalares, 75% de *S. epidermidis* e 80% de *S. haemolyticus* são resistentes a meticilina. Ainda que o *mecA* esteja presente somente em *Staphylococcus*, outros microrganismos também fabricam PFPs de baixa afinidade pelos β -lactâmicos como no caso dos *Enterococcus* e dos *Pneumococcus* resistentes a penicilina (MACEDO et al., 2005).

3.4.2.2.2. Resistência a aminoglicosídeos

A resistência aos aminoglicosídeos pode ocorrer mediante a intervenção de três mecanismos: a) variações no receptor ao nível da subunidade 30S; b) modificação enzimática do antibiótico e c) redução da entrada do antibiótico à célula bacteriana. Dentre estes, o segundo mecanismo é o mais estudado. A modificação do aminoglicosídeo pode efetuar-se por fosforilação, adenilação ou acetilação. Algumas enzimas bacterianas possuem uma dupla capacidade funcional e podem ser ao mesmo tempo fosforilantes e acetilantes, como ocorre com a enzima 6' acetilante e a 2' fosforilante que promovem capacidade defensiva ao *S. aureus* frente a gentamicina e outros aminoglicosídeos. Os genes que codificam para esta enzima em estafilococos podem ser adquiridos de outros estafilococos através de plasmídios ou por DNA em forma de transposons (OUNISSI et al, 1990; JACOBY & ARCHER, 1991; KOBAYASHI et al, 2001; GALIMAND et al, 2003; GALINDO et al, 2005).

Dado que os antibióticos aminoglicosídeos devam penetrar no interior das bactérias para impedir a síntese protéica e, tendo em conta que o ingresso destes fármacos é um processo que envolve a intervenção de mecanismos oxidativos, as bactérias têm desenvolvido mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos bloqueando a entrada destes, tornando-se muitas vezes impermeáveis ao antibiótico, tal como se observa em *Pseudomonas aeruginosa*. A adição de antibióticos de parede como as penicilinas à terapia com aminoglicosídeos, pode incrementar a entrada do aminoglicosídeo ao interior da bactéria aumentando assim a eficácia da ação antibacteriana.

3.4.2.2.3. Resistência às fluorquinolonas

As quinolonas são quimioterápicos antimicrobianos bastante desenvolvidos nas últimas décadas. Sua atividade antibacteriana depende de sua capacidade de inibir a DNA girase, complexo enzimático formado por subunidades A e B, que interferem nos processos de replicação e de transcrição do DNA. Têm-se observado um aumento na resistência às fluorquinolonas dependente, em alguns casos, de mutações que podem conferir resistência (NEU, 1994a; NEU, 1994b; NEU, 1994d; FARIAS et al., 1997; HOOPER, 2001; GARCÍA, 2003).

As mutações podem ocorrer seja nas subunidades da DNA girase, como se observa em *E. coli* ou nas porinas, proteínas da membrana celular externa, através das quais penetram as quinolonas. A mutação nestas porinas reduz o ingresso do quimioterápico à bactéria, o que naturalmente diminui sua eficácia. Em muitos casos a diminuição da acumulação intrabacteriana de quinolonas depende de um mecanismo ativo de efluxo de quimioterápico, mecanismo localizado na membrana citoplasmática da bactéria. As bactérias com alta taxa de resistência às quinolonas, conseguem combinar mecanismos de mutação tanto na DNA girase como nas porinas (NEU, 1994a; NEU, 1994b; HOOPER, 2001; SADER, 2002; SANTOS, 2004).

3.4.3. Resistência aos antifúngicos

A resistência aos agentes antifúngicos não era muito comum até meados de 1980, ocorrendo apenas casos isolados em pacientes com candidíase mucocutânea crônica. A incidência das infecções fúngicas, incluindo as infecções resistentes, aumentaram consideravelmente nas últimas décadas, refletindo o aumento da deficiência imunológica associada com a quimioterapia para câncer, transplantes e AIDS. Embora a prevalência de resistência em fungos seja menor do que a que se observa nas bactérias, muitos micologistas consideram que a pressão seletiva, com o passar dos anos, poderá ser equivalente à resistência bacteriana (LYONS; WHITE, 2000; HUDSON, 2001; BERGOLD; GEORGIADIS, 2004).

A utilização de antifúngicos na agricultura e em rebanhos também é um problema que surge nos últimos anos. Os agentes antifúngicos piridina e pirimidina usados extensivamente na agricultura possuem mecanismos de ação similares aos azólicos e é possível que este fato tenha contribuído de alguma forma para a emergência da resistência aos azólicos em humanos. Derivados imidazólicos e triazólicos também são bastante utilizados na agricultura, medicina humana/veterinária, aumentando potencialmente os problemas em relação às linhagens de fungos resistentes. Estes fatos podem ter levado a um aumento na frequência e gravidade das infecções fúngicas sistêmicas, causadas não só por agentes já conhecidos, senão também por patógenos emergentes ou contaminantes de laboratório (ESTRELLA & TUDELA, 2002; RODERO et al, 2005).

3.4.3.1. Resistência antifúngica em fungos filamentosos e leveduras

Como em outros microrganismos, a resistência dos fungos filamentosos e leveduras frente aos antifúngicos é um conceito amplo que se pode classificar em resistência microbiológica e resistência clínica (MOORE et al., 2000; PEREA et al., 2001; GROLL; WALSH, 2002; MOSQUERA; DENNING, 2002; BAGINSKI et al., 2005).

Os mecanismos identificados até agora, de como uma célula sensível se torna resistente aos agentes citotóxicos são (WHITE et al., 1998; GHANNOUM; RICE, 1999; LUPETI et al., 2002; PRASAD; PANWAR, 2004):

- I) Incapacidade do fármaco para alcançar o DIANA (produto do gene *CYP51* que é o 14- α esterol demetilase) dentro da célula, possivelmente devido a existência de barreiras de permeabilidade ou a sistemas de bombeamento ativo do composto ao exterior;
- II) Mudanças na interação fármaco-DIANA (aumento do número de cópias do DIANA ou modificações devido a mutações);
- III) Modificações nas enzimas das vias metabólicas;

IV) Alterações no processamento intracelular (degradação ou modificação) do fármaco.

No caso para os fungos filamentosos e leveduras são descritos até agora os três primeiros mecanismos. Assim mesmo, se sabe que muitos destes mecanismos podem coexistir numa mesma célula. (WHITE et al., 1998; GHANNOUM; RICE, 1999; LUPETI et al., 2002).

Nos últimos anos, se encontram cada vez com mais freqüência, cepas de leveduras com susceptibilidade diminuída ou resistente aos antifúngicos. Esta resistência pode ser clínica ou *in vitro*, sendo a primeira consequência fundamental do baixo nível do fármaco no tecido e/ou sangue, devido a uma interação entre fármacos ou ao severo quadro de imunodepressão do paciente. A resistência *in vitro* pode ser primária (a levedura é naturalmente resistente), sendo o melhor exemplo, a resistência intrínseca que apresenta *C. krusei* frente ao fluconazol. Também pode ser secundária. Este último tipo de resistência é o mais freqüente nos dias atuais e se observa principalmente em cepas de *C. glabrata*. O consenso é que a resistência antifúngica depende da interação entre o hospedeiro, o fármaco e o fungo. Neste sentido, os fatores relacionados ao paciente são com freqüência os mais relevantes para definir a resistência (BOSSCHE, 1997; LYONS; WHITE, 2000; COWEN; ANDERSON; KHON, 2002; SILVA; DIAZ; FEBRÉ, 2002; DIAZ-LOPEZ; GARAY; DIAZ, 2004).

Com a introdução do fluconazol as candidemias por *C. albicans* e *C. tropicalis* diminuíram. Por outro lado, as causadas por *C. krusei* e especialmente por *C. glabrata* experimentaram um aumento significativo. A maioria dos relatos de resistência em leveduras se referem ao fluconazol, em cepas isoladas de pacientes com AIDS (GHANNOUM; RICE, 1999; FIDEL-JR et al., 1999; SILVA; DIAZ; FEBRÉ, 2002). A Figura 9 sumariza alguns dos possíveis mecanismos de resistência dos fungos filamentosos e leveduras aos antifúngicos.

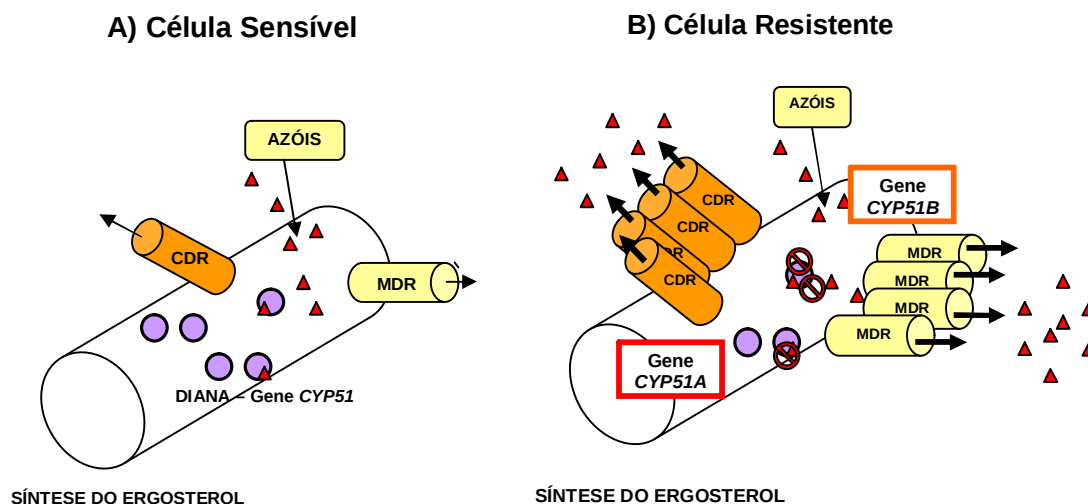


Figura 9: Representação esquemática dos mecanismos de resistência dos fungos frente os azóis. A) No fungo sensível o antifúngico interage com DIANA (14- α esterol demetilase, produto do gene *CYP51*) bloqueando a síntese do ergosterol inibindo o crescimento do mesmo. B) O fungo resistente pode defender-se: I) aumentando as bombas de eliminação ativas (MDR e CDR), o que diminuirá a concentração intracelular do fármaco; II) aumentando o número de cópias de DIANAs (*CYP51A* e/ou *CYP51B*) ou III) modificando o DIANA (mutações nos genes *CYP51A* e/ou *CYP51B*) de forma que a interação do fármaco com o DIANA seja insuficiente.

O estudo à nível molecular dos mecanismos de resistência dos fungos frente aos distintos grupos de antifúngicos é a estratégia mais importante para poder evitar as consequências que o desenvolvimento da resistência pode ocasionar a longo prazo e para desenvolver produtos mais potentes e seguros que as evitem (BERGOLD & GEORGIADIS, 2004).

3.5. Generalidades sobre o uso de plantas medicinais

O uso terapêutico das plantas medicinais na saúde humana constitui-se como prática milenar, historicamente construída na sabedoria do senso comum que articula cultura e saúde, uma vez que esses aspectos não ocorrem de maneira isolada, mas inseridos num contexto histórico determinado. A utilização de plantas medicinais, tanto na farmacopéia como na medicina caseira, é praticada desde os primórdios da civilização humana. Após a Segunda Guerra Mundial, com a descoberta dos antibióticos e o incremento cada vez maior de remédios à base de drogas sintéticas, houve um relativo abandono e, inclusive, certo ceticismo a

respeito das drogas naturais, até a década de 70. A partir da década de 80, essas plantas passaram a ser novamente valorizada como fonte de propriedades curativas de baixo custo (ARRUDA, 2001; DUARTE et al., 2004).

A resistência a drogas em patógenos humanos e animais é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. O consumo de mais de uma tonelada diária de antibióticos em alguns países da Europa tem resultado na resistência de populações bacterianas, causando assim um sério problema de saúde pública. Em vista do presente cenário, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, incluindo plantas, tem ganhado importância nas companhias farmacêuticas. No Brasil, por causa do aumento no interesse por produtos naturais, o uso de plantas medicinais tornou-se mais ou menos geral. Muitas destas plantas não têm sido estudadas e podem ser avaliadas quanto à ação antimicrobiana, em contraste com plantas nativas da Europa, que já foram exaustivamente estudadas (ARRUDA, 2001; DUARTE et al., 2004).

As propriedades antimicrobianas de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais produzidos pelas plantas como uma consequência do metabolismo secundário, também são reconhecidas empiricamente há séculos. Estudos sobre as atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas têm sido relatados em muitos países tais como Brasil, Cuba, Índia, México e Jordânia, que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais para uso como antibacteriano ou antifúngico. Dentre as diversas famílias de plantas aromáticas investigadas por conterem óleos essenciais, destacam-se a família Lamiaceae, cujo gênero *Mentha* engloba diversas espécies com atividades biológicas promissoras, em especial a *M. x villosa* Hudson (ARRUDA, 2001; DUARTE et al., 2004; ARRUDA, 2006).

3.5.1. Aspectos botânicos

A família Lamiaceae (antiga família Labiatae) constitui uma grande família das Angiospermas, compreendendo cerca de 200 gêneros e 3.000 espécies. Morfologicamente esta família é bastante diversificada, tanto que é constituída de 07 subfamílias e 19 tribos (SILVA et al, 1994).

As espécies de Lamiaceae são de enorme importância econômica devido à sua utilização pela medicina popular, indústria cosmética, alimentícia e farmacêutica. No Brasil, existem registros da existência de cerca de 20 gêneros e 300 espécies vegetais desta família, distribuídas em todo o território nacional, destacando-se o gênero *Mentha* (SILVA et al., 1994).

A origem do nome do gênero *Mentha* vem do grego *Μινθα* (*Mintha*), nome da filha de Cocylus que, segundo os poetas, foi transformada nesta planta. O gênero *Mentha* é originário da região mediterrânea e parte da Ásia, estando atualmente distribuída em quase todo o mundo, especialmente nas regiões temperadas e tropicais. Existem muitos híbridos reunidos neste gênero, considerado por alguns especialistas como complexo e de difícil identificação. As causas desta complexidade taxonômica são a plasticidade morfológica (Figura 10), facilidade de hibridização, propagações vegetativas e confusão nomenclatural (SILVA et al., 1994; LORENZO et al., 2002; AL-ANKARI; ZAKI; AL-SULTAN, 2004; BIESKI, 2005).



Figura 10: Folhas de espécies de *Mentha*: da esquerda para a direita, folha de *M. x villosa*, *M. piperita*, *M. citrata*, *M. arvensis* var. *japonica*, *M. longifolia*, *M. spicata*, *M. suaveolens* e *M. carinthiaca*.
Fonte: http://www.uni-graz.at/~katzer/engl/Ment_pip.html.

Existem cerca de 25 espécies do gênero *Mentha*. Dada à facilidade de hibridação, não se recomenda o cultivo de diversas espécies de hortelã lado a lado. A espécie *M. x villosa* Hudson (Figura 13), é um híbrido originado do cruzamento espontâneo entre *M. spicata* L. (Figura 11) e *M. suaveolens* Ehrh (Figura 12) (HIRUMA, 1993; GOBERT et al, 2002). A determinação do grau de hibridização depende de vários fatores tais como morfologia, anatomia, status químico, citologia (número de cromossomos, configurações meióticas), fisiologia, ecologia e

distribuição geográfica (BHAT et al., 2002; TUCKER; CHAMBERS, 2002; GRISI et al., 2006).



Figura 11: *Mentha spicata* L.

Fonte: <http://www.minzen.com/krausb4.htm>



Figura 12: *Mentha suaveolens* L

Fonte: http://www.minzen.com/mentha_suaveolens_ehrh.htm



Figura 13: *Mentha x villosa* Hudson

Fonte: <http://www.minzen.com/2002-194.htm>

3.5.2. Sinonímia

Hortelã rasteira, hortelã miúda, hortelã de panela, hortelã da horta, hortelã de cavalo.

3.5.3. Descrição e propagação

É uma planta herbácea possuindo de 30 a 60 cm de altura, ligeiramente aveludada; haste quadrangular, aveludada, ramosa, ramos opostos, aromáticos; folhas opostas, curtamente pecioladas, oval arredondada, lanceolada ou acuminada, serrada, algo pubescentes; inflorescência em espiga terminal, flores violáceas, numerosas, curtamente pedunculadas, reunidas em verticilos separados. Sua propagação se faz através de estacas (BIESKI, 2005).

3.6. Aspectos etnobotânicos

As informações etnobotânicas de diversos estudos da medicina popular atestam a utilização da *Mentha villosa* nas afecções bucais (halitoses, como analgésico, nas inflamações) (CARNEIRO, 1994; XAVIER et al., 1995; SOUZA; FELFILI, 2006), diarréias, cólicas intestinais, cólicas menstruais (SILVEIRA; JORDÃO, 1992; MATOS, 1997; MATOS, 1998; ALMEIDA, 2003; RADÜNZ, 2004) e nos tratamentos das amebíases, giardíases, tricomoníases e schistosomíases (MATOS, 1989; DINIZ et al., 1998; MATOS, 1999; MONTE; OLIVEIRA; BRAZ-FILHO, 2001; RADÜNZ, 2004; BIESKI, 2005). Em comunidades no estado da Bahia, é utilizada em preparações orais para facilitar o trabalho de parto e a expulsão da placenta (SANTOS et al., 2006).

3.7. Aspectos fitoquímicos e Atividade biológica da *Mentha x villosa* Hudson

Do ponto de vista químico foram isolados glicosídeo, sitosterol, ácido ursólico e um flavonóide do extrato hexânico e etanólico da *Mentha x villosa* (MONTE; FREITAS; LEMOS, 1988; HIRUMA, 1993). Do extrato butanólico das folhas, foram isolados: ácido rosmarínico (componente majoritário), luteolina, duas flavonas e uma flavona glicosilada cujas estruturas ainda estão sendo investigadas (HIRUMA, 1993; GUEDES, 2002). Do extrato clorofórmico das folhas, foi identificado uma mistura de esteróides e identificados como sendo campesterol, estigmasterol e sitosterol (SILVA et al., 1994). Já do extrato etanólico das folhas, foram ainda identificados 07 triterpenóides com possíveis indicações para o tratamento do câncer (MONTE; OLIVEIRA; BRAZ-FILHO, 2001).

A propriedade antiparasitária foi inicialmente confirmada por BORBA et al (1988), em estudo *in vitro* com a cultura de *Entamoeba histolítica* SAW 1627, em que obtiveram resultados significativos com frações do extrato bruto das folhas. As propriedades antiparasitárias no tratamento das amebíases e giardiases também foram avaliadas por SILVA et al, (2006), MATOS (1998 e 1999) e nas tricomoníases por MELO et al (1992). Resultados pré-clínicos obtidos por BORBA et al (1989a e 1989b), sugerem que o extrato bruto das folhas da *Mentha x villosa* também possui atividade no tratamento da esquistossomose mansônica. Experimentos com camundongos albinos infectados com *Schistosoma mansoni*, verificaram que certa fração do extrato de *Mentha* com solventes orgânicos foram ativos no granuloma causado por esses parasitos (DINIZ et al., 1998).

Estudos clínicos evidenciaram a eficiência do pó da planta inteira no tratamento de várias enteroparasitoses, em especial para as protozooses, provavelmente devido à presença de (+)- pulegona. Também em relação às protozooses, o extrato hidroetanólico das folhas apresentou comprovada atividade amebicida e giardicida (DE SANTANA et al., 1992; HIRUMA, 1993; DINIZ et al., 1998; GUEDES, 2002; DIMECH et al., 2006).

O extrato obtido das folhas da *Mentha x villosa* também foi utilizado para o controle do mofo-cinza (*Botrytis cinérea*) e do oídio (*Oidium spp.*) doenças que atingem diversas culturas vegetais, em especial o eucalipto. Neste estudo, o extrato se mostrou ativo, reduzindo o crescimento destas cepas de fungos (BIZI, 2006).

3.8. Considerações sobre óleos essenciais

De acordo com a International Standard Organization (ISO), os óleos essenciais são misturas de compostos orgânicos que apresentam como propriedades principais a volatilidade, aroma intenso, imiscibilidade com a água e solubilidade em solventes orgânicos. O termo óleos essenciais é definido como um produto obtido através de destilação por arraste a vapor de água, bem como produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (LAVABRE, 2006; SIMÕES; SPITZER, 2003). De forma geral, são misturas complexas de substâncias lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamadas de óleos essenciais, óleos etéreos ou essências. Essas denominações derivam de algumas

de suas características físicoquímicas, como por exemplo, a de serem líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente, advindo daí a designação óleo. No entanto, sua característica principal é a volatilidade, diferindo assim dos óleos fixos que são misturas de substâncias lipídicas, obtidas geralmente de sementes (RADÜNZ, 2004; PRABUSEENIVASAN; JAYAKUMAR; IGNACIMUTHU, 2006).

Outra característica é o aroma agradável e intenso que ocorre na maioria dos óleos voláteis, sendo por isso chamados de essências. Eles também são solúveis em solventes orgânicos pouco polares como éter, recebendo por este fato, a denominação de óleos etéreos. Em água, os óleos essenciais apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas que são denominadas de águas de cheiro (LAHLOU, 2004; RADÜNZ, 2004; SACCHETTI et al., 2005).

Outras características dos óleos essenciais são:

- Sabor: geralmente ácido e picante;
- Cor: quando recentemente extraídos são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados, sendo poucos os óleos encontrados coloridos, a exemplo do óleo de *Matricaria chamomila* L. de coloração azulada, pelo seu alto teor de azúenos;
- Estabilidade: em geral, os óleos essenciais não possuem boa estabilidade, principalmente na presença de luz, ar, calor e umidade;
- A maioria dos óleos essenciais possui índice de refração e são opticamente ativos, propriedades estas usadas na sua identificação e controle de qualidade (RADÜNZ, 2004).

Os óleos essenciais são misturas complexas de componentes. Os constituintes destes óleos são principalmente monoterpenos e sesquiterpenos que são hidrocarbonetos com a fórmula geral $(C_5H_8)_n$. Os componentes oxigenados derivados destes hidrocarbonetos incluem álcoois, aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, fenóis e óxidos. Estima-se que existam mais de 1.000 estruturas de monoterpenos e 3.000 estruturas de sesquiterpenos. Outros componentes incluem fenilpropanos e são compostos específicos possuindo na estrutura enxofre ou

nitrogênio (SVOBODA; HAMPSON, 1999; LORENZO, 2002; GUEDES et al., 2004; TURNER; CROTEAU, 2004).

Centenas de novas substâncias naturais estão sendo isoladas e identificadas todos os anos, mas os dados referentes à suas atividades biológicas são conhecidas, muitas vezes, apenas para um exemplar. Em determinadas plantas, como *M. x villosa* Hudson, um constituinte pode predominar, como é o caso da rotundifolona que pode atingir de 55,5% a 63,5% do volume total do óleo essencial, dependendo da região de cultivo ou do período de coleta. Já em outras espécies, pode acontecer que não exista um componente majoritário predominante. No entanto, predomina um equilíbrio de vários componentes, como no caso do óleo essencial de *Origanum marjorana* L. (orégano), cujos componentes individuais representam de 0,1 a 10% do volume total do óleo. A presença de traços de componentes, muitas vezes ainda não identificados, pode influenciar o odor, sabor e, possivelmente, a atividade biológica do óleo essencial (SVOBODA; HAMPSON, 1999; LORENZO, 2002; GUEDES et al., 2004; TURNER; CROTEAU, 2004).

A possibilidade da utilização dos óleos essenciais esta sendo evidenciada agora, mas suas atividades biológicas já são conhecidas por séculos, embora seus mecanismos de ação ainda não estejam totalmente elucidados. Geralmente, suas ações resultam de efeitos combinados dos componentes ativos e inativos. Estes compostos inativos podem influenciar a taxa de absorção, diversidade das reações e biodisponibilidade dos componentes ativos. Diversos componentes ativos ainda podem possuir efeitos sinérgicos entre si. Para aumentar a complexidade dos óleos essenciais, algumas pesquisas a respeito de suas composições mostram que mesmo variações genéticas intraespecíficas da espécie vegetal podem alterar o teor do princípio ativo presente no óleo. Além disso, outros fatores como clima, solo, época e forma de cultivo, tipos de adubação, uso de agrotóxicos, irrigação, tempo e condições ambientais, forma de colheita, proveniência do material da planta para extração (seco ou fresco), técnica de extração, padrões de variação geográfica, pressão atmosférica e campos magnéticos afetam a composição dos óleos essenciais podendo provocar alterações na sua atividade biológica (PORTE; GODOY, 2001; BASER, 2002; ÖZEL; ÖZGÜNVEN, 2002; INNECCO et al., 2003; SIMÕES; SPITZER, 2003; RADÜNZ, 2004; AFLATUNI, 2005; CRIVEANU; TARALUNGA, 2007; NASCIMENTO et al., 2007; SILVA; BITTENCOURT, 2007).

Dependendo da família, os óleos essenciais podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, como pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) e em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae). Podem ainda estar estocados em outros órgãos como flores, frutos, cascas dos caules, raízes, rizomas ou sementes (Figura 14 a e b) (SHARMA; SANGWAN; SANGWAN, 2003; RADÜNZ, 2004; AFLATUNI, 2005; PRABUSEENIVASAN; JAYAKUMAR; IGNACIMUTHU, 2006).

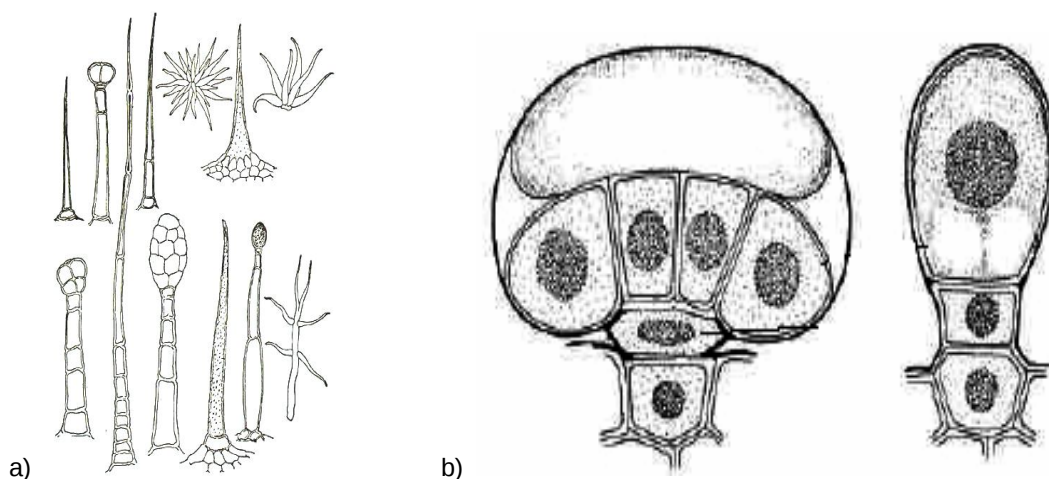


Figura 14. a) Estruturas glandulares secretoras de óleos essenciais em plantas aromáticas b) Estrutura secretora mais comum no gênero *Mentha*.

Fonte: <http://www.ice.mpg.de/usrpers/chcr2083/web/ore2.htm>

As plantas produtoras de óleos essenciais possuem estruturas especializadas chamadas glândulas de óleos essenciais. Um tipo de tricoma glandular capaz de secretar e armazenar estes óleos. Quando presentes são os sítios primários da biossíntese dos óleos essenciais. Nas espécies de *Mentha*, esta estrutura foi observada na superfície das folhas em ambos os lados (Figura 15) (LANGE et al., 2000; TURNER; GERSHENZON; CROTEAU, 2000; SHARMA; SANGWAN; SANGWAN, 2003; RAMOS et al., 2005; SACCHETTI et al., 2005).

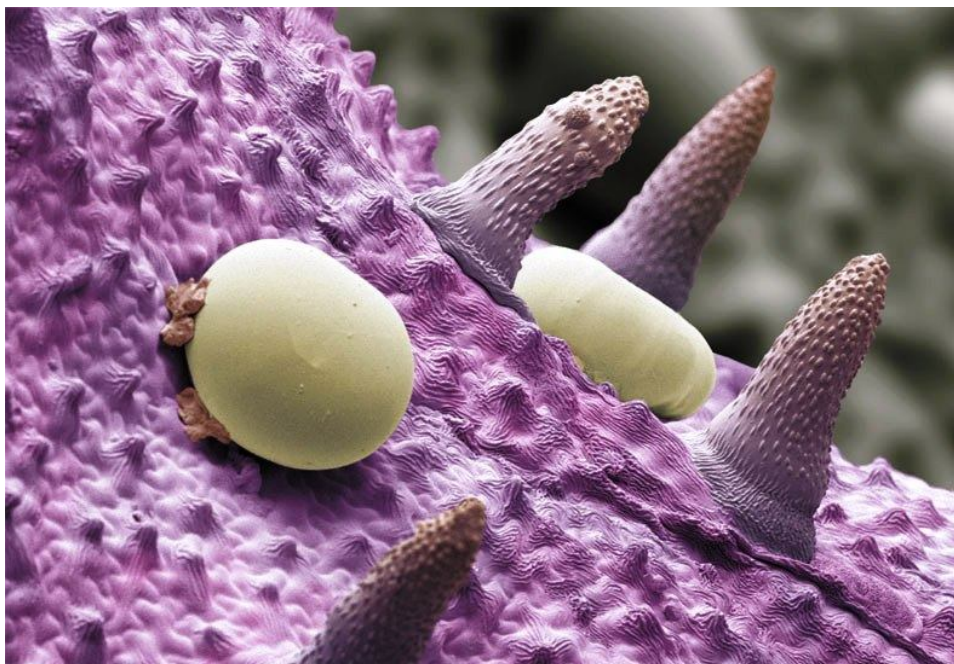


Figura 15. Microfotografia de estruturas glandulares secretoras de óleos essenciais em *Mentha piperita*.

Fonte: <http://www.herbalgram.org/files/images/peppermint.html>

De um modo geral, as espécies apresentam épocas específicas em que contêm uma maior quantidade de substâncias ativas em seus tecidos, podendo esta variação ocorrer tanto no período de um dia como em épocas do ano (REIS; MARIOT; STEENBOCK, 2003; BERTINI et al., 2005; RAMOS et al., 2005; POTZERNHEIM et al., 2006; CARVALHO-FILHO et al., 2006).

A diversidade e o grande número de substâncias encontradas nos óleos essenciais é que determinam a ampla variedade de ações farmacológicas. As propriedades dos óleos essenciais são variadas. Por exemplo, o mentol da hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) possui ação expectorante e antisséptica; o timol e o carvacrol encontrados no tomilho (*Thimus vulgaris*) e no alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) são antissépticos; o eugenol do cravo da índia (*Syzygium aromaticum*) é um anestésico local e analgésico; e o ascaridol, presente no mastruço (*Chenopodium ambrosioides*), é vermífugo (AFLATUNI, 2005; MARTINS, KOGA-ITO & JORGE, 2002; MELO & RADÜNZ, 2004; RADÜNZ, 2004; PRABUSEENIVASAN, JAYAKUMAR & IGNACIMUTHU, 2006).

Baseado em um estudo de Sharma, Sangwan e Sangwan (2003), foi observada a gênese de monoterpenos na glândula de óleo essencial de *M. arvensis*,

a partir de Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV) (Figura 16). Verificaram-se três fases distintas: a) fase pré-secretória, b) fase secretória e a c) fase pós-secretória. A fase secretória foi considerada como a fase de produção da biossíntese de monoterpenos. Esta fase, de rápida expansão, estava intimamente ligada ao desenvolvimento/ crescimento da folha.

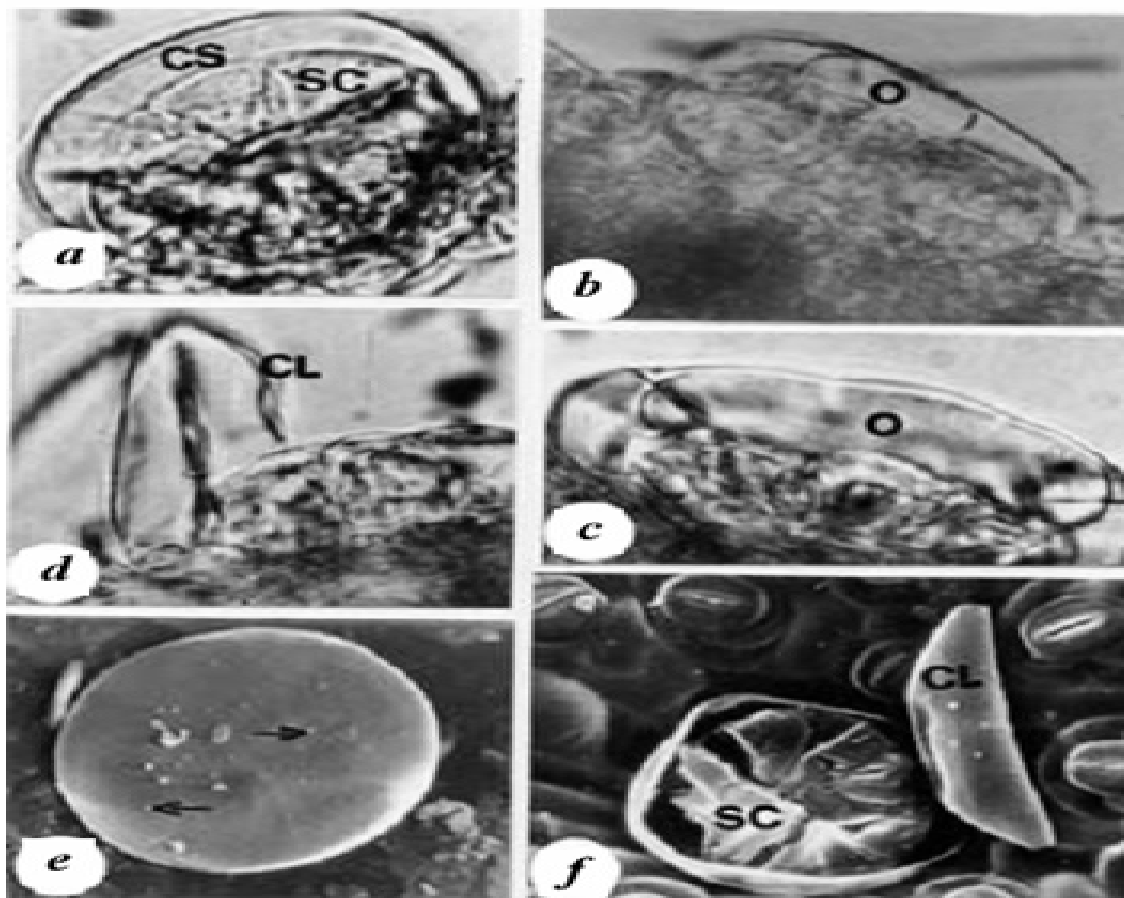


Figura 16. Estudos de desenvolvimento da folha de *Mentha arvensis* em diferentes estágios da glândula secretora de óleo essencial. De a) até d) (40x magnificação) e de e) até f) MEV. a) Largo espaço subcuticular visível no topo da glândula secretória. Neste espaço é que se estocará o óleo produzido, b) Pequena gota de óleo armazenada no espaço subcuticular, c) Espaço subcuticular cheio de óleo, d) Ruptura da cutícula da glândula, e) Glândula na fase pós-secretora (800x) e f) Glândula com a cutícula rompida para o extravasamento do óleo essencial (800x) (SHARMA; SANGWAN; SANGWAN, 2003).

Um estudo realizado por Buchbauer e Jirovetz (1994), mostrando a bioatividade de óleos essenciais, sugeriu que estes produtos inalados ou aplicados

sobre a pele, atuavam devido às reações de suas frações lipofílicas com as porções lipídicas das membranas celulares e, como resultado, modificavam a atividade dos canais de cálcio. As doses dos óleos essenciais em certos níveis saturavam as membranas e mostravam efeitos similares aos de anestésicos locais. Eles podem interagir com as membranas celulares devido às suas propriedades fisicoquímicas e estruturas moleculares, podendo influenciar enzimas carreadores, canais iônicos e receptores. Os autores descrevem vários estudos em relação aos efeitos fisiológicos em humanos como estimulante cerebral, ansiolítico, atividade antidepressiva como também o aumento do fluxo sanguíneo cerebral. Os estudos de Buchbauer e Jirovetz (1994), ainda descrevem os efeitos dos odores na cognição, memória e humor. Os componentes voláteis são absorvidos através da inalação e são também capazes de interagir com o sistema nervoso central.

Os componentes dos óleos essenciais exercem atividade antibacteriana por interferência na dupla camada fosfolipídica da parede celular por aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares; alteração de uma variedade de sistemas enzimáticos, incluindo aqueles envolvidos na produção de energia celular e síntese dos componentes estruturais e inativação ou destruição do material genético. Estudos demonstraram ainda que, de maneira geral, as bactérias Gram-negativas são mais resistentes à ação do óleo essencial (LAMBERT et al., 2001; RISTORI; PEREIRA; GELLI, 2002).

3.8.1. Constituintes químicos e atividade biológica do óleo essencial da *Mentha x villosa* Hudson

Os óleos essenciais das plantas têm sido avaliados historicamente por suas propriedades medicinais, culinárias e fragrantes. Dentre os mais estudados, estão os que são constituintes das espécies vegetais do gênero *Mentha*, que produzem alguns dos óleos mais utilizados como o de *M. x villosa* Hudson e que contém diversos compostos químicos (LANGE et al., 2000; GRAYSON, 2000; OUMZIL et al., 2002; SILVA; ALBUQUERQUE 2005; ZEINALI et al., 2005).

Matos et al. (1999), a partir do óleo essencial obtido das folhas por arraste a vapor d'água, identificaram através de cromatografia de camada gasosa acoplada a espectrometria, os compostos descritos no Quadro 2. O constituinte majoritário é a

rotundifolona, também conhecido como óxido de piperitenona, isolada através de métodos cromatográficos e identificada pelos dados espectrais de RMN¹H, ¹³C e Espectrometria de Massa (MATOS et al., 1999; AL-ANKARI; ZAKI; AL-SULTAN, 2004).

Quadro 2: Compostos encontrados no óleo essencial de *M. x villosa* Hudson

COMPOSTOS	% ENCONTRADO
α -pineno	0,7
β -pineno	1,1
Sabineno	0,8
Myrceno	3,2
Limoneno	2,5
1,8-cineol	2,1
(Z)- β -ocimeno	3,5
(E)- β -ocimeno	0,4
Linalol	0,4
Octil Acetato	0,7
Borneol	0,3
Oxido de piperitenona (rotundifolona)	55,5
β -bourboneno	0,3
β -elemeno	0,5
Cariofileno	3,4
Cis-muurola-4(14), 5-dieno	1,3
α -humuleno	0,6
Trans-muurola-4(14), 5-dieno	1,4
(E)- β -farneseno	1,4
γ -muuroleno	13,1
Biciclogermacreno	1,1
Germacreno A	0,6
Cis-calameneno	0,3
δ -cadineno	0,3
1, 10-di-epi-cubenol	0,5
T-murolol	0,4

Fonte: MATOS et al. (1999)

A avaliação farmacológica do óleo essencial da *Mentha* sobre o sistema nervoso central em camundongos, mostrou sedação e ptose palpebral. O óleo essencial sobre a musculatura esquelética *in vitro* em músculo sartório de sapo apresentou um efeito contraturante (DINIZ et al., 1998).

Os efeitos cardiovasculares do óleo essencial de *M. x villosa*, foram testados em ensaios combinados *in vivo* e *in vitro* em ratos normotensos, não-anestesiados. O óleo induziu à uma hipotensão dose-dependente, associados com o decréscimo de batimentos cardíacos, sugerindo um mecanismo independente do endotélio como o que se apresenta nos bloqueadores de canais de cálcio (SOUSA et al., 1997; GUEDES et al., 2004).

Um efeito vaso-relaxante, hipotensor e braquicárdico da rotundifolona foi observado em ratos não-anestesiados, normotensos e hipertensos produzidos tanto pelo óleo essencial como pela rotundifolona (LAHLOU et al., 2000; GUEDES, 2002; GUEDES et al., 2002; LAHLOU et al., 2002).

O óleo essencial apresenta ainda atividade antimicrobiana contra de bactérias e fungos patogênicos (SOUZA et al., 2004; BERTINI et al., 2005; RAMOS et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; LIMA et al., 2006).

Foi verificada a atividade antifúngica do óleo essencial de *M. x villosa* sobre *Fusarium* spp, *Candida* spp e bactérias oportunistas no tratamento pós-colheita de *Cucumis melo* (melão *Orange Flesh*) (GADELHA et al., 2003).

3.8.1.1. Rotundifolona e seus análogos sintéticos

A rotundifolona (Figura 17) é considerada uma cetona monoterpênica de peso molecular igual a 166, 219g e sua concentração no óleo essencial pode variar de 55,5% a 63,5%, dependendo da região de cultivo ou do período de coleta (RAVID; PUTIEVSKY; KATZIR, 1994; MATOS et al., 1999; GUEDES, 2002; LORENZO, 2002; GUEDES et al., 2004; TURNER CROTEAU, 2004; ARRUDA et al., 2006).

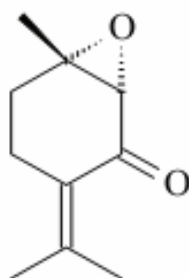


Figura 17: Rotundifolona

A rotundifolona, componente majoritário do óleo essencial, apresentou atividade relaxante sobre a musculatura lisa intestinal em ensaio realizado *in vitro* com íleo de cobaia (SOUSA et al., 1997).

Em um estudo feito com o vetor da malária *Anopheles stephensi* (Díptera: Anophelinae), a rotundifolona apresentou atividade tóxica, repelente e retardante da reprodução destes insetos (TRIPATHI et al., 2004).

A rotundifolona está incluída na categoria agente flavorizante para alimentos (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2006; WHO, 2006).

Os análogos sintéticos da rotundifolona (Figura 19) são: epoxi-limoneno, epoxi-pulegona, epoxi-carvona e (+)-pulegona, foram sintetizados para este estudo.

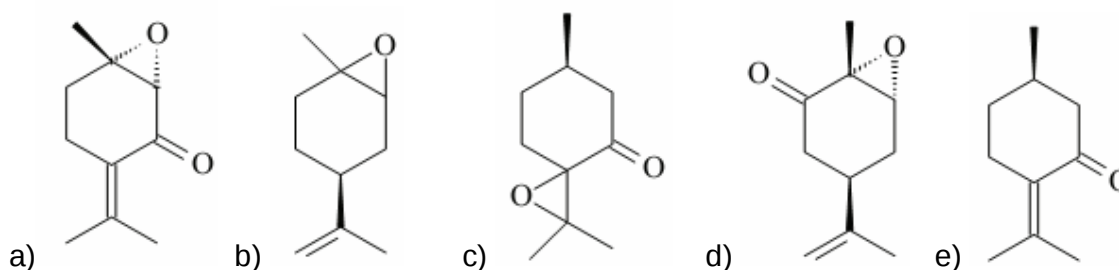


Figura 18: a) Rotundifolona; b) Epoxi-limoneno; c) Epoxi-pulegona; d) Epoxi-carvona; e) (+)-Pulegona

Ainda são poucas as pesquisas realizadas com estes análogos da rotundifolona e, conseqüentemente, poucos artigos são encontrados na literatura especializada e nas bases de dados virtuais como LILACS, MEDLINE e NAPRALERT.

O limoneno é um componente do óleo essencial de diversas frutas cítricas e espécies da família Lamiaceae. Pode oxidar-se a R-(-) carvona, *cis*- e *trans*-isômeros de óxido de limoneno. Os óxidos de limoneno são utilizados como componentes promotores da penetração de fármacos na pele, como a indometacina, especialmente quando misturados, em solução, ao etanol (AROMATHERAPY, 2006)

O óxido de limoneno apresentou efeito nematicida sobre *Meloidogyne* sp., matando cerca de 80% da população deste nematóide que infestam raízes de hortaliças (DUSCHATZKY et al., 2004).

Verificou-se também para o *D*-limoneno, propriedades anticarcinogênicas *in vivo* quando administrados subcutâneamente em ratos com tumores de pulmão (AROMATHERAPY, 2006).

O limoneno, pulegona e seus óxidos possuem efeitos tóxicos em insetos seja por efeito de contato, via sistema respiratório (efeito fumigante) e via aparelho digestivo (ingestão). Estes compostos se mostraram tóxicos para ácaros como *Oligonychus umunguis* (VIEGAS-JÚNIOR, 2003; EMEA, 2005; AROMATHERAPY, 2006).

O efeito inseticida do limoneno e seus derivados têm sido observados em pulgas de cães e gatos, tendo um efeito tóxico potente para todos os estágios de vida, da pulga de gatos (*Ctenocephalides felis*), incluindo as pulgas malation-resistentes. O (+)-limoneno reduziu significativamente o tempo de vida de ninfas de baratas domésticas, evitando a chegada destas à fase adulta (IBRAHIN et al., 2001).

O potencial alelopático de 47 monoterpenóides, incluindo epoxi-limoneno, carvona e (+)-pulegona, foi avaliado como inibidores de crescimento para sementes de *Lactuca sativa* (Alface). Dentre os componentes mais ativos, destacaram-se dois estereoisômeros da carvona, inibindo mais de 85% da germinação (VOKOU et al., 2003). A carvona e análogos foram investigados ainda como repelentes para o ácaro dos pinheiros (*Hylobius abietis*), sendo ativos em baixas concentrações (>ED50) (SCHLYTER, et al., 2004). Testada em larvas de *Aedes aegypti* (terceiro estágio larvar) em ensaio preconizado pela OMS, se mostrou bastante ativa (CL50= 43,8 ppm) (SIMAS et al., 2004).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas nos Laboratórios de Micologia (CCS/UFPB), Genética Microbiana (CCEN/UFPB) e Microbiologia (LAC/UEPB), onde funciona o Laboratório de Pesquisas em Atividades Antimicrobianas do Programa de Qualificação Institucional – PQI da UEPB.

4.2. Produtos testados

As substâncias testadas foram obtidas no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF/UFPB) e gentilmente cedidas pelo profº Dr. José Maria Barbosa Filho (óleo essencial de *Mentha x villosa* Hudson e seu componente majoritário rotundifolona) e pelo profº Dr. Damião Pergentino de Sousa (análogos sintéticos da rotundifolona).

4.2.1. Material botânico

Foram utilizadas folhas frescas da *Mentha x villosa* Hudson (hortelã da folha miúda), da família Lamiaceae, já identificada e registrada no Herbário Lauro Pires Xavier (Departamento de Sistemática e Ecologia do Centro de Ciências Exatas e da Natureza/ UFPB) e coletadas no Horto de Plantas Medicinais do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB). A espécie está registrada no Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE sobre o nº 14.996.

4.2.2. Processamento do material vegetal

O material vegetal destinado à extração do óleo essencial, foi coletado no período da manhã, para um melhor rendimento do processo extrativo. As folhas frescas da *Mentha x villosa* Hudson, foram lavadas para a retirada de resíduos e partículas indesejáveis, numa média de 2kg por coleta, trituradas por processador elétrico, à temperatura ambiente.

4.2.3. Obtenção do óleo essencial de *Mentha x vilosa* Hudson

Foram utilizadas aproximadamente 2 Kg das partes aéreas e, em seguida, trituradas por turbilhonamento em liquidificador. As folhas trituradas foram acondicionadas em um balão volumétrico de 06 litros contendo água destilada suficiente para cobri-las. Em seguida, foram submetidas a um aquecimento em manta aquecedora (Quimis), com termostato, até a ebulição da água.

O processo extrativo se deu através de arraste por vapor de água em aparelho de Clevenger adaptado, segundo Wasicky (1963). O período de extração durou em média 6 horas e foi obtido um óleo de coloração amarelada e odor característico. O óleo essencial obtido foi dessecado com sulfato de sódio anidro (Vetec-Química Fina S/A) e armazenado em recipiente âmbar, bem vedado e conservado a uma temperatura constante de 0°C.

4.2.4. Isolamento da rotundifolona a partir do óleo essencial de *Mentha x villosa* Hudson.

Os processos de isolamento e identificação da rotundifolona foram realizados conforme descrito por Hiruma (1993) e Matos et al. (1999). Resumidamente, o óleo essencial foi submetido a uma cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP), utilizando-se como eluente o Hexano P.A. (Vetec-Química Fina S. A.). As placas cromatográficas foram reveladas através de lâmpada ultravioleta λ 255nm (Modelo UV LS-25), mostrando assim a presença de um constituinte majoritário, a rotundifolona. A rotundifolona foi removida das placas cromatográficas e posteriormente recuperada da sílica gel por extração em clorofórmio P.A. (Vetec-Química Fina S. A.). Numa etapa final, a rotundifolona teve suas propriedades físicas e espectrais comparadas com as amostras-padrões disponíveis no LTF/ UFPB.

4.2.5. Obtenção dos análogos da rotundifolona

As substâncias óxido de limoneno (THOMAS; BESSIERE, 1989), óxido de pulegona (KATSUHARA, 1967) e epóxi-carvona (SANTOS et al., 1997) foram preparadas como previamente descrito. (+)-Pulegona foi adquirido de Aldrich.

4.2.6. Preparação dos produtos

O óleo essencial, rotundifolona e seus análogos foram testados inicialmente não diluídos. Para as emulsões dos óleos diluídos foram preparadas concentrações de 8% (200µl/ mL), 4% (100µl/ mL), 2% (50µl/ mL) e 1% (25µl/ mL) de acordo com protocolo de Allegrini et al. (1976). Em tubos de ensaio esterilizados (70 x 10mm) foram colocados 0,4 mL de cada produto, 0,04 mL de Tween 80 (Sigma Chemical) e quantidade suficiente para 5 mL de água destilada estéril. A emulsão foi homogeneizada por 5 minutos em agitador Vortex, sendo então processadas diluições seriadas à razão de 2. Partindo-se do primeiro tubo, foi transferido 2,5 mL para o segundo, no qual continha 2,5 mL de água destilada estéril, seguido de agitação e homogeneização, e assim sucessivamente, até a última diluição correspondente à 1%.

4.3. Substâncias

- Tween 80 (Sigma Chemical)
- Água Destilada
- Solução salina (NaCl 0,85%)
- Antibióticos
 - Tetraciclina (Lote: 1112, Fornecedor DGE. Origem: China)
 - Penicilina G (Laboratório de genética de microrganismos da UFPB)
 - Eritomicina Estolato (Lote: 200592, Fornecedor: AMT do Brasil. Origem: Índia)
 - Estreptocimina sulfato (Lote: 826.545 Fornecedor: INLAB – Brasil)
 - Discos de Antibióticos (Cefar)

4.4. Espécies microbianas

Foram utilizadas neste trabalho, as espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus* metilicina-sensíveis (MSSA) ATCC 25923, *S.aureus* metilicina-resistentes (MRSA), *S. aureus* 171C (origem humana), *S. aureus* 122U e 319U (de origem animal), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e fungos leveduriformes do gênero *Candida*: *C. albicans* ATCC 76643, *C. albicans* LM 556, *C. albicans* LM 300, *C. guilliermondii* LM18, *C. parapsilosis* LM 10, *C. stellatoidea* LM 01, *C. stellatoidea* LM 06, *C. stellatoidea* LM 018, *C. tropicalis* LM 124, *C. tropicalis* LM 556, *Saccharomyces cerevisiae*. Todas as cepas foram

mantidas em agar-Müeller-Hinton (bactérias) e ágar Sabouraud Dextrose (leveduras) à temperatura de 35°C e 4°C.

4.4.1. Isolamento e Identificação dos microrganismos

Para os ensaios foram utilizados os meios Agar Sangue, Agar Manitol Salgado e Agar Müeller-Hinton (BBL-difco). O Agar Sangue foi utilizado para verificar a pureza e a capacidade hemolítica das cepas bacterianas e o Agar Manitol Salgado para verificação da capacidade de utilização do manitol pelas cepas de *S.aureus*. O Agar Müeller-Hinton foi utilizado para a realização do Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos-TSA, por ser o meio de cultura padrão de acordo com Bauer et al. (1966) e NCCLS (2002).

As cepas de *S. aureus* de origem humana e ambiental, utilizadas nesse trabalho foram adquiridas e identificadas por métodos microbiológicos tradicionais, pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB e pelo Setor de Bacteriologia da Diagnose-Clínica de Análises Especializadas – LTDA, Campina Grande-Pb. As cepas de origem animal foram doadas da coleção do Laboratório de Genética da UFPB e as cepas ATCC foram adquiridas através da PROBAC do BRASIL. As leveduras foram obtidas no Laboratório de Micologia da Universidade de São Paulo /SP, Universidade Federal da Paraíba /PB e Instituto Adolf Lutz /São Paulo.

Para a identificação bioquímica das cepas de *S.aureus*, foram realizados testes rotineiros para detectar a produção das enzimas catalase, coagulase e DNase além de observar a utilização do manitol (fermentação e oxidação) e a produção de hemólise em Agar Sangue.

Para as leveduras foram selecionadas cepas de *C. albicans*, isoladas de amostras clínicas de pacientes portadores de infecções superficiais e/ou profundas. Os cultivos foram realizados em Agar Sabouraud Dextrose (ASD), incubados a 35°C e observados por um período de 2 a 3 dias, a fim de evidenciar o crescimento fúngico. As características macromorfológicas, microscópicas e bioquímicas dos cultivos foram estudadas e identificadas conforme rotina em laboratório de micologia de acordo com a chave de identificação proposta por GUÉHO et al. (1994).

4.4.2. Preparo da suspensão microbiana

Para as bactérias, durante a realização do ensaio, as cepas foram mantidas em meio Agar Müller-Hinton (difco) e repicadas para caldo *Brain Heart Infusion* - BHI (BBL-difco) e incubadas a 37°C/24 horas. Após este período, procedeu-se o semeio pela técnica de estrias (para obtenção de colônias isoladas) em placas de Agar Sangue, que foram incubadas a 37°C/24 horas. Com relação a obtenção do inóculo bacteriano, foram selecionadas 3 a 5 colônias semelhantes as quais foram transferidas para 5,0mL de caldo BHI e incubadas a 37°C durante 24 horas. Após este período, foi feito o subcultivo, transferindo 50µl do inóculo inicial para 30mL de caldo Müller-Hinton, incubando-o à 37°C/1h de modo a produzir uma leve turvação, de densidade visualmente equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, obtendo-se assim um inóculo de concentração aproximada de 10^6 UFC/mL. Essa suspensão, foi semeada no tempo máximo de 15 a 20 minutos após sua preparação (BAUER et al., 1966; DRUTZ, 1987; CLEELAND; SQUIRES, 1991; NCCLS, 2002).

Quanto às leveduras, as culturas foram mantidas em Agar Sabouraud Dextrose (ASD) a 35°C durante 24-72 horas. A suspensão de levedura foi preparada e padronizada em solução de cloreto de sódio a 0,85% estéril. Foi obtida uma suspensão com turvação comparativa com a do tubo 0,5 da escala de McFarland. A mesma foi ajustada no espectrofotômetro (Leitz-Photometer 340-800), para conter aproximadamente uma concentração final de 10^6 UFC/mL (CASALS, 1979, FROMTLING; PUI-YU; SHADOMY, 1983; PLEMPEL et al., 1986; CLEELAND; SQUIRES, 1991; ELLIS, 1994; NCCLS, 2002).

4.5. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação das atividades biológicas dos produtos em questão foram: Blood Agar Base (BAB), Agar Sangue (AS), Agar Manitol Salgado (AMS), Agar Mueller-Hinton (AMH), Caldo Brain Heart Infusion (BHI) e Caldo Mueller-Hinton (CMH), para as espécies bacterianas e Agar Sabouraud Dextrose – ASD para as leveduras. Estes meios de cultura, todos da DIFCO Laboratories LTDA/ Detroit foram preparados conforme as informações recomendadas pelo fabricante.

4.6. Metodologia

4.6.1. Determinação da atividade antimicrobiana – *screening*

Para a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana – *screening* foi usado o método de difusão em meio sólido, processo cavidade-placa conforme os protocolos de BAUER et al., (1966); CLEELAND; SQUIRES (1991); HADACEK; GREGER (2000); NCCLS (2002).

Para realização do teste de difusão, foram utilizadas placas de Petri (90 x 15 mm) descartáveis, estéreis, contendo 20mL do meio de cultura Agar Müller-Hinton, que foram inoculadas pela técnica de espalhamento em superfície (BAUER et al., 1966; NCCLS, 2002) (Figura 20), com auxílio de “swabs” estéreis mergulhados na suspensão contendo o inóculo, se eliminando o excesso de líquido por pressão nas paredes do tubo. O inóculo foi semeado em toda a superfície do meio, de modo a se obter um crescimento uniforme e semi-confluyente.

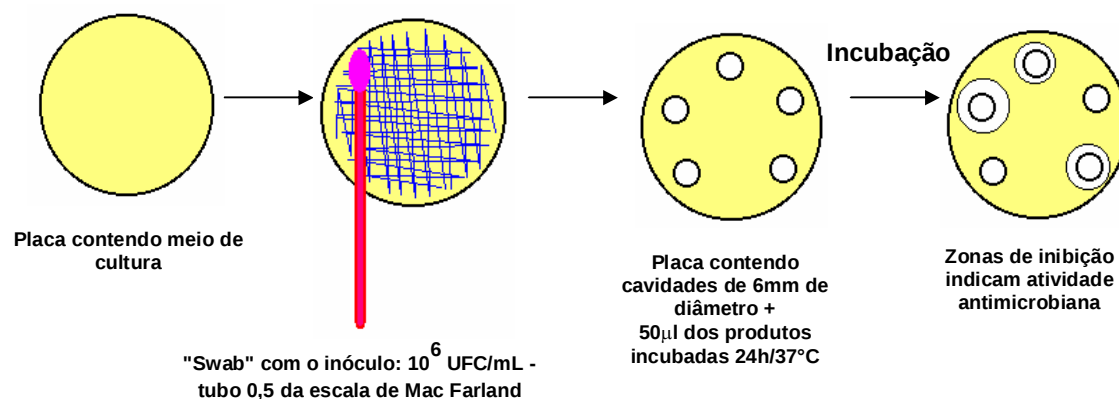


Figura 19. Técnica de difusão em meio sólido, processo cavidade-placa (NCCLS, 2002).

As placas foram colocadas para secar, durante 3 a 5 minutos, antes de se fazer as cavidades de 6 mm cada, com o auxílio de perfuradores descartáveis estéreis. Em cada cavidade foi adicionado 50µl do óleo essencial, rotundifolona e análogos em suas concentrações iniciais, para verificar a presença ou não de atividade antimicrobiana (ALVES et al., 2000). Em paralelo, foi feito o controle com os microrganismos e droga padrão cloranfenicol (30 µg/mL) para bactérias e cetoconazol (50 µg/mL) para leveduras. Todo o sistema de ensaio foi incubado à

temperatura de 37°C por 24 horas (bactérias) e 24-48 horas (leveduras) (HADACEK; GREGER, 2000).

Decorrido o tempo de incubação, foi feita a leitura e interpretação dos resultados. Foi considerado positivo o produto que inibiu o crescimento microbiano produzindo halos de inibição igual ou superior a 10 mm de diâmetro. Cada ensaio foi realizado em triplicata, para cada cepa selecionada. O resultado final foi determinado pela média aritmética do tamanho (mm) dos halos de inibição, dos valores obtidos nos três ensaios (DROUET; DUPONT, 1978; WONG-LEUNG, 1988; SAKAR, 1988).

4.6.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Os testes para a determinação da CIM, da CBM e CFM foram realizados por difusão em meio sólido, processo cavidade-placa conforme os protocolos de Bauer et al (1966); Cleeland; Squires, 1991; Hadacek; Greger (2000); NCCLS (2002).

As placas de Petri (90x15 mm), contendo 20mL do meio de cultura ágar Müeller-Hinton, foram inoculadas pela técnica de espalhamento em superfície, com auxílio de "swabs" estéreis mergulhados na suspensão bacteriana para retirar o inóculo. E no caso das leveduras, utilizou-se o meio de cultura agar Sabouraud dextrose. Em cada placa foram feitas cavidades, de 6 mm de diâmetro, com o auxílio de perfuradores descartáveis estéreis. Nesses orifícios foram colocados 50µl dos produtos, que foram diluídos no solvente utilizado na sua preparação (água destilada + tween 80), nas concentrações de 200µg/mL, 100µg/mL, 50µg/mL e 25µg/mL., para verificar a presença ou não de atividade antimicrobiana. As placas foram incubadas à 37°C por 24 horas e após este período, foram medidas, as zonas de inibição, em milímetros. Cada ensaio foi realizado em triplicata, para cada cepa selecionada. O resultado final foi determinado pela média aritmética do tamanho dos halos de inibição (mm) dos valores obtidos nos três ensaios.

A CIM e a CFM foram consideradas como a menor concentração do produto que inibiu o crescimento visível dos microrganismos após 24h/37°C de incubação para bactérias e 24-48h/35°C, para as leveduras. A CBM foi considerada como a

concentração do produto imediatamente anterior à da CIM (CLINICAL MICROBIOLOGY PROCEDURES HANDBOOK, 1992; NCCLS, 2002).

4.6.3. Determinação da cinética bacteriana

Foram determinadas as curvas de morte do óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre amostras selecionadas de *S. aureus*, estabelecendo-se que a concentração utilizada relacionada à CIM, em diferentes tempos de incubação, segundo o método proposto pelo documento M26-A do NCCLS (1998).

As amostras foram inoculadas em caldo nutritivo (BHI), incubadas a 37°C por 18 à 24h. Após este período, foram cultivadas, transferindo-se 50 µl do inóculo inicial para 50 mL de caldo Mueller-Hinton, e incubando-o à 37°C/1h de modo a produzir uma leve turvação, de densidade visualmente equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, com concentração final de 10⁶ UFC/mL. Transferiu-se 9,0mL desta cultura bacteriana e adicionou-se 1.0mL do produto a ser testado e no tubo controle foi adicionado 1,0 mL de água destilada estéril. Os tubos foram mantidos na estufa a 37°C por 24 horas, e alíquotas foram retiradas após 2, 4, 6, 8, 10, 24 e 48 horas de incubação e semeadas em BAB. A leitura das placas foi efetuada após incubação por 24/48 horas, pelo método padrão de contagem em placas (Figura 21).

A interpretação dos resultados se deu da seguinte forma: para uma substância ser considerada como bactericida deverá decrescer 3 Log₁₀ a partir do log da concentração de microrganismos que se iniciou o experimento (inóculo). Se decrescer 1 a 2 log₁₀, será considerada bacteriostática (HOSGÖR-LIMONCU; ERMERTCAN; COSAR, 2003; PESSINI et al., 2003; SALMERÓN et al., 2006).

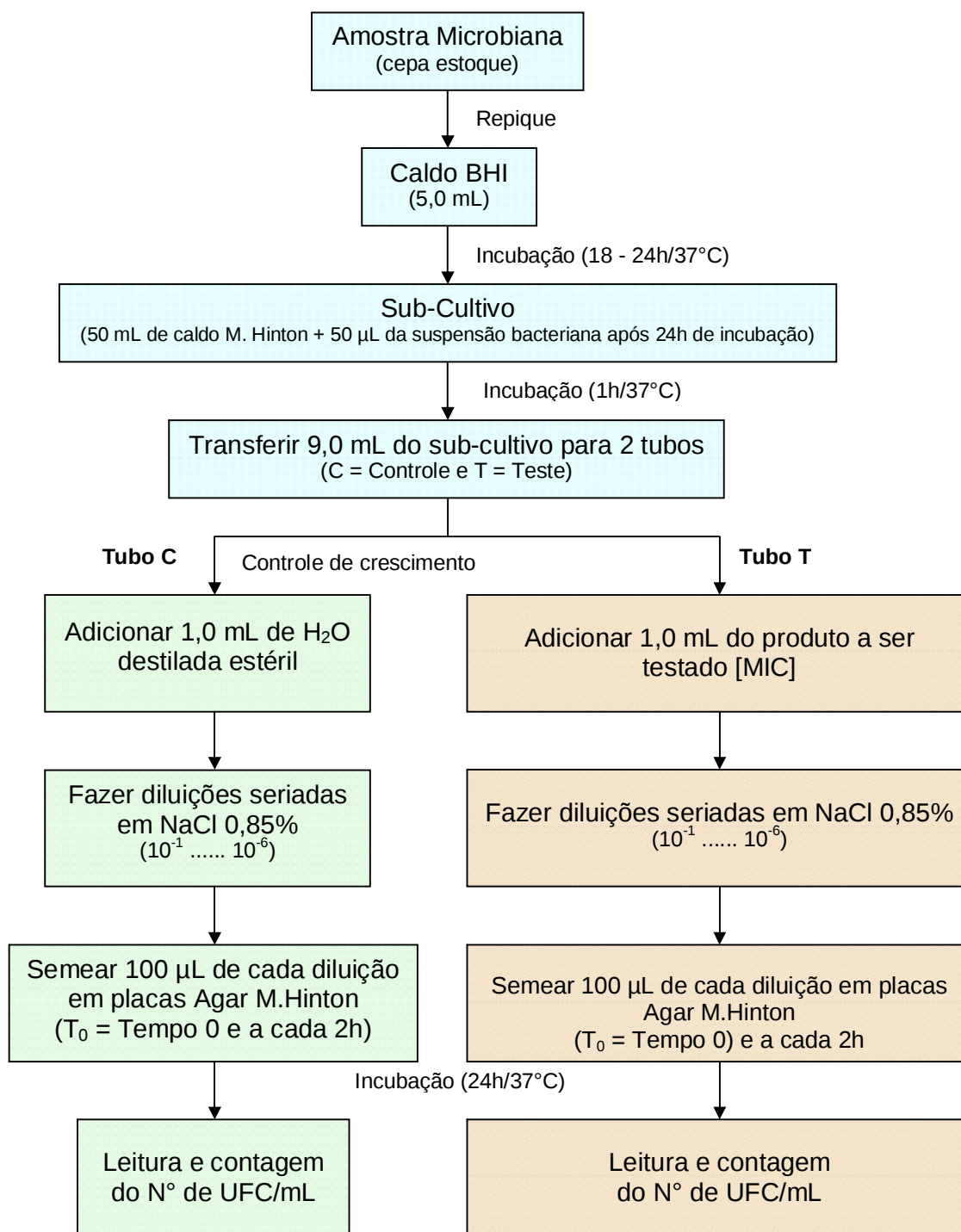


Figura 20. Fluxograma da cinética bacteriana

4.6.4. Determinação da cinética fúngica

Foram determinadas as curvas de morte microbiana após adição do óleo essencial de *Mentha x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre a amostra selecionada, *Candida albicans* ATCC 76643, estabelecendo-se concentração utilizada relacionada à CIM, em diferentes tempos de incubação, segundo o método proposto pelo documento M26-A do NCCLS, (1998).

As amostras foram inoculadas em caldo Sabouraud e incubadas a 35°C/24h. Após este período, foram subcultivadas, transferindo-se 50 µL do inóculo inicial para 50 mL de caldo Sabouraud, incubando-o à 35°C/1h de modo a produzir uma leve turvação, de densidade visualmente equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, com concentração final de 10^6 UFC/mL. Transferiu-se 9,0 mL desta cultura fúngica para um tubo teste (T) e um tubo controle (C), adicionando-se 1,0 mL do produto a ser testado no tubo T e 1,0 mL de água destilada estéril, no tubo C. Placas de agar Sabouraud dextrose (ASD), foram imediatamente semeadas com 0,1 mL dessas suspensões fúngicas, usando-se alças calibradas estéreis. As placas, previamente identificadas em T e C (Tempo 0h) foram incubadas a 35°C/24-48h. Os tubos T e C foram mantidos na estufa a 35°C por até 48 horas, e alíquotas foram retiradas após 2, 4, 6, 8, 10, 24 e 48 horas de inoculação das substâncias e semeadas em placas de ASD, as quais foram lidas após incubação por 35°C/24-48 horas, pelo método padrão de contagem em placas (Figura 22).

A interpretação dos resultados se dará da seguinte forma: para uma substância ser considerada como fungicida deverá decrescer 3 $\log_{10}$ a partir do log da concentração de microrganismos que se iniciou o experimento (inóculo). Se decrescer 1 a 2 $\log_{10}$, será considerada fungistática (CANTÓN; PÉMAN, 1999; ERNST et al., 2002; TAKEMOTO; YAMAMOTO; UEDA, 2006).

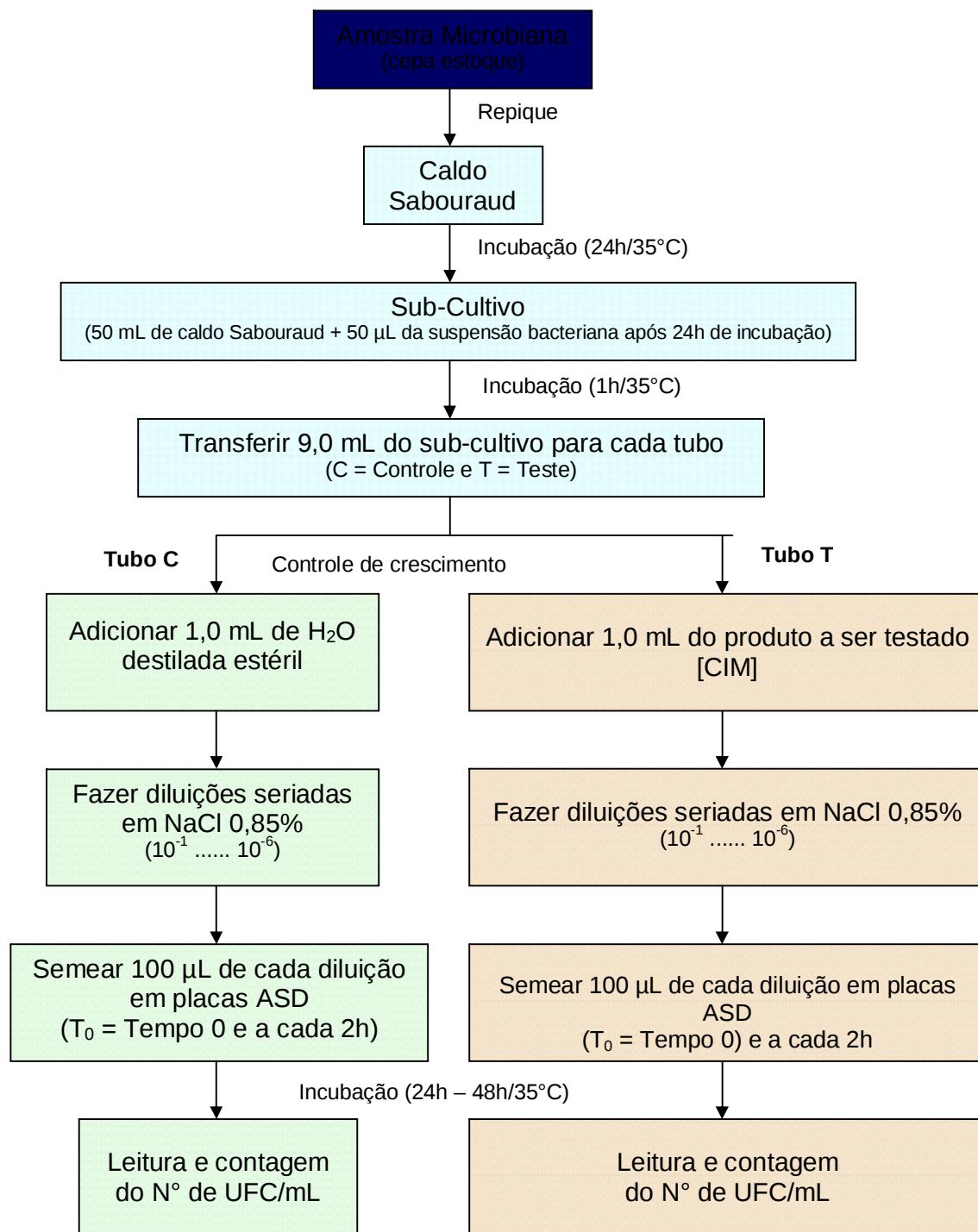


Figura 22. Fluxograma da cinética fungica

4.6.5. Determinação da caracterização fenotípica dos padrões de resistência aos antimicrobianos

A determinação do teste de sensibilidade aos antimicrobianos (Antibiograma) foi realizada pelo método de disco-difusão (BAUER et al., 1966) usando-se discos de antibióticos da Cefar, seguindo-se as recomendações do fabricante e do NCCLS (2002).

As cepas de *S. aureus* 319U e 122U foram selecionadas para este estudo por terem seu perfil plasmidial, de resistência a antimicrobianos e metais pesados previamente determinados por Pereira & Siqueira, (1995) através da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método da diluição em placas (NCCLS, 2002).

4.6.6. Avaliação da atividade curagênica

A avaliação da atividade curagênica a partir dos produtos testados sobre *S.aureus*, resistentes a drogas, foi determinada utilizando-se o valor médio da CIM. Todas as amostras bacterianas foram inoculadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion, DIFCO) a 37°C por 18-24 horas e diluídas 100 vezes no mesmo meio adicionado da concentração subinibitória (1/2 CIM) de cada produto ensaiado. Após incubação a 37°C/24horas, sob agitação, as culturas foram convenientemente diluídas em solução salina esterilizada (NaCl 0,85%) e alíquotas de 0,1mL semeadas em BAB (Blood Agar Base, DIFCO) para determinação do título (concentração em que cresceram nas placas 30 a 300 colônias). A perda da resistência a drogas foi determinada por réplica para meios de cultura, acrescidos de cada antibiótico estudado (LEDEBERG E LEDEBERG, 1952; PEREIRA, 2000). As confirmações da ocorrência de eliminação de plasmídeos nas variantes possivelmente curadas foram em placas com meio sólido (BAB) contendo os antibióticos selecionados: Penicilina e Eritromicina (Figura 23).

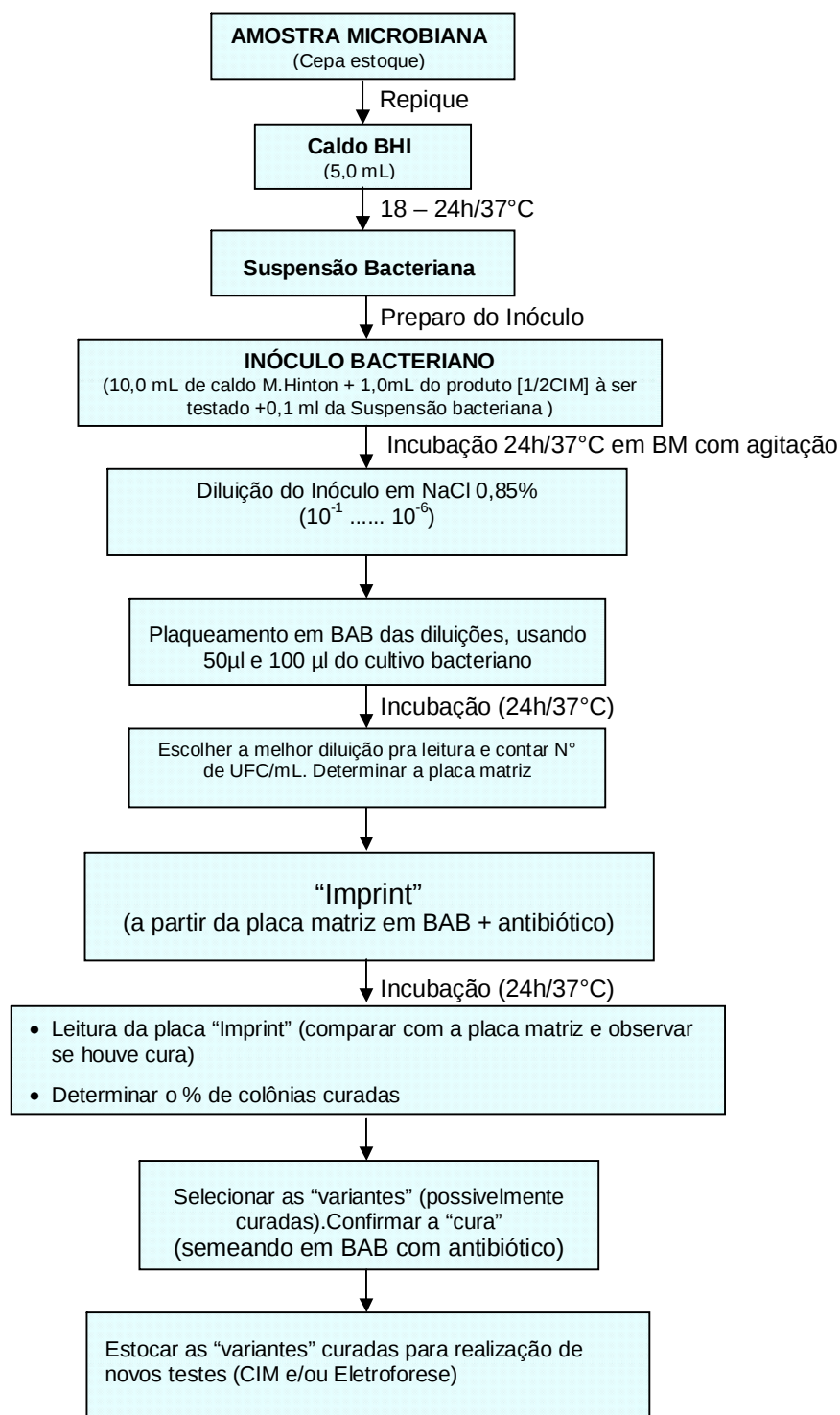


Figura 23. Fluxograma da avaliação da atividade curagênica

Experimentos controles para a determinação de eliminação espontânea de plasmídeos foram realizados anteriormente por Pereira e Siqueira (1995), utilizando o método da diluição em placas caldo e por eletroforese em gel de agarose após lise com lisostafina (GOERING; RUFF, 1983).

4.6.7. Avaliação da relação estrutura-atividade

O estudo da estrutura-atividade foi realizado observando-se a relação da mudança na molécula de rotundifolona e a variação da sua atividade antimicrobiana, em detrimento das mudanças estruturais (ARRUDA et al., 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da atividade antimicrobiana

A presença de substâncias que atuam como antibióticos, nas plantas, vem despertando interesse desde a descoberta da penicilina. Várias pesquisas, desde então, foram realizadas com o objetivo de confirmar a utilização empírica de plantas medicinais. Os componentes dos óleos essenciais exercem atividade antibacteriana por interferência na dupla camada fosfolipídica da parede celular por aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares; alteração de uma variedade de sistemas enzimáticos, incluindo aqueles envolvidos na produção de energia celular e síntese dos componentes estruturais e inativação ou destruição do material genético. Estudos demonstraram ainda que, de maneira geral, as bactérias Gram-negativas são mais resistentes à ação do óleo essencial (LAMBERT et al., 2001; RISTORI; PEREIRA; GELLI, 2002).

Os óleos essenciais obtidos de espécies vegetais do gênero *Mentha* são bastante populares e largamente utilizados na preparação de produtos humanos e veterinários. O óleo essencial de *M. x villosa* é reconhecido pelos seus constituintes como limoneno, carvona, pulegona, mentol e rotundifolona. Tanto o óleo como os seus componentes biologicamente ativos são investigados pelas suas propriedades antimicrobianas. Diversas pesquisas indicam que os óleos essenciais do gênero *Mentha* possuem atividade biológica contra diversas bactérias e fungos (OUMZIL et al., 2002; ÖZEL; ÖZGÜNVEN, 2002; SARTORATTO et al., 2004; MOUNCHID et al., 2005).

Nesta pesquisa, foi feita uma avaliação da atividade antimicrobiana do óleo de *Mentha x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos. Estes produtos foram avaliados frente às bactérias *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e uma cepa de MRSA (171C) de clínica humana. Para os fungos, foram utilizadas cepas de *C. albicans* ATCC 76645 e outras de origem laboratorial. O Quadro 3, apresenta o comportamento das amostras de *S. aureus* com o intuito de conhecer o perfil de sensibilidade frente a quinze antimicrobianos usados rotineiramente na clínica humana e veterinária. Observa-se

que a cepa ATCC foi sensível a todos os produtos testados e que *S. aureus* 171C apresentou resistência múltipla a sete dos produtos testados, sendo considerada MRSA. Todas as cepas foram sensíveis à vancomicina, gentamicina, ampicilina/sulbactam, ciprofloxacino, clindamicina e cloranfenicol. Este estudo prévio de perfil de sensibilidade, permitiu mostrar que a diversidade fenotípica das cepas em relação aos antimicrobianos tradicionais, foi independente da sua origem.

Quadro 3. Comportamento das Cepas de *S. aureus* frente aos antimicrobianos.

Cepas de <i>S. aureus</i>	ANTIMICROBIANOS															RM
	Penicilina G	Eritromicina	Tetraciclina	Ampicilina	Vancomicina	Oxacilina	Amicacina	Gentamicina	Sulfametoxazo/ Trimetoprima	Ampicilina/ Sulbactam	Ciprofloxacina	Clindamicina	Cloranfenicol	Azitromicina	Estreptomicina	n° antibióticos
122 U	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	3
319 U	R	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2
171C	R	R	R	R	S	R	I	S	R	S	S	S	S	R	S	7
ATCC 25923	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0

Legenda: S=sensível, I=intermediário, R=resistente, U=úbere, C=clínica, RM= resistência múltipla

O óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos “*in natura*”, não apresentaram nenhum poder de inibição de crescimento sobre *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922. Estes dados confirmam os resultados obtidos por ARIDOGAN et al (2002) usando óleo essencial de *M. piperita* e as mesmas cepas deste estudo (*P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922) (Tabela 1). E também aqueles resultados confirmados por SARTORATTO et al (2004), sobre a ausência de atividade do óleo essencial de espécies de *Mentha* sobre *P. aeruginosa* (Schroeter) ATCC13388 e *E. coli* CCT0547, que corroboram esta investigação e levando-se a crer que este seja um comportamento para estes produtos testados.

Foi verificado em outro estudo por Michelin et al (2005) a atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *M. pulegium* para as mesmas cepas ATCC deste estudo e apresentando resultados similares, mostrando ser este um possível comportamento do gênero, mesmo não se utilizando o óleo essencial.

Possivelmente, a não-formação de halos de inibição para a *P. aeruginosa* ATCC 27853, deve-se ao fato de que esta bactéria apresenta uma estrutura de parede celular mais complexa, estando o peptidoglicano recoberto por uma membrana externa lipopolissacarídica que reduz a permeabilidade de alguns antibióticos (MARTINS, 2005). Esta membrana externa, composta de lipopolissacarídios, cuja superfície é normalmente aniônica devido à presença de proteínas ácidas e dos grupos carboxila e fosfato da camada lipopolissacarídica, formando uma barreira de permeabilidade que confere proteção contra a ação de agentes tóxicos (HELANDER; MATTILA-SANDHOLM, 2000).

Um estudo de Mann et al. (2000), utilizando a polimixina B nonapeptídeo como agente permeabilizante de membrana em células de *P. aeruginosa*, verificou a ação do p-cimeno e γ -terpineno sobre este microrganismo, demonstrando a ineficácia destes compostos na ausência de um agente permeabilizante. Além disso, eficientes sistemas de efluxo expulsam o antimicrobiano de dentro da célula, conferindo resistência e aumentando a CIM a exemplo de vários agentes como quinolonas, aminoglicosídeos, dentre outros (LENSKI, 1998; LIVERMOORE, 2001; MARTINS, 2005).

A utilização do óleo essencial de *M. x villosa* tanto na terapêutica como nos estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* demonstram a sua atividade biológica, embora seus mecanismos de ação ainda sejam pouco elucidados. As suas ações resultam possivelmente, dos efeitos sinérgicos dos componentes ativos e inativos do óleo. A rotundifolona, componente majoritário, exerce papel fundamental nestas atividades como definido no estudo de Al-Ankari; Zaki; Al-Sultan (2004).

Tabela 1. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos, frente a microrganismos de origem ambulatorial e cepas ATCC.

Microrganismos		Produtos testados - <i>In natura</i>						Controle
		Óleo essencial	Rotundifolona	Epoxi-limoneno	Epoxi-pulegona	Epoxi-carvona	(+) – pulegona	
Halos de inibição (mm)								
Bactérias	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0	0	0	0
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	18	16	15	15	14	13	22
	<i>S. aureus</i> 319U	16	15	13	14	15	13	20
	<i>S. aureus</i> 122U	16	14	12	12	14	14	19
	<i>S. aureus</i> 171C (MRSA)	17	16	16	13	15	16	18
Leveduras	<i>C. albicans</i> ATCC 76645	17	15	16	15	13	16	22
	<i>C. albicans</i> LM 556	23	0	10	10	12	11	16
	<i>C. albicans</i> LM 300	21	0	10	11	13	11	18
	<i>C. guilliermondii</i> LM 18	23	23	20	15	10	19	20
	<i>C. parapsilosis</i> LM 10	18	0	12	0	0	10	14
	<i>C. stellatoidea</i> LM 01	21	24	17	18	13	22	20
	<i>C. stellatoidea</i> LM 06	22	0	11	0	10	10	18
	<i>C. stellatoidea</i> LM 18	20	17	12	0	10	12	22
	<i>C. tropicalis</i> LM 124	17	18	11	11	12	20	16
	<i>C. tropicalis</i> LM 556	19	23	13	10	12	20	17
	<i>S. cerevisae</i>	15	18	14	17	13	16	18

Já para a *E. coli* ATCC 25922, pode-se supor que a ineficácia dos produtos, além das características de parede celular, próprias da bactéria, a presença de fatores de virulência como plasmídios, transposons e integrinas e um eficiente processo de efluxo do antimicrobiano do meio intra-celular para o meio extra-celular, são fatores que podem contribuir para o aumento da defesa/resistência desta cepa. Um estudo feito por Imai et al. (2001), também verificou a falta de atividade do óleo essencial de *M. piperita* L, *M. spicata* L e *M. arvensis* L, além de quatro componentes majoritários dos óleos extraídos destas espécies (incluindo-se

aqui a rotundifolona) frente a cepa de *E. coli* O157:H7. Embora a cepa testada não seja a desta investigação, pode-se compará-la pelo perfil e particularidades comuns ao gênero *Escherichia* e corroborando esta investigação (LENSKI, 1998; MA; CHANG, 2004; SAÉNZ et al., 2004; ERB et al., 2007).

Em relação às cepas de *S. aureus*, observou-se que todos os produtos apresentaram atividade antibacteriana, determinada pela presença de zonas de inibição de crescimento com diâmetros que variaram de 13 mm ((+)-pulegona) a 18 mm (óleo essencial de *M. x villosa*) para a cepa de *S. aureus* ATCC 25923. Os menores halos observados foram os de epoxi-limoneno e epoxi-pulegona para a cepa de *S. aureus* 122U (12 mm), epoxi-limoneno e (+) – pulegona para a cepa de *S. aureus* 319U (13 e 14mm respectivamente) e epoxi-pulegona para a cepa *S. aureus* 171C (MRSA) (13 mm). Este fato pode ser justificado pelo comportamento individual de cada cepa e pela presença de diferentes genes de resistência plasmidial e/ou cromossomial que determinam, além dos fatores de virulência, a resistência aos agentes antimicrobianos (TRABULSI et al., 1999). Este fato também foi observado no estudo de Imai et al (2001) ao testar cepas de MRSA e MSSA com comportamentos similares aos encontrados nesta investigação.

Todos os produtos apresentaram atividade antifúngica frente à cepa de *C. albicans* ATCC 76645, apresentando zonas de inibição que variaram de 13 mm (epoxi-carvona) a 17 mm (*M. x villosa*). Ainda em relação a *C. albicans* ATCC 76645, o óleo essencial de *M. x villosa* foi o produto que apresentou a maior zona de inibição. Este fato ocorre, possivelmente, porque o óleo essencial encerra nele mesmo, diversos compostos químicos que podem interagir de forma sinérgica/potencializadora, tornando este produto com alto poder de atividade antimicrobiana (CARSON et al., 1995; ÖZEL; ÖZGÜVEN, 2002; MOUNCHID et al., 2005). Outro fator que também poderia ser estudado e considerado seria em relação à habilidade de difusão do produto no meio de cultura e a sua volatilidade, que pode favorecer em algumas situações o diâmetro das zonas de inibição.

A cepa menos sensível aos produtos testados foi *C. parapsilosis* LM10. Já as mais sensíveis foram *C. albicans* ATCC 76645, *C. guilliermondii* LM18, *C. stellatoidea* LM 01, *C. tropicalis* LM 124, *C. tropicalis* LM 556 e *S. cerevisiae*. *C. parapsilosis* LM10 tem sido reportada em alguns estudos (DERESINSKY et al., 1995; D'ANTONIO et al., 1996; BENJAMIN-JR et al., 2000; SARVIKIVI et al., 2005)

como uma cepa emergente em relação à sua multiresistência. Estudos subseqüentes com esta cepa poderão elucidar este comportamento singular diante dos produtos testados.

Ainda em relação aos fungos testados, os produtos mais ativos foram o óleo de *Mentha x villosa*, epoxi-limoneno e a (+)-pulegona. E o produto menos ativo foi a rotundifolona.

Os resultados deste estudo em relação à estrutura-atividade antimicrobiana da rotundifolona e seus análogos mostraram que o epoxi-limoneno e (+)-pulegona apresentaram atividade antimicrobiana similares, divergindo discretamente somente em relação aos tamanhos dos halos de inibição. Estes resultados demonstraram que todos os compostos avaliados apresentam perfil de promissores antimicrobianos e que tanto o grupo carbonílico quanto o epóxido possivelmente contribuíram para a atividade antimicrobiana do monoterpene rotundifolona. Também observou-se que a presença de um grupo epóxido exocíclico adjacente a carbonila na estrutura da epoxi-pulegona não potencializou a ação antimicrobiana em relação à (+) – pulegona e à rotundifolona. De acordo com Ohno (2003), as diferenças existentes na atividade do óleo essencial justificam-se pelos seus subprodutos devido à relação estrutura-atividade.

A presença de um anel cetônico na molécula epoxicarvona em uma porção diferente da molécula original rotundifolona, como também a presença de um único grupo epóxido e a ausência do grupo cetona na molécula de epoxilimoneno podem ser, possivelmente, fatores que interferem na atividade antimicrobiana, quando avaliadas em função do tamanho dos halos de inibição. Entretanto, não se pode determinar a atividade antimicrobiana de um produto, somente em função da ausência/presença de zonas de inibição, como também só em função do tamanho desta zona.

O epoxi-limoneno foi reportado em um estudo *in vitro* de Vaddi et al. (2003), como um produto de alta penetrabilidade na derme e, inclusive, facilitando a penetração de substâncias químicas através de membranas celulares, sendo responsável em 100% dos testes, pela ruptura da bicamada lipídica. As pesquisas publicadas por Cox et al. (1998) e Preeti et al. (2004), demonstraram que a atividade antimicrobiana do limoneno e epoxi-limoneno, origina-se em parte, de sua habilidade

para romper ou penetrar as estruturas lipídicas e em aumentar a permeabilidade da membrana a íons como o potássio. Isto sugere que compostos terpenóides que são microbiologicamente ativos, podem afetar a perda de potássio das células microbianas, levando à morte celular. Pode-se conjecturar, a sua destacada ação antimicrobiana neste ensaio dever-se à esta ação na parede celular microbiana.

5.2. Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM).

A avaliação da CIM e da CBM do óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e análogos sintéticos, frente à cepas de *S. aureus* estão apresentados na Tabela 2. A CIM foi considerada como a menor concentração do produto que inibiu o crescimento visível dos microrganismos após 24h/37°C de incubação para bactérias e 24-48h/35°C, para as leveduras. A CBM foi considerada como a concentração do produto imediatamente anterior à da CIM.

Estudos de Sartoratto et al. (2004) e Mounchid et al. (2005), vêm corroborar atividade antimicrobiana do gênero *Mentha* sobre bactérias e fungos, fato este observado nesta investigação.

Em relação à avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) para bactérias, foram utilizadas apenas as substâncias mais ativas, que foram testadas frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Figura 24), *S. aureus* 171C MRSA de origem humana e duas cepas com perfil plasmidial de resistência à antibióticos conhecidos (*S. aureus* 319U e 122U) de origem animal.

Observa-se que todos os produtos apresentaram CIM para a diluição de 50µl/ mL. Nenhum dos produtos testados apresentou atividade na concentração de 25µl/ mL.



Figura 23: Atividade antimicrobiana e avaliação da CIM e CBM do óleo essencial de *M. x villosa* Hudson (**E**) e Rotundifolona (**D**) nas concentrações: "in natura" (1), 200 (2), 100 (3), 50 (4) e 25µl/ mL (5) sobre *S. aureus* ATCC 25923

O efeito evidenciado do óleo essencial sobre as cepas estudadas, pode ser atribuído à totalidade dos componentes presentes neste óleo. Os óleos essenciais que possuem atividade antimicrobiana geralmente contêm uma alta percentagem de compostos fenólicos, como é o caso do óleo essencial de *M. x villosa* e cujo mecanismo de ação pode ser similar a de outros fenóis como alteração na membrana citoplasmática, interferência nas bombas de próton, efluxo de eletrólitos, transporte ativo e coagulação do conteúdo celular. O acúmulo de terpeno, incluindo a rotundifolona, aumenta a permeabilidade a prótons em células de *S. aureus*, tendo como resultado a diminuição ou dispersão da bomba de próton (DORMAN; DEANS, 2000).

Levando-se em conta as relações de estrutura-atividade, a presença de um único grupo epóxido e a ausência do grupo cetona na molécula do epoxi-limoneno, a presença do anel cetônico na molécula de epoxi-carvona em uma

posição diferente da molécula original (rotundifolona), podem ser fatores que influenciem a diminuição da CIM para estes produtos.

A presença de um grupo epóxido exocíclico adjacente a carbonila na estrutura da epoxi-pulegona possivelmente, pode ter influenciado na diminuição da CIM em relação à (+) – pulegona e à rotundifolona. A relação estrutura-atividade verificada nesta pesquisa é corroborada pelos estudos de Oumzil et al. (2002) que observou o mesmo comportamento destes compostos frente a 19 espécies de *S. aureus*, e 3 espécies de *C. albicans*.

A (+) – pulegona é um produto que faz parte da via biossintética de monoterpenos no gênero *Mentha* (TURNER; CROTEAU, 2004). É utilizada na Comunidade Européia como flavorizante de alimentos, além da utilização na medicina herbal de produtos que a contém (chás, cápsulas, shampoos, cremes, géis dentre outros). Devido à sua alta toxicidade, o Committee on Herbal Medicinal Products (EMA, 2005) da referida Comunidade, estabeleceu um alerta dos órgãos de farmacovigilância para os produtos e/ou derivados dos óleos essenciais de *Mentha* spp. Tal toxicidade pode justificar uma maior CIM deste produto em relação à epoxi-pulegona, determinada também em estudos *in vivo* (EDRIS, 2007).

Além da relação estrutura-atividade para os produtos que apresentaram as menores CIMs, deve-se levar em conta também as particularidades fenotípicas de cada cepa (319U e 122U) testadas.

Tabela 2. Avaliação da CIM e da CBM do óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e análogos sintéticos frente a bactérias

Produtos testados	Concentrações (μ l/ mL)	Microrganismos testados			
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (MSSA)	<i>S. aureus</i> 171C (MRSA)	<i>S. aureus</i> 319U	<i>S. aureus</i> 122U
		Halos de inibição (mm)			
Óleo essencial de <i>M. x villosa</i> Hudson	200	18	17	16	16
	100	13	13	13	14
	50	10	11	11	10
	25	0	0	0	0
Rotundifolona	200	16	16	15	14
	100	14	13	13	13
	50	11	10	10	10
	25	0	0	0	0
Epoxi-limoneno	200	15	16	13	12
	100	13	15	12	12
	50	10	11	10	10
	25	0	0	0	0
Epoxi-pulegona	200	15	13	14	12
	100	14	12	13	11
	50	11	10	10	10
	25	0	0	0	0
Epoxi-carvona	200	14	15	15	14
	100	12	14	12	11
	50	10	11	10	10
	25	0	0	0	0
(+) - pulegona	200	13	16	13	14
	100	12	15	10	11
	50	11	10	10	10
	25	0	0	0	0

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos da avaliação da CIM para leveduras e da CFM do óleo de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos. A CFM foi considerada como a menor concentração do produto que inibiu o crescimento visível dos microrganismos após 24-48h/35°C de incubação, para as leveduras. A CBM foi considerada como a concentração do produto imediatamente anterior à da CIM

Para a cepa de *C. albicans* ATCC 76645 e a cepa de *S. cerevisiae*, tanto o óleo essencial de *M. x villosa* quanto a rotundifolona e seus análogos sintéticos, apresentaram CIM de 50 μ l/ mL, sendo estas as cepas com maior sensibilidade deste

5.3. Cinética bacteriana

O crescimento de uma população microbiana é estudado por análise da respectiva curva de crescimento. Quando os microrganismos são cultivados em um sistema fechado, as concentrações de nutrientes sofrem um declínio enquanto aumentam as concentrações dos produtos de degradação. O crescimento dos microrganismos que se reproduzem por fissão binária pode ser representado graficamente como o logaritmo decimal do número de células versus o tempo de incubação. A curva resultante caracteriza-se por quatro fases distintas: fase de arranque, fase exponencial de crescimento, fase estacionária e fase de morte. As curvas de morte ou mortalidade-tempo proporcionam uma informação sobre a ação de um produto em relação a um microrganismo, mostrando se este produto possui perfil de bactericida ou bacteriostático (DEVER; JORGENSEN; BARBOUR, 1992; VISCONTI, 2002; HOSGÖR-LIMONCU; ERMERTCAN; COSAR, 2003; PESSINI et al., 2003; SALMERÓN et al., 2006).

Nesta pesquisa, verificamos a intervenção do óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e análogos sintéticos sobre a cinética bacteriana das cepas *S.aureus* ATCC 25923, *S.aureus* (171C – MRSA), *S.aureus* 122 U e *S. aureus* 319 U. A cepa 171C foi selecionada, devido ser uma cepa MRSA. As duas últimas cepas foram selecionadas para este estudo por terem o perfil plasmidial de resistência a antimicrobianos e metais pesados conhecidos sendo previamente determinados por Pereira; Siqueira (1995) e utilizadas no ensaio da cura de plasmídios.

A Tabela 4 e o Gráfico 1, apresentam a cinética bacteriana da cepa MRSA (171C) sobre o óleo de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos. Verifica-se que todos os produtos inibiram o crescimento bacteriano em tempos diferentes e todos são bactericidas para esta cepa.

Observa-se que o crescimento da cepa, em relação à (+)-pulegona, decresceu quatro logs na quarta hora ($2,90 \times 10^2$) e cessando de crescer (morte) na sexta hora. Desta forma, sendo o produto com o melhor desempenho para este ensaio. O óleo essencial de *M. x villosa* Hudson e a rotundifolona influenciaram o crescimento bacteriano, decrescendo três logs na quarta hora ($2,10 \times 10^3$ e $1,10 \times 10^3$), ocorrendo a morte na sexta e oitava hora, respectivamente. A epoxi-carvona conseguiu que a cepa decrescesse seu crescimento em três logs na sexta hora

($1,10 \times 10^3$) e com morte na oitava hora. Para o epoxi-limoneno e a epoxi-pulegona, a cepa decresceu três logs em tempos diferentes (oitava hora ($2,10 \times 10^3$) e décima hora ($1,30 \times 10^3$) respectivamente). Mas ambas só conseguiram inibir totalmente o crescimento na leitura das vinte e quatro horas. Em relação à estrutura-atividade da rotundifolona e seus análogos, a (+)-pulegona foi o produto com maior desempenho e a ausência da molécula de oxigênio exocíclico, possivelmente, influenciou a queda de quatro logs de crescimento na quarta hora.

A atividade biológica de *M. x villosa* Hudson nas amebíases, giardíases e tricomoníases foi investigada por Borba (1988), Melo et al. (1992), Matos (1998), Matos (1999) e Silva et al. (2006). Todos relataram que esta atividade contra essas protozooses ocorre, provavelmente, devido à presença do composto (+)-pulegona, encontrado no óleo essencial. Estes dados validam esta pesquisa quando verifica-se que a (+)-pulegona apresentou ótimos desempenhos durante os ensaios de cinética realizados.

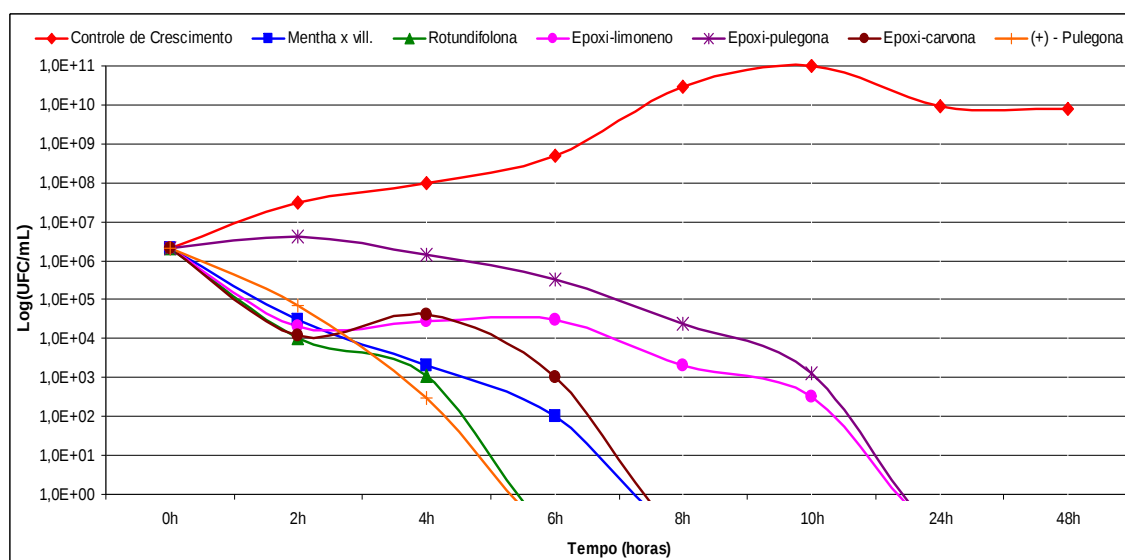
Resultados semelhantes a este estudo também foram encontrados em pesquisa feita por Imai et al. (2001), em que óleos essenciais de três espécies do gênero *Mentha* inibiram o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 e MRSA, dados que vem validar esta investigação e a dinâmica do MRSA frente ao óleo essencial de *M. X villosa* Hudson.

Tabela 4. Cinética bacteriana do óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre *S. aureus* MRSA (171C).

PRODUTOS 50µL/mL	UFC/ mL - Leitura em horas							
	0	2	4	6	8	10	24	48
Controle de Crescimento	$2,16 \times 10^6$	$3,00 \times 10^7$	$1,00 \times 10^8$	$5,00 \times 10^8$	$3,00 \times 10^{10}$	$1,00 \times 10^{11}$	$9,10 \times 10^9$	$8,00 \times 10^9$
Óleo essencial	$2,16 \times 10^6$	$3,00 \times 10^4$	$2,10 \times 10^3$	$1,00 \times 10^2$	0	0	0	0
Rotundifolona	$2,16 \times 10^6$	$1,00 \times 10^4$	$1,10 \times 10^3$	0	0	0	0	0
Epoxi-limoneno	$2,16 \times 10^6$	$2,00 \times 10^4$	$2,80 \times 10^4$	$2,92 \times 10^4$	$2,10 \times 10^3$	$3,10 \times 10^2$	0	0
Epoxi-pulegona	$2,16 \times 10^6$	$4,16 \times 10^6$	$1,40 \times 10^6$	$3,28 \times 10^5$	$2,40 \times 10^4$	$1,30 \times 10^3$	0	0
Epoxi-carvona	$2,16 \times 10^6$	$1,20 \times 10^4$	$4,00 \times 10^4$	$1,00 \times 10^3$	0	0	0	0
(+) - Pulegona	$2,16 \times 10^6$	$7,30 \times 10^4$	$2,90 \times 10^2$	0	0	0	0	0

Legenda: (0) = Não houve crescimento

Gráfico 1. Cinética bacteriana do óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre *S. aureus* MRSA (171C).



Na Tabela 5 e no Gráfico 2, estão representados o perfil da cinética bacteriana da cepa *S. aureus* ATCC 25923 frente aos produtos testados. Observa-se que todos os produtos inibiram o crescimento bacteriano em tempos diferentes, sendo todos bactericidas nesta concentração para esta cepa. O óleo essencial de *Mentha x villosa* Hudson, rotundifolona e a (+)-pulegona foram os produtos que apresentaram melhor desempenho na interferência do crescimento bacteriano, decrescendo três logs na quarta hora ($6,30 \times 10^3$, $1,00 \times 10^3$ e $2,00 \times 10^3$, respectivamente). Verifica-se ainda que a rotundifolona e a (+)-pulegona inibiram totalmente o crescimento visível na sexta hora enquanto que o óleo essencial de *M. x villosa* Hudson só inibiu totalmente na oitava hora.

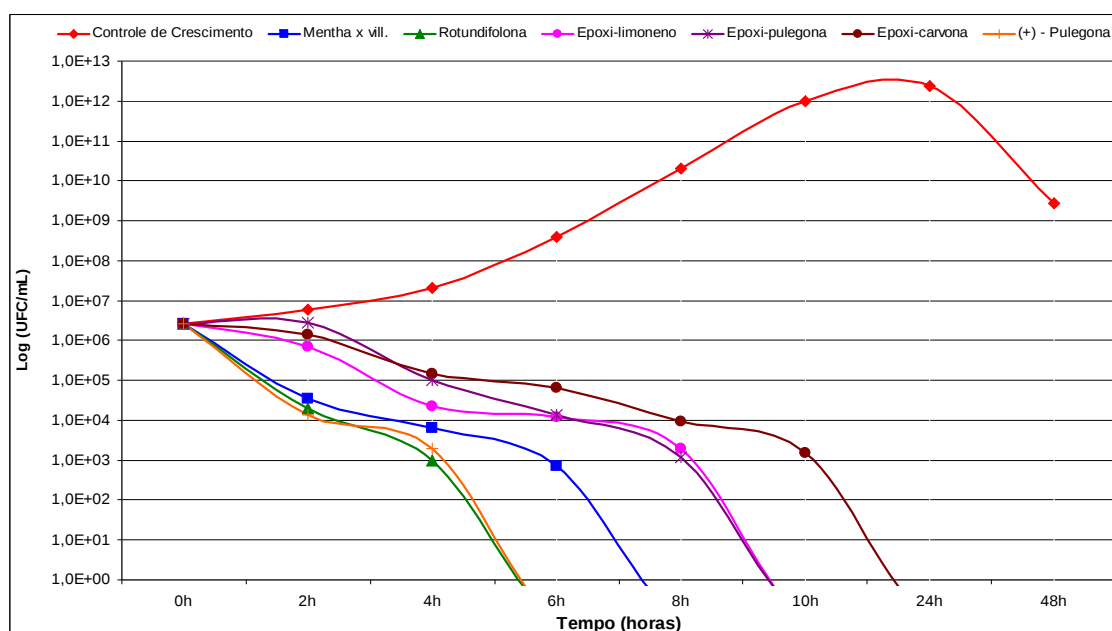
Em estudo de Imai et al. (2001), verificou-se a atividade antimicrobiana de três espécies de *Mentha* sobre a cepa *S. aureus* ATCC 25923, obtendo comportamentos similares aos encontrados nesta investigação validando portanto, este experimento.

Tabela 5. Cinética bacteriana do óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre *S. aureus* ATCC 25923.

Produtos 50µl/mL	UFC/mL - Leitura em horas							
	0	2	4	6	8	10	24	48
Controle	$2,57 \times 10^6$	$6,00 \times 10^6$	$2,10 \times 10^7$	$4,00 \times 10^8$	$2,00 \times 10^{10}$	$1,00 \times 10^{12}$	$2,40 \times 10^{12}$	$2,80 \times 10^9$
Óleo Essencial	$2,57 \times 10^6$	$3,52 \times 10^4$	$6,30 \times 10^3$	$7,00 \times 10^2$	0	0	0	0
Rotundifolona	$2,57 \times 10^6$	$2,00 \times 10^4$	$1,00 \times 10^3$	0	0	0	0	0
Epoxi-limoneno	$2,57 \times 10^6$	$6,90 \times 10^5$	$2,20 \times 10^4$	$1,20 \times 10^4$	$2,00 \times 10^3$	0	0	0
Epoxi-pulegona	$2,57 \times 10^6$	$2,84 \times 10^6$	$1,00 \times 10^5$	$1,36 \times 10^4$	$1,20 \times 10^3$	0	0	0
Epoxi-carvona	$2,57 \times 10^6$	$1,44 \times 10^6$	$1,50 \times 10^5$	$6,60 \times 10^4$	$9,40 \times 10^3$	$1,50 \times 10^3$	0	0
(+) - Pulegona	$2,57 \times 10^6$	$1,00 \times 10^4$	$2,00 \times 10^3$	0	0	0	0	0

Legenda: (0) = Não houve crescimento

Gráfico 2. Cinética bacteriana do óleo essencial de *Mentha x villosa* Hudson, rotundifolona e análogos sintéticos sobre a cepa *S. aureus* ATCC 25923.



A cinética bacteriana sobre *S. aureus* ATCC 25923 frente à rotundifolona é apresentada na Figura 24.

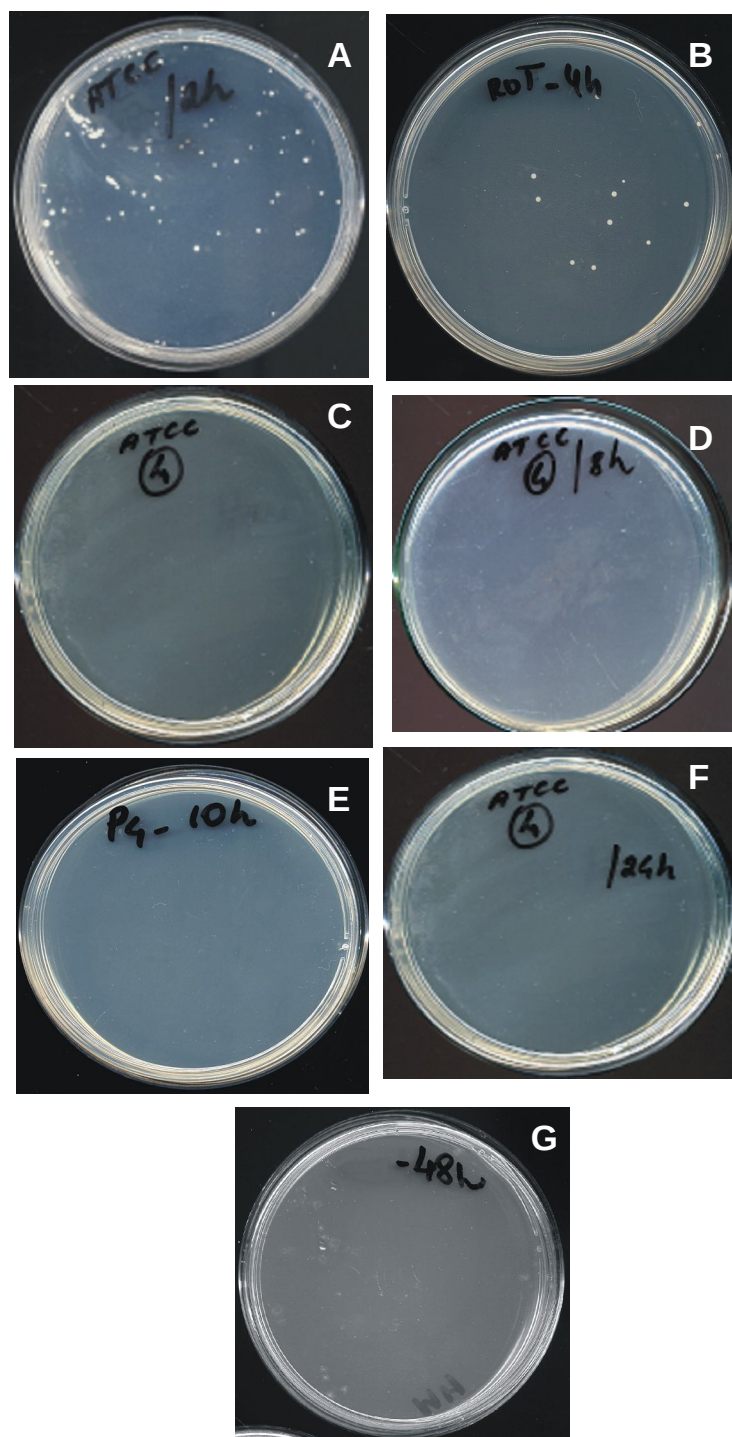


Figura 24: Cinética bacteriana de *S. aureus* ATCC 25923 para a rotundifolona nos tempos 2h (A), 4h (B), 6h (C), 8h (D), 10h (E), 24h (F) e 48h (G).

Os dados referentes à cinética bacteriana (curva de morte) de *S. aureus* ATCC 25923 frente ao óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e análogos sintéticos, após 15 dias de preparação destes, estão registrados na Tabela 6 e Gráfico 3. O interesse em realizar-se este experimento foi o de investigar a integridade/ atividade destes produtos após este tempo de preparação, mantendo-os em recipientes âmbar, devidamente fechados e sob refrigeração durante este período.

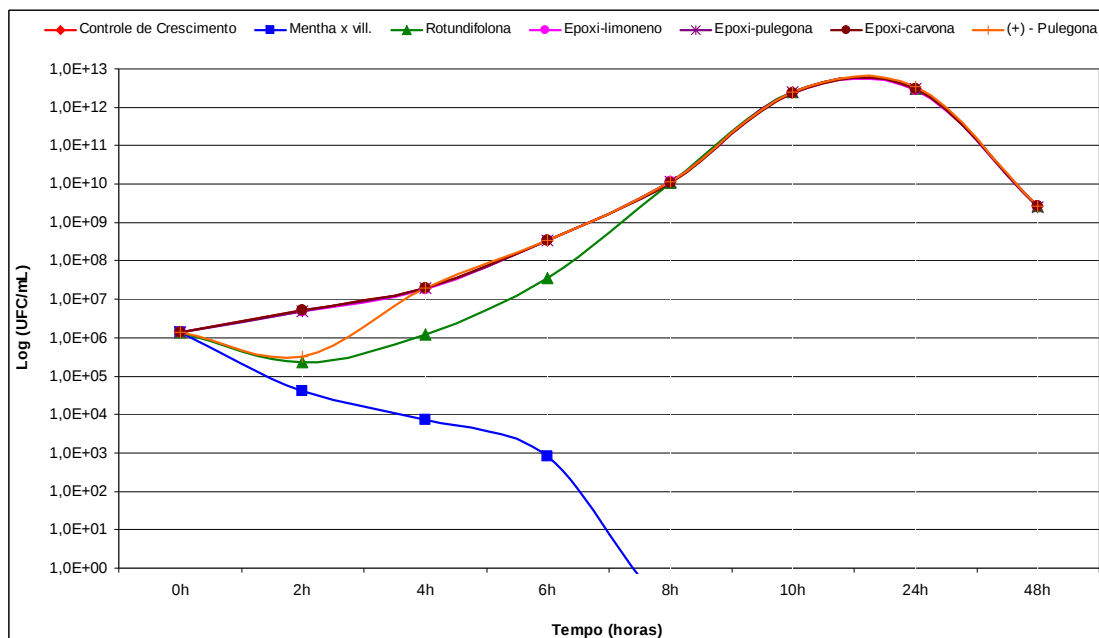
Observa-se que só o óleo essencial de *M. x villosa* Hudson manteve-se com atividade, permanecendo o decréscimo de três logs no crescimento bacteriano na quarta hora, com total inibição na oitava hora, mantendo os mesmos parâmetros do experimento anterior. Possivelmente, o sinergismo da totalidade dos componentes encontrados no óleo essencial tenha influenciado na estabilidade/ atividade deste. Fato não observado no seu componente majoritário, rotundifolona e seus análogos sintéticos.

Tabela 6. Avaliação da cinética bacteriana do óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre *S. aureus* ATCC 25923, após 15 dias de preparação destes, para verificação da estabilidade.

PRODUTOS 50 μ L/mL	UFC/ mL - Leitura em horas							
	0	2	4	6	8	10	24	48
Controle	$1,37 \times 10^6$	$5,12 \times 10^6$	$1,98 \times 10^7$	$3,50 \times 10^8$	$1,18 \times 10^{10}$	$2,50 \times 10^{12}$	$3,10 \times 10^{12}$	$2,70 \times 10^9$
Óleo essencial	$1,37 \times 10^6$	$4,10 \times 10^4$	$7,20 \times 10^3$	$8,13 \times 10^2$	0	0	0	0
Rotundifolona	$1,37 \times 10^6$	$2,28 \times 10^5$	$1,20 \times 10^6$	$3,50 \times 10^7$	$1,10 \times 10^{10}$	$2,44 \times 10^{12}$	$3,00 \times 10^{12}$	$2,68 \times 10^9$
Epoxi-limoneno	$1,37 \times 10^6$	$4,80 \times 10^6$	$1,89 \times 10^7$	$3,31 \times 10^8$	$1,12 \times 10^{10}$	$2,39 \times 10^{12}$	$2,89 \times 10^{12}$	$2,66 \times 10^9$
Epoxi-pulegona	$1,37 \times 10^6$	$5,00 \times 10^6$	$1,93 \times 10^7$	$3,44 \times 10^8$	$1,13 \times 10^{10}$	$2,47 \times 10^{12}$	$2,97 \times 10^{12}$	$2,50 \times 10^9$
Epoxi-carvona	$1,37 \times 10^6$	$5,18 \times 10^6$	$1,96 \times 10^7$	$3,52 \times 10^8$	$1,10 \times 10^{10}$	$2,40 \times 10^{12}$	$3,00 \times 10^{12}$	$2,59 \times 10^9$
(+) - Pulegona	$1,37 \times 10^6$	$3,2 \times 10^5$	$1,90 \times 10^7$	$3,50 \times 10^8$	$1,18 \times 10^{10}$	$2,49 \times 10^{12}$	$3,49 \times 10^{12}$	$2,69 \times 10^9$

Legenda: (0) = Não houve crescimento

Gráfico 3. Avaliação da cinética bacteriana do óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre *S. aureus* ATCC 25923, após 15 dias de preparação destes, para verificação da estabilidade.



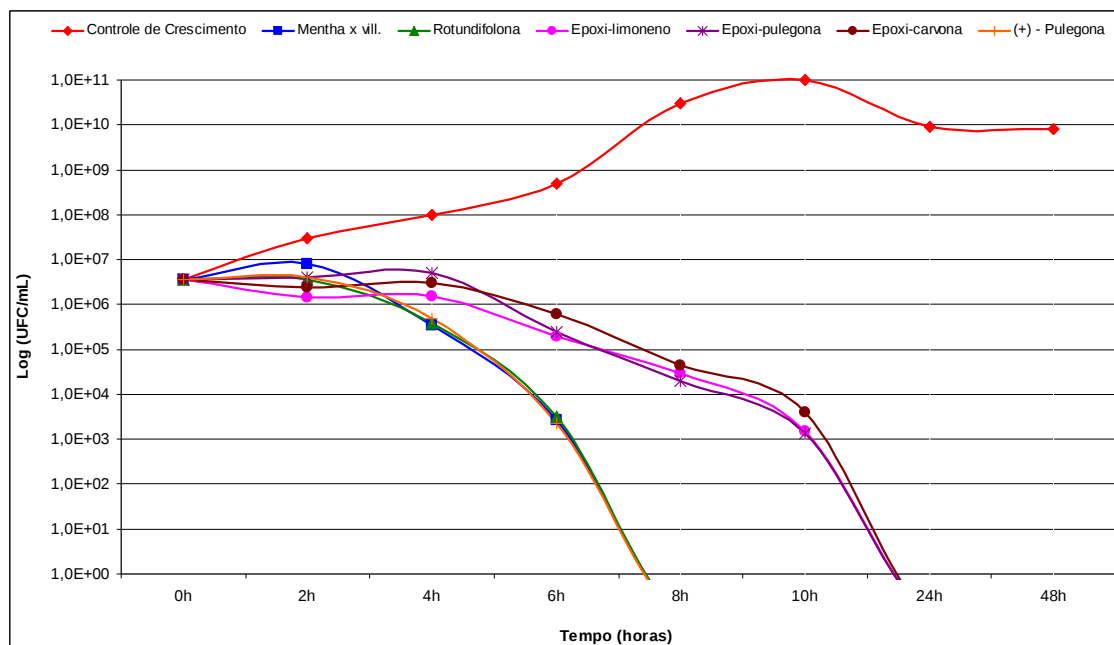
A Tabela 7 e o Gráfico 4, apresentam os dados da avaliação da cinética bacteriana (curva de morte) do óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre *S. aureus* 122U. Verifica-se que todos os produtos exerceram atividade sobre o crescimento bacteriano, sendo bactericidas na concentração ensaiada. *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e (+)-pulegona obtiveram os melhores desempenhos, decrescendo três logs na sexta hora ($2,60 \times 10^3$, $3,20 \times 10^3$ e $2,20 \times 10^3$, respectivamente), inibindo o crescimento totalmente a partir da oitava hora. Observa-se ainda que estes produtos obtiveram ainda o mesmo comportamento em relação ao log de crescimento/ tempo, comparando-se as suas curvas. Os produtos epoxi-limoneno, epoxi-pulegona e epoxi-carvona, só conseguiram decrescer 3 logs na décima hora ($1,50 \times 10^3$, $1,32 \times 10^3$ e $4,00 \times 10^3$, respectivamente). Observa-se ainda que estes produtos obtiveram ainda o mesmo comportamento em relação ao log de crescimento/ tempo, comparando-se as suas curvas.

Tabela 7. Avaliação da cinética bacteriana do óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre *S. aureus* 122U

PRODUTOS 50 µl/mL	UFC/ mL - Leitura em horas							
	0	2	4	6	8	10	24	48
Controle	$3,60 \times 10^6$	$3,00 \times 10^7$	$1,00 \times 10^8$	$5,00 \times 10^8$	$3,00 \times 10^{10}$	$1,00 \times 10^{11}$	$9,10 \times 10^9$	$8,00 \times 10^9$
Óleo essencial	$3,60 \times 10^6$	$8,10 \times 10^6$	$3,50 \times 10^5$	$2,60 \times 10^3$	0	0	0	0
Rotundifolona	$3,60 \times 10^6$	$3,50 \times 10^6$	$3,90 \times 10^5$	$3,20 \times 10^3$	0	0	0	0
Epoxi-limoneno	$3,60 \times 10^6$	$1,40 \times 10^6$	$1,50 \times 10^6$	$2,00 \times 10^5$	$3,00 \times 10^4$	$1,50 \times 10^3$	0	0
Epoxi-pulegona	$3,60 \times 10^6$	$4,00 \times 10^6$	$5,20 \times 10^6$	$2,50 \times 10^5$	$2,00 \times 10^4$	$1,32 \times 10^3$	0	0
Epoxi-carvona	$3,60 \times 10^6$	$2,40 \times 10^6$	$3,10 \times 10^6$	$6,00 \times 10^5$	$4,34 \times 10^4$	$4,00 \times 10^3$	0	0
(+) - Pulegona	$3,60 \times 10^6$	$4,00 \times 10^6$	$4,80 \times 10^5$	$2,20 \times 10^3$	0	0	0	0

Legenda: (0) = Não houve crescimento

Gráfico 4. Avaliação da cinética bacteriana do óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre *S. aureus* 122U



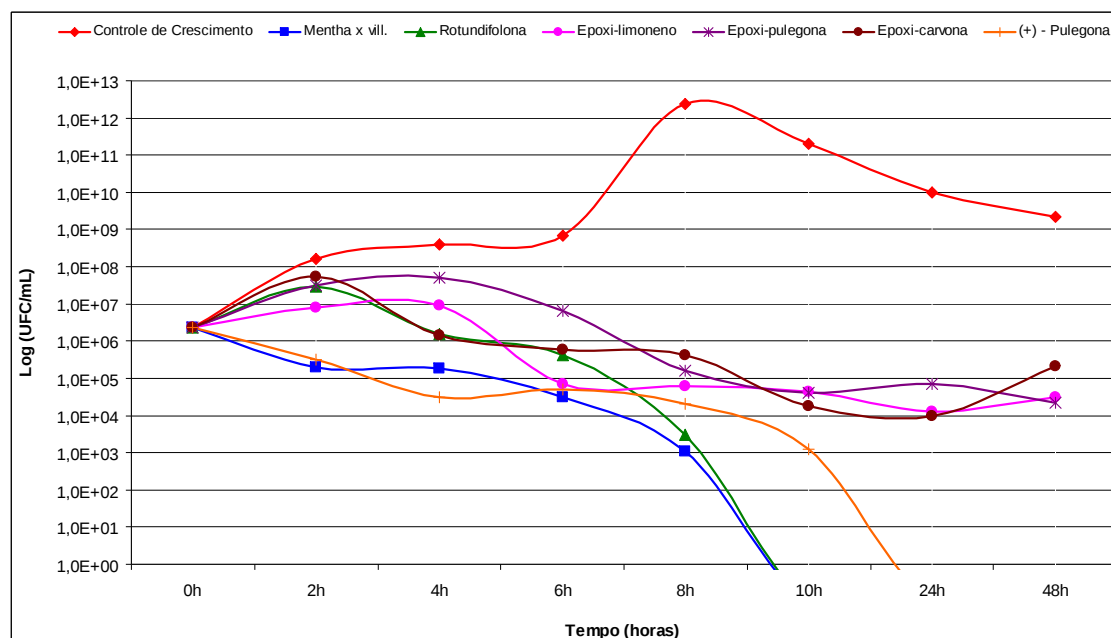
Na Tabela 8 e no Gráfico 5, estão os dados referentes à Avaliação da cinética bacteriana do óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre a cepa *S. aureus* 319U. Observa-se que os produtos com melhor desempenho foram o óleo essencial de *M. x villosa* Hudson e a rotundifolona que conseguiram decrescer três logs na oitava hora e inibir totalmente o crescimento a partir da décima hora. A (+)-pulegona decresceu três logs na décima hora e inibindo totalmente na contagem realizada às 24 horas. Portanto, baseando-se nestes dados, estes produtos são considerados como bactericidas. Já o epoxi-limoneno, epoxi-pulegona e epoxi-carvona, não conseguiram decrescer os três logs para serem considerados bactericidas. Por decrescerem apenas de 1 a 2 logs, mantendo-se assim até o tempo final do experimento, são considerados bacteriostáticos, nesta concentração para a cepa ensaiada.

Tabela 8. Avaliação da cinética bacteriana do óleo de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre *S. aureus* 319U

PRODUTOS 50µL/mL	UFC/ mL - Leitura em horas							
	0	2	4	6	8	10	24	48
Controle	$2,27 \times 10^6$	$1,60 \times 10^8$	$4,00 \times 10^8$	$7,00 \times 10^8$	$2,40 \times 10^{12}$	$2,00 \times 10^{11}$	$1,00 \times 10^{10}$	$2,20 \times 10^9$
Óleo essencial	$2,27 \times 10^6$	$2,00 \times 10^5$	$1,80 \times 10^5$	$3,00 \times 10^4$	$1,10 \times 10^3$	0	0	0
Rotundifolona	$2,27 \times 10^6$	$3,00 \times 10^7$	$1,50 \times 10^6$	$4,30 \times 10^5$	$3,00 \times 10^3$	0	0	0
Epoxi-limoneno	$2,27 \times 10^6$	$8,00 \times 10^6$	$9,00 \times 10^6$	$7,10 \times 10^4$	$6,20 \times 10^4$	$4,34 \times 10^4$	$1,30 \times 10^4$	$3,00 \times 10^4$
Epoxi-pulegona	$2,27 \times 10^6$	$3,20 \times 10^7$	$4,90 \times 10^7$	$6,30 \times 10^6$	$1,60 \times 10^5$	$4,20 \times 10^4$	$7,10 \times 10^4$	$2,20 \times 10^4$
Epoxi-carvona	$2,27 \times 10^6$	$5,40 \times 10^7$	$1,40 \times 10^6$	$5,90 \times 10^5$	$4,30 \times 10^5$	$1,80 \times 10^4$	$1,00 \times 10^4$	$2,18 \times 10^5$
(+) - Pulegona	$2,27 \times 10^6$	$3,10 \times 10^5$	$3,00 \times 10^4$	$5,00 \times 10^4$	$2,00 \times 10^4$	$1,20 \times 10^3$	0	0

Legenda: (0) = Não houve crescimento

Gráfico 5. Avaliação da cinética bacteriana do óleo de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre *S. aureus* 319U



5.4. Cinética fúngica

Em micologia, os estudos de curva de morte ainda são escassos, devido a que, até o ano de 1997, não se dispunha de uma metodologia de consenso e estandarizada para a realização e interpretação das provas de sensibilidade com os antifúngicos. Após a publicação do método descrito no NCCLS (1998), o número de publicações com estudos de curva mortalidade-tempo aumentou desde então, ajudando a padronização das mesmas (CANTÓN; PÉMAN, 1999; PFALLER; SHEEHAN; REX, 2004).

As curvas de cinética microbiana (mortalidade/-tempo) proporcionam informações sobre a dinâmica da possível ação bactericida ou fungicida de um produto. Utilizam-se, fundamentalmente, para o estudo de novos antimicrobianos e para determinar, em alguns casos, o sinergismo ou antagonismo na combinação de duas ou mais substâncias quando ensaiadas conjuntamente. Os dados obtidos ajudam a compreender parte do mecanismo de ação dos antimicrobianos (ERNST et al., 2002; VISCONTI, 2002).

Na Tabela 9 e no Gráfico 6, estão registrados os dados da Avaliação da cinética fungica do óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e análogos sintéticos sobre *C. albicans* ATCC 76645. Esta cepa foi escolhida por ser uma cepa padrão e de comportamento conhecido.

O óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona, (+)-pulegona e o epoxi-limoneno foram os produtos considerados fungicidas. O óleo essencial e a rotundifolona obtiveram os melhores desempenhos na inibição do crescimento microbiano. Decrescendo três Logs, na quarta hora ($9,00 \times 10^3$ e $1,00 \times 10^3$, respectivamente). A (+)-pulegona conseguiu inibir o crescimento da cepa na sexta hora e inibindo totalmente a partir da oitava hora. O epoxi-limoneno interferiu no crescimento do fungo, decrescendo três Logs na oitava hora, sendo verificada a inibição total de crescimento na leitura de 24 horas. A epoxi-pulegona e a epoxi-carvona conseguiram interferir no crescimento microbiano e se comportaram como fungistáticos, tendo decrescido apenas em média de um a dois Logs.

A atividade antifúngica do óleo essencial de *M. x villosa* deste experimento foi verificada sobre *Fusarium* spp, *Candida* spp e bactérias oportunistas no tratamento pós-colheita de *Cucumis melo* (melão *Orange Flesh*) (GADELHA et

al., 2003). Estes dados vem corroborar a atividade encontrada neste trabalho para a cepa fúngica ensaiada.

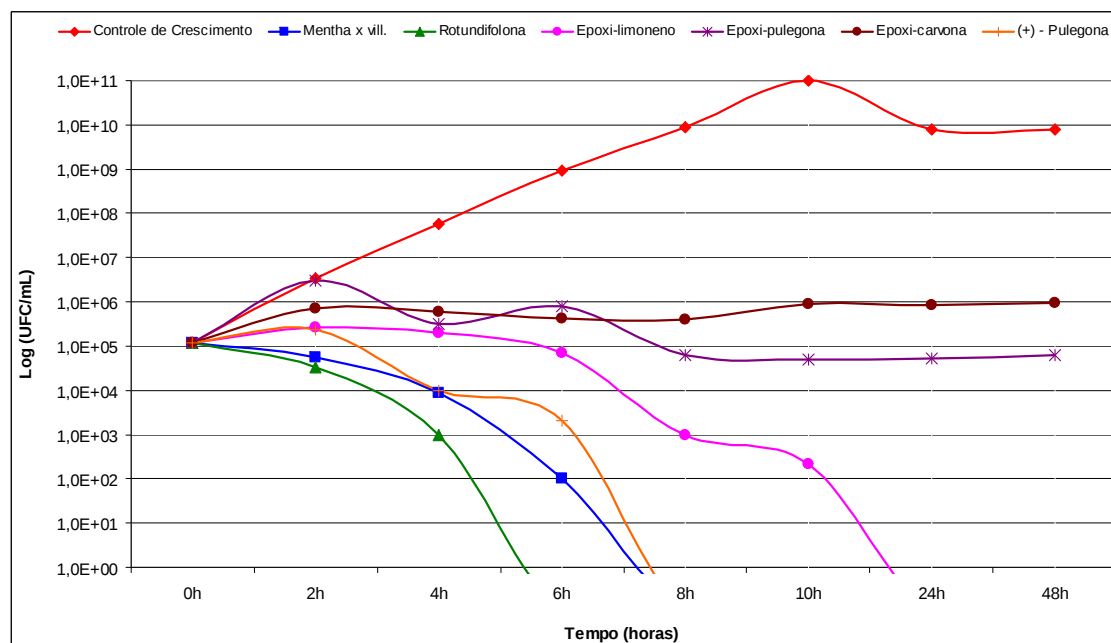
As atividades biológicas da rotundifolona e análogos sintéticos foram bem descrita em investigações científicas. Em estudo de Tripathi et al. (2004), a rotundifolona, apresentou atividade tóxica, repelente e retardante da reprodução de *Anopheles stephensi*. Já em investigação de Duschatzky et al. (2004), a epoxidação do limoneno apresentou atividade nematicida sobre *Meloydogyne* spp. que é uma praga comum do milho e hortaliças. Também foi investigada por Viegas-Júnior, (2003), Ibrahin et al. (2001) e a atividade inseticida dos análogos epoxi-limoneno e (+)-pulegona, frente a ácaros, baratas e pulgas de cães e gatos, respectivamente. Estes dados validam o desempenho destes produtos neste experimento, já que o possível efeito fungicida também foi evidenciado para estes compostos.

Tabela 9. Avaliação da cinética fungica do óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre *C. albicans* ATCC 76645.

PRODUTOS 50 μ L/mL	UFC/ mL - Leitura em horas							
	0	2	4	6	8	10	24	48
Controle	$1,20 \times 10^5$	$3,4 \times 10^6$	$5,70 \times 10^7$	$9,10 \times 10^8$	$8,70 \times 10^9$	$9,86 \times 10^{10}$	$7,70 \times 10^9$	$8,00 \times 10^9$
Óleo essencial	$1,20 \times 10^5$	$5,62 \times 10^4$	$9,00 \times 10^3$	$1,00 \times 10^2$	0	0	0	0
Rotundifolona	$1,20 \times 10^5$	$3,40 \times 10^4$	$1,00 \times 10^3$	0	0	0	0	0
Epoxi-limoneno	$1,20 \times 10^5$	$2,70 \times 10^5$	$2,00 \times 10^5$	$7,00 \times 10^4$	$1,00 \times 10^3$	$2,22 \times 10^2$	0	0
Epoxi-pulegona	$1,20 \times 10^5$	$3,00 \times 10^6$	$3,10 \times 10^5$	$8,10 \times 10^5$	$6,20 \times 10^4$	$5,00 \times 10^4$	$5,20 \times 10^4$	$6,10 \times 10^4$
Epoxi-carvona	$1,20 \times 10^5$	$7,00 \times 10^5$	$6,10 \times 10^5$	$4,20 \times 10^5$	$4,00 \times 10^5$	$9,20 \times 10^5$	$8,60 \times 10^5$	$9,56 \times 10^5$
(+) - Pulegona	$1,20 \times 10^5$	$2,40 \times 10^5$	$1,00 \times 10^4$	$2,12 \times 10^3$	0	0	0	0

Legenda: (0) = Não houve crescimento

Gráfico 6. Avaliação da cinética fungica do óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos sobre *C. albicans* ATCC 76645.



5.5. Eliminação de resistência a drogas pelo óleo essencial de *Mentha x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos

As linhagens de *S. aureus* 319U e 122U de origem bovina foram submetidas ao tratamento com o óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e (+)-pulegona por terem sido os produtos com melhores desempenhos nos ensaios de curva de morte para estas cepas. Estes produtos foram utilizados na concentração subinibitória (1/2 x CIM), de acordo com a técnica de Pereira; Siqueira-Junior; Takaki (2004) para avaliar a atividade curagênica destas substâncias sobre plasmídios de resistência, sendo estas cepas selecionadas, por possuírem um perfil plasmidial conhecido. Para todos os produtos testados, foi utilizada a CIM de 50µl.

Nas Tabelas 10 e 11 observa-se os resultados da frequência da eliminação de plasmídios resistentes à penicilina e eritromicina, pelo óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e seus análogos sintéticos.

Ao analisar estas tabelas observa-se que os produtos testados não apresentaram efeito frente à 122U e 319U para a marca de resistência à penicilina e à eritromicina. Os produtos, mesmo em concentrações reduzidas (1/2 CIM) ainda conseguiram inibir o crescimento visível das cepas ensaiadas, não obtendo assim o efeito curagênico esperado. Experimentos posteriores, realizados com concentrações mais baixas, poderão elucidar melhor este efeito.

Quando dois ou mais tipos de plasmídios de resistência (R) estão presentes em uma mesma bactéria, os genes de um deles podem passar para outro por recombinação gênica: conjugação, transformação e transdução. Esse mecanismo faz com que surjam plasmídios R portadores de diversos genes para resistência a diferentes antibióticos. Os plasmídios podem estar integrados no cromossomo, sendo capazes de transferir genes cromossômicos. Muitos são promíscuos, isto é, passam o gene de resistência para espécies não aparentadas geneticamente. A transferência de material genético entre microrganismos da mesma ou de diferentes espécies, desempenha um papel importante na evolução de resistência a drogas em bactérias. Sendo este apenas um dos mecanismos de defesa utilizados pelos microrganismos para se defenderem, é de grande

importância a pesquisa de novos compostos para a prevenção e/ou controle de linhagens multiresistentes.

Tabela 10. Frequência de cura da marca de resistência plasmidial à Penicilina pelo óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e (+)-pulegona em linhagens de *S. aureus*.

Produtos	Nº de colônias ensaiadas/ Nº de variantes sensíveis		% Frequência de cura	
	319U	122U	319U	122U
Óleo essencial	30/0	350/0	0,0	0,0
Rotundifolona	510/0	412/0	0,0	0,0
(+) - pulegona	45/0	60/0	0,0	0,0

Tabela 11. Frequência de cura da marca de resistência plasmidial à eritromicina pelo óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e (+)-pulegona em linhagens de *S. aureus*.

Produtos	Nº de colônias ensaiadas/ Nº de variantes sensíveis		% Frequência de cura	
	319U	122U	319U	122U
Óleo essencial	30/0	350/0	0,0	0,0
Rotundifolona	510/0	412/0	0,0	0,0
(+) - pulegona	45/0	60/0	0,0	0,0

Esta investigação se apresenta apenas como um ponto de partida. Tendo em vista o potencial terapêutico e promissor apresentado pelo óleo essencial de *Mentha x villosa* Hudson, do seu constituinte majoritário rotundifolona e seus análogos sintéticos, este estudo abre as portas para novos objetos de estudo, desde a investigação dos produtos testados frente à outras cepas, testes investigativos que elucidem melhor o comportamento dos microrganismos resistentes, a elucidação dos seus mecanismos de resistência e posteriores ensaios pré-clínicos e clínicos para a possível viabilização destes produtos na terapêutica.

A transferência de material genético entre microrganismos da mesma ou de diferentes espécies, desempenha um papel importante na evolução de resistência a drogas em bactérias. Sendo este apenas um dos mecanismos de defesa utilizados pelos microrganismos para sua defesa. Neste sentido, é de grande importância a pesquisa de novos compostos para a prevenção e/ou controle de linhagens multiresistentes.

O Brasil possui todos os requisitos para estar à frente da grande revolução farmacêutica que há alguns anos vem se desenhando no cenário mundial. A biodiversidade do país, o conhecimento etnobotânico e etnofarmacológico da população brasileira são vantagens importantes no processo de desenvolvimento de programas e projetos de pesquisa de plantas medicinais, que devem ser fortalecidos com maior apoio à pesquisa e conhecimento para viabilizar uma indústria forte e adequada de produtos naturais que não esteja em detrimento dos recursos utilizados e potenciais, como agente de um desenvolvimento econômico e social, que alcance um equilíbrio com o ambiente.

6. CONCLUSÕES

No estudo sobre a atividade biológica do óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e análogos sobre microrganismos, curva de crescimento microbiano e transferência plasmidial, conclui-se que:

- Em relação às cepas de *S. aureus* testadas, verificou-se que estas foram sensíveis ao óleo essencial de *M. x villosa*, rotundifolona e análogos.
- Os produtos testados não exerceram atividade microbiana frente às cepas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922.
- As cepas fúngicas *C. albicans* ATCC 76645, *C. guilliermondii* LM18, *C. stellatoidea* LM 01, *C. tropicalis* LM 124, *C. tropicalis* LM 556 e *S. cerevisiae* se apresentaram como as mais sensíveis aos produtos testados. Mas *C. parapsilosis* LM10 foi a mais resistente aos mesmos. Já os produtos mais ativos foram o óleo essencial de *M. x villosa*, epoxi-limoneno e a (+)-pulegona. O produto menos ativo foi a rotundifolona.
- Em relação à estrutura-atividade antimicrobiana da rotundifolona e análogos, foi observado que o epoxi-limoneno e (+)-pulegona apresentaram atividade antimicrobiana similares, divergindo discretamente em relação aos tamanhos das zonas de inibição.
- Todos os produtos testados, apresentaram atividade antifúngica frente à cepa de *Candida albicans* ATCC 76645, sendo o óleo essencial de *M. x villosa*, o produto que apresentou a maior zona de inibição.
- Para a cepa de *C. albicans* ATCC 76645 e a cepa de *S. cerevisiae*, o óleo essencial de *M. x villosa*, rotundifolona e análogos, apresentaram CIM de 50µl/mL.
- A cepa mais resistente foi a cepa de *C. parapsilosis* LM10, que apresentou CIM de 100µl/mL para o óleo essencial de *M. x villosa* e CIM de 200µl/mL para epoxi-limoneno e (+)-pulegona, não sendo inibida pelos demais produtos.
- Em relação à cinética bacteriana, todos os produtos inibiram *S. aureus* ATCC 25923 em tempos diferentes, sendo considerados possíveis bactericidas. Após

15 dias de preparação dos produtos para os testes, realizou-se nova cinética para verificar a integridade/estabilidade das substâncias, sendo o óleo essencial o único produto que manteve a ação bactericida.

- Os produtos testados inibiram o crescimento bacteriano de *S. aureus* (MRSA) 171C em tempos diferentes e todos com possível efeito bactericida para esta cepa.
- Na avaliação da cinética bacteriana do óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e análogos sobre *S. aureus* 122U, foi verificado que, todos os produtos exerceram atividade sobre o crescimento bacteriano, sendo bactericidas na concentração ensaiada.
- Na avaliação da cinética bacteriana do óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona e análogos sobre *S. aureus* 319U, foi verificado que, o óleo essencial, rotundifolona e (+)-pulegona foram considerados como possíveis bactericidas e os demais produtos como bacteriostáticos.
- Para a avaliação da cinética fungica dos produtos testados sobre a cepa *C. albicans* ATCC 76645, verificou-se que o óleo essencial de *M. x villosa* Hudson, rotundifolona, (+)-pulegona e o epoxi-limoneno foram os produtos considerados possivelmente como fungicidas. A epoxi-pulegona e a epoxi-carvona possivelmente conseguiram interferir no crescimento microbiano e se comportaram como fungistáticos.
- Verificou-se que os produtos testados não apresentaram efeito frente a *S. aureus* 122U e 319U para a marca de resistência à penicilina e à eritromicina. Os produtos, mesmo em concentrações reduzidas (1/2 CIM) ainda conseguiram inibir o crescimento visível das cepas ensaiadas, não obtendo assim o efeito curagênico esperado.

REFERÊNCIAS

AFLATUNI, A. The yield and essential oil content of mint (*Mentha spp.*) in northern oostrobothnia. Dissertation, Faculty of Science, University of Oulu, 50p, 2005. Disponível na internet via: <http://herkules.oulu.fi/isbn9514277465/isbn9514277465.pdf>

AIRES DE SOUSA, M.; CRISOSTOMO, M.I.; SANTOS SANCHES, I.; WU, J.S.; FUZHONG, J.; TOMASZ, A. et al. - Frequent Recovery of a Single Clonal Type of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* from Patients in Two Hospitals in Taiwan and China. **J Clin Microb**, v.41, p.159-163, 2003.

AL-ANKARI, A. S.; ZAKI, M. M.; AL-SULTAN, S. I. Used habek mint (*Mentha longifolia*) in broiler chicken diets. **Internat J Sci Infor**, v.3, n.10, p.629-634, 2004

ALMEIDA, M. Z. de. **Plantas medicinais**. 2 ed. EDUFBA. Salvador: 80-81, 2003.

ALMEIDA, R. N.; HIRUMA, C. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; Analgesic effect of rotundifolone in rodents. **Fitoterapia**, v.57, n.4, p.334-338, 1996.

ALTHERTUM, F. Origem e natureza química dos principais agentes antibacterianos In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999, p.87-92..

ÁLVAREZ, C. A. G.; CASTRO, A. L. L.; GONZALEZ, M. J. P.; JIMENEZ, M. L. N. Mecanismos de resistência em *Pseudomonas aeruginosa*: entendiendo a um peligroso enemigo. **Rev Fac Univ Nac Colomb**, v.53, n.1, Enero-marzo de 2005. Disponível na internet via: www.revmed.unal.edu.co/revistafm/v53n1/a3n1v53.html

ALVES, T. M. de A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. G.; SMÂNIA, E. de F.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Mem Instit Oswaldo Cruz**, v.95, n.3, p.367-73, 2000.

ALVIM, N. A. T.; FERREIRA, M. de A.; CABRAL, I. E.; ALMEIDA-FILHO, A. J. de. The use of medicinal plants as a therapeutical resource: from the influences of the professional formation to the ethical and legal implications of its applicability as na extension of nursing care practice. **Rev Lat Enferm**, v.14, n.3, p.316-323, 2006.

ANDERSSON, D. I. The ways in which bacteria resist antibiotics. **Int J Risk Safety Med**, v.17, n.3-4, p.11-116, 2005.

ARIDOGAN, B. C.; BAYDAR, H.; KAYA. S.; DEMIRCI, M.; OZBASARD, D.; MUMCU, E. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. **Arch Pharm Res**, v.25, n.6, 860-4, 2002.

ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro – conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Rev Esp Saúd**, v.6, n.2, 1-6, 2006.

AROMATHERAPY, The safety issue in aromatherapy. **Aromather Scien**, Pharmaceutical Press, Chapter 7, p.75-92, 2006. Disponível na internet via: www.pharmpress.com/shop/samples/AromaSciCh07.pdf

ARRUDA, T. A. Estudo etnofarmacobotânico e atividade antimicrobiana de plantas medicinais. [Dissertação-mestrado]. Campina Grande (PB): UEPB, Universidade Estadual da Paraíba, 102p., 2002.

_____.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M. R.; LIMA, E. O.; SOUSA, D. P.; NUNES, X. P.; PEREIRA, M. S. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, E. V. L. Preliminary study of antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Rev Bras Farmacogn**. V.16, n.3, p.307-311, 2006.

AZEVEDO, S. K. S. de; SILVA, I. M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados de feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta bot. bras**, v.20, n.1, p.185-194, 2006.

BAGINSKI, M.; STERNAL, K.; CZUB, J.; BOROWSKI, E. Molecular modeling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. **Acta Bioch Polon**, v.52, n.3, p.655-658, 2005.

BALLESTER, D.; ESCOBAR, A. M. U.; GRISI, S. J. F. E. Diarréia persistente: revisão dos principais aspectos fisiopatogênicos, fatores de risco e implicações terapêuticas. **Pediatria**, v.24, n.3/4, p.112-121, 2002.

BAMBEKE, F. V.; GLUPCZYNSKI, Y.; PLÉSIAT, P.; PECHÈRE, J. C.; TULKENS, P. M. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. **J Antimicrob Chem**, v.51, p.1055-1065, 2003.

BARROS, L. M. Ocorrência de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* em sítios subgengivais e nas mucosas da cavidade bucal: genotipagem por RAPD e atividade enzimática de aspartil proteinases e fosfolipases. [Tese – Doutorado]. UNICAMP. Piracicaba (SP): 133p, 2005.

BASER, K. H. C. Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of turkey. **Pure Appl Chem**, v.74, n.4, p.527-545, 2002.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. **Am J Clin Patol**, v.45, p.493-496, 1966.

BENJAMIN-JR, D. K.; ROSS, K.; MCKINNEY-JR, R. K.; BENJAMIN, D. K.; AUTEN, R.; FISHER, G. R. When to Suspect Fungal Infection in Neonates: A Clinical comparison of fungemia With coagulase-negative *Candida parapsilosis* and *Candida albicans* staphylococcal bacteremia. **Pediatrics**, v.106, n.4, p.712-718, 2000.

BENOUDIA, A. HASSAR, M.; BENJILALI, B. Lês propriétés antiséptiques dès huiles essentielles *in vitro*, testées contre dès germes pathogenes hospitaliers. **Fitoterapia**, v.59, n.2, p.115-119, 1988.

BERETTA, A. L. R. Z. Epidemiologia de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina isoladas de pacientes do hospital das clínicas – UNICAMP no período de 1991 a 2001. [Tese – Doutorado]. Campinas (SP): UNICAMP, 92p, 2004.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Vis Acad**, v.5, n.2, p.159-172, 2004.

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M.; CUNHA, F. A. C.; CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente à óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarm**, v.17, n.3/4, p.80-84, 2005.

BHAT, S.; MAHESHWARI, P.; KUMAR, S.; KUMAR, A. *Mentha* species: *In vitro* regeneration and genetic transformation. **Molecul Biol Tod**. V.3, n.1, p.11-23, 2002.

BIESKI, I. G. C.; Plantas medicinais e aromáticas no sistema único de saúde da região sul de Cuiabá – MT. Monografia. UFLA, Lavras – MG, 2005.

BIZI, R. M. Alternativas de controle do mofo-cinza e do oídio em mudas de eucalipto. Dissertação, Engenharia Florestal, UFPR, Curitiba, 2006.

BORBA, M. O. P.; KOBAYASHI, S.; ACA, I. S.; BERINO, E.; MEDEIROS, F. P. Frações ativas de *Mentha crisper* sobre cultura da *Entamoeba histolytica* cepa SAW 1627. Parte II. João Pessoa. Resumos do XI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, p.469, 1988

BORBA, M. O. P.; PADOVAN, P. A. PADOVAN, I. P.; SANTANA, J. V.; PADILHA, R. J.; JUNGSMANN, P.; SILVA, J. F. Effects of *Mentha crisper* crude extract on *Schistosoma mansoni* cercaria. Na ultra-structural study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.84, p.235, 1989b.

BORBA, M. O. P.; SANTANA, J. V.; BERINO, E. Effects of *Mentha crisper* crude extract administration on murine experimental schistosomiasis. I – clinical and parasitological aspects. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.84, p.236, 1989a.

BORIOLLO, M. F. G.; HÖFLING, J. F.; MENDES, A.; ROSA, E. A. R. Ferramentas moleculares para a caracterização de *Candida albicans* (Robin) Berkhout (1923) em estudos epidemiológicos. **Estud Biolog**, v.27, n.58, p.21-47, 2005.

BOSSCHE, H. V. Mechanisms of antifungal resistance. **Rev Iberoam Micol**, v.14, p.44-49, 1997.

BREMER, P. J.; FLETCHER, G. C.; OSBORNE, C. *Staphylococcus aureus*. **New Zealand Inst for Crop & Food Res**, p.1-6, 2004.

BRONZWAER, S.; LÖNNROTH, A.; HAIGH, R. The european community strategy against antimicrobial resistance. **Eurosurveillance**, v.9, n.1-3, p.30-36, 2004.

BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L. aromatherapy – use of fragrances and essential oils as medicaments. **Flav Frag**. v.9, p.217-222, 1994.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trend Microbiol**, v.9, n.7, p.327-35, 2001.

CAMARGO, C. B. S.; PEDRO, C. C.; LOURENÇO, D. S.; GIRONI, R. H. A.; MARTINEZ, R. Infecção de vias urinárias na comunidade de Ribeirão Preto-SP: etiologia, sensibilidade bacteriana a antimicrobianos e implicações terapêuticas. **Medicina**, v.35, p.173-178, 2002.

CAMPOS, L. C.; TRABULSI, L. R. *Escherichia* In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**, 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999, p.215-228.

CANTÓN, E.; PÉMAN, J. Curvas de letalidad en antifúngicos. **Rev Iberoam Micol**, v.16, p.82-85, 1999.

CAPOOR, M. R.; NAIR, D.; DEB, M.; VERMA, P. K.; SRIVASTAVA, L.; AGGARWAL, P. Emergence of non-*albicans* *Candida* species and antifungal resistance in a tertiary care hospital. **J Infect Dis**, v.58, p.344-348, 2005.

CARDOSO, B. C. Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. [Dissertação – Mestrado]. Minho – Portugal: Universidade do Minho, 75p, 2004.

CARNEIRO, H. Filtros, mezinhas e triacas – as drogas no mundo moderno. São Paulo: Cultrix/Pensamento, 1991.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P. A.; QUINDÓS, G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Rev Esp Quimioterap**, v.19, n.2, p.130-139, 2006.

_____; SANTOS, P.; VALLE, O. D.; CASALS, J. B.; QUINDÓS, G. Es activa la anfotericina B frente a hongos dermatófitos y *Scopulariopsis brevicaulis*? **Rev Esp Quimioterp**, v.17, n.3, p.244-249, 2004.

CARSON, C. F.; COOKSON, B. D.; FARRELLY, H. D.; RILEY, T. V. 1995 Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **J Antimicrob Chemoter**, v.35, p.421-424, 1995.

CARVALHO-FILHO, J. L. S.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; EHLERT, P. A. D.; MELO, A. S.; CAVALCANTI, S. C. H.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; SILVA-MANN, R. Influence on the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Rev Bras Farmacogn**, v.16, p.24-30, 2006.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. On the definition of virulence. **ASM News**, v.69, p.217, 2003.

_____; _____. Microbial virulence results from the interaction between host and microorganism. **Trends Microbiol**, v.11, p.157-158, 2003.

CASALS, J. B. Tablet sensibility testing of pathogenic fungi. **J. Clin. Pathol**, v.32, p.719-722, 1979.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). Immunization of health-care workers. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) and the Hospital Infection Control Practices (HICPAC). **MMWR**, v.46, n. RR-18, p.1- 44, 1997.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections In: LORIAN, V. Antibiotics in laboratory medicine. 3 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 739-788, 1991.

CLINICAL MICROBIOLOGY PROCEDURES HANDBOOK. Ed. H. D. Isenberg, ASM/ Washington, Vol I, S. 5-16, 1992.

CLOUTIER, M. J. Antibiotics: mechanisms of action and the acquisition of resistance – when magic bullets lose their magic. **Amer J Pharm Educat**, v.59, p.167-172, 1997.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, WHO/ FAO Report of the 38th Session of the codex committee on food additives and contaminants, ALINORM, 2006.

COOPER, B. S.; STONE, S. P.; KIBBLER, C. C.; COOKSON, B. D.; ROBERTS, J. A.; MEDLEY, G. F.; DUCKWORTH, G.; LAI, R.; EBRAHIM, S. Isolation measures in the hospital management of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): systematic review of the literature. **BMJ**. V.329, p.1-8, 2004.

COSENTINO, S.; TUBEROSO, G. I. G.; PISANO, B.; SATTA, M.; MASCIA, V.; ARZEDI, E.; PALMAS, F. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of sardinian thymus essential oils. **Lett Appl Microbiol**, v.29, p. 130-35, 1999.

COX, S.D.; GUSTAFSON, J. E.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; LIEW, Y. C.; HARTLAND, R. P.; BELL, H. C.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. **Lett Appl Microbiol**, v.26, p.355-358, 1998.

COWEN, L. E.; ANDERSON, J. B.; KOHN, L. M. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. **Ann Rev Microbiol**. V.56, p.139-65, 2002.

CRIVEANU, H. R.; TARALUNGA, G. Influence of magnetic fields of variable intensity on behaviour of some medicinal plants. **J Cent Eur Agr**. v.7, n.4, p.643-648, 2007.

D'ANTONIO, D.; IACONE, A.; SCHIOPPA, F.S.; BONFINI, T.; ROMANO, F. Effect of the Current Antimicrobial Therapeutic Strategy on Fungal Colonization in Patients with Hematologic Malignancies. **Current Microbiol**, v.33, n.2, p.118-122, 1996.

DE SANTANA, C. F.; ALMEIDA, E. R.; SANTOS, E. R.; SOUZA, I. A. Action of *Mentha crisper* hydroethanolic extract in patients bearing intestinal protozoan. **Fitoterapia**, v.63, n.5, p.409-411, 1992.

DÉOUX, S.; DÉOUX, P. Ecologia é a saúde - o impacto da deteriorização do ambiente na saúde. Lisboa: Instituto Piaget, 1998.

DERESISNSKY, S. C.; CLEMONS, K. V.; KEMPER, C. A.; ROESCH, K.; WALTON, B.; STEVENS, D.A. Genotypic analysis os pseudoepidemic due to contamination of hank's salt solution with *Candida parapsilosis*. **J Clin Microbiol**, v.33, n.8, 2224-2226, 1995.

DEVER, L. L.; JORGENSEN, J. H.; BARBOUR, A. G. *In vitro* antimicrobial susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi*: a microdilution MIC method and time-kill studies. **J Clin Microbiol**, v.30, n.10, p.2692-2697, 1992.

DI STASI, L. C. Arte, ciência e magia In: DI STASI, L. C. (Org.) Plantas medicinais: arte e ciência - um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Unesp, 1996, p. 161-186.

DIAZ-LOPES, M. M.; GARAY, O. A. O.; DIAZ, O. O. Análisis SSCP(ITS2, *ERG11*) de aislamentos clinicos de *Candida* spp. de cavidad oral en pacientes oncológicos. **Rev Iberoam Micol**, v.21, p.182-186, 2004.

DIMECH, G. S.; GONÇALVES, E. S.; ARAÚJO, A. V.; ARRUDA, V. M.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; WANDERLEY, A. G. Avaliação do extrato hidroalcoólico de *Mentha crisper* sobre a performance reprodutiva em ratos Wistar. **Rev Bras Farmacognosia**, v.16, n.2, p.152-157, 2006.

DINIZ, M. de F. F. M.; OLIVEIRA, R. A. G. de; MEDEIROS, A. C. D. de; MALTA JÚNIOR, A. Memento fitoterápico. As plantas como alternativa terapêutica: aspectos populares e científicos. João Pessoa: Editora Universitária, 1998.

DISMUKES, W. E.; Intruduction to antifungal drugs. **Clin Infect Dis**, v.30, p.653-657, 2000.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J Appl Microbiol**, v.88, p.308-316, 2000.

DRUTZ, D. J. In vitro antifungal susceptibility testing and measurement of levels of antifungal agents in body fluids. **Rev. Infect. Dis**, v.9, n.2, p.411-15, 1987.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P. M.; DELARMINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcóolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Rev Bras Farmacogn**. V.14, n.1, p.06-08, 2004.

DUSCHATZKY, C. B.; MARTINEZ, A. N.; ALMEIDA, N. V.; BONIVARDO, S. L. Nematicidal activity of essential oils of several Argentina plants against the root-knot nematode. **J Essent oil Res**, v.16, n.6, p.626-628, 2004

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. **Phytother Res**, 2007, Disponível na internet via: www.erbeofficinali.org/dati/nacci/studi/gli%20olii%20essenziali%20.pdf

ELLIS, D. H. Clinical Mycology. The human opportunistic mycosis. Australia: Pfizer, 1994.

EMA. European Medicines Agency. Public statement on the use of herbal medicinal products containing pulegone and menthofuran. EMA, 2005. Disponível na internet via: www.EMA.eu.int.

ERB, A.; STÜRMER, T.; MARRE, R.; BRENER, H. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variations. **Eur J of Clin Microb & Infect Dis**, v.26, n.2, p.83-90, 2007.

ERNST, E. J.; ROLING, E. E.; PETZOLD, C. R.; KEELE, D. J.; KLEPSE, M. E. *In vitro* activity of micafungin (FK-463) against *Candida* spp.: microdilution, time-kill and postantifungal-effect studies. **Antimic Ag Chemot**, v.46, n.12, p.3846-3853, 2002.

ESMERINO, L. A.; GONÇALVES, L. G.; SCHELESKY, M. E. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* isoladas de infecções urinárias comunitárias. **Publ UEPG Biol Saúde**, v.9, n.1, p.31-39, 2003.

ESTRELLA, M. C.; TUDELA, J. L. R. ¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos em los estudios de sensibilidad? **Rev Iberoamer Micol**, v.19, p.133-138, 2002.

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

FARIAS, W. V. L.; SADER, H. S.; LEME, I. L.; PIGNATARI, A. C. Padrão de sensibilidade de 117 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* isoladas em 12 hospitais. **Rev Ass Med Brasil**, v.43, n.3, p.199-204, 1997.

FERREIRA, L. L.; Estrutura clonal e multiresistência em *Pseudomonas aeruginosa*. [Dissertação – Mestrado]. INCQSP. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro: 2005, 98p.

FIDEL-JR, P. I.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clin Microbiol Rev**, v.12, n.1, p.80-96, 1999.

FILE Jr.,T. M. Visão Geral Sobre Resistência Bacteriana nos Anos 90. In: PLE CHEST The Cardiopulmonary and Critical Care Journal (edição em português). Suplemento 2:1(3-9). 2000.

FISHBAN, J. T.; LEE, J. C.; NGUYEN, H. D.; MIKITA, J. A.; MIKITA, C. P.; UYEHARA, C.F. et al. Nosocomial transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a blinded study to establish base line acquisition rates. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.24, n.6, p.415-421, 2003.

FREITAS, D. B.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; FREITAS, F. I. S.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana de fluorquinolonas sobre *Staphylococcus aureus* hospitalares. **Rev Bras Cien Saúde**, v.7, n.2, p.143-148, 2003.

FROMTLING, R. A.; PUI-YU, H.; SHADOMY, S. *In vitro* inhibitory activities of 2 new orally absorbable imidazole derivatives: BAYN 7133 and BAYN 913. **Sabouraudia**, v.21, p.179-184, 1983.

FURLETTI, V. F. Susceptibilidade de isolados orais de *Candida* spp. provenientes de pacientes com doença perodontal aos antifúngicos azólicos e a anfotericina B. [Dissertação – Mestrado]. Piracicaba (SP): UNICAMP, 88P, 2006.

GADELHA, J. C.; INNECCO, R.; ALCANFOR, D. C.; MATTOS, S. H.; MEDEIROS-FILHO, S.; VIEIRA, A. V. Defensivos naturais no tratamento pós-colheita do pedúnculo do mamão. **Rev Cien Agron**, v.34, n.1, p.5-10, 2003.

GALES, A. C.; JONES, R. N.; TURNIDGE, J.; RENNIE, R.; RAMPHAL C. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Clin Infect Dis**, v.32, n.2, p.145-155, 2001.

GALES, A. C.; PIGNATARI, A. C.; JONES, R. N.; BARETTA, M.; SADER, H. S. Avaliação da atividade *in vitro* dos novos antimicrobianos da classe das

fluorquinolonas, cefalosporinas e carbapenens contra 569 amostras clínicas de bactérias Gram-negativas. **Rev Ass Méd Bras**, v.43, n.2, p.137-144, 1997.

GALIMAND M. COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. **Antimicrob Agents Chemother**, v.47, n.8, p.2565-2571, 2003.

GALINDO, J. A.; TEJADA, Y. G.; CEREZO, S. G.; SALAZAR, O. M.; REYES, E. A. P. High-level aminoglycosides resistance *Enterococcus spp.* in a tertiary care hospital in Mexico. **Electron J Biomed**, v.1, p.40-45, 2005.

GARCÍA, P. C. Resistência bacteriana en Chile. **Rev Chil Infect**, v.20, n.1, p.11-13, 2003.

GHANNOUM M. A.; ABU-ALTEEN, K. H. Pathogenicity determinants of Candida. **Mycoses**, v.33, n.6, p.265-82, 1986.

GHANNOUM M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanism of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin Microbiol Rev**, v.12, p.501-517, 1999.

GIUSANI, A. D.; VINCES, M.; KUMAMOTO, C. A. Invasive filamentous growth of *Candida albicans* is promoted by Czflp-dependent relief of Efglp-mediated repression. **Genetics**, v.160, p.1749-1753, 2002.

GOBERT, V.; MOJA, S.; COLSON, M.; TABERLET, P. Hybridization in the section *Mentha* (Lamiaceae) inferred from AFLP markers. **Am. J. Bot**, v.89, n.12, 2017-2023, 2002.

GOERING, R. V. & RUFF, E. A. Comparative analysis of conjugative plasmids mediating gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemother**, v.24, p.450 – 452, 1983.

GOMPERTZ, O. F.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CORRÊA, B. Características gerais das micoses In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. Microbiologia. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999, p.377-386.

_____.; _____.; _____. Micoses oportunisticas e outras micoses In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. Microbiologia. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999, p.413-419.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. M. B. Biodiversidade: um enfoque químico-farmacológico. Rio de Janeiro: UFRJ, 1996.

GRAYSON, D. H. Monoterpenoids. **Nat Prod Rep**, v.17, p.385-419, 2000.

GRISI, M. C.M.; SILVA, D. B.; ALVES, R. B. N.; GRACINDO, L. A. M. B.; VIEIRA, R. F. Avaliação de genótipos de menta (*Mentha spp*) nas condições do Distrito Federal, Brasil. **Rev Bras PI Med**, v.8, n.4, p.33-39, 2006.

GROLL, A. H.; WALSH, T. J. Antifungal chemotherapy: advances and perspectives. **Swiss Med Wkly**, v.132, p.303-311, 2002.

GRUNDMANN, H.; SOUSA, M. A.; BOYCE, J.; TIEMERSMA, E. emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. **Lancet**, v.368, p.874-885, 2006.

GUEDES, D. N. Avaliação da atividade cardiovascular do óleo essencial extraído das folhas de *Mentha x villosa* (Lamiaceae) – Estudos “in vitro” e “in vivo”, [Tese-doutorado]. João Pessoa (PB): UFPB, Universidade Federal da Paraíba, 2002.

_____.; SILVA, D. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, I. A. de. Muscarinic agonist properties involved in the hypotensive and vasorelaxant responses of rotundifolone in rats. **Planta Méd**, v.68, p.700-704, 2002.

_____.; _____.; _____.; _____. Endothelium-dependent hypotensive and vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Mentha x villosa* in rats. **Phytom**, v.11, n.6, p.490-497, 2004.

GUÉHO, E; IMPROVISI, L.; HOOG, G. S. de; DUPONT, B. *Trichosporon* on humans: a pratical account. **Mycoses**, v.37, p.3-10, 1994.

GUNDIDZA, M. Screening of extracts from Zimbabwean higher plants II: antifungal properties. **Fitoterapia**, v.57, p.111-114, 1986.

HADACEK, F. & GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choise. **Phytochem Anal**, v.11, p.137-147, 2000.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A.; Anthocyanins and others flavonoids. **Nat. Prod. Rep**, v.12, n.6 p. 639-57, 1995.

HAUSSEN, D. C.; BRANDALISE, L. N.; PRAETZEL, F. A.; MALYSZ, A. S.; MOHRDIECK, R.; REICHELT, M. A. F.; MAGALHÃES, C. B.; GROSSI, S. P.; GUARDIOLA, A. Meningite neonatal – aspectos associados. **Arq Neuropsiquiat**, v.65, n.3, p.625-631, 2005.

HELANDER, I. M.; MATTILA-SANDHOLM, T. Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. **Intern J Food Microbiol**, v.60, p.153-161, 2000.

HIRUMA, C. A. Estudo químico e farmacológico do óleo essencial das folhas da *Mentha x villosa* Hudson. Dissertação de Mestrado – LTF/UFPB, 97p. 1993

HOEFLER, R.; VIDOTI, C. C. F.; MENEZES, E. S.; PINHEIRO, S. Ações que estimulam o uso racional de antimicrobianos. **Farmacoterapêutica**, v.11, n.4, p.1-3, 2006.

HOLLANDA, L. M. de. Caracterização molecular de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes com fibrose cística [Dissertação – mestrado]. Instituto de Biologia. UNICAMP. Campinas (SP): 104p, 2002.

HOOPER, D. C. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. **Emerg Infect Diseases**, v.7, n.2, p.337-341, 2001.

HOSGÖR-LIMONCU, M.; ERMERTCAN, S.; COSAR, G. Investigation of the bactericidal effects on vancomycin and quinupristin/ dalfopriditin on *Staphylococcus aureus* isolates. **Turk J Med Sci**, v.34, p.115-119, 2004.

HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, v.147, p.1997-2005, 2001.

HUDSON, M. M. T. Antifungal resistance and over-the-counter availability in the UK: a current perspective. **J Antimicrob Chem**, v.48, p.345-350, 2001.

IBRAHIN, M. A.; KAINULAINEN, P.; AFLATUNI, A.; TIILIKKALA, K.; HOLOPAINEN, J. K. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils with especial reference to limonene and its suitability for control of insect pests. **Agric Food Scien Finland**, v.10, p.243-259, 2001.

IMAI, H.; OSAWA, K.; YASUDA, H.; HAMASHIMA, H.; ARAI, T.; SASATSU, M. Inhibition by the essential oils of peppermint and spearmint of the growth of pathogenic bacteria. **Micróbios**, v.106, p.31-39, 2001.

INNECCO, R.; CRUZ, G. F.; VIEIRA, A. V.; MATTOS, S. H.; CHAVES, F. C. M. Espaçamento, época e número de colheitas em hortelã-rasteira (*Mentha x villosa* Huds). **Rev Cien Agronom**, v.34, n.2, p. 247-251, 2003.

JACOBY, G. A.; ARCHER, G. L. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **N Engl J Med**, v.324, n.9, p.601-12, 1991.

KATSUHARA, J. Absolute configuration of pulegone oxide and piperitenone dioxide. **J Org Chem**, v.32, p.797-799, 1967.

KNIGHT, V.; SANGIER, J. J.; DITULLIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v.62, p.446-458, 2003.

KOBAYASHI, N.; ALAM M.; NISHIMOTO, Y.; URASAWA, S.; UEHARA, N.; WATANABE, N. Distribution of aminoglycoside resistance genes in recent clinical

isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus avium*. **Epidemiol Infect**, v.126, p.197-204, 2001.

LAHLOU, M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. **Phytother Res**. v.18, p.435-448, 2004.

LAHLOU, S.; CARNEIRO-LEÃO, R. F. L.; LEAL-CARDOSO, J. H.; TOSCANO, C. F. Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha x villosa* and its main constituent, piperitenone oxide, in normotensive anaesthetized rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Med**, v.67, p.638-643, 2000.

_____; MAGALHÃES, P. J. C.; CARNEIRO-LEÃO, R. F. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Involvement of nitric oxide in the mediation of the hypotensive action of the essential oil of *Mentha x villosa* in normotensive conscious rats. **Planta Med**, v.68, p.694-699, 2002.

LAMBERT, P. A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **J R Soc Med**, v.95, n.41, 22-26, 2002.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **J Appl Microbiol**. v.91, p.453-462, 2001.

LANGE B. M.; WILDUNG, M. R.; STAUBER, E. J.; SANCHEZ, C.; POUCHNIK, D.; CROTEAU, R. Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. **PNAS**, v.97, n.6, p.2934-2939, 2000.

LAVABRE, M. Aromaterapia a cura pelos óleos essenciais. 2 ed. Best Seller, Rio de Janeiro: 79-80, 2006.

LEDEBERG, J. & LEDEBERG, E. M. Replic plating and indirect selection of bacterial mutants. **J Bacteriol**, v.63, p.399 - 406. 1952.

LENSKI, E. R. Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance. *Internat Microbiol*. 1: 265–270, 1998.

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

LIMA, E. O.; GOMPERTZ, O. F.; GIESBRECHT, A. M.; PAULO, M.Q. *In vitro* antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses**, v.36, p.333-336, 1993.

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

LIMA. C. A. H.; ALMEIDA, R. N.; BARBOSA-FILHO, J. M. Avaliação do efeito antinociceptivo do óleo essencial e da rotundifolona obtidos de *Mentha x villosa* Hudson. IX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu/MG, resumos, p.196, 1994a.

_____.; _____.; _____. Avaliação do efeito antinociceptivo do óleo essencial de *Mentha x villosa* Hudson sobre o sistema nervoso central. IX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu/MG, resumos, p.196, 1994b.

LIU, H. H. Antibiotic resistance in bactéria. **Rheumaderm**, v.455, p.387-396, 1999.

LIVERMOORE, D. M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **J Antimic Chem**, v.47, p.247-250, 2001.

LOGUERCIO-LEITE, C.; GROPOSO, C.; DRESCHLER-SANTOS, E. R.; FIGUEIREDO, N. F.; GODINHO, P. S.; ABRÃO, R. L. A particularidade de ser um fungo – I. constituintes celulares. **Biotemas**, v.19, n.2, p.17-27, 2006.

LORENZO, D.; PAZ, D.; DELLACASSA, E.; DAVIES, P.; VILA, R.; CAÑIGUERAL, S. Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. **Braz Arch Biol Technol**, v.45, n.4, p.519-524, 2002.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Invest**, v.11, p.1265-1273, 2003.

LUPETTI, A.; DANESI, R.; CAMPA, M.; DEL TACCA, M.; KELLY S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends Mol Med**, v.8, p.76-81, 2002.

LYONS, C. N.; WHITE, T. C. Transcriptional analyses of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. **Antim Agen Chemother**, v.44, n.9, p.2296-2303, 2000.

MA, C.; CHANG, G. Structure of the multidrug resistance efflux transporter EmrE from *Escherichia coli*. **PNAS**, v.101, n.9, p.2852-2857, 2004.

MACEDO, M. L. A. P.; CARTAXO, R. S.; ALMEIDA, T. C. C.; SOUZA, L. B. S.; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M.; Mecanismos de resistência e detecção de β -lactamases. **Ciênc Biol Saúde**, v.7, n.1, p.59-63, 2005.

MACHADO, J. K. K.; FEFERBAUM, R.; DINIZ, E. M. A.; OKAY, T. S.; CECCON, M. E. J.; VAZ, F. A. C. Monitoring the treatment of sepsis with vancomycin in term newborn infants. **Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo**, v.56, n.1, p.17-24, 2001.

MACHADO, V. L. L.; PALMA, M. S.; COSTA, O. M. Ação repelente das frações de óleos essenciais da folha de louro (*Laurus nobilis*) em ninfas e adultos de *Periplaneta americana* L. (Blattaria: Blattidade). **Ann Soc Entomol Bras, Anais...** v.24, n.1, 1995.

MANN, C. M.; COX, S. D.; MARKHAM, J. L. The outer membrane of *pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Lett Appl Microbiol**, v.30, p.294-297, 2000.

MARDEGAN, R. C.; FOGLIO, M. A.; GONÇALVES, R. B.; HÖFLING, J. F. *Candida albicans* proteinases. **Braz J Oral Scien**, v.5, n.16, p.944-952, 2006.

MARTIN, M. V. The use of fluconazole and itraconazole in treatment of *Candida albicans* infections: a review. **J Antimic Chemot**, v.44, p.429-437, 1999.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **J Bras Pneumol**, v.32, n.5, p.449-460, 2006.

MARTINS, A. F. Caracterização de metalo- β -lactamases produzidas por amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em dois hospitais de Porto Alegre. [Tese – Doutorado]. Porto Alegre (RS): UFRGS, 50p, 2005.

MARTINS, C. A. P.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C. Presence of *Staphylococcus* spp. And *Candida* spp. In the human oral cavity. **Braz J Microb**, v.33, p.236-240, 2002.

MARTINS, L. T. *Staphylococcus* In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. Microbiologia. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999, p.149-156.

MATOS, F. J. A. Plantas medicinais – guia de seleção e emprego de plantas medicinais do nordeste do Brasil. Fortaleza: IOCE, VII, 1989.

_____. O formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha: informações sobre o emprego na medicina caseira, de plantas do nordeste, especialmente do Ceará. 2 ed. Fortaleza: EUFC, 1997.

_____.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR J. W.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, E. V. L. da; HIRUMA, C. A. Essential oil of *Mentha x villosa* Huds. From northeastern Brazil. **J. essent. Oil Res**, v.11, p.41-44, 1999.

_____. Farmácias vivas. 3. ed. Fortaleza: EUFC, 1998

_____. Plantas da medicina popular do nordeste. 2.ed. Fortaleza: EUFC, 1999.

McDOUGAL, L. K.; STEWARD, C. D.; KILLGORE, G. E.; CHAITRAM, J. M.; MCALLISTER, S. K.; TENOVER, F. C. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database. **J Clin Microbiol**, v.41, p.5113-5120; 2003.

McGINNIS, M. R. Laboratory handbook of medical mycology. New York: Academic Press, 1980, p.411-416.

MELO, A. M.; PINHO, S.; DE SANTANA, C. F.; SANTOS, E. R.; SOUZA, I. A. Primeiras observações sobre o uso da *Mentha crispa* em tricomoníase urogenital. Curitiba, Resumos do XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, p.160, 1992.

MELO, E. de C.; RADÜNZ, L. L.; MELO, R. C. de A. Influência do processo de secagem na qualidade de plantas medicinais – Revisão. **Eng Agr**, v.12, n.4, p.307-315, 2004.

MENEZES, E. A.; CARNEIRO, H. M.; CUNHA, F. A.; OLIVEIRA, I. R. N.; ÂNGELO, M. R. F.; SALVIANO, M. N. C. Frequência de microrganismos causadores de infecções urinárias hospitalares em pacientes do hospital geral de Fortaleza. **RBAC**, v.37, n.4, p.243-246, 2005.

MIRANDA, K. C.; ARAÚJO, C. R.; KHRAIS, C. H. A.; LEMOS, J. A.; COSTA, C. R.; SOUZA, L. K. H.; PASSOS, X. S.; FERNANDES, O. F. S.; SILVA, M. R. R. Identificação de leveduras do gênero *Candida* nas unhas e em descamação de pele em Goiânia (GO), durante o ano de 2003. **Rev Patol Trop**, v.34, n.2, p.123-128, 2005.

MIZUTANI, S.; MASAHIRO, E.; INO-EU, T.; KURASAWA, M.; UNO, Y.; SAITO, H.; KATO, I.; TAKESAKO, K. Immunization with the *Candida albicans* membrane fraction and in combination with fluconazole protects against systemic fungal infections. **Antimic Agent Chemot**, v.44, n.2, p.243-247, 2000.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. da S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quim Nova**, v.24, n.1, p.105-111, 2001.

MONTE, F. J. Q.; OLIVEIRA, E. F. de; BRAZ-FILHO, R. Triterpenoides pentacíclicos de *Mentha villosa*: identificação estrutural e atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. **Quim nova**, v.24, n.4, p.491-500, 2001.

MONTE, J. Q.; FREITAS, M. R.; LEMOS, T. L. G. Contribuição ao estudo químico de plantas medicinais *Mentha crispa* Linn. João Pessoa, resumos do XI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, p.204, 1988.

MOORE, C. B.; SAYERS, N.; MOSQUERA, J.; SLAVEN, J.; DENNING, D. W. Antifungal drug resistance in *Aspergillus*. **J Infection**, v.41, p.203-220, 2000.

MOREIRA, L. B. Princípios para uso racional de antimicrobianos. **Rev AMRIGS**. V.48, n.2, p.118-120, 2004.

MOREIRA, L. S. Estudo da atividade de drogas antifúngicas através de curvas de crescimento de *Cândida albicans* utilizando o sistema automatizado bio-cell tracer®. [Dissertação – mestrado]. UNICAMP. Campinas (SP): 71p, 2003.

MOSQUERA, J.; DENNING, D. W. Azole cross-resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, p.556-557, 2002.

MOULIN, A. M. a hipótese vacinal: por uma abordagem crítica e antropológica de um fenômeno histórico. **Hist Cien Saúde**, v.10, n.2, p.499-517, 2003.

MOUNCHID, K.; BOURJILAT, F.; DERSI, N.; ABOUSSAOUIRA, T.; RACHIDAI, A.; TANTAOUI-ELARAKI, M.; ALAOUI-ISMAILI. The susceptibility of *Escherichia coli* strains to essential oils of *Rosmarinus officinalis* and *Eucalyptus globules*. **Afric J Biotechn**, v.4, p.1175-1176, 2005.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. E.; BARBOSA-JÚNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev Bras Farmacogn**. v.17, n.1, p.108-113, 2007.

NASSIS, C. Z.; GIESBRECHT, A. M.; SAITO, M. L.; OLIVEIRA, F. Atividade antibiótica de extratos de espécies de *Annonaceae*. **Cienc. Cult**, v.41, n.7, p.527 1989.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microb Rev**, v.11, n.1, 142-201, 1998.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDART - NCCLS, Method for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved guideline M26-A. NCCLS, Wayne, Pa, 1998.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDART - NCCLS, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2 ed. Tentative standart. NCCLS Document M7-T2, V. B. n. B. Villa Nova PA, National Committee for Clinical Laboratory Standart, 2002.

NEU, H. C. Inibidores da parede celular bacteriana. In: BRODY, T. M.; LARNER, J.; MINNEMAN, K. P.; NEU, H. C. Farmacologia humana – da molecular à clínica. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994b, p563-589.

_____. Inibidores da parede celular bacteriana. In: BRODY, T. M.; LARNER, J.; MINNEMAN, K. P.; NEU, H. C. Farmacologia humana – da molecular à clínica. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994c, p590-605.

_____. Inibidores da parede celular bacteriana. In: BRODY, T. M.; LARNER, J.; MINNEMAN, K. P.; NEU, H. C. Farmacologia humana – da molecular à clínica. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994d, p613-619.

_____. Inibidores da parede celular bacteriana. In: BRODY, T. M.; LARNER, J.; MINNEMAN, K. P.; NEU, H. C. Farmacologia humana – da molecular à clínica. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994e, p635-643.

_____. Princípios do uso de antimicrobianos. In: BRODY, T. M.; LARNER, J.; MINNEMAN, K. P.; NEU, H. C. Farmacologia humana – da molecular à clínica. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994a, p551-562.

NOBRE, M. O.; NASCENTE, P. S.; MEIRELES, M. C.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Cienc Rur**, v.32, n.1, p.175-184, 2002.

ODDS F. C. Antifungal activity of saperconazole (R. 66905) *in vitro*. **J Antimicrob Chemoter**, v.24, p.533-537, 1989.

_____. *Candida* and Candidosis. Factors predisposing to oral yeasts infections. **Acta Odont Scand**, v.48, n.1, p.71-74, 1990.

_____. *Candida* species and virulence. **ASM News**, v.60, p.313-318, 1994.

OHNO, T.; KITA, M.; YAMAOKA, Y.; IMAMURA, S.; YAMAMOTO, S. M.; KODAMA, T.; KASHIMA, K.; IMANASHI, J. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v.8, p.207-215.

OLIVEIRA R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev Bras Farmacogn**, v.16, p.77-82, 2006.

OLIVEIRA, R. A. G. ; SILVA, M. da S. H. da. Plantas medicinais na atenção primária à saúde. João Pessoa: Série Extensão, 1994

OLLERT M. W; WENDE, C; GÖRLICH, M; MCMULLAN-VOGEL, C. G; ZEPELIN, M. B.; VOGEL, C. W.; KORTING, H. C. Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from Human Immunodeficiency Virus-positive patients. **J Clin Microbiol**, v.33, n.10, p.2543-2549. 1995.

OUMZIL, H.; GHOULAMI. S.; RHAJAOU, M.; ILIDRISSI, A.; FKI-H-TETOUANI, S.; FAID, M.; BENJOUAD, A. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. **Phytother Res**, v.6, n.8, p.727-31, 2002.

OUNISSI, H.; DERLOT, E.; CARLIER, C.; COURVALIN, P. Gene homogeneity for aminoglycoside-modifying enzymes in Gram-positive cocci. **Antimic Agent Chemot**, v.34, n.11, p.2164-2168, 1990.

ÖZEL, A.; ÖZGÜNVEN, M. Effect of different planting on essential oil components of different mint (*Mentha spp.*) varieties. **Turk J Agric For**, v.26, p.289-294, 2002.

PAVIANI, E. R.; STADNIK, C. B.; HEINEK, I. estudo da epidemiologia e perfil de sensibilidade da *Pseudomona aeruginosa*. **INFARMA**, v.15, n.11-12, p.66-70, 2004.

PEREA, S.; RIBOT, J. L.; KIRKPATRICK, W. R.; MCTEE, R. K.; SANTILLÁN, R. A.; MARTÍNEZ, M.; CALABRESE, D.; SANGLARD, D.; PATTERSON, T. F. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. **Antimic Agents Chemoter**, v.45, n.10, p.2676-2684, 2001.

PEREIRA, M. S. V. Atividade *in vitro* de fluorquinolonas e ação sobre plasmídios em amostras de *Staphylococcus aureus* humanas e bovinas. (Tese de doutorado. UFPE), 2000.

_____.; SIQUEIRA Jr., J. P. Antimicrobial drugs resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brasil. **Lett Appl Microbiol**, v.20, p.391-395.1995.

_____.; _____.; TAKAKI, G. M. C.; Eliminação de resistência a drogas por fluorquinolonas em *Staphylococcus aureus* de origem bovina. **Pesq Vet Bras**, v.24, n.1, p.11-14, 2004.

PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLAN, M. R.; JORGE, A. O. C.; UENO, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Rev Saude Públ**, v.38, n.2, p.326-328, 2004.

PESSINI, G. L.; DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ, D. A. G. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. Var. *pallenscens* (C. DC.) Yunk. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.98, n.8., p.1115-1120, 2003.

PFALLER, M. A.; SHEEHAN, D. J.; REX, J. H. Determination of fungicidal activities against yeast and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. **Clin Microbiol Rev**, v.17, n.2, p.268-280, 2004.

PLEMPEL, M.; BERG, D.; BUCHEL, D. B.; ABBINK, D. Test methods for antifungalagents – a critical review. **Mykosen**, v.30, n.1, p.28-34, 1986.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **B. CEPPA**. v.19, n.2, p.193-210, 2001.

POTZERNHEIM, M. C. L.; BIZZO, H. R.; VIEIRA, R. F. análise dos óleos essenciais de três espécies de *piper* coletadas na região do Distrito Federal (cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (mata atlântica). **Rev Bras Farmacogn**, v.16, p.246-251, 2006.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complement Altern Med**, v.6, n.1, p.39-47, 2006

PRASAD, R.; PANWAR, S. Physiological functions of multidrug transporters in yeast. **Current Scien**, v.86, n.1, p.62-66, 2004.

PREETI, D.; ANDARGE, E.; MORISSEAU, S. Study of the structural changes on the antimicrobial activity of [3.1.1]-bicyclics. **J Essent Oil Res**, v.16, p.612-616, 2004.

RADÜNZ, L. L. Efeito da temperatura do ar de secagem no teor e na composição dos óleos essenciais de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e hortelã-comum (*Mentha x villosa* Huds.). Tese. UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2004.

RAMOS, C. G. S. Estudo dos padrões de resistência aos β -lactâmicos e inibidores de β -lactamases em estirpes de *Escherichia coli* uropatogênicas isoladas em animais. [relatório de Estágio Profissional]. PROPED III, Lisboa. Portugal: 2002, 38p. Disponível na internet via: dited.bn.pt/29851/851/1262.pdf

RAMOS, S. J.; FERNANDES, L. A.; MARQUES, C. C. L.; SILVA, D. D.; PALMEIRA, C. M.; MARTINS, E. R. Produção de matéria seca e óleo essencial de menta sob diferentes doses de fósforo. **Rev Bras Plant Méd**, v.8, n.1, p.9-12, 2005.

RAVID, U.; PUTIEVSKY, E.; KATZIR, E.; Enantiomeric distribution of piperitone in essential oils of some *Mentha* spp., *Calamintha incana* (Sm) Heldr. And *Artemisia judaica* L. **Flav Frag J**. v.9, p. 85-87, 1994.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas. **Invest**, v.111, p.1265-1273, 2003.

REMONATTO, G.; CARDOSO, C. M.; MARQUES, C. G.; SILVA, A. E. B.; GELATTI, L. C.; LEITE, C. F. M. CA-MRSA: um patógeno emergente. **News Lab**, v.80, p.92-96, 2007.

RISTORI, C. A.; PEREIRA, M. A. S.; GELLI, D. S. O efeito da pimenta do reino preta moída frente a contaminação *in vitro* com *Salmionella* Rubislaw. **Rev Inst Adolfo Lutz**. v.61, n.2, p. 131-133, 2002.

RIVERÓN, F. F.; HERNANDÉZ, J. L.; MARTÍNEZ, L. M. P.; BETARTE, C. M. Resistencia bacteriana. **Rev Cub Méd Milit**, v.32, n.1, p.44-48, 2003.

RODERO, L.; DAVEL, M.; SORIA, M.; VIVOT, W.; CÓRDOBA, S.; CANTEROS, C. E.; SAPORITI, A. Estudio multicéntrico de fungemias por levaduras en la república Argentina. **Rev Arg microbiol**, v.37, p.189-195, 2005.

ROEL, A. R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Rev Internacion Desenvol Local**, v.1, n.2, p.43-50, 2001

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chem**, v.91, p.621-632, 2005

SADER, H. S. Resistencia antimicrobiana em latinoamérica. ¿Cómo estamos?. **Rev Chil Infectol**, v.19, n.1, S5-S13, 2002.

SAÉNZ, Y.; BRINAS, L.; DOMINGUÉZ, E.; RUIZ, J.; ZARAZAGA, M.; VILA, J.; TORRES, C. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal and food origins. **Antmic Agent Chemoter**, v.48, n.10, p.3996-4001, 2004.

SALLÉ, J. O totum em fitoterapia - abordagem de fito-bioterapia. São Paulo: Rose, 1996.

SALMERÓN, J. P.; GARCÍA, F. M.; CONESA, D. R.; SALINAS, I. L.; FORNÁS, F. L.; GÓMEZ, J. R.; GÓMEZ, J. G.; HERNÁNDEZ, M. S.; CHÁVARRI, M. V. Comparación de la eficacia de quinupristina-dalfopristina en monoterapia y combinada con gentamicina, teicoplanina, imipenem o levofloxacino en un modelo experimental de endocarditis por *Enterococcus faecium* multirresistente. **Rev Esp Quimioterp**, v.19, n.3, p.258-266, 2006.

SANTOS, B. A. As infecções respiratórias em crianças e a resistência bacteriana: um desafio para o pediatra. **Rev AMRIGS**, v.48, n.2, p.73-152, 2004.

SANTOS, B. M. O.; DARINI, A. L. C. Colonização por *Staphylococcus aureus* em portadores são relacionados de uma creche de hospital universitário. **Medicina**, v.35, p.160-172, 2002.

SANTOS, D. S. dos, RIBEIRO, C. S., JESUS, A. R. de, SILVA JUNIOR, A. C. A. da, SILVA, N. C. A., COSTA NETO, E. M. Cuidados na gestação , pós-parto e com bebês pelas mulheres do povoado de pedra branca, Santa Terezinha, Bahia. **Stientibus Série Ciências Biológicas 6 (Etnobiologia)**, p.21-25, 2006.

SANTOS, L. D.; CAVALCANTI, M. B.; SPERANCA, P. A.; ANDRADE, M. C. Drogas antimicrobianas sistêmicas indicadas no tratamento das osteomielites do complexo maxilo-mandibular. considerações microbiológicas atuais. **Rev Cirurg Traum Buco-Maxilo-Facial**, v.3, n.1, p.1-5, 2003.

SANTOS, R. B.; BROCKSOM, T. J. BROCKSOM, U. A convenient deoxygenation of α , β - epoxi ketones to enones. **Tetrahedron Lett**, v.38, 745-748, 1997.

SANTOS-JR, I. D.; SOUZA, I. A. M.; BORGES, R. G.; SOUZA, L. B. S.; SANTANA, W. J.; COUTINHO. H. D. M.; Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scient Med**, v.15, n.3, p.189-197, 2005.

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. **Braz J Microb**, v.35, p.275-280, 2004.

SARVIKIVI, E.; LYYTIKAINEN, O.; SOLL, D. R.; PUJOL, C.; PFALLER, A.; RICHARDSON, M.; KOUKILA-KAHKOLA, P.; LUUKKAINEN, P.; SAXÉN, H. Emergence of fluconazole resistance in a *Candida parapsilosis* strain that caused infections in a neonatal intensive care unit. **J Clin Microbiol**, v.43, n.6, p.2729-2735, 2005.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. Microbiologia. 3ªEd.Guanabara Koogan:120-127. 642p. 2002.

SCHLYTER F.; SMITT O.; SJÖDIN K.; HÖGBERG H. E.; LÖFQVIST J. Carvone and less volatile analogues as repellent and deterrent antifeedants against the pine weevil, *Hylobius abietis*. **J Appl Entomol**, v.128, n.9-10, p.610-619, 2004.

SEABRA, F. R. G.; SEABRA, B. G. M.; SEABRA, E. G. Antibioticoterapia profilática em cirurgias periodontais. **Odontol Clin Cient**, v.3, n.1, 11-16, 2004.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal proteins. **App Envirom Microbiol**, v.67, n.7, p.2883-2894, 2001.

SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROF, A.; GABHAR, R. J. *In vitro* studies with sf 86-327, a new orally active allylamione derivatives. **J. Med. Vet Mycol**, v.23, p.125-132, 1985.

SHARMA, S.; SANGWAN, N. S.; SANGWAN, R. S. Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. **Current Scien**, v.84, n4, p.544-550, 2003.

SHELBURNE, S. A.; MUSHER, D. M.; HULTEN, K.; CEASAR, H.; LU, M. Y.; BHAILA, I.; HAMILL, J. *In vitro* killing of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with drugs combinations. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, n.10, p.4016-4019, 2004.

SHLAES, D. M.; GERDING, D. N.; CRAIG, W. A.; BORNSTEIN, D. L.; DUNCAN, R. A.; ECKMAN, M. R.; FARRER, W. D.; GREENE, W. H. Society for healthcare epidemiology of America and infections diseases society of America joint committee

of the prevention of antimicrobial resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. **SHEA**, v.18, n.4, p.275-295, 1997.

SILVA, A. C. O. da; ALBUQUERQUE, U. P. de. Woody medicinal plants of the caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). **Acta bot Bras**, v.19, n.1, 17-26, 2005.

SILVA, C. H. P. M. Elaboration and evaluation of a new screening medium for detection and presumptive identification of extended-spectrum β -lactamase-producing organisms (ESBL). **Braz J Microbiol**, v.31, p.271-274, 2000.

SILVA, J. A.; SILVA, W. D. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Escherichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. **Rev Patol Trop**, v.34, n.3, p.175-196, 2005.

SILVA, L. S.; BITTENCOURT, A. H. C. Avaliação de diferentes níveis de luminosidade no desenvolvimento de *Mentha villosa* Huds. **Rev Cien FAMINAS**. v.3, sup.1, p.188, 2007.

SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, I. F. S.; SOUSA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Rev Bras Farmacogn**, v.16, n.4, p.455-462, 2006.

SILVA, M. V. da; RODRIGUES, G. M.; BORBA, M. O.; BARBOSA-FILHO, J. M. Constituintes químicos do extrato clorofórmico de *Mentha x villosa* (Labiatae). CCS, XIII(2): Abril/Junho 1994.

SILVA, V. V.; DIAZ, C. M.; FEBRÉ, N. Vigilancia de la resistencia a los antifúngicos. **Rev Chil Infect**, v.19, n.2, p.149-156, 2002.

SILVEIRA, F.; JORDÃO, L. das raízes à resistência: repensando a medicina popular. Campina Grande: UEPB/CENTRAC, 1992.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Quim nova**, v.29, n.4, p.844-855, 2006.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. C.; CONCEIÇÃO, S. C.; KUSTER, R. M.; OLIVEIRA-FILHO, A. M. de. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Quim Nova**, v.27, n.1, p.46-49, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. – Porto Alegre: Universidade/UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2003. p. 467-495.

SMITH, R. D.; COAST J. Antimicrobial resistance: a global response. **Bull WHO**, v.80, n.2, 126-133, 2002.

SORIANO, E. V.; SALGADO-MIRANDA, C.; SUÁREZ-GÜEMES, F.; TAVERA, F. J. T. Patogenia microbiana: conceptos básicos en la interacción hospedero-microrganismo. **Vet Méx**, v.37, n.4, 457-465, 2006.

SOTO, L. D. Resistencia bacteriana. **Rev Cub Med Milit**, v.32, n.1, p.44-48, 2003.

SOUSA, P. J. C.; MAGALHÃES, P. J. C.; LIMA, C. C.; OLIVEIRA, V. S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of piperitenone oxide on the intestinal smooth muscle of guinea pig. **Bras J Med Biol Res**, v.30, p.787-791, 1997.

SOUSA-JR, M. A.; FERREIRA, E. S.; CONCEIÇÃO, G. C. Betalactamases de espectro ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. **NewsLab**. 63: 152-168, 2004.

SOUZA, C. D. de; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta bot bras** 20(1): 135-142, 2006.

SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C.; Revisão sobre aquisição de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Rev Patol Trop**. 34(1): 27-36, 2005.

SOUZA, S. M. C.; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L.; PIMENTA, C. J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciênc Agrot**. V.28. n.3, p. 685-690, 2004.

STEIN, A.; BEHAR, P.; CUNHA, C. R. H.; PELLEGRIN, L.; FERREIRA, J. A. S. Uso racional de antibióticos para médicos de atenção primária. **Rev AMRIGS**, v.48, n.2, p.126-134, 2004.

SUDBERY, P.; GOW, N; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in Microbiol**, v.12, n.7, p.217-324, 2004.

TAKEMOTO, K.; YAMAMOTO, Y.; UEDA, Y. Evaluation of antifungal pharmacodynamic characteristics of AmBisome against *Candida albicans*. **Microbiol Immunol**, v.50, n.8, p.579-586, 2006.

TANAKA, E.M.; RIBEIRO, M. G.; MEGID, J.; LISTONI, F. J. P. Tris-EDTA no teste de sensibilidade antimicrobiana in vitro em amostras de *Pseudomonas aeruginosa*. **Arq Bras Med Ve. Zootec**, v.54, n.3, p. 331-334, 2002.

TAVARES, W. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev Med Trop**, v.33, n.3, p.281-301, 2000.

TAVARES, W. Manual de antibióticos. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1984, 374p.

TENOVER, F. C. A melhor época, a pior época: a evolução do problema de resistência das bactérias aos agentes antimicrobianos. In: Patógenos emergentes nas doenças infecciosas: relatório Especial Hospital Practice. Euromédice. Ed. Médicas. 8-13, 2000.

THOMAS, A. F.; BESSIERE, Y. Limonene. **Nat Prod Rep**, v.6, p.291-309, 1989.

TOLEDO, M. R. F.; TRABULSI, L.R. *Pseudomonas* In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. Microbiologia. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999, p.269-271.

TRABULSI, L. R. Mecanismo de ação dos antibacterianos In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. Microbiologia. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999, p.93-98.

_____; MIMICA, I.; MIMICA, L. M. J. Características dos principais grupos de antibacterianos: espectro de ação e indicações In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. Microbiologia. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999, p.99-104.

TRIPATHI, A. K.; PRAJAPATI, V.; AHMAD, A.; AGGARWAL, K. K.; KHANUJA, S. P. S. piperitenone oxide as toxic, repellent, and reproduction retardant toward malarial vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Anophelinae). **J Med Entomol**, v.41, n.4, p.691-698, 2004.

TUCKER, A. O.; CHAMBERS, H. L.; *Mentha Canadensis* L. (Lamiaceae): a relict amphidiploid from the lower tertiary. **Taxon**, v.51, p.703-718, 2002.

TURNER, G. W.; CROTEAU, R. Organization of monoterpene biosynthesis in *Mentha*. Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase. **Plant Physiol**, v.136, p.4215-4220, 2004.

TURNER, G. W.; GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. B. Development of peltate glandular trichomes of peppermint. **Plant Physiol**, v.124, p.665-679, 2000.

TUROLLA M. S. dos R.; NASCIMENTO, E. de S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Braz J Pharm Scien** 42(2): 289-306, 2006.

VADDI, H. K.; HO, P. C.; CHAN, Y. W.; CHAN, S. Y. Oxide Terpenes as Human Skin Penetration Enhancers of Haloperidol from Ethanol and Propylene Glycol and Their Modes of Action on Stratum Corneum. **Biol Pharm Bull**, v.26, n.2, p.220-228, 2003.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. **Sal Pub Mex**, v.47, n.5, p.381-387, 2005

VIEGAS-JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Quim Nova**, v.26, n.3, p.390-400, 2003.

VISCONTI, R. T. Actividad antimicrobiana in vitro de nuevas 6-fluoroquinolonas de administración por via oral. Relación estructura-actividad. [Tese-Doutorado]. Valencia – Espanha, Universitat de Valencia, 332p., 2002. Disponível na internet via http://www.tesisenred.net/TESIS_UV/AVAILABLE/TDX-1014103-141639//TESIS_TO.PDF.

VOUKOU, D.; DOUVLI, P.; BLIONIS, G. J.; HALLEY, J. M. Effects of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent seedling growth. **J Chem Ecol**, v.29, n.10, p.2281-301, 2003.

VUCKOVIC, N.; BOKOR-BRATIC, M.; VUCKOVIC, D.; PICURIC, I.; Presence of *Candida albicans* in potentially malignant oral mucosal lesions. **Arch Oncol**, v.12, n.1, p.51-54, 2004.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v.406, p.775-781, 2000.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? **CEBRIM-Temas Selecionados**, v.1, n.4, p.1-6, 2004.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. **Rev Farm Bioq**, v., p.77-81, 1963.

WEISSMAN, Z.; BERDICEVSKY, I.; CAVARI, B.; KORNITZER, D. The high tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. **PNAS**, v.97, n.7, p.3520-3525, 2000.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN R. A. Clinical cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 11: 382-402, 1998.

WICKENS, H.; WADE, P. Understanding antibiotic resistance. **Pharm J**, v.274, p.501-505, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Evaluation of certain food additives, 65° Report of the joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Activities, Who Technical Report Series, 934, Geneva, 2006.

XAVIER, M. N.; RAMOS, I. N. C.; XAVIER FILHO, L. A fitoterapia no combate às afecções bucais. João Pessoa: Idéia, 1995.

YAMADA, C. S. B. Fitoterapia: sua história e importância. Fitoterapia - **Rev Racine**, n.43, p.50-1, 1998.

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

ZEINALI, H.; ARZANI, A.; RAZMJOO, K.; REZAEI, M. B. Evaluation of oil compositions of Iranian mints (*Mentha* sp.). **J Essent Oil Res**, v.17, n.2, p.156-159, 2005

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)