

DANIELLE MENDES SILVA

**EFEITO DE EXTRATOS VEGETAIS E ANTIBIÓTICOS SOBRE
Staphylococcus aureus DE ORIGEM BOVINA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2012

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

S586e
2012

Silva, Danielle Mendes, 1986-
Efeito de extratos vegetais e antibióticos sobre
Staphylococcus aureus de origem bovina / Danielle Mendes
Silva. – Viçosa, MG, 2012.
x, 45f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 36-45

1. Plantas medicinais. 2. Extratos vegetais. 3. Antibióticos.
4. Bactérias patogênicas. 5. *Staphylococcus aureus*.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 581.634

DANIELLE MENDES SILVA

**EFEITO DE EXTRATOS VEGETAIS E ANTIBIÓTICOS SOBRE
Staphylococcus aureus DE ORIGEM BOVINA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 16 de fevereiro de 2012.

Andréa de Oliveira Barros Ribon
(Coorientadora)

Virgínia Ramos Pizzolo

Marisa Alves Nogueira Diaz
(Orientadora)

A Deus

Aos meus pais, Diomedes e Maria Izabel

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A Deus pela vida;

à Universidade Federal de Viçosa e ao departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela infra-estrutura que permitiu a realização deste trabalho;

ao Fundo de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais pela bolsa concedida;

à professora e orientadora Marisa Nogueira Diaz por me receber em seu grupo de pesquisa, pelos conselhos e ensinamentos;

à professora Andréa Barros Ribon pelo acolhimento em seu laboratório, pela orientação ao longo de todos esses anos e por partilhar comigo seus conhecimentos, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho;

aos meus pais Diomedes e Maria Izabel pelo amor incondicional, pela presença constante apesar da distância, por todo apoio, força e orações;

ao Igor Henrique por todo amor e companheirismo *“e até quem me vê lendo jornal, na fila do pão, sabe que eu te encontrei” Rodrigo Amarante;*

ao professor Gaspar Diaz pela co-orientação;

à professora Virgínia Ramos Pizziolo pelas sugestões e participação na banca examinadora;

ao professor Luiz Alexandre Peternelli por ceder seu tempo e conhecimento para auxílio das análises estatísticas deste trabalho;

aos amigos do LBM Aline, Ancély, Ananda, Carlos, Daniela, Héllida, Glauco, Mary Hellen, Mônica, Patrícia, Raphael, Mário, Marina, Mariana, Murilo, Silvana pela convivência, por tornarem a rotina de trabalho algo tão prazeroso, pelos momentos de descontração, pelos cafezinhos, noites das brocas e pela amizade. E a Priscilla, além de tudo isso, pela ajuda imprescindível nos experimentos.

ao Eduardo secretário do Programa de Pós-graduação em Bioquímica pela competência indiscutível, pelos emails com puxões de orelha, mas que acabavam deixando o dia mais divertido;

aos amigos da Bioquímica e do mestrado em Bioquímica por serem uns queridões;

ao Ciro, Roberta, Rodrigo pela amizade sincera ao longo de todos esses anos;

aos meus familiares pela torcida, especialmente minhas avós Ana e Rita, Tio Miguel, Anderson, Mayara, Madá, Pizetta;

ao Peter, meu amor de asas.

BIOGRAFIA

Danielle Mendes Silva, filha de Diomedes Gaudencio da Silva e Maria Izabel Mendes Silva, nasceu na cidade de Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, em 15 de dezembro de 1986.

Em dezembro de 2003 completou o ensino médio no Centro Educacional Imediato em Cachoeiro de Itapemirim.

Em março de 2005, ingressou no bacharelado em Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa, MG, graduando-se em janeiro de 2010.

Ingressou no Programa de Pós Graduação em Bioquímica Agrícola em março de 2011, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 16 de fevereiro de 2012.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. OBJETIVOS.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. Micro-organismos e condição de cultivo.....	13
4.2. Extratos vegetais e antibióticos.....	13
4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	14
4.4. Determinação da concentração inibitória mínima dos extratos vegetais e dos antibióticos.....	14
4.5. Avaliação da interação entre extratos vegetais e antibióticos.....	15
4.6. Determinação da frequência de mutação.....	16
4.7. Efeito de antibióticos sobre a frequência de mutação e indução do fenótipo SCV.....	16
5. RESULTADOS.....	18
5.1. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e sinergismo.....	18
5.2. Efeito de antibióticos sobre a frequência de mutação e indução do fenótipo SCV.....	23
6. DISCUSSÃO.....	29
6.1. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e sinergismo.....	29
6.2. Efeito de antibióticos sobre a frequência de mutação e indução do fenótipo SCV.....	32
7. CONCLUSÕES.....	35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabólitos secundários de plantas como modificadores de mecanismos de resistência multi-drogas.....	8
Figura 2. Halos de inibição extratos vegetais sobre <i>Staphylococcus aureus</i> 4125.....	18
Figura 3. Determinação da concentração inibitória mínima.....	20
Figura 4. Avaliação da interação entre extratos vegetais e antibióticos sobre o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> 3993 e 4125.....	21
Figura 5. Frequência de mutação induzida por antibióticos.....	24
Figura 6. Frequências de mutação reunidas.....	25
Figura 7. Alteração da frequência de mutação.....	26
Figura 8. Colônias SCV induzidas por gentamicina.....	27
Figura 9. Colônias suspeitas em ágar sangue.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais classes de antibióticos, alvos e vias afetadas.....	4
Tabela 2. Compostos isolados de extratos vegetais com efeito sinérgico sobre antibióticos.....	7
Tabela 3. Halos médios de inibição para os extratos ativos sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	19
Tabela 4. Valores de concentrações inibitórias mínimas (mg.mL ⁻¹) obtidos para os extratos vegetais testados.....	19
Tabela 5. Valores de concentrações inibitórias mínimas obtidas para os antibióticos testados.....	20
Tabela 6. Interação entre extratos vegetais e antibióticos sobre <i>Staphylococcus aureus</i> 3993 e 4125.....	22
Tabela 7. Concentração inibitória mínima para isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	23
Tabela 8. Medianas das frequências de mutação.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

BHA - Ágar infusão cérebro-coração

BHI - Caldo infusão cérebro-coração

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DMSO – Dimetilsulfóxido

E. coli – *Escherichia coli*

FIC – Concentração inibitória fracionária

INT – Iodonitrotetrazolium

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

SCV – Colônias variantes pequenas

SubCIM – Concentração subinibitóriamínima

TSA – Ágar triptona de soja

TSB – Caldo triptona de soja

UFC – Unidades formadoras de colônia

RESUMO

SILVA, Danielle Mendes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Efeito de extratos vegetais e antibióticos sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina.** Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientadores: Andréa de Oliveira Barros Ribon e Gaspar Diaz Muñoz.

Devido ao crescente aumento da resistência bacteriana ao longo dos anos, o uso combinado de terapêuticos vem sendo visto como uma alternativa no combate às infecções. Esse trabalho avaliou o efeito de extratos vegetais e antibióticos sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina. A atividade antimicrobiana de quinze extratos vegetais sobre *S. aureus* foi determinada pelo método de *hole plate* e halos de inibição superiores que 7 mm foram observados para os extratos de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*), boldinho (*Plectranthus ornatus*), ingá (*Inga edulis*), sálvia (*Salvia officinalis*) e sena (*Senna macranthera*). Em seguida, foi avaliada a interação entre os extratos vegetais ativos e cinco antibióticos comumente utilizados no tratamento da mastite bovina. Sinergismo foi visualizado entre o extrato de boldinho e os antibióticos ampicilina, canamicina e gentamicina, com uma redução da concentração inibitória mínima (CIM) do antibiótico em combinação de oito vezes. Tanto o extrato de sálvia quanto o extrato de sena mostraram sinergismo com ampicilina, canamicina, gentamicina e tetraciclina, havendo uma redução da CIM em até oito vezes. Posteriormente, estimou-se o efeito de concentrações subinibitórias de ampicilina, gentamicina e tetraciclina sobre células de *S. aureus* por meio da obtenção de mutantes resistentes à rifampicina após exposição a 0,25X, 0,5X e 0,75X CIM dos três antibióticos. Constatou-se que os antibióticos promoveram aumento na frequência de mutação em pelo menos uma das condições testadas. Todas as concentrações de gentamicina aumentaram a frequência de mutação para o isolado *S. aureus* 3993. Para o isolado *S. aureus* 4125 só não houve aumento na mutação na condição 0,25X CIM de ampicilina. Colônias de *S. aureus* apresentando o fenótipo SCV (small colony variant), normalmente relacionado com infecções crônicas, foram observadas quando 0,5X CIM, 1X CIM, 1,5X CIM dos três antibióticos foram testadas. Esses resultados ratificam a necessidade de se conhecer o efeito de antibióticos sobre bactérias a fim de subsidiar terapias mais eficazes para o tratamento de doenças.

ABSTRACT

SILVA, Danielle Mendes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Effect of plant extracts and antibiotics against *Staphylococcus aureus* of bovine origin.** Adviser: Marisa Alves Nogueira Diaz. Co-Advisers: Andréa de Oliveira Barros Ribon and Gaspar Diaz Muñoz.

Due to the increasing bacterial resistance over the years, the use of combined therapy has been seen as an alternative to fight infections. This study evaluated the effect of plant extracts and antibiotics on *Staphylococcus aureus* of bovine origin. The antimicrobial activity of fifteen plant extracts was determined by the hole plate method and zones of inhibition greater than 7 mm were observed for the extracts prepared from rosemary (*Baccharis dracunculifolia*), dog bane (*Plectranthus ornatus*), guama (*Inga edulis*), sage (*Salvia officinalis*), and senna (*Senna macranthera*). Next, we evaluated the interaction between the active plant extracts and five antibiotics commonly used in the treatment of bovine mastitis. Synergism was visualized between boldinho and the antibiotics ampicillin, kanamycin, and gentamicin, with an eight fold reduction in the MIC. The extracts prepared from sage and senna showed synergism with ampicillin, kanamycin, gentamicin, and tetracycline. In the case, the combination between extracts and antibiotics promoted a reduction of up to eight times the MIC. Next, the effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on *S. aureus* was evaluated upon exposure to 0.25 X to 0.75 X 0.5 X MIC of ampicillin, gentamicin, and tetracycline. All antibiotics promoted an increase in the mutation frequency in at least one of the conditions tested. All concentrations of gentamicin increased the mutation frequency for the isolate *S. aureus* 3993. However for *S. aureus* 4125, 0.25 X MIC of ampicillin was the only condition where no significant change was seen. Colonies of *S. aureus* displaying the small colony variant phenotype, which is usually related to chronic infections, were observed when 0.5 MIC X, 1X MIC, 1.5 X MIC of the mentioned antibiotics were added to the culture media. These results confirm the need to investigate the effect of antibiotics against bacteria in order to support more effective therapies for the treatment of diseases.

1. INTRODUÇÃO

O homem sempre buscou nas plantas recursos para sua sobrevivência, seja como fonte de alimentação, seja para cura de suas doenças por meio do uso de plantas medicinais. A construção do arsenal de informações sobre o uso terapêutico de plantas ao longo da história baseou-se, sobretudo, no conhecimento intuitivo de homens que, com o passar do tempo, aprenderam a diferenciar ervas benéficas daquelas tóxicas a saúde (Leite, 2009). Com o desenvolvimento tecnológico, a utilização das plantas para o tratamento de doenças que antes era feito de forma empírica passou a ser pesquisado e comprovado cientificamente.

A descoberta dos primeiros antibióticos, nas décadas de 30 e 40, revolucionou a prática da medicina reduzindo drasticamente as taxas de mortalidade associadas a infecções bacterianas. Essas descobertas levaram a uma intensa busca por novas drogas antibacterianas nos anos seguintes, o que resultou na descoberta da maioria das classes de antimicrobianos conhecidas e utilizadas até os dias de hoje, muitas delas derivadas de fontes naturais (Butler e Buss, 2006).

Em 1940 foi relatado o primeiro caso de resistência bacteriana (Bush, 2004; Abraham e Chain, 1940). Desde então uma série de estratégias vem sendo usada pelas indústrias farmacêuticas para desenvolvimento de antimicrobianos, entre elas a prospecção de substâncias vegetais com efeito bactericida, o desenvolvimento de compostos sintéticos e a modificação de drogas a fim de torná-las mais eficazes. Isso, porém, é um processo laborioso e caro, o que faz voltar à atenção para alternativas que potencializem os efeitos dos antimicrobianos já disponíveis ou que minimizem a resistência dos micro-organismos.

Apesar de os antibacterianos derivados de plantas serem menos potentes, os vegetais combatem infecções com sucesso. Para isso adotam uma estratégia diferente de luta conhecida por sinergismo (Hemaiswarya et al., 2008), um mecanismo no qual dois diferentes compostos são combinados para aumentar suas atividades individuais (Rani et al., 2009). Essa estratégia tem servido de inspiração para novas pesquisas voltadas para a descoberta de moléculas que tem como finalidade atuar nos mecanismos de resistência bacteriana, minimizando-os.

A capacidade de extratos brutos vegetais de potencializar a atividade de antibióticos já utilizados foi observada anteriormente (Chung et al., 2011; Aiyegoro et al., 2009; Sibanda and Okoh, 2008). O efeito sinérgico entre derivados de plantas e antibióticos permite a utilização

dessas drogas quando sua eficácia como agente único no tratamento já está reduzida (Chung et al., 2011).

Durante o tratamento de infecções o hospedeiro é exposto a concentrações de antibióticos que são ineficientes no combate de micro-organismos. Muitos autores têm mostrado que essas concentrações sub-inibitórias (subCIM) podem ter efeitos não esperados sobre a bactéria como extensiva mudança no padrão transcricional (Yim et al., 2006), aumento na frequência de mutação (Henderson-Begg et al., 2006) e na secreção de toxinas (Ohlsen et al., 1998), entre outros. Trabalhos recentes comprovaram que subCIM também selecionam bactérias resistentes ou mesmo promovem o aparecimento de resistentes a partir de uma população de bactérias sensíveis ao antibiótico (Cantón e Morosini, 2011; Gullberg et al., 2011). Esses estudos reforçam a necessidade de uma compreensão mais detalhada da ação de antibióticos sobre a fisiologia da célula o que refletirá positivamente na terapia administrada.

Esse trabalho teve por objetivos avaliar a atividade de extratos vegetais e antibióticos sobre isolados de *Staphylococcus aureus* associados à mastite bovina. Para isso, foi determinada a atividade antibacteriana de quinze extratos vegetais de forma isolada ou em associação com antibióticos comumente empregados no tratamento da doença. A influência de concentrações subinibitórias dos antibióticos na frequência de mutação e na formação de colônias variantes pequenas também foi avaliada. Os resultados mostraram que cinco extratos vegetais foram ativos sobre os isolados de *Staphylococcus aureus* e três deles apresentaram interações de sinergismo com quatro dos antibióticos testados. Além disso, o tratamento com concentrações subinibitórias de antibióticos levou a um aumento nas frequências de mutação das bactérias e permitiu a observação de colônias com fenótipo de variantes pequenas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias, sendo por isso denominados bacteriostáticos e bactericidas, respectivamente (Walsh, 2003). A era da antibioticoterapia iniciou no século XX com a descoberta da penicilina por Sir Alexander Fleming em 1928. Em 1945, no mesmo ano que recebeu o prêmio, Fleming advertiu que o uso inadequado dos antibióticos poderia levar à seleção de linhagens resistentes de micro-organismos, fato que começou ocorrer com isolados bacterianos dez anos depois que a penicilina foi introduzida em larga escala no mercado (Rosenblatt-Farrell, 2009; Walsh, 2003).

Entre os anos 1940-1960 vários antibióticos foram descobertos através de triagens de produtos naturais (Guimarães et al., 2010). Essas décadas ficaram conhecidas como a era de ouro na descoberta de antibióticos, por terem sido isolados e purificados as penicilinas, as cefalosporinas, os aminoglicosídeos e a tetraciclina (Walsh, 2003).

Antibióticos semi-sintéticos análogos aos antibióticos naturais já existentes foram introduzidos no mercado entre os anos 1960-1980. A maioria deles foi obtida a partir de protótipos naturais microbianos, como derivados β -lactâmicos (análogos de penicilina e cefalosporina, ácido clavulânico, aztreonam), análogos da tetraciclina e derivados aminoglicosídicos (gentamicina, tobramicina, ampicilina) (Guimarães et al., 2010). Esses novos antibióticos eram mais potentes, menos susceptíveis a inativação por enzimas ou simplesmente se ligavam de forma mais efetiva a seus alvos bacterianos (Fernandes, 2006). No entanto, no início dos anos 80, depois de duas décadas de produção de derivados análogos, as companhias farmacêuticas começaram a encontrar dificuldade em sintetizar novos compostos (Fernandes, 2006).

Entre os anos 1980-2000 as principais ferramentas utilizadas para a busca de novos antibióticos foram a genômica e as triagens de coleções de compostos (Guimarães et al., 2010). As coleções de compostos são constituídas por produtos sintéticos, sendo os agentes antibacterianos provenientes de estruturas não encontradas na natureza. Essas bibliotecas sintéticas produziram quantidade, mas não qualidade em candidatos a novas drogas (Walsh, 2003). Juntamente com os esforços em identificar novos compostos químicos que funcionassem como antibióticos, as pesquisas também foram focadas em proteínas microbianas como

ferramentas na descoberta de antimicrobianos. A clonagem de genes microbianos, o sequenciamento do genoma, a expressão de proteínas e o desenvolvimento de bibliotecas de ligantes geraram uma série de novos alvos bacterianos. Infelizmente, a maioria destas ligações não provou ser eficaz como agente antibacteriano (Fernandes, 2006).

No início de 2000, programas de descoberta de antibióticos a partir de fontes naturais foram retomados em algumas indústrias farmacêuticas (Guimarães et al. 2010). Treze drogas tiveram seu uso aprovado entre 2005 e 2007. Atualmente mais de cem derivados de produtos naturais se encontram em fase de estudo clínico e pelo menos, mais de cem projetos estão em desenvolvimento pré-clínico (Harvey, 2008).

Dado tamanho sucesso, seria um desperdício não optar pela exploração da rica diversidade química encontrada da natureza. Por este motivo, várias pesquisas combinam as áreas de produtos naturais e a da química orgânica, explorando os produtos naturais como arcabouços para o desenho de moléculas com potencial uso em terapias (Ortholand e Ganesan, 2004) e como possível alternativa no tratamento de micro-organismos resistentes aos antibióticos disponíveis.

As principais classes de antibióticos disponíveis atualmente, seus alvos na bactéria e as vias que são afetadas são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Principais classes de antibióticos, alvos e vias afetadas (Kohanski, et al., 2007).

Classe de Antibiótico	Antibióticos	Origem	Espectro de ação	Alvo primário	Vias afetadas
Fluoroquinonas					
Inibidor da síntese de DNA	Ácido nalidíxico, ciprofloxacino, levofloxacino e gemifloxacino	Sintético	Gram positivos e Gram negativos aeróbios, algumas espécies Gram negativos anaeróbios	Topoisomerase II (DNA girase), Topoisomerase IV	Replicação do DNA, resposta SOS, geração ATP, ciclo do ácido cítrico, Formação de ROS
Rifamicinas					
Inibidor da síntese de RNA	Rifamicinas, rifampicinas e reifapentinas	Natural e semi-sintético	Gram positivo e Gram negativos aeróbios	RNA polimerase DNA dependente	Transcrição de RNA, replicação de DNA e resposta SOS

cont. Tabela 1

β lactâmicos					
Inibidor da síntese de parede celular	Penicilinas (penicilina, ampicilina, oxacilina) Cefalosporinas (cefazolina, cefoxitina, ceftriazona, cefepima) e carbapenemos (imipenemo)	Natural e semi-sintético	Gram positivo e Gram negativos aeróbios e anaeróbios	Proteínas ligadoras de penicilina	Síntese de parede celular, divisão celular, atividade de autólise, resposta SOS, ciclo do ácido cítrico, formação de ROS
Glicopeptídeos e glicolipopeptídeos					
Inibidor da síntese de parede celular	Vancomicina e teicoplanina	Natural e semi-sintético	Gram positivo	Unidades do peptídeo glicano	Síntese de parede celular, transglicosilação, transpeptidação e ativação da autólise
Lipopeptídeos					
Inibidor da síntese de parede celular	Daptomicina e polimixina B	Natural e semi-sintético	Gram positivo (daptomicina) Gram negativo (pilimixina)	Membrana celular	Síntese da parede celular e dois componentes do sistema de envelope
Aminoglicosídeos					
Inibidor da síntese de proteínas	Gentamicina, trombamicina, estreptomina e canamicina	Natural e semi-sintético	Gram positivo e Gram negativos aeróbios	Unidade 30S do ribossomo	Tradução de proteínas, resposta SOS, formação de ROS
Tetraciclínas					
	Tetraciclina e doxiciclina	Natural e semi-sintético	Gram positivo e Gram negativos aeróbios	Unidade 30S do ribossomo	Tradução de proteínas
Macrolídeos					
	Eritromicina e azitromicina	Natural e semi-sintético	Gram positivo e Gram negativos aeróbios	Unidade 50S do ribossomo	Tradução de proteínas, esgotamento do tRNA livre
Streptogamínas					
	Pristinamicina, Dalfofristina e quinupristina	Natural e semi-sintético	Gram positivo e Gram negativos aeróbios	Unidade 50S do ribossomo	Tradução de proteínas, esgotamento do tRNA livre
Fenicóis					
	Cloranfenicol	Natural e semi-sintético	Algumas espécies de Gram negativos e Gram positivos	Unidade 50S do ribossomo	Tradução de proteínas

O desenvolvimento de fármacos a partir de compostos naturais e o isolamento de um composto ativo dependem de um passo fundamental, a seleção de plantas para o estudo farmacológico. Isso pode ser feito de várias maneiras, incluindo uso tradicional, conteúdo

químico, toxicidade, seleção randômica, ou a combinação de uma série de critérios. A estratégia mais comum é a observação cuidadosa de fontes naturais pela medicina popular, em diferentes culturas, o que é conhecido como etnobotânica ou etnofarmacologia (Rates, 2001).

Existem vários registros históricos sobre a utilização das plantas para tratamento de doenças desde 4.000 a.C. O primeiro registro médico depositado no Museu da Pensilvânia é datado de 2.100 a.C. e inclui uma coleção de fórmulas de trinta diferentes drogas de origem vegetal, animal ou mineral. O manuscrito Egípcio “Ebers Papyrus” (1.500 a.C.) contém 811 prescrições e 700 drogas e o primeiro texto Chinês sobre plantas medicinais (500 a.C.) relata nomes, doses e indicações de uso de plantas para tratamento de doenças. Algumas dessas plantas ainda são utilizadas, como Ginseng (*Panax spp*), *Ephedraspp*, *Cassia spp* e *Rheum palmatum* L., inclusive como fontes para indústrias farmacêuticas (Duarte, 2006).

Além da sua importância no tratamento de infecções humanas, estudos de etnoveterinária mostram a utilização de diversas plantas medicinais, por produtores rurais. Essas plantas têm sido utilizadas no tratamento de infecções de animais como vacas, ovelhas, aves domésticas, cavalos e porcos (Marinho et al., 2007; Diaz et al., 2010).

Apesar de os antimicrobianos com um único mecanismo de ação ter sido eficazes nos últimos anos, parece cada vez mais improvável que este seja o padrão no futuro devido ao crescente aumento da resistência bacteriana aos antibióticos em uso nas práticas humana e veterinária (Walsh, 2003). O uso combinado de terapêuticos pode expandir o espectro de atividade das drogas, aumentando as chances de combate às infecções (Lee et al., 2008; Chung et al., 2011).

Uma série de medicamentos utilizados atualmente baseia-se em interações sinérgicas entre diferentes antibióticos que possuem diferentes alvos (Sibanda e Okoh, 2007). A combinação do ácido clavulânico com a amoxicilina é o exemplo de maior sucesso do uso de um antibiótico, no caso um β -lactâmico em associação com um inibidor da β -lactamase, o que restaura a atividade da amoxicilina. Conhecida como Augmentin (Clavulin ®) essa é a combinação mais comercializada pela indústria farmacêutica e gerou 1,3 bilhões de dólares em vendas em 1995 (Oliveira et al., 2009). Mesmo após 20 anos de uso clínico, a combinação amoxicilina/AC continua apresentando excelente atividade contra a maioria das espécies de bactérias patogênicas Gram-positivas e também contra muitas bactérias Gram-negativas (Oliveira et al., 2009).

Estudos mostram que o uso de extratos de plantas em combinação com antibióticos tem promovido uma significativa redução das concentrações inibitórias mínimas sobre alguns isolados resistentes (Darwish et al., 2002; Al-hebshi et al., 2006; Betoni et al., 2006; Lee et al., 2008; Souza et al., 2010; Vinod et al., 2010). Pallaniapan e Holey (2010) estudando o efeito de antimicrobianos naturais (eugenol, timol, cravacol e cinemaldeído) em combinação com antibióticos (ampicilina, penicilina, tetracilina, eritromicina e bacitracina) frente a isolados resistentes de *Salmonella Typhimurim*, *E. coli*, *S. aureus* e *Streptococcus pyogenes* observaram redução de 25% a 12,5% nas concentrações inibitórias mínimas dos antimicrobianos combinados. Recentemente, Chan et al. (2011) mostraram que a baicaleína proveniente de *Scutellaria baicalensis* Georgi. – uma das plantas com uso popular mais difundido da China – tornou isolados de *S. aureus* com resistência multidrogas novamente susceptíveis à ciprofloxacino, possivelmente por inibição da bomba de efluxo de antibióticos bacteriana. Alguns compostos isolados de extratos vegetais com efeito sinérgico sobre antibióticos são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Compostos isolados de extratos vegetais com efeito sinérgico sobre antibióticos. Fonte: (Sibanda e Okoh, 2007).

Composto	Fonte vegetal	Antibiótico potencializado	Referência
Ferruginol	<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	Oxacilina, Tetraciclina, Norfloxacino	Smith et al.(2007)
5-Epipsiferol		Tetraciclina	
2,6-dimetil-4-fenil-piridina-3,5-acido dicarboxílico di etil éster	<i>Jatropha elliptica</i>	Ciprofloxacino, Norfloxacino, Pefloxacino, Acriflavina e Brometo de Etídio	Marquez et al. (2005)
Ácido carnósico e carnosol	<i>Rosmarinus officinalis</i>	β -lactâmicos	Shibata et al. (2005)
Metil-1- α -7- α -14- α -diidroxí-8,15-isopimaradien-18-oate	<i>Lycopus europaeus</i>	Tetraciclina e Eritromicina	Gibbons et al. (2003)
Metil-1- α -14- α -diacetoxi-7- α -hidroxí- 8,15-isopimaradien-18-oate			

Epicatequina galata	<i>Camellia sinensis</i>	Norfloxacino	Gibbons et al. (2004)
		Imipenem	Hu et al. (2002)
Epigalocatequina gálata		Panipenem	Zhao et al.(2001)
		β -lactâmicos	

O mecanismo exato para a redução da resistência ao antibiótico pelos compostos naturais ainda é desconhecido. Sugere-se, porém, que os antimicrobianos naturais facilitem a penetração da droga através da membrana bacteriana, atuem bloqueando o efeito inibidor das enzimas do micro-organismo, ou ainda interfiram com um ou vários alvos do antibiótico (Palaniappan e Holley, 2010) (Fig 1).

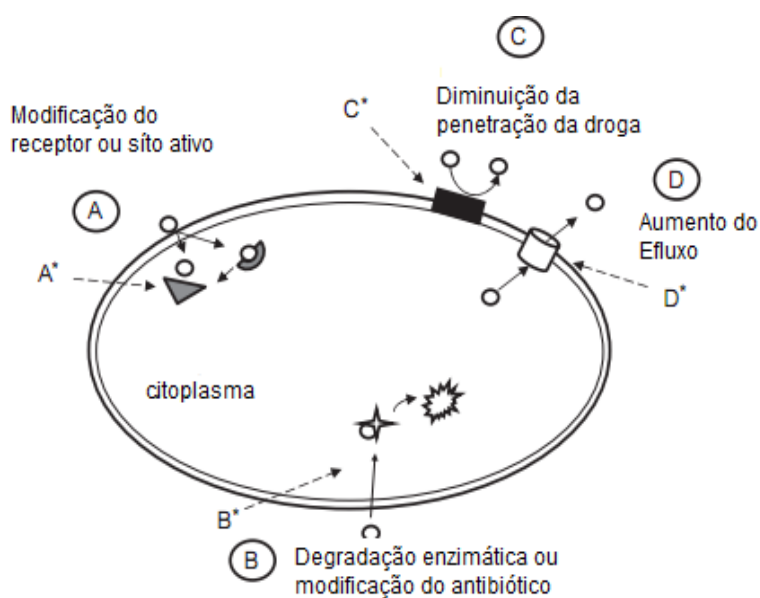


Figura 1. Metabólitos secundários de plantas como modificadores de mecanismos de resistência multi-drogas. As letras A, B, C e D mostram os principais mecanismos usados pelas bactérias para se tornarem resistentes aos antibióticos. As letras A*, B*, C* e D* representam os metabólitos secundários de planta e onde eles atuam a fim de modificar o mecanismo de resistência. (Fonte: Hemaiswarya et al., 2008, adaptado).

Efeito de concentrações subinibitórias de antibióticos sobre bactérias

Espera-se que os antibióticos atuem combatendo o patógeno causador da infecção, porém, outras respostas têm sido observadas na presença de antimicrobianos. Recentemente, vários estudos comprovaram que a exposição a concentrações subinibitórias de antibióticos produz múltiplos efeitos nas células bacterianas, como a diminuição da formação de biofilmes, secreção de fatores de virulência, expressão do flagelo, bem como um aumento na adesão bacteriana, transferência de genes e na frequência de mutação (Cortes et al., 2008).

A expressão do gene *hla*, que codifica a α -toxina de *Staphylococcus aureus* mostrou modulada por concentrações subinibitórias de diferentes antibióticos. Em estudo realizado por Ohlsen e colaboradores (1998) foi observado que quando *S. aureus* foi exposto a β -lactâmicos, a expressão de *hla* foi fortemente induzida. A clindamicina, por sua vez, reprimiu completamente a expressão do gene, enquanto a metilicina aumentou os níveis da toxina Hla em isolados resistentes.

Kohanski e colaboradores (2010) mostraram que o tratamento de infecções causadas por *Escherichia coli* com baixas concentrações de antibióticos pode gerar resistência multidrogas. Norfloxacino, ampicilina e canamicina em concentrações subCIM levaram à produção de espécies reativas de oxigênio, que conduziram a aumentos nas taxas de mutação. Taxa de mutação é uma estimativa da probabilidade de uma mutação ocorrer por divisão celular (Pope et al., 2008). Os autores ainda relacionaram o aumento na taxa de mutação com o aumento da resistência cruzada uma série de outros antibióticos.

Para demonstrar que níveis subletais de antibióticos também levam a aumentos na resistência cruzada em *S. aureus* as taxas de resistência a norfloxacino, ampicilina, canamicina, tetraciclina e cloranfenicol foram analisadas quando a bactéria foi crescida em concentrações subinibitórias de ampicilina. Os autores mostraram que as taxas de resistência foram superiores em relação à bactéria que cresceu em meio sem antibiótico (Kohanski et al., 2007; Kohanski et al., 2010).

Gulberg e colaboradores (2011) avaliaram a relação entre a exposição de *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* a concentrações subinibitórias de antibióticos e o enriquecimento de resistentes. Os resultados mostraram que aminoglicosídeos, fluoroquinonas e tetraciclinas em

níveis subCIM não somente promoveram o enriquecimento de mutantes resistentes em cultura, como também selecionaram resistentes a partir de uma população susceptível .

Henderson-Begg et al.(2006) mostraram que concentrações subinibitórias de antibióticos, particularmente ciprofloxacino em *Streptococcus pneumoniae*, aumentaram a frequência de mutação bacteriana, estimada pela proporção de bactérias mutantes presentes em uma cultura (Popes et al., 2008). Isso foi observado para diferentes bactérias como *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium fortuitum*. Embora não tenha sido comprovado, os autores propuseram que esse aumento na frequência estava relacionado com o mecanismo de resposta SOS, um sistema de reparo ativado em muitas bactérias em resposta a danos extensivos no DNA

É bem documentado que em *E. coli* resposta SOS é induzida por antibióticos que interferem na síntese da parede celular. Maiques e colaboradores (2006) mostraram que β lactâmicos agem como estímulo extracelular para resposta SOS em *S. aureus*, assim como acontece em *E. coli*. Mais tarde, outros autores observaram o aumento na transcrição dos genes SOS quando *S. aureus* foi submetido a concentrações subCIM de fluoroquinonas (Mesak et al., 2008).

Além de fluoroquinonas, outros antibióticos como rifampicina e aminoglicosídeos podem induzir resposta SOS e causar mutações resultando em resistência multidrogas em diferentes bactérias(Peng et al., 2011). Já é bem documentado que no sistema SOS DNA polimerases que realizam a síntese translesão são ativadas e acabam por incorporar nucleotídeos independentemente do pareamento de bases. Esse mecanismo é altamente sujeito a erros e, portanto, capaz de introduzir mutações.

Concentrações subinibitórias de antibióticos também podem levar a rearranjos genômicos que levam a modificações fenotípicas em bactérias (Pedró et al., 2011). Colônias não hemolíticas de *E. coli* foram obtidas quando a bactéria selvagem foi submetida a concentrações subCIM 0,25X de canamicina. A mudança fenotípica observada se deveu ao fato do operon da hemolisina ser flanqueado por IS 91, um elemento de inserção presente em *E. coli* e *Shigella* que flanqueia regiões associadas à patogenicidade. Em subCIM do antibiótico, IS 91 promoveu a recombinação que levou a deleção do operon *hly*. Os autores sugeriram que, a exemplo do que aconteceu com esse operon, algumas mudanças não desejadas podem acontecer, como um rearranjo no genoma que terá como consequência o aumento da virulência do patógeno.

Estudos recentes mostraram que o uso de aminoglicosídeos favorece a emergência de uma subpopulação de *S. aureus* denominada SCV (*small colony variants*) que possui maior capacidade de invadir e permanecer nas células hospedeiras e está, frequentemente, relacionada a infecções humanas recorrentes (Mitchell et al., 2010). O isolamento de bactérias apresentando este fenótipo nem sempre é possível, dado que uma vez fora do ambiente intracelular SCV reverte para a forma selvagem e totalmente virulenta. Tuscherr e colaboradores (2012) mostraram que essa troca de fenótipos faz parte do processo de infecção e permite a bactéria permanecer nos tecido hospedeiro causando infecções crônicas e recorrentes.

S. aureus SCVs foram identificados inicialmente, há mais de 80 anos, em associação com várias doenças humanas, e em uma ocasião, essas pequenas colônias foram conectadas a mastite bovina em rebanhos israelenses por Sompolinsky et al. (1974). O primeiro isolamento de *S. aureus* a partir de leite de vacas com mastite bovina persistente se deu em 2008 e há indícios que essa subpopulação esteja relacionada com a persistência da doença. Porém até o momento não existe indicação que esse fenótipo seja induzido por subCIM.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a ação de extratos vegetais, antibióticos e sua combinação sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de diferentes plantas sobre isolados de *Staphylococcus aureus*;
- 2) Avaliar a ação combinada dos extratos vegetais e de antibióticos sobre o patógeno;
- 3) Avaliar o efeito de concentrações subinibitórias de diferentes antibióticos sobre a frequência de mutação em *S. aureus* e a indução do fenótipo SCV.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Molecular e no Laboratório BIONAT, ambos pertencentes ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa.

4.1. *Micro-organismos e condição de cultivo*

Os isolados *Staphylococcus aureus* 3993 e 4125, gentilmente cedidos pela Embrapa/CNPGL, Juiz de Fora, foram utilizados neste trabalho. As culturas bacterianas foram estriadas em placas contendo ágar infusão-cérebro-coração (BHA; Himedia ®) e mantidas por 16 horas a 37°C. Para preparo dos estoques cada isolado foi inoculado em 5 mL de caldo BHI, e mantido em estufa a 37°C por 16-18 horas. Esse volume foi transferido para microtubos de 1,5 mL e centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 850 µL de BHI com adição posterior de 150 µL de glicerol estéril. Os microtubos foram mantidos a -80 °C. Para determinação da concentração inibitória mínima e da atividade antimicrobiana dos extratos foi utilizado meio de cultura Muller Hinton (Himedia ®).

4.2. *Extratos vegetais e antibióticos*

Os extratos vegetais utilizados neste trabalho são provenientes da extratoteca do Laboratório BIONAT e foram obtidos de plantas oriundas da região de Viçosa-MG. Foram testados extratos etanólicos de folhas de boldinho (*Plectranthus ornatus*), de braço-de-momo (*Solanum cernuum*), de calêndula (*Calendula officinalis*), de capim-limão (*Cymbopogon citrates*), de confrei (*Symphytum officinale*), de ingá (*Inga edulis*), de jacarandá (*Jacaranda cuspidifolia*), de nim indiano (*Azadirachta indica*), de sálvia (*Salvia officinalis*), de sena (*Senna macranthera*) e de urucum (*Bixa orellana*). Extrato hexânico de folhas de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) e demanjerição (*Ocimum basilicum*) e extrato hexânico de óleo de semente de girassol (*Helianthus annuus*) e óleo de semente de macaúba (*Acrocomia aculeata*) também foram avaliados. Estoques de todos os extratos vegetais em dimetilsulfóxido (DMSO; Vetec®) foram preparados na concentração de 50 mg/mL.

Estoques de soluções dos antibióticos ampicilina (Sigma®, A9518), canamicina (Sigma®, K1377), cloranfenicol (Sigma®, C3175), gentamicina (Sigma®, G3632), tetraciclina (Sigma®, T7660), e rifampicina (Sigma®, R3501) foram preparados a uma concentração de 50 mg/mL, esterilizados por filtração, quando necessário, e armazenados a -20°C.

4.3.Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada segundo a técnica de difusão em ágar pelo método *hole plate*. Para isso, 100 µL de uma suspensão contendo 10⁶ UFC/mL foram espalhados com alça de Drigalsky em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton (Himedia®). Furos de aproximadamente 5 mm de diâmetro e 3 mm de altura foram feitos no ágar e 30 µL dos extratos na concentração de 50 mg/mL adicionados a esses. Controles foram realizados com 30 µL de DMSO e 5 mg/ml de ampicilina (Sigma®, A9518). As placas foram mantidas a 37°C por 24h e os halos de inibição medidos em milímetros. Halos de inibição maiores que 7 mm foram considerados como resultados positivos (Nascimento et al., 2000). Os testes foram realizados por duas vezes em triplicata.

4.4.Determinação da concentração inibitória mínima dos extratos vegetais e dos antibióticos

A atividade dos extratos sobre o crescimento bacteriano foi determinada através do método da microdiluição (CLSI, 2003). Os microrganismos foram, inicialmente, cultivados em placas contendo ágar BHI (Himedia®), as quais foram incubadas por 24 horas a 37°C. Posteriormente, colônias isoladas foram repicadas para caldo Müller-Hinton (Himedia®), que foi incubado a 37°C por 180 rpm até que a cultura atingisse a fase exponencial, e posteriormente diluídos até densidade óptica correspondente ao padrão 0,5 da escala de McFarland (OD₆₂₀=0,10). Orifícios de microplacas foram preenchidos com 100 µL de caldo Müller-Hinton (Himedia®), que continham concentrações de extratos variando de 0,1mg/mL a 10 mg/mL e 10⁶ UFC/ml da suspensão bacteriana. Para o controle do crescimento, 100 µL da mesma suspensão bacteriana foram adicionados a 100 µL do caldo Müller-Hinton acrescido de DMSO no volume

correspondente a maior concentração de extrato testada. Após incubação da placa por 24 horas, a 37 °C, 4µL de P-Iodonitrotetrazolium (INT, I8377, Sigma®) foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada a 37°C por 2 horas. Alteração da coloração do meio de amarelo para róseo-violeta foi utilizada como indicação de crescimento bacteriano. A determinação da CIM dos antibióticos sobre os isolados foi realizada utilizando o mesmo procedimento, variando-se concentrações de 0,01 µg/mL a 5,0 mg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos, por no mínimo, duas vezes.

4.5. Avaliação da interação entre extratos vegetais e antibióticos

O método do *checkerboard*, que é comumente utilizado para medida de inibição interativa, foi utilizado para determinação de sinergismo entre os antibióticos e os extratos que apresentaram halos de inibição com diâmetro superior a 7 mm. Soluções-estoque e diluições seriadas de cada droga e extrato até pelo menos o dobro da CIM foram preparadas. Um volume de 100 µL de caldo Müeller-Hinton foi distribuído em cada orifício da placa de microdiluição. O antibiótico foi adicionado ao longo dos poços da primeira coluna em uma concentração correspondente a 8X a CIM, e diluído serialmente no eixo das abscissas da placa. Terminada a distribuição do antibiótico, o extrato foi adicionado na primeira linha da placa em uma concentração de 4X a CIM, e diluído serialmente no eixo das ordenadas. Realizadas as diluições o antibiótico e o extrato estarão distribuídos nos poços em concentrações variando de 2X até 1/8X CIM. Um volume de 100µL de suspensão bacteriana correspondente ao padrão 0,5 da escala de McFarland (OD₆₂₀= 0,10) foi adicionado a cada orifício, e as placas foram incubadas por 48h a 37°C. A avaliação do crescimento bacteriano foi feita utilizando a adição de 4µL de INT nos poços, e incubando a placa a 37°C por 2 horas. Os efeitos das combinações foram avaliados pelo cálculo do índice FIC (concentração inibitória fracionária) para cada combinação usando as fórmulas abaixo. As combinações foram consideradas sinergismo quando o índice FIC ≤ 0,5 (Palaniappan e Holley, 2010).

$$FIC (\text{antibiótico}) = \frac{CIM(\text{antibiótico})emcombinação}{CIM(\text{antibiótico})sozinho}$$

$$FIC (\text{extrato}) = \frac{CIM(\text{extrato})emcombinação}{CIM(\text{extrato})sozinho}$$

$$\text{Índice de FIC} = \sum \text{FIC} = \text{FIC}(\text{antibiótico}) + \text{FIC}(\text{extrato})$$

4.6. Determinação da frequência de mutação

A metodologia sugerida por Hendersen-Beeg (2006) foi utilizada para estabelecimento da frequência de mutação. O micro-organismo foi inicialmente cultivado em placas contendo BHA (Himedia®), as quais foram incubadas por 24 horas a 37°C. Posteriormente, colônias isoladas foram repicadas em tubos contendo caldo Müeller-Hinton mantidos a 37°C por 180 rpm. Essas bactérias foram então adicionadas a tubos de ensaio contendo caldo Müeller-Hinton (Himedia®) e tiveram a D.O.₆₀₀ ajustada para 0,1. Os tubos foram mantidos a 37°C, 180 rpm até D.O.= 0,4, quando 30 µL dessa cultura foram adicionados a tubos contendo 3 mL de caldo Mueller-Hinton sem antibiótico e com o antibiótico nas concentrações correspondentes a 0,75X, 0,5X, 0,25X da CIM. Após crescimento a 37°C até que a máxima O.D₆₀₀ fosse alcançada, alíquotas de 100 µL foram plaqueadas em BHA acrescido de rifampicina 4 mg/L para contagem do número de mutantes resistentes. Para determinar o número de colônias total na cultura foram realizadas a diluições seriadas e alíquotas de 100µL foram plaqueadas seguido de contagem e determinação do número de UFC/mL. Os testes foram realizados por quinze vezes em triplicata. Os dados das frequências de mutação foram analisados estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney.

4.7. Efeito de concentrações subinibitórias de antibióticos sobre a indução do fenótipo SCV

Para quantificar as colônias SCV, foi utilizada a metodologia sugerida por Mitchel et al.(2010) e Musher et al. (1977). Culturas crescidas por 18-20h foram usadas para inocular tubos de ensaio contendo 5 mL do meio caldo triptona de soja (TSB, Himedia®) , em uma concentração final de 10⁷ UFC/mL, suplementado ou não com os antibióticos a 1,5X, 1X, 0,5X da CIM. As culturas foram incubadas por 24h a 37°C com agitação de 225 rpm. As avaliação da indução do fenótipo SCV foi realizada por plaqueamento de alíquotas de 100µL das culturas em ágar triptona de soja (TSA) contendo 5µg/mL de gentamicina (Sigma®, G3632) e incubadas a

37°C por 72h. A frequência de indução de SCV foi determinada como o número de SCVs pela UFC total na placa. A confirmação das colônias SCV foi feita segundo Atalla et al. (2008) realizando-se teste de Gram, teste de catalase, fermentação do ágar sal manitol (Himedia®) e não hemólise em ágar sangue de carneiro 5%.

RESULTADOS

5.1. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e sinergismo

Neste trabalho foi avaliado o potencial antimicrobiano de extratos de plantas provenientes da Zona da Mata de Minas Gerais. A atividade desses extratos foi testada contra as cepas de *S. aureus* 3993 e 4125 isoladas de vacas acometidas com mastite.

Aplicando-se uma dose de 150mg de extrato, diluído em DMSO, obteve-se que cinco dos quinze extratos vegetais testados possuem atividade antimicrobiana, ou seja, halos de inibição superiores a 7mm sobre *S. aureus* de origem bovina (Tab. 3). Os extratos ativos sobre o isolado 4125 e seus halos de inibição são mostrados na figura 2, além disso, é apresentado um exemplo de extrato sem atividade.

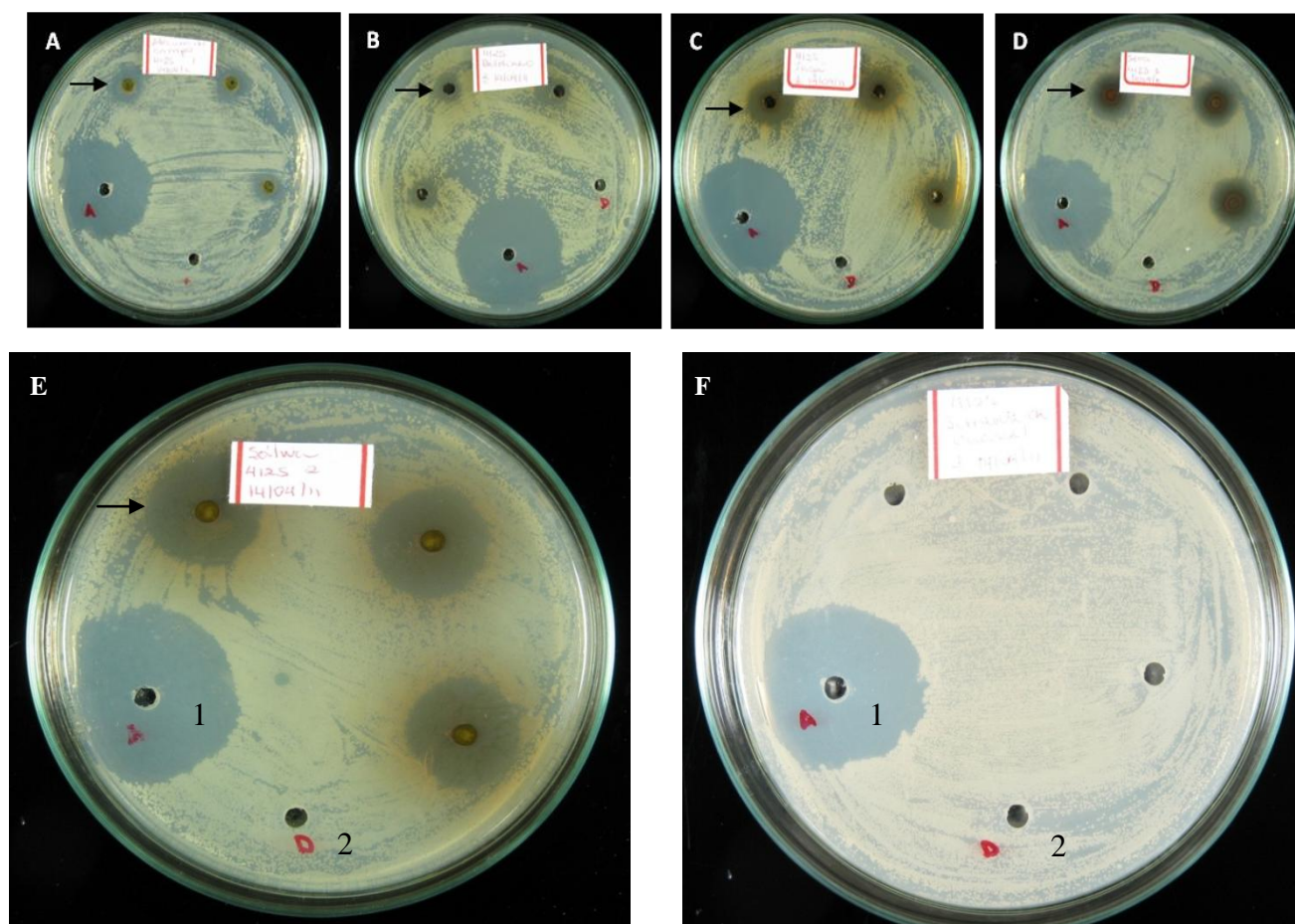


Figura 2. Halos de inibição extratos vegetais sobre *Staphylococcus aureus* 4125. Os halos de inibição dos extratos de alecrim do campo (A); de boldinho (B); de ingá (C); de sena (D) e de sálvia (E) estão

indicados pelas setas. Para o controle positivo de inibição do crescimento foi utilizado antibiótico ampicilina, identificado na figura pelo número 1 (E; F), enquanto o controle negativo de inibição foi feito com DMSO, número 2 (E; F). Além disso, para ilustrar ausência de atividade sobre os micro-organismos testados, é mostrado o resultado do teste com extrato de semente de girassol (F).

Tabela 3. Halos médios de inibição para os extratos ativos sobre *Staphylococcus aureus*.

Extrato	Halo médio (mm)			
	<i>S. aureus</i> 4125		<i>S. aureus</i> 3993	
	Repetição1	Repetição2	Repetição1	Repetição2
Alecrim do campo (<i>Baccharis dracunculifolia</i>)	9,66	10,66	10	9,66
Boldinho (<i>Plectranthus ornatus</i>)	13,66	11,33	9,66	8,66
Ingá (<i>Inga edulis</i>)	14,66	13,33	17,66	15,66
Sálvia (<i>Salvia officinalis</i>)	23,66	20	20,66	20
Sena (<i>Senna macranthera</i>)	15,66	15,33	12,33	13

A concentração inibitória mínima dos extratos ativos foi determinada para os dois isolados de *S. aureus* (Tab. 4). A CIM para o extrato de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) não pode ser determinada devido à limitação na quantidade de material.

Alguns extratos vegetais quando adicionados a meios de cultura promoveram uma turvação imediata do meio, interferindo na visualização do crescimento bacteriano. A fim de facilitar a visualização do resultado, aos poços foi adicionado o INT (iodonitrotetrazolium) que na presença de células viáveis sofre redução à formazan, composto que apresenta coloração rósea, permitindo avaliar em onde houve ou não inibição do crescimento bacteriano (Fig. 3).

Tabela 4. Valores de concentrações inibitórias mínimas (mg.mL^{-1}) obtidos para os extratos vegetais ativos.

Extrato	Concentração inibitória mínima (CIM)	
	<i>S. aureus</i> 3993	<i>S. aureus</i> 4125
Boldinho (<i>Plectranthus ornatus</i>)	2 mg.mL^{-1}	2 mg.mL^{-1}
Ingá (<i>Inga edulis</i>)	7 mg.mL^{-1}	7 mg.mL^{-1}
Sálvia (<i>Salvia officinalis</i>)	0,3 mg.mL^{-1}	0,3 mg.mL^{-1}
Sena (<i>Senna macranthera</i>)	0,2 mg.mL^{-1}	0,3 mg.mL^{-1}

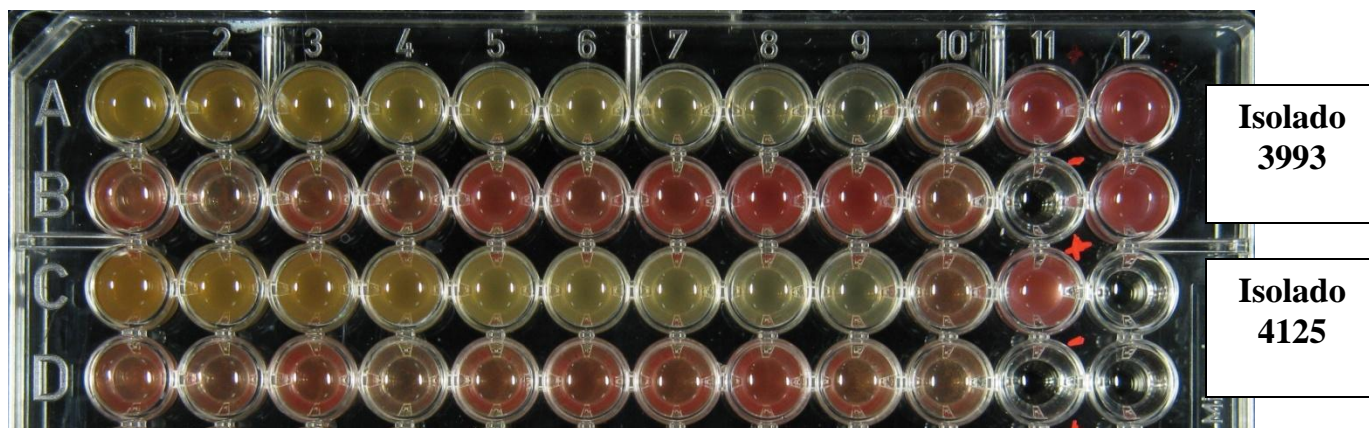


Figura 3. Determinação da concentração inibitória mínima. Extrato etanólico de boldinho, determinação da CIM pelo método da microdiluição em placas de 96 poços. Nos poços com coloração rósea, o extrato não inibiu o crescimento bacteriano havendo a redução do INT.

Dentre os extratos vegetais testados, os de sálvia e de sena com valores de CIM 0,2 mg/mL e 0,3 mg/mL mostram forte inibição sobre *S. aureus*, enquanto boldinho (2 mg/mL) e ingá (7 mg/mL) são extratos com fraca inibição.

Além do potencial antimicrobiano dos extratos vegetais, foi investigado neste trabalho o efeito combinado dos extratos ativos com antibióticos tradicionalmente utilizados no tratamento da mastite bovina.

Para permitir esta avaliação, primeiramente, foi determinada a concentração inibitória mínima de cinco antibióticos - ampicilina, canamicina, cloranfenicol, gentamicina e tetraciclina - sobre os isolados de *S. aureus* 3993 e 4125 (Tab. 5).

Tabela 5. Valores de concentrações inibitórias mínimas obtidas para os antibióticos testados.

Antibiótico	Concentração inibitória mínima (CIM)	
	<i>S. aureus</i> 3993	<i>S. aureus</i> 4125
Ampicilina	0,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Canamicina	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Cloranfenicol	8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Gentamicina	0,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Tetraciclina	0,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Com base nos dados publicados pelo CLSI (2005) foi avaliado o padrão de susceptibilidade dos isolados frente aos antibióticos testados. São considerados susceptíveis isolados de *S. aureus* que mostrem valores de CIM: em ampicilina $\leq 0,25\mu\text{g/mL}$; em canamicina $\leq 16\mu\text{g/mL}$; cloranfenicol $\leq 8\mu\text{g/mL}$; gentamicina $\leq 4\mu\text{g/mL}$ e tetraciclina $\leq 4\mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2005). O isolado 3993 mostrou-se sensível a todos esses antibióticos. Já o isolado 4125 apresentou uma CIM para ampicilina de $7\mu\text{g/mL}$ característica de isolado resistente.

O método do *checkerboard* foi utilizado para determinação das interações entre os antibióticos e os extratos ativos. As concentrações de extratos e antibióticos foram variadas e combinadas de 2X CIM até 1/8X CIM. Para avaliação do crescimento do micro-organismo mais uma vez foi utilizada a incubação com o INT (Fig. 4). Com base nas menores concentrações combinadas em que houve inibição do crescimento bacteriano foi calculado o índice de concentrações fracionárias inibitórias (FIC) e determinado o tipo de interação (Tab. 6).

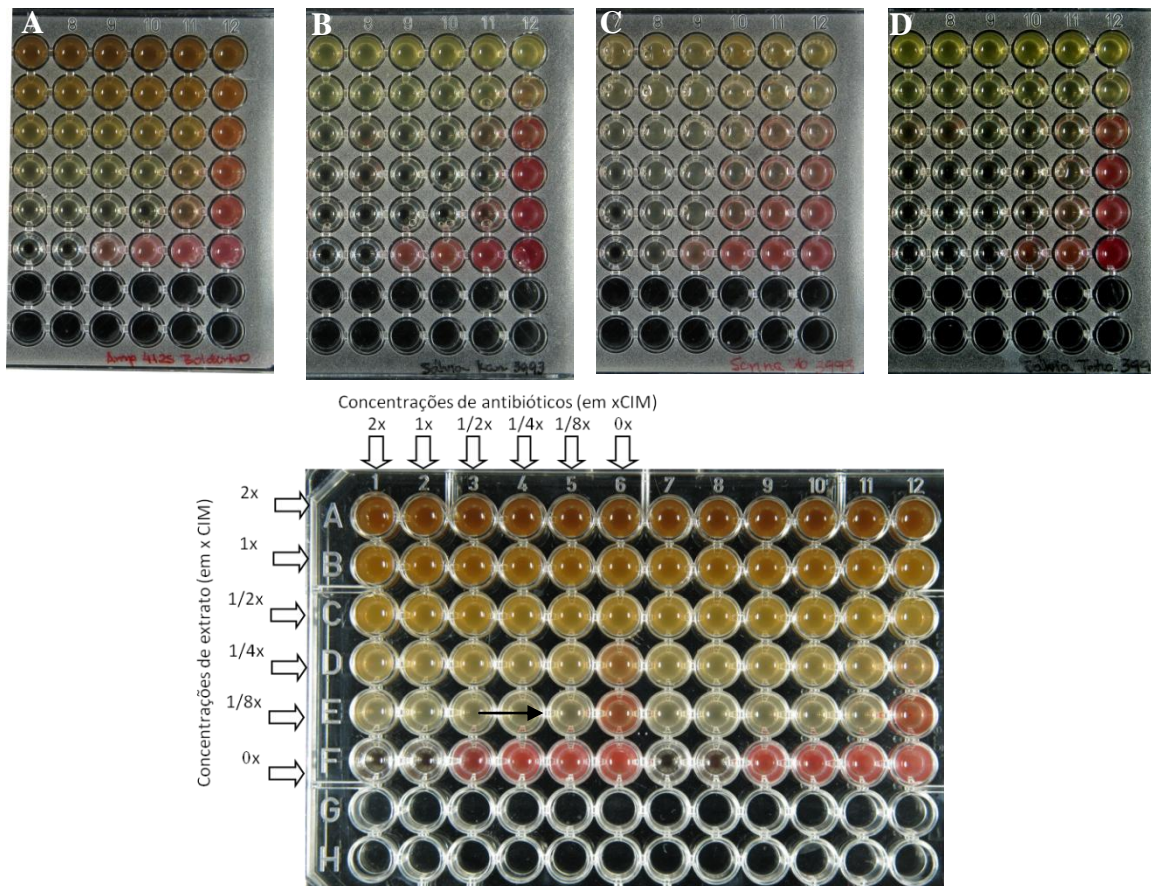


Figura 4. Avaliação da interação entre extratos vegetais e antibióticos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* 3993 e 4125. Interação entre ampicilina e boldinho sobre isolado 4125 (A);

interação entre canamicina e sálvia sobre o isolado 3993 (B); interação entre cloranfenicol e sena sobre o isolado 3993 (C); interação entre tetraciclina e sálvia sobre o isolado 3993 (D); interação entre gentamicina e boldinho sobre o isolado 4125 (E). Em todas as placas extratos foram diluídos serialmente ao longo das linhas, e os antibióticos ao longo das colunas assim como mostrado na figura (E) indicada pela seta preta tem-se a combinação de extrato e antibiótico em menor concentração que inibiu o crescimento, utilizada para cálculo de FIC.

Tabela 6. Interação entre extratos vegetais e antibióticos sobre *Staphylococcus aureus* 3993 e 4125.

Extrato	Antibiótico	<i>S. aureus</i> 3993				<i>S. aureus</i> 4125			
		FIC ant	FIC ext	Σ FIC	Interação	FIC ant	FIC ext	Σ FIC	Interação
Boldinho	Ampicilina	1/8CIM	1/8CIM	0,25	Sinergismo	1/8CIM	1/4CIM	0,375	Sinergismo
	Canamicina	1/8CIM	1/8CIM	0,25	Sinergismo	1/8CIM	1/8CIM	0,25	Sinergismo
	Cloranfenicol	1CIM	1/8CIM	0,75	Aditiva	1CIM	1/8CIM	0,75	Aditiva
	Gentamicina	1/8CIM	1/4CIM	0,375	Sinergismo	1/8CIM	1/8CIM	0,25	Sinergismo
	Tetraciclina	1/2CIM	1/4CIM	0,75	Aditiva	1CIM	1/8CIM	0,875	Aditiva
Sálvia	Ampicilina	1/8CIM	1/8CIM	0,25	Sinergismo	1/2CIM	1/8CIM	0,625	Aditiva
	Canamicina	1/8CIM	1/4CIM	0,375	Sinergismo	1/8CIM	1/4CIM	0,375	Sinergismo
	Cloranfenicol	1/2CIM	1CIM	1,5	Indiferente	1/2CIM	1CIM	1,5	Indiferente
	Gentamicina	1/8CIM	1/8CIM	0,25	Sinergismo	1/4CIM	1/8CIM	0,375	Sinergismo
	Tetraciclina	1/4CIM	1/8CIM	0,375	Sinergismo	1/4CIM	1/8CIM	0,375	Sinergismo
Sena	Ampicilina	1/2CIM	1/8CIM	0,5	Sinergismo	1/4CIM	1/8CIM	0,375	Sinergismo
	Canamicina	1/8CIM	1/4CIM	0,375	Sinergismo	1/8CIM	1/4CIM	0,375	Sinergismo
	Cloranfenicol	1/2CIM	1/8CIM	0,625	Aditiva	1/2CIM	1/4CIM	0,75	Aditiva
	Gentamicina	1/4CIM	1/8CIM	0,325	Sinergismo	1/4CIM	1/8CIM	0,325	Sinergismo
	Tetraciclina	1/4CIM	1/8CIM	0,325	Sinergismo	1/4CIM	1/8CIM	0,325	Sinergismo

Para o método utilizado, as interações são interpretadas com base no Σ FIC, quando este valor é $\leq 0,5$, considera-se a interação como sinergismo; para $0,5 < \Sigma$ FIC ≤ 1 a interação é aditiva; para $1 < \Sigma$ FIC ≤ 4 a interação indiferente; e valores maiores que 4 são de antagonismo (Palaniappan e Holey, 2010). Em quase todas as combinações de extrato e antibiótico testadas houve interações sinérgicas ou aditivas. Somente a interação entre sálvia e cloranfenicol foi indiferente. Além disso, não foram observadas interações antagônicas.

O extrato de boldinho foi sinérgico com a ampicilina (β lactâmico), a canamicina e a gentamicina (aminoglicosídeos) e foi possível observar reduções da CIM em 8 vezes para todos os antibióticos. O extrato de sálvia também foi sinérgico com ampicilina, canamicina, gentamicina e tetraciclina, porém, apresentou uma interação indiferente como cloranfenicol. Para este extrato também houve diminuição da CIM em até 8 vezes. O mesmo foi observado para o extrato de sena, no entanto, a interação do cloranfenicol com este extrato foi aditiva.

5.2. Efeito de antibióticos sobre a frequência de mutação e indução do fenótipo SCV.

Para determinação das frequências de mutação, inicialmente a CIM dos antibióticos ampicilina, gentamicina e tetraciclina foi determinada para os isolados 3993 e 4125 (Tab. 7). Em seguida, foram inoculados em meio BHI contendo concentrações correspondentes a 0,25X, 0,5X e 0,75X a CIM dos antibióticos e mantidos a 37°C e 180rpm.

Tabela 7. Concentração inibitória mínima para isolados de *Staphylococcus aureus*.

Antibióticos	Isolado 3993	Isolado 4125
Ampicilina	0,3 mg.mL ⁻¹	4,0 mg.mL ⁻¹
Gentamicina	0,8 mg.mL ⁻¹	0,8 mg.mL ⁻¹
Tetraciclina	0,6 mg.mL ⁻¹	0,4 mg.mL ⁻¹

As frequências de mutação observadas estão mostradas nas figuras 5 e 6, e as medianas das frequências de mutação, na tabela 9. Para facilitar a visualização foi construído um gráfico com o número de vezes o aumento da frequência de mutação em relação ao controle sem antibiótico (Fig. 7). De modo geral, pode-se dizer que os antibióticos exerceram maior influência sobre as frequências de mutação em 4125 do que em 3993. O tratamento que mostrou maior efeito nas frequências para o isolado 4125 foi gentamicina 0,5X CIM com aumento de 107 vezes, enquanto que para o isolado 3993, 0,75X CIM de tetraciclina levou ao aumento mais pronunciado (24 vezes) (Fig. 7).

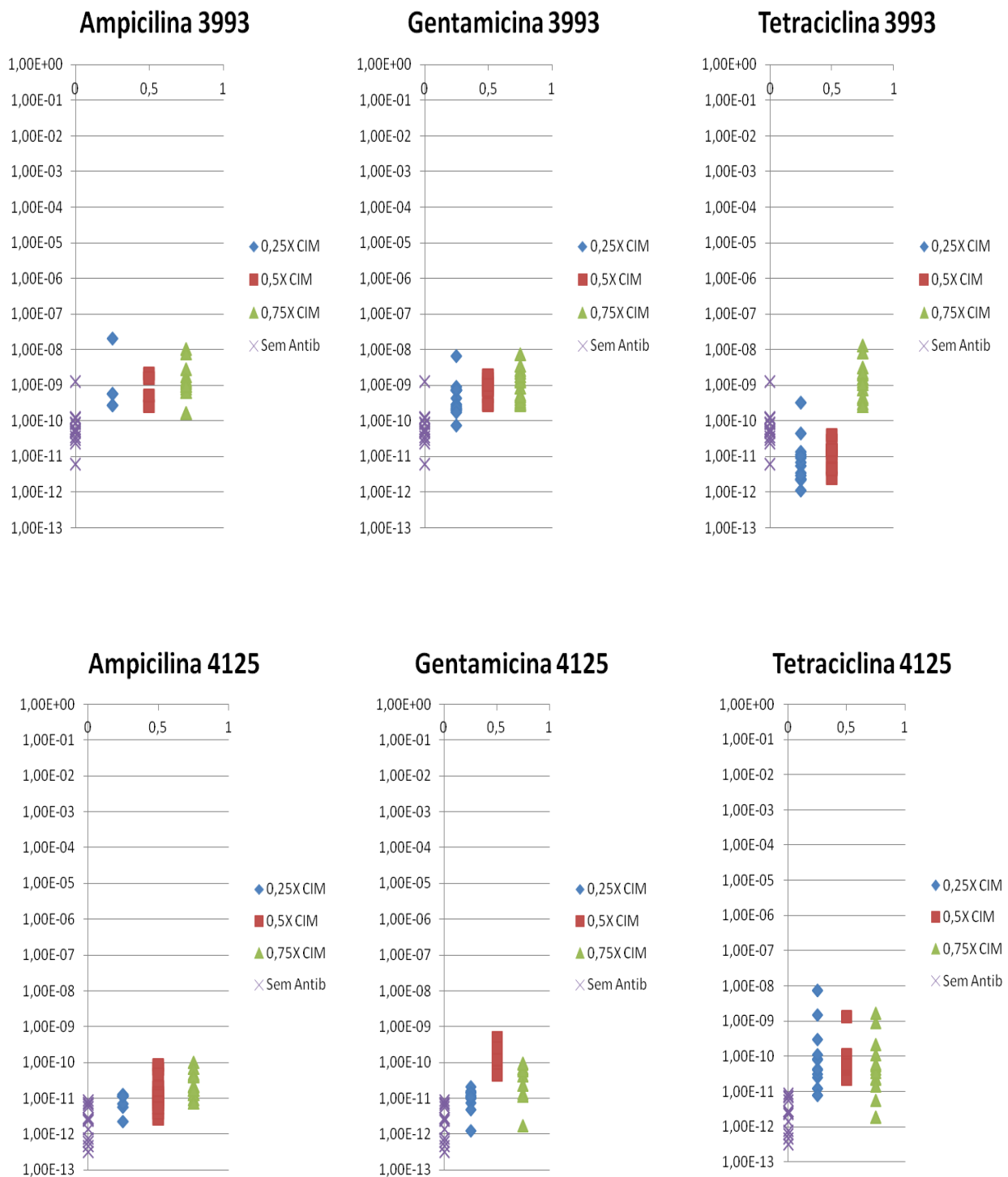


Figura 5. Frequência de mutação induzida por antibióticos. Frequência de mutação para rifampicina resistentes observada após crescimento dos isolados 3993 e 4125 de *Staphylococcus aureus* sem antibiótico ou com adição concentrações subinibitórias de ampicilina, gentamicina e tetraciclina.

Ao crescer o isolado *S aureus* 3993 em ampicilina 0,25X CIM e 0,5X CIM as culturas não produziram colônias resistentes a rifampicina, para a maior parte das repetições. Isso levou ao que alguns autores chamam de impacto do resultado zero (Hendersen-Beeget al., 2006). Apesar de ser considerado um dos fatores que podem distorcer a interpretação dos resultados, assim como na literatura, esses valores foram mantidos durante a análise.

Quando as frequências obtidas para os dois isolados foram reunidas (Fig. 6; Tab. 8), que quando *S. aureus* foi submetido a condições de 0,5X gentamicina e 0,75X gentamicina e tetraciclina observou-se um aumento significativo na frequência de mutação mediana de rifampicina resistentes.

Dados Reunidos

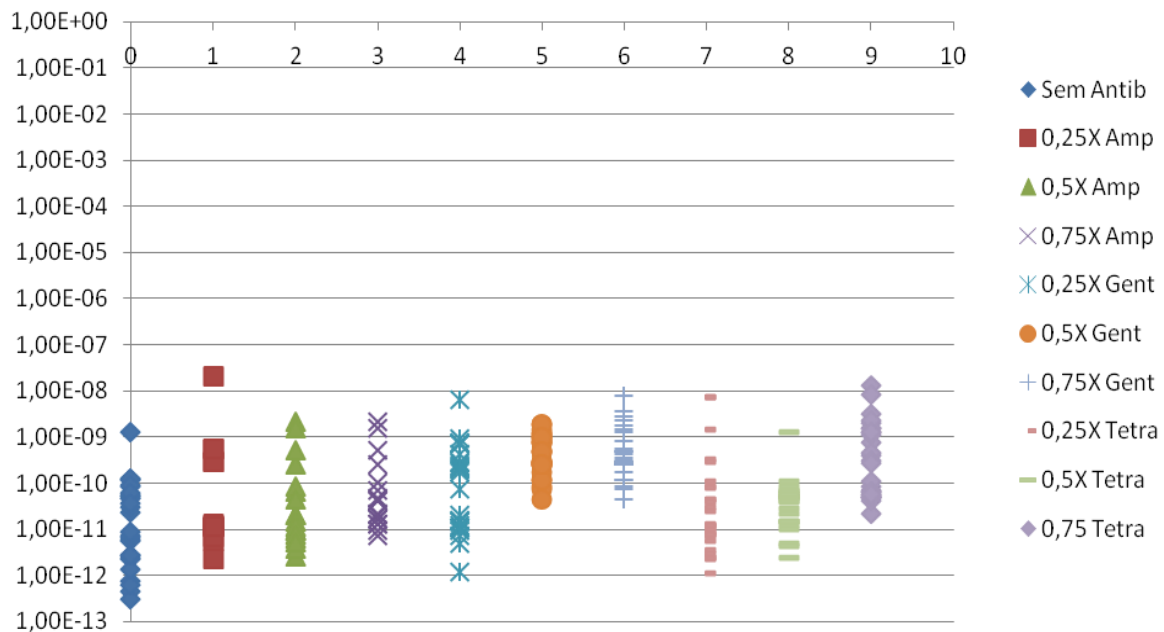


Figura6. Frequências de mutação reunidas. Frequência de mutação para rifampicina resistentes observada após crescimento de *Staphylococcus aureus* sem antibiótico ou com adição de ampicilina, gentamicina e tetraciclina em concentrações subinibitórias.

Tabela 8. Medianas das frequências de mutação. Valores observados após crescimento dos isolados de *Staphylococcus aureus* sem antibiótico ou com adição de antibióticos em concentrações subinibitórias (Tab. 7). Valores significativos pelo teste de Mann-Whitney 0,05 estão assinalados com *

Condição de crescimento da cultura	Mediana da freqüência de mutação		
	Isolado 3993	Isolado 4125	Dados reunidos
BHI	$5,45 \times 10^{-11}$	$2,34 \times 10^{-12}$	$8,02 \times 10^{-12}$
BHI + Ampicilina 0,25X CIM	0,00	$2,32 \times 10^{-12}$	0,00
BHI + Ampicilina 0,50X CIM	0,00	$9,26 \times 10^{-12} *$	$5,95 \times 10^{-12}$
BHI + Ampicilina 0,75X CIM	$9,85 \times 10^{-10} *$	$1,68 \times 10^{-11} *$	$1,30 \times 10^{-11}$
BHI+ Gentamicina 0,25X CIM	$2,99 \times 10^{-10} *$	$1,09 \times 10^{-11} *$	$4,83 \times 10^{-11} *$
BHI+ Gentamicina 0,50X CIM	$9,76 \times 10^{-10} *$	$2,50 \times 10^{-10} *$	$3,90 \times 10^{-10} *$
BHI+ Gentamicina 0,75X CIM	$8,51 \times 10^{-10} *$	$4,23 \times 10^{-11} *$	$3,03 \times 10^{-10} *$
BHI+ Tetraciclina 0,25X CIM	$5,67 \times 10^{-12}$	$4,42 \times 10^{-11} *$	$1,20 \times 10^{-11}$
BHI+ Tetraciclina 0,50X CIM	$5,05 \times 10^{-12}$	$5,73 \times 10^{-11} *$	$3,46 \times 10^{-11}$
BHI+ Tetraciclina 0,75X CIM	$1,32 \times 10^{-09} *$	$3,48 \times 10^{-11} *$	$1,91 \times 10^{-10} *$

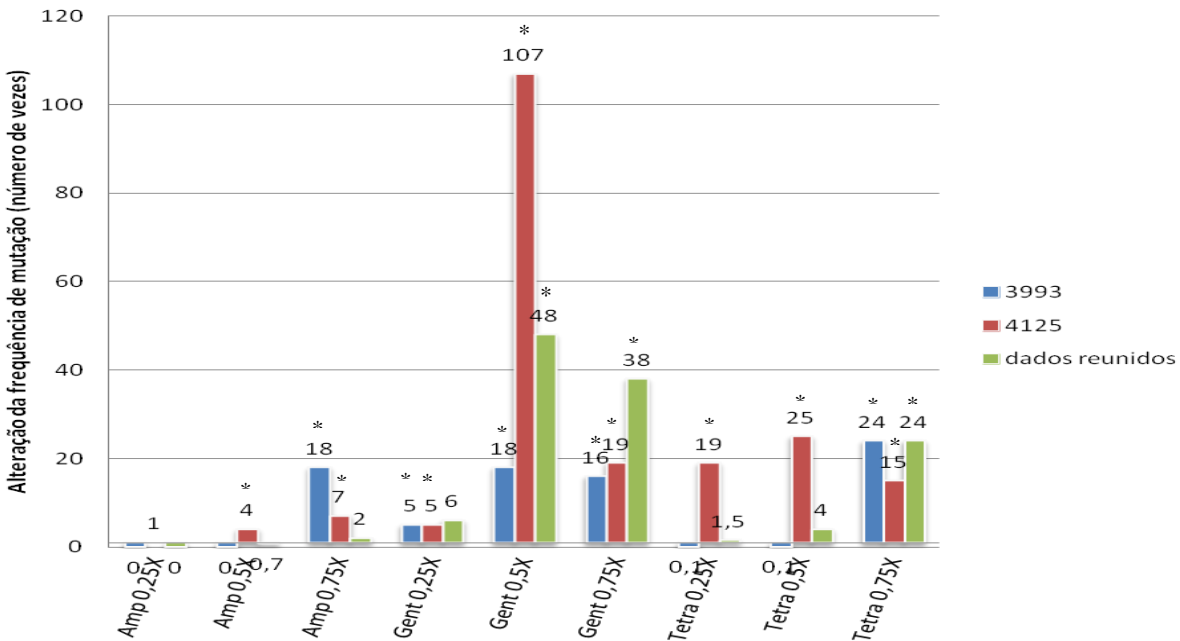


Figura 7. Alteração da frequência de mutação, em número de vezes, com relação às culturas crescidas em meio sem antibiótico. (*) Valores significativos pelo teste de Mann-Whitney 0,05.

Além de testar o efeito de antibióticos sobre a frequência de mutação, foi avaliado se ampicilina, gentamicina e tetraciclina em diferentes concentrações seriam capazes de influenciar a emergência de uma subpopulação de *S. aureus* com fenótipo SCV. Os resultados obtidos permitiram constatar somente a presença ou ausência da seleção, não sendo possível afirmar em que magnitude isso acontece.

Foi observado que ampicilina, gentamicina e tetraciclina em diferentes concentrações induziram o fenótipo SCV sobre isolados 3993 e 4125 (Fig. 8). Colônias com fenótipo SCV foram observadas quando os isolados 3993 e 4125 foram tratados com concentrações de 0,5X, 1X e 1,5X de gentamicina. Após o tratamento com ampicilina foi observado o fenótipo SCV no isolado 4125, e tetraciclina induziu colônias no isolado 3993. *S. aureus* SCV possuem colônias com fenótipo particular, sendo cerca de 10 vezes menores que colônias selvagens e não possuem a capacidade de formar halo de hemólise em placas de ágar sangue de carneiro (Fig. 9). Além disso, para confirmação que se tratava de *S. aureus* foram realizados teste de catalase e Gram em todas as colônias.

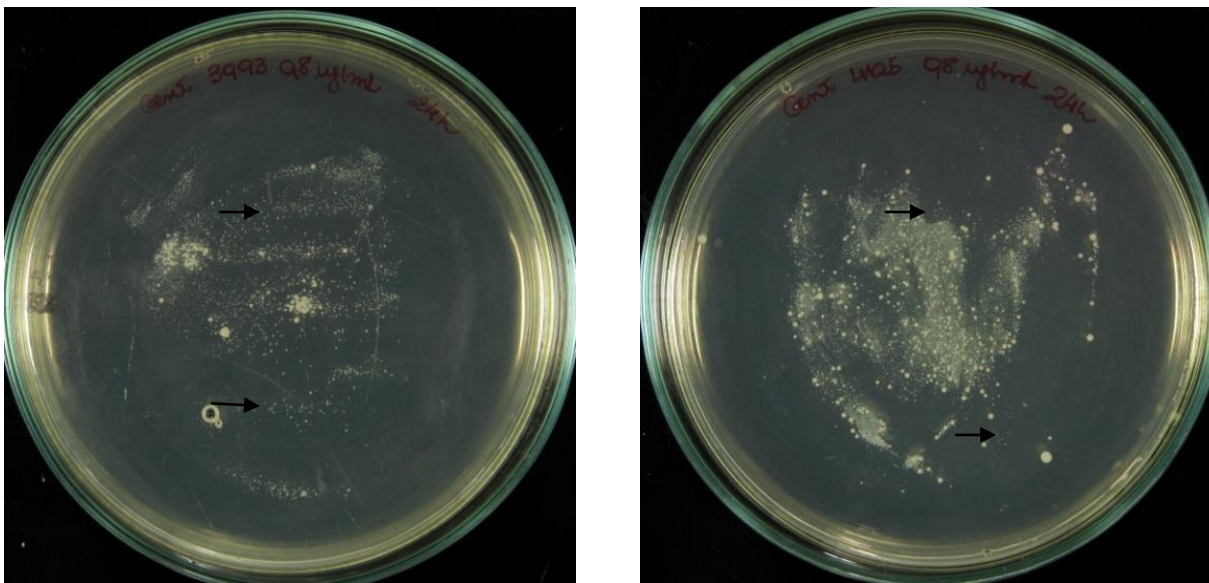


Figura 8. Colônias SCV induzidas por gentamicina. Isolados crescidos na presença de gentamicina por 24h 3993 (A); 4125 (B). Indicadas pelas setas podem ser observadas algumas colônias isoladas que apresentam fenótipo típico de SCV cerca de 10 vezes menores que uma colônia selvagem.

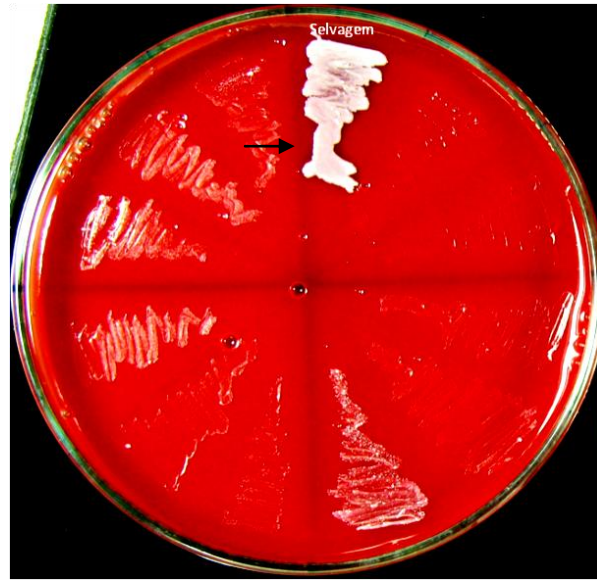


Figura 9. Colônias suspeitas em ágar sangue. As colônias com fenótipo característico de SCV foram repicadas em ágar sangue para avaliar formação de halo de hemólise. Pode-se observar que somente a colônia selvagem, utilizada como controle, mostrou um halo mais claro em torno das colônias. As demais colônias, suspeitas de serem SCV, não foram hemolíticas.

6. DISCUSSÃO

6.1. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e sinergismo

Neste estudo foi avaliado o potencial antimicrobiano de quinze espécies vegetais sobre *S. aureus* isolados de vacas acometidas com mastite bovina. Embora a maioria das espécies testadas possua alguma atividade antimicrobiana descrita na literatura (Vargas et al., 2010; Parente et al., 2009; Sharma et al., 2009) , nas concentrações testadas e sobre *S. aureus*, somente cinco dos quinze extratos foram ativos sendo eles alecrim do campo, boldinho, ingá, sálvia e sena.

As atividades antimicrobianas dos extratos de boldinho e ingá ainda não haviam sido descritas na literatura. Brasileiro e colaboradores (2006) avaliaram o efeito do extrato de boldinho sobre isolados de *S. aureus* e *E. coli* que sob as condições testadas não foi ativo. Existem vários métodos diferentes para avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais, além disso, fatores como local de obtenção do material vegetal, época da coleta, e ainda o solvente utilizado para preparo dos extratos pode interferir na composição deste (Hayda et al., 2007). Isso pode explicar a divergência nos resultados de atividade sobre a mesma espécie de micro-organismo obtidos pelo presente trabalho e por Brasileiro et al. (2006).

Não foram encontrados na literatura quaisquer relatos sobre a investigação do potencial antimicrobiano de ingá, uma leguminosa arbórea da subfamília *Mimosoideae* (Falcão e Clemente, 2000). Porém, a atividade antimicrobiana de plantas dessa subfamília sobre *S. aureus* como, por exemplo, o angico (*Anadenanthera macrocarpa* Benth), jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) e acácia mimosa (*Acacia podalyriifolia*) já foi amplamente descrita (Andrade et al., 2010; Padilha et al., 2010; Palmeira et al., 2010).

Há vários relatos na literatura sobre a atividade antimicrobiana de alecrim do campo. Alguns autores chamam atenção para o uso do óleo essencial dessa planta no setor farmacêutico devido a essa atividade (Canton e Onofre, 2010; Burt 2004). Acredita-se que a ação desses óleos se dá por meio da degradação da parede bacteriana ou alterações na membrana plasmática, nas proteínas de membrana e no fluxo de elétrons do micro-organismo (Juven et al., 1994; Ultee et al., 2002). Devido a limitações na quantidade de material vegetal e de extrato preparado, análises

posteriores como determinação da concentração inibitória mínima para esse extrato não foi realizada.

O extrato de sálvia foi o que apresentou maiores halos de inibição sobre os isolados de *S. aureus* testados. Estudos realizados em 1998, por Bara e Vanetti, já mostravam o potencial antimicrobiano de extratos vegetais de sálvia sobre bactérias Gram positivas. Haida e colaboradores (2007) também mostraram a atividade antimicrobiana para de extrato etanólico de sálvia sobre isolados de *Pseudomonas aeruginosa*. Segundo Abu-Shanab et al. (2004), os extratos aquosos e etanólicos de *S. officinalis* possuem atividade inibitória sobre *E. coli*, evidenciando um potencial antimicrobiano também sobre bactérias Gram negativas.

Outro extrato que foi ativo neste estudo foi o extrato de sena, a atividade já havia sido identificada por Diaz et al. (2010). Porém, não foram encontrados outros relatos na literatura da avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de folhas de sena.

Não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibições superiores (Duarte, 2006). Uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de MIC foi proposta por Aligianis e colaboradores (2001) são consideradas: forte inibição extratos com a CIM até 0,5 mg/mL; inibição moderada CIM entre 0,6 e 1,5 mg/mL e fraca inibição CIM acima de 1,6 mg/mL.

As plantas são conhecidas por produzirem grande variedade de moléculas com potencial antimicrobiano em seu metabolismo secundário. É interessante observar que a maioria dessas moléculas possui uma fraca atividade antibiótica, quando comparadas aos antibióticos produzidos por bactérias ou fungos. Apesar de os antibacterianos derivados de plantas serem menos potentes, os vegetais combatem infecções com sucesso, para isso adotam uma estratégia diferente de luta, o sinergismo (Hemaiswarya et al., 2008).

Avaliação de interações entre compostos que apresentam atividade antimicrobiana vem sendo utilizada nos últimos anos como alternativa na busca por novos medicamentos. Estudos mostram que o uso de extratos de plantas em combinação com antibióticos tem promovido uma significativa redução das concentrações inibitórias mínimas sobre isolados resistentes de uma série de bactérias Gram negativas e Gram positivas (Souza et al., 2010; Vinod et al., 2010; Lee et al., 2008; Al-hebshi et al., 2006; Betoni et al., 2006; Darwish et al., 2002).

A maioria das combinações de extrato e antibiótico testadas mostrou interações sinérgicas ou aditivas. Extratos de boldinho, sálvia e sena tiveram interações favoráveis (redução da CIM) com β lactâmicos, aminoglicosídeos, fenicol e tetraciclina. Não havendo especificidade para um grupo de antibióticos, esses resultados sugerem, assim como o obtido por Aiyegoro et al, (2010) que o extrato bruto dessas plantas podem conter uma mistura de compostos que potencializam a atividade dos diferentes antibióticos.

Os principais componentes dos extratos testados foram investigados na literatura, em uma tentativa de relacionar a composição química à redução da CIM observada nos experimentos. Para o boldinho, foi encontrado que os principais constituintes do seu óleo essencial são cariofileno, eugenol e timol (Albuquerque et al., 2007). Um estudo químico realizado com extratos de folhas de sálvia mostrou que esses mesmos compostos eram encontrados, apesar de em concentrações inferiores a ácidos rosmarínico, caféico, carnosol, flavonóides, entre outros, predominantes na constituição do extrato (Velickovic et al., 2003; Nascimento et al., 2000).

Sinergismo entre cariofileno e eugenol com antibióticos ampicilina e gentamicina foi avaliado por Moon et al. (2011) sobre isolados de *Streptococcus*. A combinação de eugenol com ampicilina e gentamicina reduziu os valores de MIC de 4 a 8 vezes, o que leva a um valor de índice FIC menor que 0,5 sendo, portanto, a interação sinérgica. O cariofileno não mostrou sinergismo nas condições testadas.

Senna macranthera mostrou como composição principal, no estudo realizado por Nogueira (2009), emodina e uma grande quantidade de compostos fenólicos em especial flavonóides. Há relatos na literatura de sinergismo entre emodina, isolada de *Rheum palmatum* L. com β lactâmicos sobre *S aureus* metilicina resistentes. O índice FIC para ampicilina e emodina variou entre 0,37 e 0,5 para os isolados testados segundo Lee et al. (2010). Os mesmo valores de FIC foram encontrados no presente trabalho sobre *S. aureus* 3993 e 4125, quando combinados ampicilina e extrato de sena. Podemos inferir com base nessas informações que o composto emodina de *Senna macranthera* pode ser o responsável pela diminuição nas CIM combinadas dos extratos de sena com β lactâmicos. Além disso, o efeito antimicrobiano e o potencial de modificar resistência de polifenóis e flavonóides tem sido descrito por outros autores como Cushnie e Lamb (2005) e Sato et al., (2004).

O uso dessas combinações promove uma redução da dose mínima necessária para a eficácia dos antimicrobianos, isso é interessante, pois pode reduzir a chance de efeitos colaterais,

bem como reduzir o custo dos tratamentos. No entanto, para a utilização terapêutica dessas combinações é necessário que sejam realizados trabalhos que explorem o modo de ação dos extratos vegetais e que permitam a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nas interações.

5.2. Efeito de antibióticos sobre a frequência de mutação e indução do fenótipo SCV.

Para uma droga ser eficaz, ela deve atingir o sítio de infecção em concentrações satisfatórias. No caso específico da mastite bovina, onde a forma mais usual para o tratamento é a antibioticoterapia, existem duas vias de administração, a saber, intramamária e parenteral. Porém, frequentemente as concentrações *in vivo* caem abaixo dos níveis inibitórios e atingem alguns tecidos em concentrações insuficientes (Gruet et al., 2001). Avaliando o potencial de distribuição dos antibióticos usados nesse trabalho, pode-se dizer que a ampicilina tem distribuição limitada pela via parenteral, a tetraciclina possui distribuição limitada pelas duas vias e gentamicina possui má distribuição se ambas forem consideradas (Gruet et al., 2001). Dessa forma, as chances de um patógeno ser exposto a subCIM são grandes.

Esse estudo mostrou que 0,75X CIM de ampicilina e tetraciclina promoveram aumento na frequência de mutação dos isolados 3993 e 4125 de *S. aureus*. O mecanismo pelo qual isso ocorreu não pode ser comprovado, mas explicações já foram encontradas por outros autores.

As elevações nas frequências de mutação causadas por ampicilina podem ter como uma possível explicação um mecanismo descrito por Maiques et al. (2006). Segundo esses autores, o tratamento de *S. aureus* com concentrações subinibitórias de ampicilina, bem como outros β lactâmicos, promove a ativação da via de resposta SOS. Nesse tipo de resposta, é utilizada para a replicação do material genético a DNA polimerase V, considerada *error-prone*, o que aumenta o risco de mutações. O mesmo já havia sido proposto por Henderson-Begg et al. (2006).

Outro mecanismo que pode ser utilizado para tentar explicar os resultados obtidos é o aumento de espécies reativas de oxigênio que pode ser provocado por β lactâmicos e aminoglicosídeos (Kohanski et al., 2007). Kohanski et al. (2010) comprovaram que o tratamento com concentração subinibitória de antibióticos aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio que estão relacionadas com a elevação dos índices de mutação para o micro-organismo utilizado no estudo.

Dos antibióticos testados, somente a gentamicina mostrou aumento nas frequências de mutação em todas as concentrações e para os dois isolados testados. A gentamicina é um antibiótico bactericida da classe dos aminoglicosídeos. Dwyer e colaboradores (2009) mostraram que aminoglicosídeos induzem erros na tradução e no dobramento de proteínas associadas à membrana que ativam a resposta de estresse do envelope e o sistema de sinal de dois componentes responsivos a redox levando a produção de radicais livres.

A ativação da resposta SOS por concentrações subinibitórias de aminoglicosídeos e tetraciclinas foi observada por Baharoglu e Mazel (2011), além disso, esses autores determinaram que a incubação de *Vibrio cholerae* com concentrações 0,01X CIM de tetraciclina levava a um aumento na frequência de mutação de aproximadamente dez vezes.

Aminoglicosídeos são descritos como sendo relacionados à emergência de *S. aureus* com fenótipo de colônias variantes pequenas (SCV). Em contraste com fenótipo normal, *S. aureus* SCV tem requerimento fastidioso para crescimento. As colônias SCV podem ser identificadas como não pigmentadas, não hemolíticas e com tamanho reduzido após 24-72 horas de crescimento em ágar contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro.

Alguns autores mostraram que a emergência de SCV ocorre com mais frequência na presença de gentamicina que espontaneamente, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Schaff et al., 2003). Em seu trabalho, os autores demonstraram que uma alta frequência de mutação em *S. aureus* favorece a emergência de SCV e sugeriram que mutações podiam ter um importante papel no desenvolvimento desses variantes.

Como esperado, quando os isolados 3993 e 4125 foram tratados com gentamicina, em diferentes concentrações, houve a emergência do fenótipo SCV. No entanto, o tratamento do isolado 4125 com ampicilina e do 3993 com tetraciclina também levou ao aparecimento de colônias com esse fenótipo, o que ainda não havia sido relatado na literatura. A relação proposta por Schaff et al. (2003) pode ser uma explicação para esse evento.

Não foi possível realizar a contagem do número de colônias SCV obtidas. No entanto, dado a importância desse fenótipo em infecções humanas e animais, propõe-se que novos ensaios sejam realizados a fim de determinar de forma mais elucidativa o papel desses antibióticos na emergência dos SCVs. O experimento deve ser repetido realizando-se diluições apropriadas que permitam a contagem de colônias e determinação da frequência de formação dos SCVs. Posterior

a isso, propõe-se a realização de ensaios para a caracterização fenotípica e molecular dos isolados SCV e a identificação da região que possui a mutação em relação ao fenótipo normal.

A importância do fenótipo SCV em infecções humanas tem sido intensamente investigada, devido à associação entre este fenótipo de *S. aureus* com infecções persistentes e recorrentes (Proctor et al. 2006). Brouillete et al. (2004) foram os primeiros a relacionar o fenótipo SCV com infecções persistentes de mastite bovina, seguido por Atalla et al, (2008 e 2011). Pelos resultados obtidos neste trabalho é possível que antibióticos possam estar contribuindo para a seleção de SCV, o que poderia prejudicar a eficácia do tratamento, uma vez que bactérias SCV estão associadas à recidiva da mastite.

A utilização de antibióticos é fundamental para o tratamento de doenças como mastite bovina. Porém, os resultados mostrados aqui vêm mais uma vez ratificar a importância da determinação e da administração de doses adequadas de antimicrobianos a fim de evitar efeitos não desejados *in vivo*, como o agravamento da infecção.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- extratos de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*), boldinho (*Plectranthus ornatus*), ingá (*Inga edulis*), sálvia (*Salvia officinalis*) e sena (*Senna macranthera*) possuem atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina;
- há interações de sinergismo entre extratos de boldinho, sálvia e sena com os antibióticos ampicilina, canamicina, gentamicina e tetraciclina;
- concentrações de 0,25X, 0,5X e 0,75X a CIM de ampicilina, gentamicina e tetraciclina aumentam a frequência de mutação de *Staphylococcus aureus* de origem bovina tornando-os resistentes ao antibiótico rifampicina;
- colônias apresentando o fenótipo SCV foram observadas quando os isolados 3993 e 4125 de *S. aureus* foram expostas a concentrações de 0,5X, 1X e 1,5X a CIM de gentamicina, o mesmo foi observado quando o isolado 3993 foi exposto as mesmas concentrações de tetraciclina e o isolado 4125 à ampicilina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, E P; Chain, E. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146:837.
- Abu-shanab, B. 2004. Antibacterial activities of some plant extracts utilized in popular medicine in Palestine. *Turk. J. Biol.* 28:99-102.
- Aiyegoro, O A; Afolayan, A J, Okoh, A I. 2009. Synergistic interaction of *Helichrysum pedunculatum* leaf extracts with antibiotics against wound infection associated bacteria. *Biol. Res.* 42: 327-338.
- Albuquerque, R L; Silva M G V; Machado M I L; Matos, F J A; Morais S M; Neto, J S. 2008. Chemical composition and antioxidant activity of *Plectranthus grandis* and *P. ornatus* essential oils from north-eastern Brazil. *Flavour Fragr. J.* 22: 24–26.
- Al-hebshi, N; Al-haroni, M; Skaug, N. 2006. *In vitro* antimicrobial and resistance-modifying activities of aqueous crude that extracts against oral microorganisms. *Arch. Oral Biol.* 51:183-188
- Aligianis, N; Kalpoutzais, E; Mitaku, S; Chinou, J B. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4168-4170.
- Andrade, C A; Carvalho, C L S; Cunico, M M; Lordello, A L L; Higaskino, C E K; Almeida, S C C; Dias, J F G; Kerber, V A; Miguel, M D; Miguel, O G. 2010. Antioxidant and antibacterial activity of extracts, fractions and isolated substances from the flowers of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn.ex G. Don. *Braz. J. Pharm. Sci.* 46. 715-722
- Atalla, H; Gyles, C; Jacob, C; Moisan, H; Malouin, F; Mallard, B. 2008. Characterization of a *Staphylococcus aureus* small colony variant (SCV) associated with persistent bovine mastitis. *Foodbor.Path.and Dis.* 5:785-799.

- Baharoglu, Z; Mazel D. 2011. *Vibrio cholerae* triggers SOS and mutagenesis in response to a wide range of antibiotics: a route towards multiresistance. *Antim. Ag. Chem.* 55:2438–2441.
- Bara, M T F; Vanett, M C D. 1998. Estudo da atividade antibacteriana de plantas medicinais, aromáticos e corantes naturais. *Rev. Bras. Farmag.*
- Betoni J E C; Mantovani, R P; Barbosa, L N; Di Stasi, L C; Fernandes, A Jr. 2006. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*4:387-390.
- Brasileiro, B G; Pizziolo, V R; Raslan, D S; Jamal, M; Silveira, D. 2006. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Braz. J. Pharmg. Scien.*42: 195-201.
- Brouillette, E; Martinez, A; Boyll, B J; Allen, N E; Malouin, F.2004. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 41:35–41.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int. J. Food Microbiol.* 3: 223-253.
- Bush, K. 2004. Why it is important continue antibacterial drug discovery. *ASM News.* 70:282-288.
- Butler, M S; Buss, A D. 2006. Natural products — The future scaffolds for novel antibiotics? *Biochem. Pharmac.* 71:919-929.
- Canton, M; Onofre, S B. 2010. Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., *Asteraceae*, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica. *Braz. J. Pharmg.* 20: 348-354.
- Cantón, R; Morosini, M I. 2011. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol Rev.* 35: 977–991

- Chan, B C L M; Margareth, I P; Lau, C B S; Lui, S L; Jolivalte, C; Ganem-Elbaze, C; Litaudon, M. 2011. Synergistic effects of *baicalein* with ciprofloxacin against NorA over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and inhibition of MRSA pyruvate kinase. *J. Ethnopharm.* 137:767-773.
- Chung, P Y; Navaratnam, P; Chung L Y. 2011. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. *Ann. of Clin. Microb and Antim.* 10:25-31.
- CLSI, 2003. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: norma aprovada - Sexta Edição.
- CLSI, 2005. Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana: 15° Suplemento informativo.
- Cortes, P R; Piñas, E G; Orio, A G A; Echenique, J R. 2008. Subinhibitory concentrations of penicillin increase the mutation rate to optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antim. Chem.* 62, 973–977.
- Cushnie, T P T; Lamb, A J .2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int.J. Antimic. Agents.* 26: 343-356.
- Darwish, R M; Aburjai, T; Al-Khalil, S; Mahafzah, A. 2002. Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharm.* 79:359-364.
- Diaz, M A N; Rossi, C C; Mendonça, V R; Silva, D M; Ribon, A O B; Aguilar, A P; Muñoz, G D. 2010. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *Braz. J. Pharmg.* 20: 724-728.
- Duarte, M C T. 2006. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *Multiciência.* 7.
- Dwyer, D J; Kohanski, M A; Collins, J J. 2009. Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Curr. Opin. Microb.* 12:482-489.

- Falcão, M A; Clement, C R. 2000. Fenologia e produtividade do Ingá-cipó (*Ingá edulis*) na Amazônia central. *Acta Amaz.* 30:173-180.
- Fernandes, P. 2006. Antibacterial discovery and development — the failure of success? *Nat. Biotech.* 12:1497-1503.
- Gibbons, S; Moser, E; Kaatz, G. W. 2004. *Catechin gallates* inhibit multidrug resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus*. *Plant Med.* 70:1240-1242.
- Gibbons, S; Oluwatuyi, M; Veitch, N C; Gray, A I. 2003. Bacterial resistance modifying agents from *Lycopus europaeus*. *Phytochemistry.* 62: 83-87.
- Giraud, A; Matic, I; Tenaillon, O. 2001. Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut. *Science.* 291:2606–8.
- Gruet, P; Maincent, P; Berthelot, X; Kaltsatos, V. 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Ad. Drug Del. Rev.* 50:245–259.
- Guimarães, D O; Momesso, L S; Pupo, M T. 2010. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim. Nova.* 3:667-679.
- Gullberg, E; Cao, S; Berg, O G; Ilba, G; Sandegren L; Hughes D; Andersson D I. 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Path.* 7.
- Haida, K S; Parzianello, L; Werner, S; Garcia, D R; Inácio C V. 2007. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. *Arq. Cien. Sal. UniP.* 11
- Harvey, A L. 2008. Natural products in drug discovery. *Drug Disc. Tod.* 13:894-901.
- Hemaiswaryaa, S; Kruthiventi, A K; Doble M. 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine.* 15:639-652.
- Henderson-Begg, S K; Livermore, D M; Hall, L M C. 2006. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on mutation frequency in *Streptococcus pneumoniae*. *Journ Antim. Chem.* 57:849-854.

- Hoffman, L R; Déziel, E; D'Argenio, D A; Lépine, F; Emerson, J; McNamara, S; Gobson, R L; Ramsey, B W, Miller, S I. 2008. Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS*. 103:19890-19895.
- Hu, Z Q; Zhao, W H; Asano, N; Yoda, Y; Hara, Y; Shimamura, T. 2002. *Epigallocatechin gallate* synergistically enhances the activity of carbapenems against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antim. Ag. Chem.* 46: 558-560.
- Juven, B J; Kanner, J; Schved, F; Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J Appl Bacteriol.* 76: 626-631.
- Kohanski, M A; DePristo, M A; James, J C. 2010. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol. Cell.* 37:311–320.
- Kohanski, M A; Dwyer, D J; Collins, J J. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev.* 8:423-435.
- Kohanski, M A; Dwyer, D J; Hayete, B; Lawrence, C A; Collins, J J. 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell.* 130:797-810.
- Lee, Y S; Kang, O H; Choi, J G. 2010. Synergistic effect of *emodin* in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharm Biol.* 48:1285-90.
- Lee, Y. et al. 2008. Synergistic effects of the combination of *galangin* with gentamicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The J. of Microbiol.* 46:283-288.
- Leite, J P V. 2009. Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. Editora Atheneu.
- Maiques, E; Úbeda, C; Campoy, S; Salvador, N, Lasa, I, Novick, R P; Barné, J; Penadés, J R. 2006. β -Lactam antibiotics induce the sos response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 18:2726.

- Marinho, M L; Alves, M S; Rodrigues, M L C; Rotondano, T E F; Vidal I F; Silva W W; Athayde A C R. 2007. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. *Rev Bras Pl Med.* 9: 64-69.
- Marquez, B; Neuville, L; Moreau, N J; Genet, J P; Santos, A F; Andrade, M C C; SantAna, A E G. 2005. Multidrug resistance reversal agent from *Jatropha elliptica*. *Phytochemistry.* 66: 1804-1811.
- Mesak, L R; Miao, V; Davies J. 2008. Effect of subinhibitory concentrations and DNA repair gene expression of *S. aureus*. *Antib. Ag. Chem.* 52: 3394–3397.
- Mitchell, G; Lamontagne, C; Brouillette, E; Grondin, G; Talbot, B G; Grandbois, M; Malouin, F. 2008. *Staphylococcus aureus* SigB activity promotes a strong fibronectin–bacterium interaction which may sustain host tissue colonization by small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients. *Molec.Microbiol.*70:1540 – 1555.
- Mitchell, G; Gattuso, M; Grodin, G; Marsault, E; Bouarab, E; Malouin F. 2011. Tomatidine inhibits replication of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Antim.Ag. Chem.* 55: 1937–1945.
- Moon, S E; Kim, H; Cha, J. 2011. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Arc. Oral Biol.* 9:907-916.
- Musher, D M; Baughn, R E; Templeton, G B; Minuth, J N. 1977. Emergence of variant forms of *Staphylococcus aureus* after exposure to gentamicin and infectivity of the variants in experimental animals. *Journ. Infect. Disea.* 136:360-369.
- Nascimento, G G F; Locatelli, J; Freitas, P C; Silva G L. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Bras. Journ Microbiol.*31:247-256.
- Nogueira, L G. 2009. *Senna macranthera*: constituição química e atividades biológicas. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora.

- Ohlsen, K; Ziebuhr, W; Koller, K; Hell, W; Wichelhaus, T; Hacker, J. 1998. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (*hla*) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antim. Ag. Chem.* 42: 2817–2823.
- Oliveira, J H H L; Granato, A C; Hirata, D B; Hokka C O; Barboza M. 2009. Ácido clavulânico e cefamicina c: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. *Quim. Nova.* 32:2142-2150.
- Ortholand, J; Ganesan, A. 2004. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Curr. Opin. in Chem. Biol.* 8:271–280.
- Padilha, I Q M; Pereira, A V; Rodrigues, O G; Siqueira-Junior J P; Pereira, S. 2010. Antimicrobial activity of *Mimosa tenuiflora* (Willd.)Poir. from Northeast Brazil against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Braz. J. Pharm.* 20:45-47.
- Palaniappan, K.; Holley, R. A. 2010. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Intern. J. of Food Microb.* 140:164-168.
- Palmeira, J D; Ferreira, S B; Souza, J H; Almeida, J M; Figueiredo, M C; Pequeno, A S; Arruda, T A; Antunes, R M P; Catão, R M R. 2010. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcoólico de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. *RBAC.* 42: 33-37.
- Parente, L M L; Silva, M S B; Brito, L A B; Lino-Júnior, R S; Paula, J R; Trevenzol, L M F; Zatta, D T; Paulo, N. 2009. Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. *Rev. Bras. Pl. Med.* 11,383-391.
- Pedró, L; Baños, R C; Aznar, S; Madrid, C; Balsalobre, C. 2011. Antibiotics shaping bacterial genome: deletion of an IS91 flanked virulence determinant upon exposure to subinhibitory antibiotic concentrations. *PLoS ONE.* 6: e27606.
- Peng, Q; Zhou, S; Yao, F; Hou, B; Huang, Y; Hua, D; Zheng, Y; Qian, Y. 2011. *Baicalein* suppresses the SOS response system of *Staphylococcus aureus* induced by ciprofloxacin. *Cell. Physiol. Biochem.* 28:1045-1050

- Pope, C F; O'Sullivan, D M; McHugh T D; Gillespie S H. 2008. A practical guide to measuring mutation rates in antibiotic resistance. *Antib. Ag. Chem.* 52: 1209–1214.
- Proctor, R A; von Eiff, C; Kahl, B C; Becker, K; McNamara, P; Herrmann, M; Peters G. 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat. Rev. Microb.*4:295–305.
- Rani, A; Jain, S; Dureja, P; Kumar, R; Kumar A. 2009. Synergistic interaction between synthetic and natural products: a promising tool for the development of environmentally safe potent antimicrobial agents. *World Appl Sci J.* 5:59-63.
- Rates, S M K. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon.* 39:603–613.
- Rosenblatt-Farrell, N. 2009. The landscape of antibiotic resistance. *Envir. Health Persp.*117:6.
- Sato Y, Shibata H, Arai T, Yamamoto A, Okimura Y, Arakaki N, Higuti T. 2004. Variation in synergistic activity by flavone and its related compounds on the increased susceptibility of various strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to β -lactam antibiotics. *Int. J. Antimic. Agents.*24: 226-233.
- Schaff, F; Bierbaum, G; Boumert, N; Bartmann, P; Sahl, H. 2003. Mutations are involved in emergence of aminoglycoside-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 293:427- 435.
- Sharma, D; Lavania, A A; Sharma, A. 2009. *In vitro* comparative screening of antibacterial and antifungal activities of some common plants and weeds extracts. *Asian J. Exp. Sci.* 23:169-172.
- Shibata, H; Kondo, K; Katsuyama, R; Kawazoe, K; Sato, Y; Murakami K; Takaishi, Y; Arakaki, N; Higuti, T. 2005. Alkyl Gallates, intensifiers of β -Lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antim. Ag. Chem.* 49:549-555.
- Sibanda, T; Okoh, A I. 2008. *In vitro* evaluation of the interactions between acetone extracts of *Garcinia kola* seeds and some antibiotics. *Afr. J. Biotech.* 7: 1672-1678.

- Sibanda, T; Okoh, I. 2007. The challenges of overcoming antibiotic resistance: plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents. *Afr. J. of Biotech.* 6:2886-2896.
- Smith, E C J; Williamson, E M; Wareham, N; Kaatz, G W; Gibbons, S. 2007. Antibacterials and modulators of bacterial resistance from the immature cones of *Chamaecyparis lawsoniana*. *Phytochemistry.* 68:210-217.
- Sompolinsk, D; Cohen, M; Ziv, G. 1974. Epidemiological and biochemical studies on thiamine-less dwarf colony variants of *Staphylococcus aureus* as etiological agents of bovine. *Infect Immun.* 9:217-28.
- Souza, E O; Barreto, S F; Rodrigues, F F G; Costa, J G M. 2010. Atividade antibacteriana e interferência de *Lantana camara* Linn e *Lantana montevidensis* Briq na resistência de aminoglicosídeos. *Rev. Bras. Bioc.* 9:1-5.
- Tuchscher, L; Medina, E; Hussain, M; Volker, W; Heitmann, V; Niemann, S; Holzinger, D; Roth, J; Becker, K; Peters, G; Loffler, B. 2012. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol. Med.* 3: 129–141.
- Ultee, A; Bennik, M H; Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1561-1568.
- Vargas, F S; Oliveira, C F; Giro, E M A; Sacramento, L V S; Spolidorio, D M P; Costa, C A S. 2010. Antimicrobial and cytotoxic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* on odontoblast-like cells. *Rev. Odontol. Bras.* 19: 101-108.
- Velickovic, D T; Randjelovic, N V; Ristic, M S; Velickovic A S; Smelcerovic A A. 2003. Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanol extracts obtained from the flower, leaf and stem of *Salvia officinalis* L. *J.Serb. Chem.Soc.* 68:17–24.

- Vinod, N V; Shijina, R; Dileep, K V; Sadasivan, V. 2010. Inhibition of beta-lactamase by 1,4-naphthalenedione from the plant *Holoptelea integrifolia*. *Appl. Bioch. Biotech.* 160:1752–1759.
- Walsh, C. 2003. Antibiotics: actions, origins, resistance. *ASM Press: Washington*.
- Walsh, C. 2003. Where will new antibiotics come from? *Nat. Rev.* 1:65-70.
- Yim, G; Wang H H; Davies J. 2006. The truth about antibiotics. *Int.J. Med. Microbiol.* 296:163–170.
- Zhao, W H; Hu, Z Q; Okubo, S; Hara, Y; Shimamura, T. 2001. Mechanism of synergy between *Epigallochatechin gallate* and β -lactams against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Antim.Ag. Chem.* 45:1737-1742.