



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

RENATA ALEXANDRE RAMOS DA SILVA

**Atividade sinérgica do citral em associação com antimicrobianos convencionais
frente à *Enterococcus faecalis* multirresistentes.**

RECIFE

2014

RENATA ALEXANDRE RAMOS DA SILVA

**Atividade sinérgica do citral em associação com antimicrobianos convencionais
frente à *Enterococcus faecalis* multirresistentes**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eulália Azevedo Ximenes

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas para
obtenção do grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.
Área de Concentração:
Obtenção de Produtos Naturais
e Bioativos

RECIFE

2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586a Silva, Renata Alexandre Ramos da.
Atividade sinérgica do citral em associação com antimicrobianos convencionais frente à *enterococcus faecalis* multirresistentes / Renata Alexandre Ramos da Silva. – Recife: O autor, 2014.
53 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Eulália Azevedo Ximenes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.
Inclui referências.

1. Terpenos. 2. Enterococcus faecalis. 3. Sinergismo farmacológico. I. Ximenes, Eulália Azevedo (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2014-209)

RENATA ALEXANDRE RAMOS DA SILVA

**“ Atividade sinérgica do citral em associação com antimicrobianos convencionais frente
à *Enterococcus faecalis* multirresistentes”**

**Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 20 de Fevereiro de 2014 pela banca
examinadora constituída pelos Professores Doutores:**

Profa. Dra. EULÁLIA AZEVEDO XIMENES
Departamento de Antibióticos – UFPE

Prof. Dr. MÔNICA CAMELO PESSOA DE AZEVEDO ALBUQUERQUE
Departamento de Medicina Tropical – UFPE

Profa. Dra. ANA CATARINA DE SOUZA LOPES
Departamento de Medicina Tropical - UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho.

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Profa. Karina Perrelli Randau

COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Almir Gonçalves Wanderley

VICE-COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Profa. Ana Cristina Lima Leite

À Deus e minha família pelo apoio, força,
Incentivo e amor. Sem eles
nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa Eulália Azevedo Ximenes, pela amizade, ajuda, paciência, incentivo, apoio e pela confiança depositada em mim.

Aos meu pais, meus irmãos, Davison, Daniele e Evellinne, minha cunhada Rafaela e ao meu sobrinho Davi, por serem tudo na minha vida, por todo apoio e amor incondicional.

A Roberto Chaves pela amizade, carinho, atenção e por ter colocado um sorriso em mim a cada dia desses últimos tempos.

A Leonardo Aquino, companheiro fiel de bancada, presente em todas as dores físicas e psicológicas, tristezas e alegrias em todo trajeto.

Aos colegas de laboratório Fábio, Klewdma, Tarcilene, Lucas pelos bons momentos de convívio e especialmente a Amanda, por sempre estar presente pra me salvar das dúvidas, a Gustavo por toda ajuda profissional e risadas.

A todos os professores da pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo convívio e aprendizado.

A secretária do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Nerilim Trajano, pela atenção e dedicação para com os assuntos relacionados a defesa da dissertação.

Aos amigos fora da UFPE que de uma forma indireta me apoiaram sempre.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do citral, linalol e quatro antimicrobianos (ampicilina, gentamicina, linezolida e vancomicina) frente à dez cepas de *Enterococcus faecalis* cujo fenótipo de resistência fora previamente determinado pelo método de difusão em disco. Quatro cepas de *Enterococcus faecalis* (EF 07, EF 11, EF 13 e ATCC 51299) apresentaram resistência à vancomicina e foram selecionadas para o estudo de interação entre o citral e os quatros antimicrobianos o qual foi realizado pelo método *checkerboard*. Os critérios utilizados para avaliar a atividade sinérgica foram definidos pelo Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FIC index). O citral foi o mais eficaz frente as cepas de *Enterococcus faecalis* avaliadas quando comparado ao linalol. Os valores do FIC index variaram de 0,5 a 0,125 sugerindo uma interação sinérgica para todas as associações exceto com gentamicina a qual se mostrou indiferente. Este estudo demonstrou que o citral associado à vancomicina foi capaz de reduzir os valores da concentração inibitória mínima deste último em 93,75%. Antimicrobianos beta lactâmicos e glicopeptídeos agem sinergicamente quando associados ao citral inibindo cepas de *Enterococcus faecalis* multirresistentes.

Palavras-chave: Terpenos. Citral. VRE. Concentração Inibitória Fracionada (FIC Index).

ABSTRACT

The purpose of this work has been to evaluate the antimicrobial activity of citral, linalol and four antimicrobials (ampicillin, gentamicin, vancomycin and linezolid) against ten *Enterococcus faecalis* strains whose resistance phenotype was previously determined by disc diffusion method. Four *Enterococcus faecalis* strains (EF 07, EF 11, EF 13 e ATCC 51299) present resistance to vancomycin, and they were selected to the interaction study between the citral and the four antimicrobials which was realized by *checkerboard* method. The criteria used to evaluate the synergistic activity were defined by fractional inhibitory concentration index (FIC index). The citral was the most effective against the *Enterococcus faecalis* strains evaluated when it was compared to linalol. The value of FIC index ranged from 0.5 to 0.125 suggesting a synergistic interaction to all associations except with gentamicin which showed indifferent. This study has demonstrated that the citral associated with vancomycin was able to reduce the values of the minimum inhibitory concentration of this latter in 93.75%. Beta lactam antimicrobials and glycopeptides act synergistically when combined with citral inhibiting multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* strains.

Key-words: Terpene. Citral. VRE. Fractional Inhibitory Concentration (FIC Index).

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Origem e susceptibilidade das cepas <i>Enterococcus faecalis</i> multirresistentes utilizados na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).	30
Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima de citral, linalol e agentes antimicrobianos frente a cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> multidroga resistentes.	36
Tabela 3. Associação do citral com ampicilina, gentamicina ou vancomicina frente à cepas LFBM EF 07, LFBM EF 11, LFBM EF 13 e ATCC 51299 de <i>Enterococcus faecalis</i> multirresistentes.	41

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura química do Citral (A) e Linalol (B)	27
Figura 2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de Monoterpenos e dos agentes antimicrobianos	33
Figura 3. Representação gráfica da técnica do tabuleiro de xadrez (<i>Checkerboard method</i>)	34
Figura 4. Isoblograma revelando o efeito sinérgico do citral em associação com vancomicina frente à <i>Enterococcus faecalis</i> LFBM EF 07(A), <i>E. faecalis</i> LFBM EF 11(B), <i>E. faecalis</i> LFBM EF13 (C) e <i>E. faecalis</i> ATCC 51299 (D).	39
Figura 5. Isoblograma revelando o efeito sinérgico do citral em associação com ampicilina frente à <i>Enterococcus faecalis</i> LFBM EF 07(A) e <i>E. faecalis</i> LFBM EF 11(B)	40
Figura 6. Isoblograma revelando o efeito sinérgico do citral em associação com gentamicina frente à <i>Enterococcus faecalis</i> LFBM EF 13(A) e <i>E. faecalis</i> 51299 (B)	40

SUMÁRIO

	Página
1.Introdução	13
2. Objetivos	16
2.1 Objetivos Gerais	17
2.2 Objetivos específicos:	17
3. Revisão de literatura	18
3.1 Microbiologia dos enterococos	19
3.2 <i>Enterococcus faecalis</i>	20
3.3 Infecções Nosocomiais	20
3.4 Patogenia	21
3.5 Resistência a antibióticos	23
3.5.1 Resistência Intrínseca	23
3.5.2 Resistência adquirida	24
3.6 Terpenos	25
3.6.1 Citral e Linalol	26
4. Materiais e Métodos	29
4.1 Cepas de <i>Enterococcus faecalis</i>	30
4.2 Cultura, manutenção e padronização do inóculo	31
4.3 Agentes antimicrobianos e monoterpenos	31

4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	31
4.5 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	32
4.6 Interação entre citral e agentes antimicrobianos	33
5. Resultados	35
5.1 Atividade antimicrobiana do citral, linalol e agentes antimicrobianos	36
5.2 Determinação <i>in vitro</i> da atividade sinérgica	37
6. Discussão	42
7. Conclusão	46
Referências	48

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os Enterococos estão entre microrganismos que causam sérias infecções nosocomiais, especialmente em unidades de terapia intensiva (HANIN et al., 2010; REFFUVEILLE et al., 2011; TYNE, VAN, MARTIN e GILMORE, 2013). Consistem em bactérias Gram-positivas que habitam o trato intestinal de humanos e animais.

A espécie mais frequentemente isolada, *Enterococcus faecalis* é responsável por infecções no trato urinário, infecções intra-abdominais, pélvicas, endocardites, meningites neonatais, infecções dérmicas, bacteremias e septicemias, comportando-se como microrganismo oportunista em infecções hospitalares (LOURENÇO et al., 2011).

Enterococcus faecalis é caracterizado por apresentar resistência intrínseca ou adquirida via plasmídeos ou transposons, à uma grande quantidade de agentes antimicrobianos (JARZEMBOWSKI, JO e WIS, 2010). Estes microrganismos podem ser resistentes aos β -lactâmicos, clindamicina, trimetoprim, quinolonas, glicopeptídeos e aos aminoglicosídeos (FRENCH, 1998).

Um surto de infecções causadas por enterococos resistentes à vancomicina (VRE), droga de escolha para o gênero, foi relatado pela primeira vez em 1988 e evidências do mecanismo de resistência mediado por plasmídeo foi demonstrado logo após (LECLERCQ et al., 1989). Os VRE são um desafio terapêutico na clínica médica, pois suas infecções estão associadas à alta morbidade, altas taxas de mortalidade e um excessivo custo para os sistemas de saúde (KOBAYASHI et al., 2011).

Os enterococos com altos níveis de resistência aos aminoglicosídeos, aos β -lactâmicos e a linezolida também são responsáveis por diversos surtos de infecções hospitalares, aumentando ainda mais a preocupação dos órgãos de vigilância epidemiológica sobre as limitadas opções para a terapêutica (KOBAYASHI et al., 2011; KAINER et al., 2007).

Contando com uma grande biodiversidade, o Brasil representa uma das maiores fontes para a descoberta de novas drogas de origem natural. Plantas e seus óleos essenciais são fontes potencialmente úteis de compostos antimicrobianos. A utilização de metabólitos secundários oriundos de plantas com atividade antimicrobiana auxiliando as terapêuticas convencionais vem sendo estudado como uma alternativa para o tratamento das infecções e diminuição da resistência microbiana aos antibióticos (FADLI et. al, 2012).

Os terpenos são metabólitos secundários das plantas superiores. São hidrocarbonetos produzidos pela combinação de várias unidades de isopreno (C_5H_8) e denominados pela quantidade de carbonos em: monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}),

triterpenos (C30) e seus derivados terpenóides (com um ou mais grupos funcionais) (ZWENGER e BASU, 2008).

Os monoterpenos são amplamente estudados devido a suas ações sobre bactérias, fungos, vírus e protozoários (SANTOS et al., 2011). Podem ser encontrados em ervas aromáticas, frutas e flores, sendo responsáveis pelo aroma e proteção contra predadores (CHEN et al., 2011; ECHEVERRIGARAY et al., 2008).

Fazendo parte da constituição de diversos óleos essenciais, especialmente em frutas cítricas (MUTHAIYAN et al., 2012), os monoterpenos, citral e linalool, apresentam atividade antimicrobianos contra espécies de enterococos e outros gêneros de bactérias Gram-positivas (AIEMSAARD et al., 2011; FISHER e PHILLIPS, 2006; HENDRY et al., 2009; VUUREN e VILJOEN, 2007) e possuem baixa citotoxicidade (RABBANI, DEVI e ZAHRA, 2005).

A interação de metabólitos secundários com agentes antimicrobianos é uma das maneiras de inibir os mecanismos de resistência bacteriana (FADLI, SAAD, SAYADI, CHEVALIER, MEZRIOUI, N., et al., 2012). A associação entre as diversas substâncias químicas pode induzir efeitos sinérgicos, indiferentes ou antagônicos e testes que avaliem a eficácia da inibição do crescimento microbiano são essenciais para avaliação farmacodinâmica de possíveis fármacos utilizados isoladamente ou associados (D'ARRIGO et al., 2010).

Diante do que foi exposto, este trabalho teve por objetivo a avaliação da atividade antimicrobiana do citral e linalol, e o estudo da interação entre o citral com agentes antimicrobianos convencionais frente à cepas multirresistentes de *Enterococcus faecalis*.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a atividade antimicrobiana do citral e linalol e a interação da associação de citral com agentes antimicrobianos frente a cepas de *Enterococcus faecalis* multidroga resistentes.

2.2 Objetivos específicos:

- Determinar a atividade antimicrobiana através da concentração mínima inibitória (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da associação dos monoterpenos Citral e Linalol e os seguintes agentes antimicrobianos: ampicilina; gentamicina, linezolida e vancomicina frente a 10 cepas de *Enterococcus faecalis* multidroga resistentes;
- Avaliar o tipo de interação entre o Citral e Vancomicina, Ampicilina e Gentamicina frente a quatro cepas de *Enterococcus faecalis* mais resistentes a agentes antimicrobianos.

REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Microbiologia dos enterococos

Pertencentes à família Enterococcaceae, o gênero *Enterococcus* possui mais de 40 diferentes espécies (TYNE, VAN, MARTIN e GILMORE, 2013). Os enterococos fazem parte do grupo das bactérias Gram-positivas, identificados por testes bioquímicos, como bactérias anaeróbicas facultativas, catalase negativa, oxidase negativa e produtoras de ácido láctico. São micro-organismos não esporulados que se apresenta em colônias pequenas, amarelas, com 0,5 a 1 mm de diâmetro e cujo arranjo em microscopia após coloração de Gram apresentam-se isoladas, aos pares ou em cadeias curtas (MURRAY, 1990).

O nome enterococos foi sugerido por Thiercelin no ano de 1899 como referência a sua origem intestinal (THIERCELIN et. al, 1988). Anteriormente classificados como pertencentes ao gênero *Streptococcus*, os enterococos só foram diferenciados de outras espécies do gênero após a classificação sorológica de *Streptococcus*, proposta por Rebecca Lancefield em 1933. Esta classificação está baseada na composição dos antígenos bacterianos, mais precisamente poliosídeos C presentes na parede celular. Desta forma os enterococos foram classificados como positivos para o antissoro do grupo D devido ao seu antígeno Ácido Teicóico, que é associado a membrana plasmática, diferenciando-os de outras espécies da família. Sherman então, em 1937, criou um sistema para a classificação que dividiu os *Streptococcus* em quatro grupos, lácticos, *viridans*, piogênicos e enterococos (SHERMAN, 1937). Só em 1984, os enterococos foram oficialmente reconhecidos como gênero a parte, após estudos genéticos demonstrarem uma relação distante com os estreptococos (MURRAY, 1990).

Os enterococos têm como principais características a capacidade de crescimento em condições de estresses e ambientais adversas, tais como, em temperaturas de 10° C a 45° C, podendo também sobreviver a temperaturas elevadas (60° C durante 30 min), resistem a pH de 9,6 e em altas concentrações de sais (6,5% de NaCl) e sais biliares (40%), o que os torna distintos de outros gêneros principalmente *Streptococcus* (LINDENSTRAUSS et al., 2013; MURRAY, 1990; TIAN et al., 2013). Eles Possuem a capacidade de hidrolisar a o L-pirrolidonil-β-naftilamida (PYR) e hidolisar a esculina em esculetina, principais testes para sua identificação (MURRAY, 1990; SHERMAN, 1937). Apesar de não reagirem positivamente para a prova da enzima citocromo-oxidase, podem se mostrar positivo para a prova da presença da catalase pela produção de uma pseudo catalase que se caracteriza uma ligeira liberação de oxigênio quando a colônia é colocada em contato com o peróxido de hidrogênio (MURRAY,

1990). Quanto à hemólise em ágar sangue, o comportamento dos enterococos é variável, podendo ser α , β hemolíticos ou não hemolíticos (FURTADO, 2011).

Enterococos são bactérias comuns, de baixa virulência e podem ser encontradas habitando comensalmente o trato gastrointestinal, cavidade oral e vaginal de humanos e animais. São os principais cocos Gram-positivos da microbiota intestinal humana, chegando a ser isolados em concentrações de 10^5 a 10^7 CFU por grama de fezes (TYNE, VAN, MARTIN e GILMORE, 2013). São também isolados de plantas, água e solos por contaminação de fezes (REFFUVEILLE et al., 2012; SUN et al., 2012), podendo também serem encontrados em alimentos (principalmente em produtos lácteos e carnes) (MAISNIER-PATIN, FORNI e RICHARD, 1996).

3.2 *Enterococcus faecalis*

E. faecalis é a espécie mais encontrada em humanos seguida por *E. faecium* e corresponde a 80% das infecções nosocomiais por enterococos (REFFUVEILLE et al., 2011).

E. faecalis fermenta manitol, sucrose, sorbitol e hidrolisa a esculina e cresce em ágar telurito de sódio-sangue produzindo colônias negras. Sua parede celular contém uma grande quantidade de ácido peptideoglicano e ácido teicóico (MURRAY, 1990).

O interesse nos estudos com a espécie *E. faecalis* surgiu pelo fato de esta possuir vários plasmídeos, podendo alguns serem transferidos por conjugação a outras bactérias. Conjugação é um importante mecanismo de transferência genética horizontal em cocos Gram-positivos e os genes transferidos frequentemente incluem os determinantes de resistência a antibióticos e fatores de virulência (DUNNY et al., 1995). Este fato levou a considerar esta espécie como reservatórios de plasmídeos (BØHLE et al., 2011).

3.3 Infecções Nosocomiais

As fontes de infecção nosocomial causadas por enterococos são resumidas em duas: a causada por enterococos presentes no trato gastrointestinal do próprio paciente e a adquirida por contaminação do ambiente hospitalar.

E. faecalis podem sobreviver por longos períodos em superfícies, como equipamentos médicos, camas e maçanetas devido principalmente a sua capacidade de tolerância a calor, cloro e algumas soluções de álcool etílico, aumentando desta forma a sua capacidade de disseminação (ARIAS e MURRAY, 2012).

Embora não seja considerado particularmente virulento, nas últimas duas décadas vêm se isolando cepas com potencial para causar infecções hospitalares pois se comportam como patógenos oportunistas principalmente em pacientes imunodeprimidos (RIGOTTIER-GOIS et al., 2011). Doenças ou as condições de saúde do paciente como neutropenia, quimioterapia antineoplásica, utilização de medicamentos imunossupressores são fatores de risco para infecções invasivas por enterococos (GEISS-LIEBISCH et al., 2012; RIGOTTIER-GOIS et al., 2011).

O primeiro caso de infecção causada por *E. faecalis* foi reportada em 1899 e atualmente são considerados o terceiro grupo de bactérias mais encontradas em infecções nosocomiais em todo o mundo, ficando atrás das *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, correspondendo a 12% de todas as infecções. É o segundo micro-organismo mais encontrado em infecções hospitalares nos Estados Unidos e o quarto na Europa, porém estudos epidemiológicos sobre a sua prevalência nos hospitais brasileiros e sua relação com as infecções hospitalares ainda são escassas (ARIAS e MURRAY, 2012; HOLLENBECK e RICE, 2012; LOURENÇO et al., 2011; RIGOTTIER-GOIS et al., 2011; TYNE, VAN, MARTIN e GILMORE, 2013).

Hoje se sabe que a espécie *Enterococcus faecalis* pode ser responsável por diversos tipos de infecções como: septicemia, endocardite, meningites, infecções em feridas e infecções no trato urinário (AL-ABBAS, 2012; THEILACKER et al., 2012). *E. faecalis* é o agente causal de endocardite infecciosa (EI), uma condição grave cuja taxa de mortalidade de até 20%. (ARIAS e MURRAY, 2012; JOHANSSON e RASMUSSEN, 2013). *E. faecalis* é o enterococos mais comumente isolado, seguido pelo *E. faecium*, e é responsável por cerca de 60% das bacteremias causadas por espécies de enterococos (BØHLE et al., 2011).

Meningites enterocócicas são raras, porém possuem uma alta taxa de mortalidade, atingindo 21% dos casos, as quais são agravadas pois as cepas apresentam resistência a terapia antimicrobiana (PEPPOLONI et al., 2011). *E. faecalis* estão são frequentemente encontrados em 32%–77% nas lesões em canais perirradiculares após tratamentos do canal dentários podendo levar a infecções persistentes e de prognóstico complicado (QUAH et al., 2012).

3.4 Patogenia

Muitos fatores intrínsecos ao microrganismo determinam a virulência dos enterococos, se iniciando por sua capacidade de colonizar e interagir com células e proteínas do trato gastrointestinal e por isso terem a capacidade de invadir sítios extra intestinais e causarem

infecções (FISHER e PHILLIPS, 2009; GIRIDHARA UPADHYAYA, RAVIKUMAR e UMAPATHY, 2009).

Fazendo parte de sua estrutura celular e atuando na virulência dos *E. faecalis*, destacam-se as proteínas de superfície, também conhecidas como lipoproteínas, as quais estão envolvidas no processo de adesão da célula, na sinalização célula-célula, nas interações com o sistema imunológico do hospedeiro, na sinalização dos fatores ambientais na proteção contra fatores ambientais.

Os ácidos teicóicos estão envolvidos na fixação com os receptores da célula do hospedeiro, formação de biofilme, resistência a peptídeos antimicrobianos e também envolvidos indução da formação de abscessos; o ácido lipoteicóico estimula a liberação de mediadores pelos leucócitos responsáveis por várias fases do processo inflamatório; o antígeno polissacarídico de *Enterococcus* spp. presente na parede celular, possui uma forte semelhança com os antígenos de outros estreptococos e estudos sugerem que eles atuam durante a adesão e invasão nos tecidos do hospedeiro, na formação de biofilmes e na resistência à fagocitose e a cápsula de polissacarídeos que protege o micro-organismo contra o ataque por células do sistema imunológico do hospedeiro (BØHLE et al., 2011; CASADEVALL e PIROFSKI, 2009; GEISS-LIEBISCH et al., 2012; THEILACKER et al., 2012; TIAN et al., 2013).

E. faecalis também podem secretar diversas substâncias que atuam na sua virulência, destacando-se: a citolisina, também denominada de estreptolisina, que são toxinas hemolíticas de células sanguíneas de humanos as quais podem atuar também como bacteriocinas; Hialuronidase, substância que facilita a propagação das bactérias e suas toxinas através do tecido do hospedeiro e atuam no ácido hialurônico causando danos nos tecidos; Gelatinase, enzima capaz de hidrolisar a gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros peptídeos; Serina protease, responsável por causar danos nos tecidos; Substância de agregação, envolvida na formação de agregados na conjugação bacteriana; Beta-hemolisina, uma proteína citolítica capaz de lizar eritrócitos humanos, de cavalos e coelhos, sendo ela uma das principais responsáveis pelo agravamento das infecções (BØHLE et al., 2011; GIRIDHARA UPADHYAYA, RAVIKUMAR e UMAPATHY, 2009; THURLOW et al., 2010)

Um mecanismo de virulência muito importante é a formação de biofilme, cuja definição corresponde a um denso agregado de micro-organismos revestidos por uma matriz de biopolímeros: polissacarídeos, poli peptídeos, lipídeos e ácidos nucleicos. As células bacterianas no estado de biofilme podem demonstrar resistência extremamente elevada para a maioria dos agentes antimicrobianos. Esta resistência pode estar relacionada fisicamente à

própria matriz ou uma função de genes que são expressos para codificar proteínas implicadas na resistência da célula (BARNES, BALLERING e LEIBMAN, 2012). Biofilmes são essenciais no processo patogênico de *E. faecalis* em doenças como endocardites bacterianas, alguns tipos de nefro-litíases, fibrose cística e cáries (CASADEVALL e PIROFSKI, 2009; FISHER e PHILLIPS, 2009).

3.5 Resistência a antibióticos

Desde os anos 1960, as infecções enterocócicas nosocomiais tornaram-se preocupantes para saúde pública pois as cepas isoladas demonstravam um perfil de resistência aos antibióticos (TYNE, VAN, MARTIN e GILMORE, 2013). Ao longo do tempo os enterococos vêm tornando-se uma das mais frequentes bactérias isoladas nos ambientes hospitalares e isso se deve, principalmente por apresentarem resistência intrínseca a diversos grupos de agentes antimicrobianos e a abundância de elementos móveis (plasmídeos e transposons) em *E. faecalis* que provavelmente contribuem para a acumulação de virulência e o surgimento de resistência a drogas (BØHLE et al., 2011; PALMER et al., 2011).

3.5.1 Resistência Intrínseca

Uma das características marcantes dos enterococos é a sua resistência natural a diversos antibióticos utilizados rotineiramente na clínica contra cocos Gram-positivos. Esta resistência está diretamente ligada a genes localizados no cromossoma. Isto leva esses micro-organismos a serem naturalmente resistente a β -lactâmicos, cefalosporinas, sulfonamidas, clidamicina e aminoglicosídeos (MURRAY, 1990).

A resistência aos β -lactâmicos está implicada com a superprodução da proteína de ligação à penicilina (PLP) que leva a obter Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) maiores para essa droga em enterococos quando comparados a outros organismos Gram-positivos. *E. faecalis* pode adquirir maior resistência aos β -lactâmicos através da aquisição de β -lactamases oriunda de outras bactérias (HOLLENBECK e RICE, 2012; WOODFORD e LIVERMORE, 2009).

Os aminoglicosídeos atuam pela inibição da síntese de proteínas ribossomal e é a sua incapacidade de entrar na bactéria que lhe confere a baixa atividade em baixas concentrações da droga (HOLLENBECK e RICE, 2012).

3.5.2 Resistência adquirida

No tratamento de infecções enterocócicas a terapia de escolha é feita frequentemente através do uso de vancomicina e em casos de graves infecções, através da combinação sinérgica de agentes ativos na parede celular (glicopeptídeos, principalmente vancomicina, e beta-lactâmicos) com aminoglicosídeos (geralmente, gentamicina) (ARIAS et al., 2007; GIRIDHARA UPADHYAYA, RAVIKUMAR e UMAPATHY, 2009; WOODFORD e LIVERMORE, 2009). Entretanto, o que gera grande preocupação é o fato de que os *E. faecalis* também possuem a capacidade de adquirir rápida resistência através de genes localizados em plasmídeos, transposons e através de troca cromossômica e mutações, levando a um grande desafio para medidas terapêuticas e se tornando a mais importante forma de patogenia da espécie (RATHNAYAKE, HARGREAVES e HUYGENS, 2011; TREMBLAY e ARCHAMBAULT, 2013). Os genes de resistência a drogas constituem mais de 25% dos elementos móveis, refletindo assim uma acumulação desenfreada de elementos de resistência de drogas e fatores de virulência (TYNE, VAN, MARTIN e GILMORE, 2013). Por estarem presentes no trato gastrointestinal, aumentam ainda mais a possibilidade de receberem genes de resistência de outros micro-organismos, podendo posteriormente ser reservatórios de tais genes para outras bactérias mais patogênicas (HEGSTAD et al., 2010). Através da cadeia alimentar, enterococos resistentes a antimicrobianos também podem ser transmitidos aos seres humanos através do gado e produtos alimentares derivados (JAMET et al., 2012).

Primeiro relatados na Europa em 1987, cepas de enterococos resistentes à vancomicina (ERV) têm recebido atenção crescente desde o final dos anos 1980, quando um rápido aumento nos números de infecções nosocomiais foi relatado nos Estados Unidos. A bactéria se espalhou pelo mundo, causando surtos de infecção hospitalar por colonização de enterococos (TITZ-DE-ALMEIDA et al., 2004). Dos sete fenótipos (VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG e VanL) associados à resistência a Vancomicina, os fenótipos VanA e VanB são os mais relevantes clinicamente devido à capacidade de transferência genética entre espécies e gêneros e por provocarem alto grau de resistência à droga, sendo ambos mais encontrados em *E. faecalis*. A teicoplanina é outro fármaco glicopeptídico que exibe muitas semelhanças com a Vancomicina, onde os enterococos VanA são resistentes à teicoplanina e os fenótipos VanB e VanC são suscetíveis a este fármaco (BATISTÃO et al., 2012; FURTADO, 2011).

Em aminoglicosídeos temos como exemplo o principal mecanismo de resistência a gentamicina, que ocorre mais frequentemente através da aquisição de um gene (APH(2'')-Ia-AAC(6')-Ie) que modifica a gentamicina, tornando-a não mais capaz de se ligar ao seu alvo na

subunidade ribossômica 30S e assim perdendo sua atividade antibacteriana (HOLLENBECK e RICE, 2012).

A partir do ano 2000, cepas ERV se mostravam sensíveis para o tratamento mais recente, através do inibidor de síntese proteica, Linezolida. Quadro este que já vem mudando com a descoberta cada vez mais de cepas resistentes a essa droga (GIRIDHARA UPADHYAYA, RAVIKUMAR e UMAPATHY, 2009; KAINER et al., 2007).

Resistência ao cloranfenicol, eritromicina, níveis elevados de clindamicina, tetraciclina e fluoroquinolonas são também exemplos de resistência adquirida por esses micro-organismos (RATHNAYAKE, HARGREAVES e HUYGENS, 2011).

Cada vez mais a literatura descreve casos de cepas multirresistente as principais formas de tratamento aumentando a taxa de mortalidade em unidades de terapia intensiva, fazendo-se, assim, urgente a descobertas de novas drogas contra essas graves infecções (LOURENÇO et al., 2011).

3.6 Terpenos

Uma grande diversidade estrutural de terpenos pode ser encontrada em bactérias, fungos, algas, plantas (em abundância em óleos essenciais, resinas e ceras látex) e alguns animais (principalmente insetos e organismos marinhos) sendo responsáveis pelo aroma e proteção contra predadores (GONZÁLEZ-BURGOS e GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012).

Os óleos essenciais são substâncias voláteis e perfumadas com uma consistência oleosa, tipicamente biossintetizados pelas plantas. Eles podem ser líquidos à temperatura ambiente, embora alguns deles sejam sólidos ou de consistência resinosa. Os óleos essenciais incluem principalmente dois grupos biossinteticamente relacionados: o principal grupo incluem terpenos e terpenóides e o outro os de componentes aromáticos e alifáticos, todos caracterizados por baixo peso molecular (BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

Estruturalmente os terpenos são derivados de uma molécula de hidrocarboneto simples contendo 5 carbonos, o isopreno (2-metil-1,3-butadieno), e podem apresentar-se como monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), e triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}) e politerpenos (C_{5n}) (ZWENGER e BASU, 2008).

A produção de unidades de isopreno se dá através de duas vias independentes nas plantas. A via do ácido mevalônico, onde a produção ocorre nas bactérias, fungos, mamíferos e no citosol das plantas, neste último ocorrerá a formação de sesquiterpenos e seus derivados e a via do fosfato deoxi xilose/metileritritol (DOXP/MEP) que se dá através do uso do piruvato

e gliceraldeído-3-fosfato, como os precursores iniciais. Esta última é detectada em várias algas verdes, alguns parasitas, algumas bactérias e em plantas superiores, onde, nos plastídeos, os precursores de monoterpenos (C₁₀) e seus derivados são produzidos (CHEN et al., 2011; GONZÁLEZ-BURGOS e GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012).

Após sofrerem alterações em sua estrutura e serem acrescidos de oxigênio, os terpenos podem ser transformados em compostos oxigenados como álcoois, aldeídos, cetonas e epóxidos, passando a serem classificados como terpenóides. Apresentam estruturas cíclicas ou acíclicas que resultam de reações na cadeia nos isoprenóides como reduções, oxidações, ciclizações, quebras do anel ou rearranjo (MENDANHA et al., 2013; SANTOS et al., 2011).

O baixo peso molecular, a natureza lipofílica dos numerosos monoterpenos, combinada com a grande variedade estrutural, representam o seu papel como transportadores de informações químicas (AJIKUMAR et al., 2008).

Terpenos e terpenóides possuem propriedades antioxidantes, anticancerígena, anti-espasmódica, hipotensora e vasorelaxante e também são ativos contra bactérias, fungos, vírus e protozoários (ECHEVERRIGARAY et al., 2008a; GONZÁLEZ-BURGOS e GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012; SANTOS et al., 2011).

A ação antibacteriana dos terpenos não está totalmente elucidada, mas é sugerido que envolva modificações na integridade e funcionamento da membrana citoplasmática resultando em alterações na permeabilidade, extravasamento do material intracelular, inibição da cadeia respiratória, sendo essas ações provavelmente ligadas as suas características lipofílicas (AJIKUMAR et al., 2008; ECHEVERRIGARAY et al., 2008; GREAY; HAMMER, 2011). Em alguns casos agem pela bloqueio na expressão de genes que codificam os fatores de virulência e expressão de proteínas citoplasmáticas e de membrana (DI PASQUA ET AL., 2010; QIU ET AL., 2011).

3.6.1 Citral e Linalol

Citral e Linalol são dois monoterpenos que estão presentes na composição de folhas e frutos de várias espécies de plantas. Citral e Linalol estão presentes principalmente em frutos cítricos (limões, limas, laranjas) e em ervas (manjeriço, coentro e lavanda) (BELLETTI et al., 2010a).

Possuindo um forte aroma cítrico, citral é usado como aromatizante e agente de fragrância em alimentos e cosméticos (RESS et al., 2003).

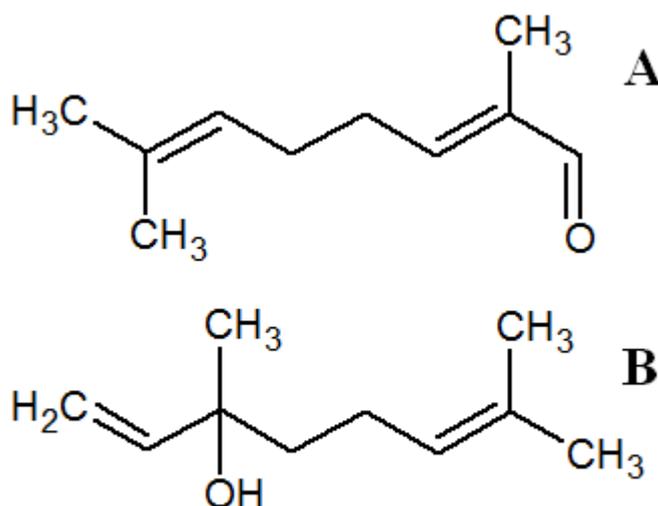
O citral é um aldeído α - acíclico, β -insaturado tem nomenclatura química 2,6-octadienal, 3,7-dimetil e fórmula química $C_{10}H_{16}O$. Corresponde a uma mistura de dois isômeros geométricos, neral (conformação cis) e Geranial (conformação trans). Possui ponto de fusão $< -10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e ponto de ebulição $226\text{-}228\text{ }^{\circ}\text{C}$ e peso molecular de 152.24 g/mol .

Estudos deste produto mostraram que sua toxicidade aguda é baixa em roedores, cujos valores de DL_{50} quando administrados oralmente ou topicamente foram superiores a 1.000 mg/kg . (BELLETTI et al., 2010a; RESS et al., 2003; WOLKEN, HAVE, TEN e WERF, VAN DER, 2000).

Linalol é um monoterpene alcoólico comumente utilizado nas indústrias de alimentos e cosméticos principalmente em perfumes (BELLETTI et al., 2010b; SANTOS et al., 2011).

Possui nomenclatura química 3,7-dimetilocta-1,6-dien-3-ol e fórmula química $C_{10}H_{18}O$. Possui ponto de fusão $< 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e ponto de ebulição entre $198 - 199\text{ }^{\circ}\text{C}$ e peso molecular de 154.24 g/mol .

Figura 1. Estrutura química do Citral (A) e Linalol (B)



Em estudos com óleos essenciais e vapores de monoterpeneos foi observado que o citral e o linalol apresentaram atividade antimicrobiana contra cepas de *S. aureus* como também conseguiram inibir o crescimento de cepas de *Escherichia coli*, contrariando os estudos que demonstram a baixa atividade de monoterpeneos frente a bactérias Gram negativas (FISHER e PHILLIPS, 2006). Citral e Linalol são um dos principais constituintes de óleos essenciais com atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* (FISHER e PHILLIPS, 2009; PANT et

al., 2012). Quanto a atividade do linalol este se mostrou ativo contra bactérias cariogênicas (LIM et al., 2012).

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepas de *Enterococcus faecalis*

Neste trabalho foram utilizados *Enterococcus faecalis* (n=09), mantidos no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos e identificações sob a seguinte numeração: LFBM EF 03, LFBM EF 06, LFBM EF 07, LFBM EF 09, LFBM EF 11, LFBM EF 12, LFBM EF 13, LFBM EF 14, LFBM EF 15. Estas cepas foram isoladas de pacientes hospitalizados de hemocultura e possuem o fenótipo de resistência a diversos agentes antimicrobianos (Tabela 1).

Enterococcus faecalis ATCC 29212 (sensível a vancomicina, ampicilina e altos níveis de aminoglicosídeos) e *Enterococcus faecalis* ATCC 5129 (resistente à vancomicina e aminoglicosídeos) foram incluídas neste estudo como microrganismos padrão

Tabela 1 - Origem e susceptibilidade das cepas *Enterococcus faecalis* multirresistentes utilizados na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

<i>Enterococcus faecalis</i>	Origem	Fenótipo de resistência
LFBM EF 03	Sangue	PEN, IPM, CIP, APS, ERI, VAN
LFBM EF 06	Sangue	PEN, IPM, CIP, APS, ERI, VAN
LFBM EF 07	Sangue	PEN, IPM, CIP, APS, ERI, VAN
LFBM EF 09	Sangue	PEN, IPM, CIP, APS, ERI, VAN, TET
LFBM EF 11	Sangue	PEN, IPM, CIP, APS, ERI, VAN
LFBM EF 12	Sangue	PEN, IPM, CIP, APS, ERI, VAN, TET
LFBM EF 13	Sangue	PEN, IPM, CIP, APS, ERI, VAN
LFBM EF 14	Sangue	PEN, IPM, CIP, APS, ERI, VAN, TET
LFBM EF 15	Sangue	PEN, IPM, CIP, APS, ERI, VAN, TET
ATCC 29212	Sangue	-
ATCC 51299	Sangue	-

Fenótipo de resistência realizado previamente através da técnica de difusão em disco/Agar de Mueller Hinton. LFBM EF: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos *Enterococcus faecalis*. ATCC: American Type Culture Collection. AMP: Ampicilina; CIP: Ciprofloxacina ERI: Eritromicina; GEN: Gentamicina; IPM: Imipenem; VAN: Vancomicina; TET: Tetraciclina

4.2 Cultura, manutenção e padronização do inóculo

As cepas de *E. faecalis* foram mantidas em ágar Mueller-Hinton sob óleo mineral. Para reativação, estas culturas foram transferidas para tubos contendo caldo Mueller-Hinton e incubadas a 35°C por 18 horas. Essas culturas foram diluídas e sua turbidez comparada ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, o que corresponde a 10^8 UFC/mL. A partir desta suspensão foi realizada uma diluição ao décimo de forma a padronizar o inóculo em 10^7 UFC/mL.

4.3 Agentes antimicrobianos e monoterpenos

Os agentes antimicrobianos selecionados para este estudo foram: Ampicilina (Agila), Gentamicina (Hipolabor), Linezolida (Pfizer) e Vancomicina (Antibióticos do Brasil - ABL). Estes foram pesados analiticamente e solubilizados em água, de forma a obter uma solução estoque de concentração 2048 µg/mL.

O critério de resistência foi definido para cada agente antimicrobiano com base no que preconiza o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) 2011: ampicilina (CIM \geq 16µg/mL); vancomicina (CIM \geq 32µg/mL); linezolida (CIM \geq 8µg/mL) e gentamicina (CIM \geq 500 µg/mL) (CLSI, 2011).

O citral cujo grau de pureza é (\geq 96%) e linalool (\geq 97%) (Sigma Aldrich) foram incluídos neste estudo. Após pesagem analítica estes monoterpenos foram solubilizados em um sistema composto por etanol/tween 80/água, de forma a obter uma solução de 4096 µg/mL. Todas as soluções estoque foram esterilizadas por filtração em membrana Milipore® de 0,22µm de porosidade. De acordo com Aligiannis et al., 2001 e Sartorato et al., 2004, uma forte atividade do antimicrobiana é dada para valores de CIM entre 50 - 500µg/mL, atividade moderada MIC entre 600 - 1500 µg/ mL e atividade fraca acima de 1500 µg/mL

Um controle do sistema de solvente, etanol/tween 80/água, foi incluído para assegurar que este sistema não possuiu atividade intrínseca sobre os enterococos avaliados.

4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para determinação da CIM foi utilizado o método de microdiluição em placa de 96 poços preconizado pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2011), com algumas modificações (figura 2).

Diluições seriadas dos agentes antimicrobianos juntamente com uma cepa de *Enterococcus faecalis* foram incubadas em caldo Mueller-Hinton.

Em cada coluna da placa foi inoculado 5,0 µL (contendo 10^4 UFC/poço) de cada uma das cepas de *E. faecalis*. As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas e após este período a revelação dos resultados da CIM foi realizada através do uso Resazurina usada como um indicador visual redox que se apresenta na forma azul na sua forma oxidada e rosa na sua forma reduzida (GALLUCCI et. al., 2009) Em cada poço das placas foram adicionados e 10 µL de uma solução aquosa a 0,01% de resazurina. As placas foram novamente incubadas por quatro horas a 37°C. Após esta última incubação a presença de uma coloração rosa nos poços foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório do agente antimicrobiano. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do agente antimicrobiano expresso em microgramas por mililitro (µg/mL) capaz de impedir o crescimento microbiano, ou seja, o aparecimento da coloração rosa.

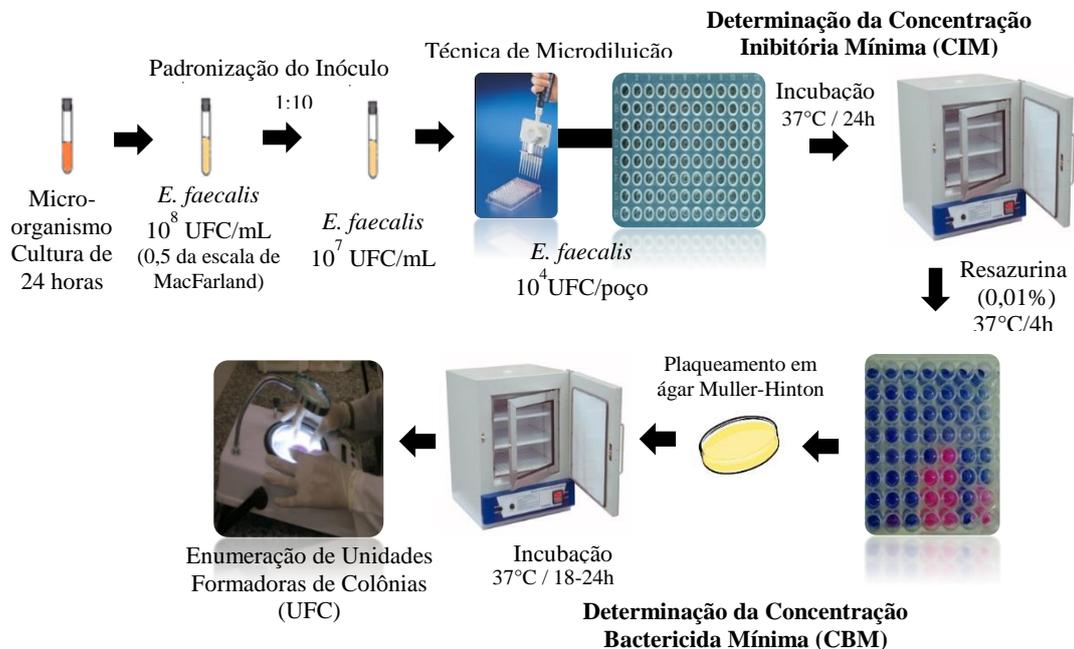
4.5 Determinação da Concentração Bactericida Mínima

A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada, utilizando-se o método proposto por Courvalin et al. (1985).

Após a determinação da CIM, os poços onde não foram visualizados crescimento foram agitados vigorosamente, e em seguida 0,01 mL do cultivo foi semeado em placas de Petri contendo o meio Mueller-Hinton sólido. As placas foram incubadas a 37° C por 18-24 horas. A CBM foi definida como a menor concentração do antibiótico capaz de eliminar 99,9 % da população inicial (figura 2).

O monoterpeno que apresentou maior atividade antienterococica foi selecionado para as próximas avaliações.

Figura 2 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de monoterpêneos e dos agentes antimicrobianos.



4.6 Interação entre citral e agentes antimicrobianos

O método do tabuleiro de xadrez (*checkerboard*) foi utilizado para o estudo da interação entre o citral e os agentes antimicrobianos (KROGSTAD & MOELLERING, 1991).

Através dos valores obtidos da CIM, foram preparadas soluções de agentes antimicrobianos e do citral em caldo Mueller Hinton de forma a obter concentrações subinibitórias que variaram de 0,5 CIM a 0,0004 CIM e de 0,5 CIM a 0,007CIM para agentes antimicrobianos e citral respectivamente. Nos poços da placa de microdiluição, foram depositadas na orientação horizontal 100 μL das soluções dos agentes antimicrobianos e na orientação vertical 100 μL da solução de citral (figura 3). Em cada poço foi inoculado 5 μL da suspensão bacteriana padronizada em uma concentração final de 10^4 UFC/poço.

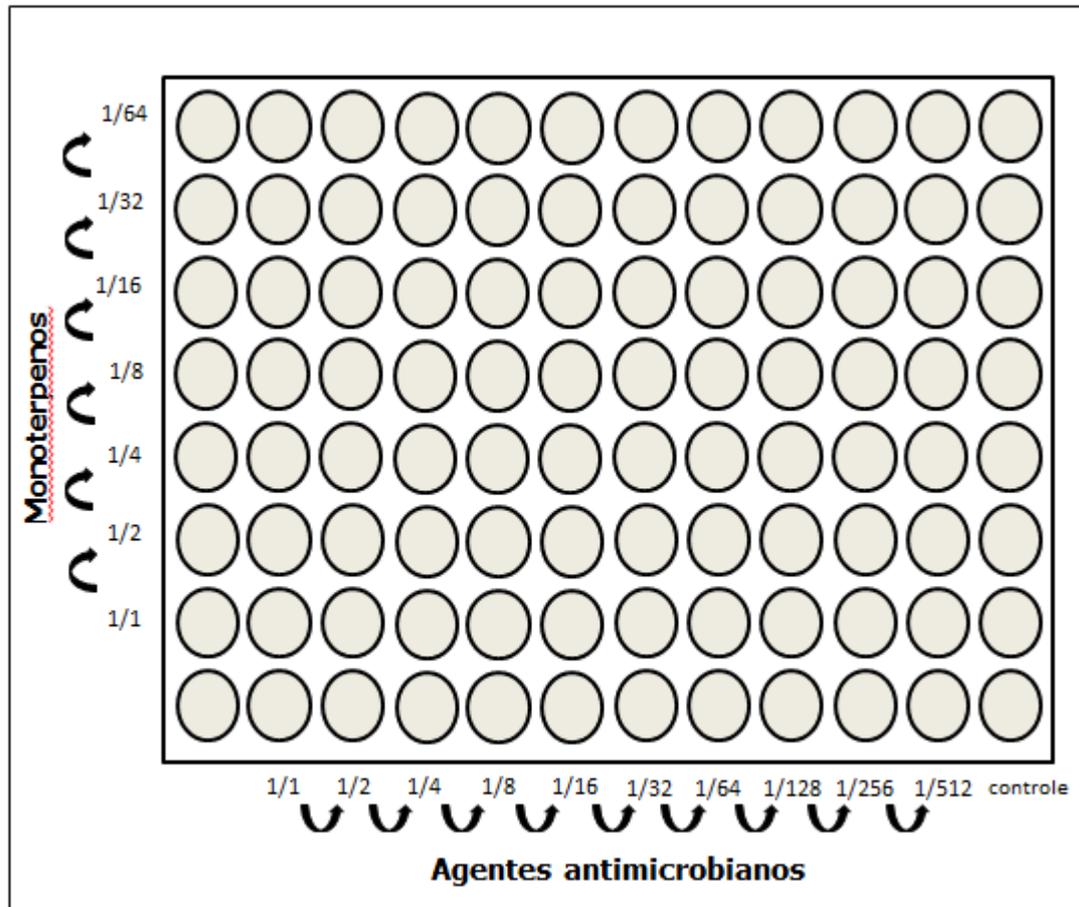
A interação entre os agentes antimicrobianos e o citral foi determinado pelo Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FIC Index) obtido pela seguinte equação: (CIM do agente antimicrobiano associado ao citral/CIM do agente) + (CIM do citral associado ao agente antimicrobiano/CIM do citral).

Valores do FICI $\leq 0,5$ foram interpretados como uma interação sinérgica total; $0,5 < \text{FICI} \leq 0,75$ um sinergismo parcial. Uma interação indiferente quando os valores do FICI foram

entre $0,75 < FICI \leq 2,0$ e um efeito antagônico quando FICI foi maior que 2,0 (FADLI et. al., 2012).

Com os resultados dos FIC_s individuais foram construídos isobogramas (KROGSTAD & MOELLERING, 1986).

Figura 3. Representação gráfica da técnica do tabuleiro de xadrez (*Checkerboard method*).



RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Atividade antimicrobiana do citral, linalol e agentes antimicrobianos

Os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) citral, linalol e dos agentes antimicrobianos frente a dez cepas de *Enterococcus faecalis* estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima de citral, linalol e agentes antimicrobianos frente a cepas de *Enterococcus faecalis* multidroga resistentes.

<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i>	CIM/CBM ($\mu\text{g/mL}$)					
	VAN	AMP	GENT	LNZ	CIT	LIN
LFBM EF 03	256/1024	04/04	32/32	04/08	2048/2048	2048/2048
LFBM EF 06	512/1024	04/04	32/32	02/04	1024/1024	2048/2048
LFBM EF 07	512/2048	256/256	32/32	02/04	1024/1024	1024/1024
LFBM EF 09	256/1024	04/04	16/32	02/04	1024/1024	2048/2048
LFBM EF 11	512/1024	256/256	32/32	02/04	1024/1024	1024/1024
LFBM EF 12	256/1024	04/04	32/32	04/08	1024/1024	2048/2048
LFBM EF 13	512/512	32/32	512/512	04/08	1024/1024	2048/2048
LFBM EF 14	256/1024	04/04	32/32	04/08	1024/1024	2048/2048
LFBM EF 15	256/1024	04/04	32/32	04/08	1024/1024	2048/2048
ATCC 29212	4/8	04/04	64/64	04/08	1024/1024	2048/2048
ATCC 51299	128/256	04/04	512/512	04/08	2048/2018	4096/4096

LFBM EF: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos *Enterococcus faecalis*;

ATCC: American Type Culture Collection;

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima;

AMP: Ampicilina (CIM $\geq 16 \mu\text{g/mL}$); GET: Gentamicina (CIM $\geq 500 \mu\text{g/mL}$); LNZ: Linezolida (CIM $\geq 8 \mu\text{g/mL}$); VAN: Vancomicina (CIM $\geq 32 \mu\text{g/mL}$); CIT: Citral; LIN: Linalol (CLSI, 2011)

Todas as cepas de *E. faecalis* isoladas de hemoculturas apresentaram resistência frente à vancomicina, principal agente terapêutico utilizados em infecções enterocócicas de

origem nosocomial. *E. faecalis* ATCC 29212 mostrou-se sensível a ação deste glicosídeo. Os valores da CIM para a vancomicina variaram de 128 – 512 µg/mL.

De todas as cepas de enterococos avaliadas, três mostraram-se resistentes a ampicilina (LFBM EF 07, LFBM EF11 e LFBM EF 13). Destas, as cepas de *E. faecalis* LFBM EF 07 e LFBM EF 11 apresentaram ser mais resistentes a este β-lactâmico quando comparadas a *E. faecalis* LFBM EF 13.

Todas as cepas mostraram-se sensíveis a gentamicina exceto *E. faecalis* LFBM EF13 e *E. faecalis* ATCC 51299 cujo valores de CIM foram superiores a 500 µg/mL.

Todas as cepas de enterococos avaliadas mostraram-se sensíveis a linezolida, agente antimicrobiano que atua inibindo a síntese proteica.

Citral e linalol mostraram valores de CIM entre 1024 e 2048 µg/mL contra todas as cepas de *E. faecalis* avaliadas. Embora este valores sejam altos eles são iguais a concentração bactericida mínima o que caracteriza estes monoterpênicos como moléculas de caráter bactericida. O citral mostrou uma atividade antimicrobiana superior ao linalol em uma concentração sendo esta escolhida para a segunda parte deste trabalho.

As cepas *E. faecalis* LFBM EF 07, LFBM EF 11, LFBM EF 13 e LFBM ATCC 51299 foram resistentes a maior parte dos agentes antimicrobianos avaliados e foram selecionadas para o estudo da interação entre citral e a vancomicina, citral e ampicilina ou citral e gentamicina.

5.2 Determinação *in vitro* da atividade sinérgica

Os valores da CIM, do índice FIC e da redução dos valores da CIM obtidos para as associações citral/vancomicina, citral/ampicilina e citral/gentamicina sobre LFBM EF 07 e LFBM EF 11, LFBM EF13 e ATCC 51299 estão apresentados na tabela 3

As concentrações sub-inibitórias do citral (≤ 1024 µg/mL) aumentaram a atividade antibacteriana da vancomicina e ampicilina, porém não apresentou nenhuma alteração nos valores da gentamicina.

A combinação de citral e vancomicina apresentaram os menores valores de FICI que variaram de 0,1250-0,25. A atividade sinérgica foi detectada por uma diminuição de até 6 diluições o valor da CIM dos agentes antimicrobianos na combinação e determinado pelo FICI $\leq 0,1563$ na cepa EF 07. A cepa ATCC 51299 apresentou o menor FICI (0,125) resultando em uma diminuição de 5 diluições o valor individual da CIM do citral (2048- 128 µg/mL) e da vancomicina (128 – 8 µg/mL).

Ampicilina quando em combinação com o citral também sofreu igual alteração em sua CIM para as duas cepas testadas. Os valores de FICI para a combinação foram de 0,5 com uma diminuição de três vezes o valor da CIM da individual da ampicilina (256-64 $\mu\text{g/mL}$).

Nenhuma alteração nas CIM individuais foi vista quando realizada a combinação entre Citral e Gentamicina, apresentando valor de FICI= 2 caracterizando um efeito sinérgico indiferente.

Todos os resultados também podem ser vistos nos gráficos de Isobogramas (figuras 4, 5 e 6).

Figura 4. Isoblograma revelando o efeito sinérgico do citral em associação com vancomicina frente à *Enterococcus faecalis* LFBM EF 07(A), *E. faecalis* LFBM EF 11(B), *E. faecalis* LFBM EF13 (C) e *E. faecalis* ATCC 51299 (D).

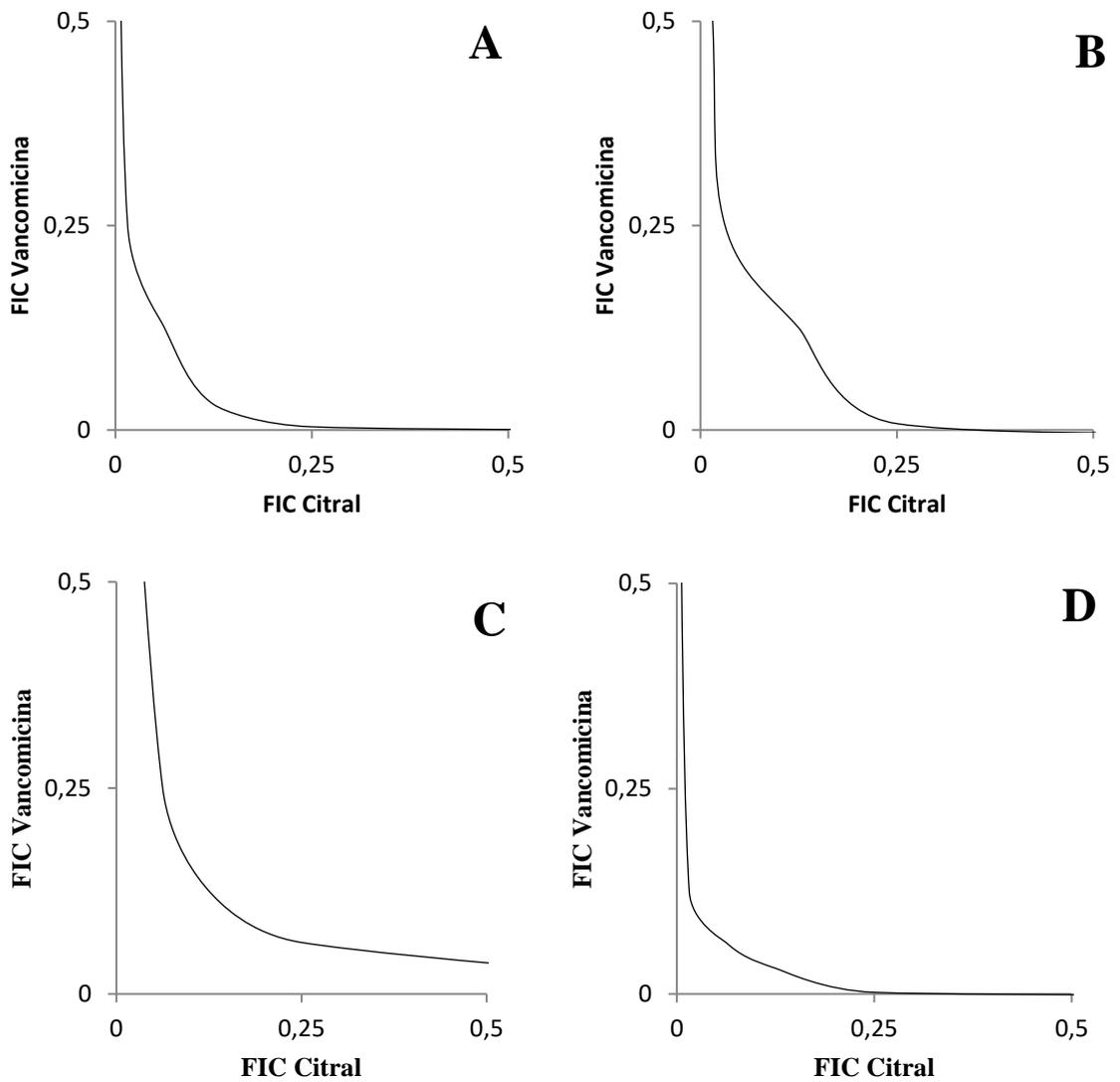


Figura 5. Isoblograma revelando o efeito sinérgico do citral em associação com ampicilina frente à *Enterococcus faecalis* LFBM EF 07(A) e *E. faecalis* LFBM EF 11(B).

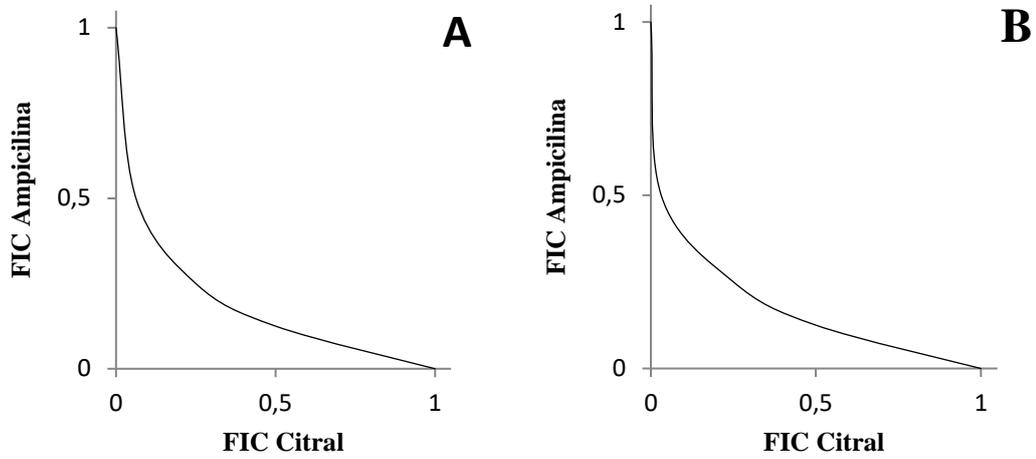


Figura 6. Isoblograma revelando o efeito sinérgico do citral em associação com gentamicina frente à *Enterococcus faecalis* LFBM EF 13(A) e *E. faecalis* ATCC 51299 (B).

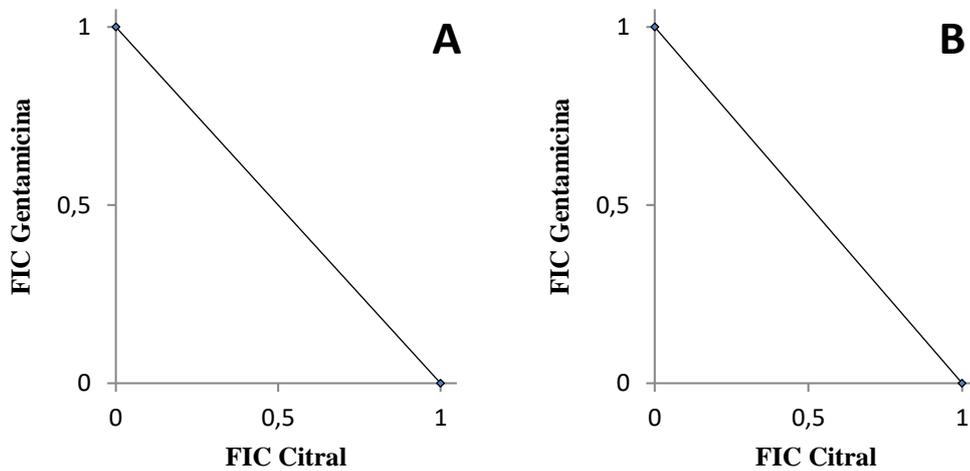


Tabela 3. Associação do citral com ampicilina, gentamicina ou vancomicina frente à cepas LFBM EF 07, LFBM EF 11, LFBM EF 13 e ATCC 51299 de *Enterococcus faecalis* multirresistentes.

<i>Enterococcus faecalis</i>	Associação	CIM individual (µg/mL)	CIM da associação (µg/mL)	FIC Individual	FIC index (FICI)	Interpretação	% redução CIM
LFBM EF 07	CIT + VAN	1024/512	128/16	0,1250/0,0313	0,1563	Sinergismo total	87,5000/96,8750
	CIT + AMP	1024/256	256/64	0,2500/0,2500	0,5000	Sinergismo total	75,0000/75,0000
	CIT + GEN	-	-	-	-	-	-
LFBM EF 11	CIT + VAN	1024/512	128/64	0,1250/0,1250	0,2500	Sinergismo total	87,5000/87,5000
	CIT + AMP	1024/256	256/64	0,2500/0,2500	0,5000	Sinergismo total	75,0000/75,0000
	CIT + GEN	-	-	-	-	-	-
LFBM EF 13	CIT + VAN	1024/512	128/64	0,1250/0,1250	0,2500	Sinergismo total	87,5000/87,5000
	CIT + AMP	-	-	-	-	-	-
	CIT + GEN	1024/512	1024/512	1/1	2	Indiferente	0/0
ATCC 51299	CIT + VAN	2048/128	128/8	0,0625/0,0625	0,1250	Sinergismo total	93,7500/93,7500
	CIT + AMP	-	-	-	-	-	-
	CIT + GEN	2048/512	2048/512	1/1	2	Indiferente	0/0

CIM: Concentração Inibitória Mínima; FIC: Concentração Inibitória Fracionada; FICI: Índice da Concentração Inibitória Fracionada;

AMP: Ampicilina; GEN: Gentamicina; VAN: Vancomicina; CIT: Citral

% redução CIM: (CIM individual – CIM combinação) x 100 / CIM individual

LFBM EF: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos *Enterococcus faecalis*

ATCC: American Type Culture Collection

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Enterococcus faecalis estão entre as maiores causas de infecções hospitalares no mundo. Podem atuar como patógenos oportunistas em pacientes com o sistema imunológico comprometido. A partir deste quadro podem causar sérias complicações como septicemias, endocardites, meningites.

Essas bactérias são naturalmente resistentes a grande número de agentes antimicrobianos e por serem reservatório de genes de resistência, comprometem a sobrevivência de pacientes hospitalizados. A principal forma de tratamento clínico é feito através da utilização de glicopeptídeos, em especial, a vancomicina. Em casos mais graves, são utilizadas as combinação sinérgica de agentes antimicrobianos que atuam na parede celular (glicopeptídeos e beta-lactâmicos) com os inibidores da síntese proteica, os aminoglicosídeos (geralmente, gentamicina) (ARIAS et al., 2007; GIRIDHARA UPADHYAYA, RAVIKUMAR e UMAPATHY, 2009; WOODFORD e LIVERMORE, 2009).

O fato acima descrito é um desafio para os clínicos na terapia as infecções causadas por cepas resistentes a estas classes de medicamentos. Diante disso há necessidade da pesquisa e desenvolvimento de novas moléculas e/ou novas associações terapêuticas eficazes que auxiliem ao combate dessas infecções cujo tratamento é limitado a poucos agentes antimicrobianos (PALANIAPPAN e HOLLEY, 2010).

Terpenos estão presentes na constituição de plantas, principalmente na composição de óleos essenciais. O alto potencial antimicrobiano dos óleos essenciais é dado principalmente pela sua vasta composição em terpenos (FADLI et. al., 2012). A ação dos constituintes individuais dos óleos essenciais, em especial dos terpenos, tem sido amplamente estudada (BELLETTI et al., 2010). De uma forma geral, os terpenos são baratos, estáveis quimicamente, abundantes em vários produtos naturais e considerados seguros para a utilização terapêutica. (ECHEVERRIGARAY et al., 2008a).

Os monoterpênos são caracterizados por possuírem cadeias curtas de carbonos (C₁₀) e a determinação de sua atividade antimicrobiana foram objeto do presente trabalho. Neste estudo foi avaliado o potencial antimicrobiano de citral e linalol contra cepas de *Enterococcus faecalis* (VRE) e suas interações com aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, glicopeptídeos.

Nossos resultados corroboram com os relatados da literatura podemos considerar que citral (1024 µg/mL) tem uma atividade moderada enquanto linalol (2048 µg/mL) possui uma fraca atividade frente à cepas de *E. faecalis* multidroga resistentes segundo a classificação de com Aligiannis et al., 2001 e Sartorato et al., 2004. Resultado que confirma a demonstração da

atividade desses dois monoterpenos sobre *E. faecalis* em testes de disco difusão (FISHER e PHILLIPS, 2009). Estudos sobre a interação dessas moléculas frente à VRE são inexistentes.

Citral e Linalol já demonstraram atividade antibacteriana frente à *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (ONAWUNMI et al., 1984). Stevens, em 1970 também demonstrou que Citral inibiu o crescimento de *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, porém não houve nenhuma inibição de crescimento quando seus dois isômeros funcionais, neral e geranial, foram usados isoladamente, provando mais uma vez que existe uma interação entre essas moléculas para provar seu potencial antimicrobiano. Vapor de Citral e Linalol também demonstram efeito inibidor no crescimento de cepas de *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus* (FISHER e PHILLIPS, 2006).

A maioria dos metabólitos secundários de plantas tem atividade antimicrobiana fraca. Apesar desta observação, eles são capazes de combater infecções causadas por fungos e bactérias. Assim, parece que as plantas adotam mecanismos sinérgicos entre seus compostos bioativos (WAGNER et al., 2009).

Estudos *in vitro* têm mostrado que os componentes de óleos essenciais, tais como o carvacrol, timol, eugenol, cinamaldeído e ácido cinâmico pode ter um efeito sinérgico contra bactérias quando usado em combinação com antibióticos.

Zanini et al. em recente estudo (2014), demonstraram a atividade sinérgica do citral em combinação com agentes antimicrobianos frente à *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua*.

As interações dos terpenos e agentes antimicrobianos foram avaliadas contra uma variedade de microorganismos resistentes. Estes estudos não são exclusivos para os extratos, uma vez que as combinações eficazes entre um único composto ou óleos essenciais e antimicrobianos convencionais têm sido publicados recentemente (DUARTE et al., 2012, FADLI et al., 2012, ZANINI et al., 2014).

Citral potencializou a atividade antibiótica da vancomicina reduzindo em até seis diluições a sua concentração inibitória mínima. Para a ampicilina, sua atividade também foi potencializada, sendo sua CIM reduzida em 3 diluições.

Para as duas cepas que apresentaram resistência a gentamicina, a combinação com o citral não demonstrou nenhuma diminuição na atividade antimicrobiana de ambos os agentes, tendo sido obtido valor de FICI= 2, caracterizando-se como um efeito de atividade indiferente para esta combinação, sugerindo-se assim que seu mecanismo de ação não esteja ligado ao mesmo sítio da gentamicina na inibição da síntese de proteínas nos enterococos

Terpenóides com grupos funcionais como fenóis, álcoois e aldeídos mesmo que em pequenas concentrações são capazes de interferir com a integridade da membrana ou se

associarem com proteínas enzimáticas (KNOBLOCH et al., 1988). Em geral, a atividade antimicrobiana de um composto aumenta com a presença de um átomo de oxigênio contendo um grupo funcional, indicando uma relação entre estrutura e atividade biológica (ECHEVERRIGARAY et al., 2008a). A atividade antimicrobiana da maioria dos terpenóides está ligada aos seus grupos funcionais, e demonstrou-se que o grupo hidroxila de terpenóides fenólicos e a presença de elétrons deslocalizados são importantes para a atividade antimicrobiana (HYLDGAARD et al., 2012). Eles combinam-se com os grupos carregados das membranas bacterianas, aumentando assim sua permeabilidade (FADLI et al., 2012).

Citral e linalol mostraram que seu mecanismo de ação é dado pelo rompimento da parede de celular em *E. faecalis* e *E. faecium* (FISHER e PHILLIPS, 2009). Somolinos et al. (2010) viu que citral causa lesões subletais nos envelopes celulares de *Escherichia coli* e para o uso em preservação de alimentos se aconselha o uso e combinação com outros métodos antimicrobianos para aumentar sua atividade bactericida, como calor, campo elétrico pulsado e alta pressão hidrostática.

Pelo fato do citral ter demonstrado atividade moderada quando utilizado isoladamente e ter demonstrado um grande efeito sinérgico apenas com agentes antimicrobianos que interferem na estrutura da parede celular, vancomicina e ampicilina, sugere-se que sua atividade antimicrobiana esta ligada ao aumento da permeabilidade da parede celular para essas substâncias.

O efeito sinérgico entre produtos naturais e agentes antimicrobianos é uma área de pesquisa fitomédica com uma perspectiva para o desenvolvimento de novas drogas. Devido ao aumento de prevalência de microrganismos resistentes a múltiplas drogas, testes de sinergismo usando várias combinações de fitoquímicos com agentes antimicrobianos pode ser uma ferramenta poderosa para ajudar a selecionar um tratamento antimicrobiano mais eficaz e menos tóxico (HEMAISWARYA et al., 2008, WAGNER et al ., 2009).

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Os monoterpenos citral e linalol demonstram moderada atividade antimicrobiana frente a cepas multirresistentes de *E. faecalis*, tendo, porém o citral demonstrado maior atividade.

Combinações de Citral com o glicopeptídeo Vancomicina em suas respectivas CIM e concentrações sub-inibidoras para quatro micro-organismos de *E. faecalis* multiresistentes apresentaram atividades sinérgicas assim como para a combinação de Citral e Ampicilina para duas cepas multirresistentes. Não foi demonstrado nenhum perfil sinérgico para a associação de citral e gentamicina.

Os resultados demonstram que o citral combinado com antimicrobianos que atuam na parede celular, como vancomicina e ampicilina agem sinergicamente inibindo cepas de *E. faecalis* multirresistentes.

Estudos devem ser realizados *in vivo*, para estabelecer previamente seu uso clínico.

REFERÊNCIAS

- AIEMSAARD, J. et al. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. **Research in veterinary science**, v. 91, n. 3, p. e31–7. 2011.
- AJIKUMAR, P. K. et al. reviews Terpenoids : Opportunities for Biosynthesis of Natural Product Drugs Using Engineered Microorganisms. **Molecular pharmaceutics** v. 5, n. 2, p. 167–190, 2008.
- AL-ABBAS, M. J. A. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* and a novel Planomicrobium isolate of bacterimia. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 19–27, 2012.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 40:4168-4170, 2001.
- AN, J.; ZUO, G.Y.; HAO, X.Y.; WANG, G.C.; LI, Z.S. Antibacterial and synergy of a flavononol rhamnoside with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine**, v. 18, p. 990–993, 2011.
- ARIAS, C. A.; SINGH, K.V.; PANESSO, D.; MURRAY, B. E. Time-kill and synergism studies of ceftobiprole against *Enterococcus faecalis*, including *beta*-lactamase-producing and vancomycin-resistant isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 2043–7, 2007.
- ARIAS, C. a e MURRAY, B. E. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nature reviews. Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 266–78, 2012.
- BARNES, A. M. T.; BALLERING, K. S.; LEIBMAN, R. S; WELLS, C. L.; DUNNY, G. M. *Enterococcus faecalis* Produces Abundant Extracellular Structures Containing DNA in the Absence of Cell Lysis during Early Biofilm. **mBio**, v. 3, 2012.
- BATISTÃO, D. W. D. F. GONTIJO-FILHO, P. P.; CONCEIÇÃO, N.; OLIVEIRA, A.G.; RIBAS, R. M. Risk factors for vancomycin-resistant enterococci colonisation in critically ill patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 1, p. 57–63, 2012.
- BELLETTI, N.; KAMDEM, S. S.; TABANELLI, G.; LANCIOTTI, R. G.; GARDINI, F. Modeling of combined effects of citral, linalool and beta-pinene used against *Saccharomyces cerevisiae* in citrus-based beverages subjected to a mild heat treatment. **International journal of food microbiology**, v. 136, n. 3, p. 283–9, 2010.
- BØHLE, L. A.; RIAZ, T.; EGGE-JACOBSEN, W.; SKAUGEN, M.; BUSK, Ø. L.; EIJSINK, V. G. H.; MATHIESEN, G. Identification of surface proteins in *Enterococcus faecalis* V583. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 135, 2011.
- CASADEVALL, A. e PIROFSKI, L.A. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. **Journal of water and health**, v. 7 Suppl 1, p. S2–S18, 2009.

CASTELO, C.; ARTIAGA, B.; SADOYAMA, G.; DANIEL, J.; VIEIRA, G.; PIMENTA, F. C. Associated antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. clinical isolates. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 3, p. 344–348, 2011.

CHEN, F.; THOLL, D.; BOHLMANN, J.; PICHERSKY, E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. **The Plant journal**, v. 66, n. 1, p. 212–29. 2011.

CHO, Y.S.; OHB, J.J.; OHA, K.H. Synergistic anti-bacterial and proteomic effects of epigallocatechin gallate on clinical isolates of imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Phytomedicine** v. 18, p. 941–946. 2011.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100-S20.

COURVALIN, P.; GOLDSTEIN, F.; PHILIPPON, A.; SIROT, J. M. L'antibiogramme, Ed. MPC – Videom, Paris, France. 1985.

D'ARRIGO, M. GINESTRA, G.; MANDALARI, G.; FURNERI, P. M.; BISIGNANO, G. Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and Melaleuca alternifolia (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 317–22, 2010.

DI PASQUA, R. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, v.10, n.5, p. 1040-9, 2010.

DUARTE, A.; FERREIRA, S.; SILVA, F.; DOMINGUES, F. Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. **Phytomedicine** v. 19, p. 236–238, 2012.

DUNNY, G.; LEONARD, B.; HEDBERG, P. Pheromone-Inducible Conjugation in *Enterococcus faecalis*: Interbacterial and Host-Parasite Chemical Communication. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 4, p. 871–876, 1995.

ECHEVERRIGARAY, S. MICHELIM, L.; DELAMARE, A. P. L.; ANDRADE, C. P.; COSTA, S. O. P.; ZACARIA, J. The effect of monoterpenes on swarming differentiation and haemolysin activity in *Proteus mirabilis*. **Molecules**, v. 13, n. 12, p. 3107–16. 2008.

FADLI, M.; SAAD, A.; SAYADI, S.; CHEVALIER, J.; MEZRIOUI, N.; PAGÈS, J.; HASSANI, L. Phytomedicine Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. **Phytomedicine**, v. 19, n. 5, p. 464–471. 2012.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 3, p. 156–164. 2008.

FISHER, K. e PHILLIPS, C. The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **Journal of applied microbiology**, v. 106, n. 4, p. 1343–9. 2009.

FISHER, K. e PHILLIPS, C. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus in vitro* and in food systems. **Journal of applied microbiology**, v. 101, n. 6, p. 1232–40. 2006.

FRENCH, G. L. Enterococci and vancomycin resistance. **Clinical infectious diseases**, v. 27 Suppl 1, p. S75–83. 1998.

FURTADO, I. Detecção por Reação em Cadeia da Polimerase de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* em Sangue de Recém-Nascidos. 2011.

GALLUCCI, M. N.; OLIVA, M.; CASERO, C.; DAMBOLENA, J.; LUNA, A.; ZYGADLOB, J.; DEMOA, M. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 24, p. 348–354. 2009.

GEISS-LIEBISCH, S.; ROOIJAKKERS, S. H. M.; BECZALA, A.; SANCHEZ-CARBALLO, P.; KRUSZYNSKA, K.; REPP, C.; SAKINC, T.; VINOGRADOV, E.; HOLST, O.; HUEBNER, J.; THEILACKER, C. Secondary cell wall polymers of *Enterococcus faecalis* are critical for resistance to complement activation via mannose-binding lectin. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 45, p. 37769–77. 2012.

GIRIDHARA UPADHYAYA, P. M.; RAVIKUMAR, K. L.; UMAPATHY, B. L. Review of virulence factors of enterococcus: an emerging nosocomial pathogen. **Indian journal of medical microbiology**, v. 27, n. 4, p. 301–5. 2009.

GONZÁLEZ-BURGOS, E.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M. P. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 31, p. 5319–41, 2012.

GREAY, S. J. e HAMMER, K. a. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, doi:10.1007/s11101-011-9212-6. 2011.

HANIN, A.; SAVA, I.; BAO, Y.; HUEBNER, J.; HARTKE, A.; AUFRAY, Y. Screening of in vivo activated genes in *Enterococcus faecalis* during insect and mouse infections and growth in urine. **PloS one**, v. 5, n. 7, p. e11879. 2010.

HARE, F. INTERACTION OF TERPENES AND OXYGENATED TERPENES WITH SOME DRUGS. 2012.

HEGSTAD, K.; HEGSTAD, K.; MIKALSEN, T.; COQUE, T. M.; WERNER, G.; SUNDSFJORD, A. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **Clinical microbiology and infection**, v. 16, n. 6, p. 541–54. 2010.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytochemistry**, v. 15, p. 639–652, 2008.

HENDRY, E. R.; WORTHINGTON, T.; CONWAY, B. R.; LAMBERT, P. A. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1219–25. 2009.

HENRI, I.; BASSOLÉ, N.; JULIANI, H. R.; Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. **Molecules**, v. 17, p. 3989–4006. 2012.

HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *enterococcus*. **Virulence**, v. 3, n. 5, p. 421–33. 2012.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.; DEBABOV, D. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1–24. 2012.

JAMET, E. AKARY, E.; POISSON, M.; CHAMBA, J.; BERTRAND, X.; SERROR, P. Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. **Food microbiology**, v. 31, n. 2, p. 191–8, 2012.

JARZEMBOWSKI, T.; JO, A.; WIS, K. Flow Cytometry Approach Study of *Enterococcus faecalis* Vancomycin Resistance by Detection of Vancomycin @ FL Binding to the Bacterial Cells. **Current Microbiology**, v. 61, p. 407–410, 2010.

JOHANSSON, D.; RASMUSSEN, M. Virulence factors in isolates of *Enterococcus faecalis* from infective endocarditis and from the normal flora. **Microbial pathogenesis**, v. 55, p. 28–31. 2013.

KAINER, M.; DEVASIA, R. A.; JONES, T. F.; SIMMONS, B. P.; MELTON, K.; CHOW, S.; BROYLES, J.; MOORE, K. L.; CRAIG, A. S.; SCHAFFNER, W. Response to emerging infection leading to outbreak of linezolid-resistant enterococci. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 7, p. 1024–30, 2007.

KROGSTAD, D. J.; MOELLERING, R. C. Antimicrobial Combinations. In: Lorian, V. Antibiotics in Laboratory Medicine. Baltimore, 2ed. Editora Williams & Wilkins. p. 537-595, 1986.

LECLERCQ, R.; DERLOT, E; WEBER, M; DUVAL, J; COURVALIN, P. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 33, n. 1, p. 10–5, 1989.

LIM, J.-H.; KIM, M.; HWANG, Y.; SONG, I.; KIM, T.; YUN, H. Effect of orange oil on the oral absorption of enrofloxacin in rats. **Experimental animals**, v. 61, n. 1, p. 71–5, 2012.

LINDENSTRAUSS, A. G.; BEHR, J.; EHRMANN, M. A.; HALLER, D.; VOGEL, R. F. Identification of fitness determinants in *Enterococcus faecalis* by differential proteomics. **Archives of microbiology**, v. 195, n. 2, p. 121–30, 2013.

LOURENÇO, A. L.; ABREU, P. A; LEAL, B.; SILVA JÚNIOR, E. N.; PINTO, A.V.; PINTO, M. C. F. R.; SOUZA, A. M. T.; NOVAIS, J. S.; PAIVA, M. B.; CABRAL, L. M.; RODRIGUES, C. R.; FERREIRA, V. F.; CASTRO, H. C. Identification of nor- β -lapachone

derivatives as potential antibacterial compounds against *Enterococcus faecalis* clinical strain. **Current microbiology**, v. 62, n. 2, p. 684–9, 2011.

MAISNIER-PATIN, S.; FORNI, E.; RICHARD, J. Purification, partial characterisation and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. **International journal of food microbiology**, v. 30, n. 3, p. 255–70, 1996.

MENDANHA, S.; MOURA, S. S.; ANJOS, J. L. V.; VALADARES, M. C.; ALONSO, A. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. **Toxicology in vitro**, v. 27, n. 1, p. 323–9, 2013.

MURRAY, B. E. The life and times of the Enterococcus. **Clinical microbiology reviews**, v. 3, n. 1, p. 46–65, 1990.

MUTHAIYAN, A. BISWAS, D.; CRANDALL, P. G.; WILKINSON, B. J.; RICKE, S. C. Application of orange essential oil as an antistaphylococcal agent in a dressing model. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, p. 125, doi:10.1186/1472-6882-12-125, 2012.

ONAWUNMI, G.; YISAK, W.; OGUNLANA, E. Antibacterial Constituents in the essential Oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 12, p. 279–286, 1984.

PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, R. A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 140, n. 2-3, p. 164–8, 2010.

PALMER, K. L.; DANIEL, A.; HARDY, C.; SILVERMAN, J.; GILMORE, M. S. Genetic basis for daptomycin resistance in enterococci. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3345–56, 2011.

PANT, C. C.; MELKANI, A.B.; MOHAN, L.; DEV, V. Composition and antibacterial activity of essential oil from *Scutellaria grossa* Wall ex Benth. **Natural Product Research**, v. 26, n. 2, p. 190-2. 2012.

PEPPOLONI, S.; POSTERARO, B.; COLOMBARI, B.; MANCA, L.; HARTKE, A.; GIARD, J.; SANGUINETTI, M.; FADDA, G.; BLASI, E. Role of the (Mn)superoxide dismutase of *Enterococcus faecalis* in the in vitro interaction with microglia. **Microbiology**, v. 157, n. Pt 6, p. 1816–22, 2011.

QUAH, S. Y.; WU, S.; LUI, J. N.; SUM, C. P.; TAN, K. S. N-acetylcysteine inhibits growth and eradicates biofilm of *Enterococcus faecalis*. **Journal of endodontics**, v. 38, n. 1, p. 81–5, 2012.

RABBANI, S. I.; DEVI, K.; ZAHRA, N. Anti-Clastogenic Effects of Citral. **Iranian journal of pharmacology & therapeutics** v. 4, n. 1, p. 28–31, 2005.

RATHNAYAKE, I.; HARGREAVES, M. e HUYGENS, F. SN P diversity of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a South East Queensland waterway, Australia, and associated antibiotic resistance gene profiles. **BMC microbiology**, v. 11, p. 201, 2011.

REFFUVEILLE, F.; LENEVEU, C.; CHEVALIER, S.; AUFRAY, Y.; RINCÉ, A. Lipoproteins of *Enterococcus faecalis*: bioinformatic identification, expression analysis and relation to virulence. **Microbiology**, v. 157, n. Pt 11, p. 3001–13, 2011.

REFFUVEILLE, F.; SERROR, P.; CHEVALIER, S.; BUDIN-VERNEUIL, A.; LADJOUZI, R.; BERNAY, B.; AUFRAY, Y.; RINCÉ, A. The prolipoprotein diacylglyceryl transferase (Lgt) of *Enterococcus faecalis* contributes to virulence. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 3, p. 816–25, 2012.

RESS, N. B.; HAILEY, J. R.; MARONPOT, R. R.; BUCHER, J. R.; TRAVLOS, G. S.; HASEMAN, J. K.; ORZECH, D. P.; JOHNSON, J. D.; HEJTMANCIK, M. R. Toxicology and carcinogenesis studies of microencapsulated citral in rats and mice. **Toxicological sciences**, v. 71, n. 2, p. 198–206, 2003.

RIGOTTIER-GOIS, L.; ALBERTI, A.; HOUEL, A.; TALY, J.; PALCY, P.; MANSON, J.; PINTO, D.; MATOS, R. C.; CARRILERO, L.; MONTERO, N.; TARIQ, M.; KARSSENS, H.; REPP, C.; KROPEC, A.; BUDIN-VERNEUIL, A.; BENACHOUR, A.; SAUVAGEOT, N.; BIZZINI, A.; GILMORE, M. S.; BESSIÈRES, P.; KOK, J.; HUEBNER, J.; LOPES, F.; GONZALEZ-ZORN, B.; HARTKE, A.; SERROR, P. Large-scale screening of a targeted *Enterococcus faecalis* mutant library identifies envelope fitness factors. **PloS one**, v. 6, n. 12, 2011.

QIU, J.; ZHANG, X.; LUO, M.; LI, H.; DONG, J.; WANG, J.; LENG, B.; WANG, X.; FENG, H.; REN, W.; DENG, X. Subinhibitory concentrations of perilla oil affect the expression of secreted virulence factor genes in *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**, v.6, n.1, 2011.

SARTORATTO A; MACHADO, ALM; DELARMELENA, C. ET AL. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35: p.275-280, 2004

SANTOS, M. R. V.; MOREIRA, F. V.; FRAGA, B. P.; SOUZA, D. P.; BONJARDIM, L. R.;QUINTANS-JUNIOR, L. J. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 764–771, 2011.

SHERMAN, J. M. The Streptococci. **Bacteriological reviews**, v. 1, n. 1, p. 3–97, 1937.

SOKOVIĆ, M.; GLAMOČLIJA, J.; MARIN, P. D.; BRKIĆ, D.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. **Molecules**, v. 15, n. 11, p. 7532–46, 2010.

SOMOLINOS, M.; GARCÍA, D.; CONDÓN, S.; MACKAY, B.; PAGÁN, R. Inactivation of *Escherichia coli* by citral. **Journal of applied microbiology**, v. 108, n. 6, p. 1928–39, 2010.

SUN, H.; WANG, H.; XU, Y.; JONES, R.N.; COSTELLO, A. J.; LIU, Y.; LI, G.; CHEN, M.; MENDES, R. E. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. clinical

isolates recovered from hospitalized patients among several medical institutions in China. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 74, n. 4, p. 399–403, 2012.

THEILACKER, C.; HOLST, O.; LINDNER, B.; HUEBNER, J.; KACZYŃSKI, Z. The structure of the wall teichoic acid isolated from *Enterococcus faecalis* strain 12030. **Carbohydrate research**, v. 354, p. 106–9, 2012.

THURLOW, L. R.; THOMAS, V. C.; NARAYANAN, S.; OLSON, S.; FLEMING, S. D.; HANCOCK, L. E. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. **Infection and immunity**, v. 78, n. 11, p. 4936–43, 2010.

TIAN, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, K.; SONG, Z.; WANG, R.; HUANG, S.; LIN, H. Effect of *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid on apoptosis in human osteoblast-like cells. **Journal of endodontics**, v. 39, n. 5, p. 632–7, 2013.

TITZE-DE-ALMEIDA, R.; ROLLO FILHO, M.; NOGUEIRA, C. A.; RODRIGUES, I. P.; EUDES FILHO, J.; NASCIMENTO, R. S.; FERREIRA, R. F.; MORAES, L. M. P.; BOELEN, H.; VAN BELKUM, A.; FELIPE, M. S. S. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of Enterococci recovered from Brazilian intensive care units. **The Brazilian journal of infectious diseases**, v. 8, n. 3, p. 197–205, 2004.

TREMBLAY, C. L.; ARCHAMBAULT, M. Interference in Pheromone-Responsive Conjugation of a High-Level Bacitracin Resistant *Enterococcus faecalis* Plasmid of Poultry Origin. **International journal of environmental research and public health**, v. 10, n. 9, p. 4245–60, 2013.

TYNE, D. VAN; MARTIN, M. J.; GILMORE, M. S. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. **Toxins**, v. 5, n. 5, p. 895–911, 2013.

VUUREN, S. F. V.; VILJOEN, A. M. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1, 8-cineole alone and in combination. **Flavour and Fragrance Journal**, p. 540–544, 2007.

WAGNER, H., ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v.16, p. 97–110, 2009.

WOLKEN, W. A.; HAVE, R. T.; WERF, M. J. V. D. Amino acid-catalyzed conversion of citral: cis-trans isomerization and its conversion into 6-methyl-5-hepten-2-one and acetaldehyde. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5401–5, 2000.

WOODFORD, N.; LIVERMORE, D. M. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. **The Journal of infection**, v. 59 Suppl 1, p. S4–16, 2009.

ZANINI, S. F.; SILVA-ANGULO, A. B.; ROSENTHAL, A; RODRIGO, D; MARTÍNEZ, A. Effect of citral and carvacrol on the susceptibility of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* to antibiotics. **Letters in applied microbiology**, 2014.

ZWENGER, S.; BASU, C. Plant terpenoids : applications and future potentials. v. 3, n. p. 1–7, 2008.